

醋甘遂不同提取部位对癌性腹水大鼠泻水逐饮功效比较研究

曹亮亮, 王文晓, 张丽*, 丁安伟, 窦志华, 王宇华

南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心,
江苏 南京 210023

摘要: **目的** 考察醋甘遂不同提取部位对癌性腹水模型大鼠泻水逐饮功效的影响。**方法** 以 Walker-256 细胞株制备癌性腹水大鼠模型, 分组 ig 给予醋甘遂粉末、醋甘遂醇提物、醋甘遂水提物和醋甘遂醇提加水提物 340 mg/kg (生药量), 连续 7 d; 给药后测定大鼠尿量、腹水量, 试剂盒检测尿液中钠、钾、氯离子浓度, 检测尿液 pH 值, 测定血清中肾素 (PRA)、血管紧张素 II (Ang II) 及醛固酮 (ALD) 水平。运用 UPLC-QTOF MS 联用技术, 初步分析醋甘遂各提取部位的成分差异。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠尿量显著减少 ($P < 0.05$); 腹水, 尿液中钠、钾、氯离子水平, 尿液 pH 值, 血清 PRA、Ang II、ALD 水平均显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠腹水均有减少的趋势; 阳性药 (呋塞米) 组及醋甘遂粉末、醇提加水提组大鼠尿量显著增多 ($P < 0.05$); 醋甘遂水提组大鼠尿钠离子显著降低 ($P < 0.05$); 呋塞米组及醋甘遂粉末、醇提物、醇提加水提物组大鼠尿液中钠、钾、氯离子水平及尿液 pH 值, 血清 PRA、Ang II、ALD 水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。醋甘遂醇提物及醇提加水提物中均检测到二萜类成分, 醋甘遂水提物中二萜类成分较少。**结论** 醋甘遂粉末与醋甘遂醇提加水提物对癌性腹水模型大鼠泻水逐饮作用较为显著, 且二者无显著性差异, 而醋甘遂水提物作用较弱, 为醋甘遂临床应用多入丸散提供依据。醋甘遂二萜类成分可能是其泻水逐饮活性成分。

关键词: 醋甘遂; 泻水逐饮; 癌性腹水; 肾素; 血管紧张素 II; 醛固酮

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)17-2593-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.17.015

Comparative effects of different extracts of *Kansui Radix* stir-baked with vinegar on function of expelling water retention with drastic purgative in cancerous ascites model rats

CAO Liang-liang, WANG Wen-xiao, ZHANG Li, DING An-wei, DOU Zhi-hua, WANG Yu-hua

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, and National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To study the effects of different extracts of *Kansui Radix* stir-baked with vinegar (KRV) on the function of expelling water retention with drastic purgative in cancerous ascites model rats. **Methods** The cancerous ascites model rats were respectively ig administered with KRV powder, ethanol extract, aqueous extract, and ethanol and aqueous extract of KRV (340 mg/kg) for 7 d. The amounts of urine and ascites, the levels of urinary sodium, potassium, chloride ion, and pH value, and the contents of PRA, Ang II, and ALD in serum were investigated. UPLC-QTOF MS technology was used to explore the components differences in various extracts of KRV. **Results** Compared with the control group, the amount of urine in model group was significantly reduced ($P < 0.05$), the ascites generated, and the urinary sodium, potassium, chloride ion, pH value, and the contents of PRA, Ang II, and ALD in serum were all significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model groups, the treatment groups showed decreasing trend in ascites; The amounts of urine in positive groups, powder groups, ethanol and aqueous extract groups showed a significant increase ($P < 0.05$); The level of urinary sodium of water extraction groups showed significant decrease ($P < 0.05$); The levels of urinary sodium, potassium, chloride ion, pH value, and the contents of PRA, Ang II, and ALD in serum of positive groups, powder groups, ethanol

收稿日期: 2015-01-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973940, 81373972); 江苏省“六大人才高峰”项目 (2010-YY-009); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2014)

作者简介: 曹亮亮 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制与质量控制研究。Tel: 13912974196 E-mail: caoliangliang320@163.com

*通信作者 张丽, 博士生导师, 教授, 从事中药炮制与质量控制研究。Tel: (025)85811509 E-mail: zhangliguanxiong@163.com

extract groups, and ethanol and aqueous extract groups all showed a significant decrease ($P < 0.05, 0.01$). Diterpenes were inspected in the alcohol extract and alcohol and aqueous extract, fewer in the aqueous extract. **Conclusion** Powder groups and ethanol and aqueous extract groups of KRV have remarkable effect on expelling water retention with drastic purgative, and there is no significant difference between the two groups, which could provide the basis for clinical medication of KRV that is made into the pill and powder. Diterpenes in KRV may be the active components on the function of expelling water retention with drastic purgative.

Key words: *Kansui Radix* stir-baked with vinegar; expelling water retention with drastic purgative; cancerous ascites; PRA; Ang II; ALD

甘遂 *Kansui Radix* 为大戟科 (Euphorbiaceae)

植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根^[1], 性寒、味苦, 有毒, 归肺、肾、大肠经; 具有泻水逐饮、消肿散结之效; 临床多用于治疗水肿、腹水、留饮结胸、大小便不通等症。研究表明, 甘遂有强烈的皮肤刺激性和严重的肝脏、胃肠道毒性以及促炎、诱发肿瘤等毒性^[2]。醋制可降低其毒性, 且临床上内服多为醋制。甘遂中医临床炮制后多入丸散用^[1], 如《太平圣惠方》“甘遂散”“甘遂圆”, 《圣济总录》“甘遂饼”“比圣饼子”等。《梦溪笔谈》记载: “汤、散、丸, 各有所宜…无毒者宜汤, 小毒者宜散, 大毒者须用丸”。甘遂入丸散可缓和毒性, 减少不良反应, 为临床安全用药提供保障。有研究表明, 醋甘遂主要化学成分是二萜、三萜及甾体类化合物^[3-4], 且其泻下作用有效成分主要集中在石油醚和二萜部位^[5], 提示醋甘遂泻水逐饮活性成分可能不易溶于水。故本实验以癌性腹水模型大鼠为研究对象, 考察醋甘遂不同提取部位的泻水逐饮功效差异, 揭示其临床用药多入丸散的合理性, 并通过 UPLC-QTOF-MS 分析手段比较不同提取部位的成分差异, 为探究其泻水逐饮活性成分提供参考。

1 材料

1.1 仪器及试剂

TDZ4-WS 台式低速离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); 全自动酶标仪 (美国 Bio-Red 公司); Waters I Class 超高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); Waters Q-TOF MicroTM Mass 四级杆飞行时间质谱 (美国沃特世公司)。羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 上海久亿化学试剂有限公司); 水合氯醛 (Kermel); 氯化钠 (NaCl, 国药集团化学试剂有限公司); 钠离子、钾离子、氯离子、肾素 (PRA)、血管紧张素 (Ang II)、醛固酮 (ALD) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。乙腈为色谱纯 (TEDIA), 超纯水自制, 甲酸为色谱纯 (ACS)。呋塞米片 (天津力生制药股份有限公司, 批号 1101002), 称取适量呋塞米片, 加 0.5% CMC-Na 制成 0.84 mg/mL 的药液。

1.2 药材

生甘遂药材购自陕西宝鸡县赤沙乡, 经南京中医药大学唐于平教授鉴定为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠 56 只, SPF 级, 体质量 (230 ± 20) g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK (浙) 2014-0001。

2 方法

2.1 药材的醋制及不同提取部位的制备

2.1.1 醋甘遂的制备 将生甘遂依照《中国药典》2010 年版 (一部) 醋炙法 (附录 II D) 加醋拌匀 (每 100 千克甘遂用醋 30 kg), 闷透, 待醋被吸尽后, 将炒锅加热到 260 °C 左右, 不断翻炒, 9 min 后至颜色加深, 略有焦斑出锅, 放凉。打粉备用。

2.1.2 醋甘遂粉末制备 称取醋甘遂粗粉适量 (过 4 号筛), 加 0.5% CMC-Na 制成质量浓度为 34 mg/mL 的药液 (以下均按生药量计算, 对应剂量约为临床使用剂量的 4 倍)。

2.1.3 醋甘遂醇提物的制备 称取醋甘遂粗粉适量, 加 10 倍量 95%乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 趁热滤过, 合并滤液并浓缩至浸膏 (得率为 8.6%)。临用前加 0.5% CMC-Na 溶解并稀释至 34 mg/mL。

2.1.4 醋甘遂水提物的制备 取“2.1.3”项醇提后的残渣适量, 加 10 倍量水加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 趁热滤过, 合并滤液并浓缩至浸膏 (得率为 20.1%)。临用前加 0.5% CMC-Na 溶解并稀释至 34 mg/mL。

2.1.5 醋甘遂醇提加水提物的制备 称取醋甘遂粗粉适量, 加 10 倍量 95%乙醇加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 趁热滤过, 残渣加 10 倍量的水加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 趁热滤过, 合并 4 次滤液并浓缩至浸膏 (得率为 39.9%)。临用前加 0.5% CMC-Na 溶解并稀释至 34 mg/mL。

2.1.6 定性分析用供试品溶液的制备 分别称取醋甘遂醇提物浸膏 86 mg、水提物浸膏 201 mg、醇提加水提物 399 mg (均相当于生药量 1 g), 置于

10 mL 量瓶中, 加甲醇超声 (500 W, 50 Hz) 使溶解后加甲醇至刻度, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2 分组

将 SD 大鼠置于室温、通风的清洁级动物室中, 自由摄食饮水, 适应 3 d 后, 仿 Aston 利尿筛选法^[6]筛选符合标准的大鼠, 进入正式实验。大鼠按体质量随机分为 7 组, 每组 8 只, 分别为对照组、模型组、阳性药 (呋塞米片) 组、醋甘遂粉末组、醋甘遂醇提物组、醋甘遂水提物组、醋甘遂醇提加水提物组。

2.3 模型复制

Walker-256 大鼠腹水癌细胞株 (乳腺癌细胞) 购自上海拜力生物科技有限公司。将冻存的 Walker-256 细胞株 37 $^{\circ}\text{C}$ 复苏呈液态, 1 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用生理盐水悬浮至含细胞个数约 $1.2 \times 10^8/\text{mL}$, 每只大鼠注射 1 mL 细胞悬液, 进行传代, 6 d 后将传代后的腹水抽出进行细胞计数, 用生理盐水稀释至细胞浓度 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 再给其余大鼠 ip 细胞悬液, 每只注射 1 mL, 复制癌性腹水模型。造模次日开始给药。

2.4 给药

对照组、模型组 ig 给予 0.5% CMC-Na, 其余各组均 ig 给予相应药液, 呋塞米片剂量为 8.4 mg/kg, 醋甘遂各提取部位剂量均为 340 mg/kg (以生药计), 给药体积 10 mL/kg, 每日 1 次, 连续 7 d。

2.5 一般情况观察

给药后观察大鼠精神状态, 行为活动, 饮食情况, 二便情况, 皮肤毛色, 死亡情况, 记录死亡时间。

2.6 尿液及血清相关指标检测

2.6.1 大鼠尿量, 腹水量, 尿中钠、钾、氯离子浓度及尿 pH 值测定 第 4 天给药后, 将各组大鼠置于代谢笼中, 禁食不禁水, 收集 24 h 尿液, 测量尿液体积; 按试剂盒方法测定尿液中钠、钾、氯离子浓度及 pH 值。末次给药 1 h 后, 剖腹放尽腹水, 通过计算放腹水前后的大鼠体质量的差值间接测量腹水量。

2.6.2 大鼠血清 PRA、Ang II、ALD 水平的测定 各组大鼠于第 7 天给药 1 h 后, 均用 10% 水合氯醛麻醉, 颈总动脉取血, 静置 30 min 以上, 待血液凝集后, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按试剂盒操作测定 PRA、Ang II、ALD 水平。

2.7 不同提取部位的定性分析

2.7.1 色谱条件 样品分析使用 Waters I Class UPLC 与 Waters Q-TOF MicroTM Mass 联用系统。

Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B); 洗脱过程: 0~8 min, 60% A; 8~17 min, 20% A; 17~21 min, 1% A; 21~22 min, 60% A; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 2 μL 。

2.7.2 质谱条件 电喷雾电离 (ESI) 离子源, V 模式检测, 质量扫描范围 m/z 50~1 500, 毛细管电压分别为 3 kV (正离子模式) 和 2.8 kV (负离子模式), 样品锥电压 30 V; 离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$ 。数据采集控制和分析软件为 Masslynx (V4.1)。

2.8 统计学方法

数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 各组定量检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析, 组间比较采用 LSD 检验; 数据方差不齐, 不满足 t 检验条件时, 采用 Wilcoxon 秩和检验。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察结果

实验过程中无大鼠死亡现象。对照组大鼠精神状态良好, 行动灵活, 毛发光泽, 二便正常。模型组大鼠毛色无光泽, 眼神黯淡, 精神萎靡, 腹部胀大, 严重者嘴唇青紫, 肛周污秽, 甚至尿血。各给药组较模型组大鼠一般情况程度有所减轻。

3.2 对大鼠尿量及腹水量的影响

与对照组比较, 模型组大鼠尿量显著减少 ($P < 0.05$), 并产生腹水。与模型组比较, 各给药组大鼠尿量均有增加的趋势, 其中呋塞米组、醋甘遂粉末组、醋甘遂醇提加水提物组大鼠尿量显著增加 ($P < 0.05$)。各给药组大鼠腹水均有减少趋势, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

3.3 对大鼠尿液中钠、钾、氯离子浓度及尿液 pH 值的影响

与对照组比较, 模型组大鼠尿液中钠、钾、氯离子浓度及尿液 pH 值显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 呋塞米组、醋甘遂粉末组、醋甘遂醇提物组、醋甘遂醇提加水提物组大鼠尿液中钠、钾、氯离子浓度及尿液 pH 值均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 醋甘遂水提物组大鼠尿液中仅钠离子浓度显著降低 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

3.4 对大鼠血清 PRA、Ang II、ALD 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清中 PRA、Ang II、ALD 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 呋塞米组、醋甘遂粉末组、醋甘遂醇提物组、醋甘遂

表 1 醋甘遂不同提取部位对癌性腹水大鼠尿量及腹水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of different extracts from KRV on urine and ascites volumes in cancerous ascites model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	尿量/mL	腹水量/g
对照	—	22.83 ± 6.19	0
模型	—	16.00 ± 4.15*	19.35 ± 5.91
呋塞米	8.4	21.83 ± 3.83 [#]	15.05 ± 4.88
醋甘遂粉末	340	26.31 ± 8.03 [#]	13.33 ± 3.37
醋甘遂醇提物	340	20.86 ± 7.51	14.13 ± 3.68
醋甘遂水提物	340	16.33 ± 5.21	16.21 ± 4.01
醋甘遂醇提加水提物	340	29.38 ± 11.85 [#]	12.33 ± 4.79

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

表 2 醋甘遂不同提取部位对癌性腹水大鼠尿液中钠、钾、氯离子浓度及尿液 pH 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of different extracts from KRV on levels of urinary sodium, potassium, chloride ion, and pH value in cancerous ascites model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	钠离子/(mmol·L ⁻¹)	钾离子/(mmol·L ⁻¹)	氯离子/(mmol·L ⁻¹)	pH 值
对照	—	38.53 ± 7.03	182.05 ± 20.80	58.94 ± 21.47	7.60 ± 0.21
模型	—	72.13 ± 7.56**	287.29 ± 50.20**	175.17 ± 25.46**	9.18 ± 0.10**
呋塞米	8.4	59.13 ± 9.44 [#]	225.13 ± 29.70 [#]	141.14 ± 15.39 [#]	8.91 ± 0.25 [#]
醋甘遂粉末	340	41.39 ± 4.29 ^{##}	198.46 ± 30.46 ^{##}	134.66 ± 31.41 [#]	8.78 ± 0.17 ^{##}
醋甘遂醇提物	340	49.72 ± 9.00 ^{##}	210.76 ± 27.73 ^{##}	144.32 ± 16.88 [#]	8.66 ± 0.42 ^{##}
醋甘遂水提物	340	62.47 ± 3.89 [#]	265.13 ± 50.43	156.28 ± 18.17	8.94 ± 0.44
醋甘遂醇提加水提物	340	44.51 ± 4.74 ^{##}	226.67 ± 25.08 [#]	138.69 ± 14.72 [#]	8.87 ± 0.26 ^{##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下同

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below

表 3 醋甘遂不同提取部位对癌性腹水大鼠血清 PRA、Ang II、ALD 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of different extracts from KRV on contents of PRA, Ang II, and ALD in serum of cancerous ascites model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PRA/(ng·L ⁻¹)	Ang II/(ng·L ⁻¹)	ALD/(ng·L ⁻¹)
对照	—	87.421 ± 12.326	1.574 ± 0.386	39.063 ± 6.401
模型	—	228.855 ± 12.183**	3.413 ± 0.094**	200.982 ± 15.028**
呋塞米	8.4	160.380 ± 10.158 ^{##}	2.011 ± 0.087 ^{##}	71.097 ± 17.983 ^{##}
醋甘遂粉末	340	141.746 ± 10.492 ^{##}	2.285 ± 0.089 ^{##}	52.007 ± 13.484 ^{##}
醋甘遂醇提物	340	141.673 ± 17.128 ^{##}	2.690 ± 0.260 ^{##}	87.482 ± 17.677 ^{##}
醋甘遂水提物	340	220.863 ± 17.178	3.216 ± 0.276	184.189 ± 22.669
醋甘遂醇提加水提物	340	161.782 ± 12.071 ^{##}	2.868 ± 0.098 ^{##}	73.509 ± 20.201 ^{##}

decadienoyl)-20-O-acetylingenol/3-O-(2'E,4'Z-decadienoyl)-20-O-acetylingenol、3-O-(2,3-dimethylbutanoyl)-13-O-dodecanoylingenol/20-O-(2,3-dimethylbutanoyl)-13-O-dodecanoylingenol、

醇提加水提物组大鼠血清 PRA、Ang II、ALD 水平显著降低 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

3.5 醋甘遂不同提取部位的定性分析

醋甘遂醇提物、水提物、醇提加水提物样品在正、负离子模式下的 UPLC-QTOF-MS 总离子流图见图 1 和 2。

根据正、负离子模式的一级质谱的分子离子峰得到化合物的准确相对分子质量,再依据二级质谱碎片峰信息,依据保留时间及相关文献报道^[7-11]对分子离子峰进行归属,结合裂解规律最终推定化合物结构,推测出假白榄烷型二萜类:kansuinin C/kansuinin B、kansuinin A、kansuinin E、kansuinin D;巨大戟烷型二萜类:3-O-(2,3-dimethylbutanoyl)-13-O-dodecanoyl-20-O-acetylingenol、3-O-(2'E,4'E-

3-O-(2'E,4'Z-decadienoyl)-20-deoxyingenol/3-O-(2'E,4'E-decadienoyl)-20-deoxyingenol、5-O-benzoyl-20-deoxyingenol/3-O-benzoyl-20-deoxyingenol。一级质谱信息及二级质谱碎片信息见表 4 和 5。

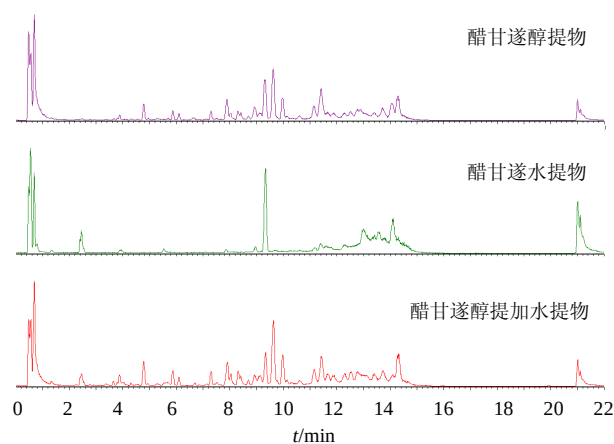


图 1 正离子模式下醋甘遂不同提取部位总离子流图
Fig. 1 TIC of different extracts of KRV in positive ion mode

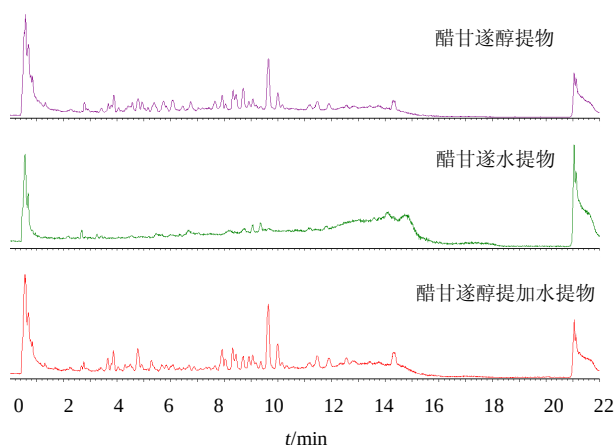


图 2 负离子模式下醋甘遂不同提取部位总离子流图
Fig. 2 TIC of different extracts of KRV in negative ion mode

甘遂二萜类碎片离子以母离子失去一个或多个中性羧酸分子为主^[7]。假白榄烷型二萜类如 kansuinin B/kansuinin C, m/z 722 母离子通过失去一分子苯甲酸或乙酸, 产生 $[M-C_6H_5COOH+Na]^+$ (m/z 623), $[M-C_6H_5COOH-2HOAc+H]^+$ (m/z 479) 等碎片离子。又如化合物 kansuinin A, 母离子同理产生 $[M-HOAc+Na]^+$ (m/z 693), $[M-2HOAc+Na]^+$ (m/z 611), $[M-HOAc-C_6H_5COOH+Na]^+$ (m/z 549) 等碎片离子。巨大戟烷型二萜类如 3-*O*-(2'*E*,4'*E*-decadienoyl)-20-*O*-acetylingenol/3-*O*-(2'*E*,4'*Z*-decadienoyl)-20-*O*-acetylingenol, 失去羧酸分子分别产生 $[M-HOAc]^+$ (m/z 480), $[M-C_9H_{15}COOH]^+$ (m/z 372), $[M-HOAc-C_9H_{15}COOH]^+$

表 4 化合物相对分子质量分析 ($[M+H]^+$)

Table 4 Analysis of relative molecular weight ($[M+H]^+$)

序号	分子式	理论值 (m/z)	测定值 (m/z)	误差/ ($\times 10^{-6}$)
1	$C_{38}H_{42}O_{14}$	723.265 3	723.264 6	-0.97
2	$C_{37}H_{46}O_{15}$	731.291 4	731.293 4	2.70
3	$C_{41}H_{47}NO_{14}$	778.307 4	778.305 3	-2.70
4	$C_{41}H_{47}NO_{15}$	794.302 3	794.300 6	-2.10
5	$C_{40}H_{62}O_9$	687.447 1	687.445 9	-1.80
6	$C_{32}H_{44}O_7$	541.316 5	541.314 8	-3.10
7	$C_{38}H_{60}O_8$	645.436 6	645.435 1	-2.30
8	$C_{30}H_{42}O_5$	483.311 0	483.310 3	-1.45
9	$C_{27}H_{32}O_5$	437.232 8	437.234 4	3.70

表 5 二级质谱数据分析

Table 5 Analysis of mass spectrum data

序号	相对分子 质量	二级碎片(m/z)	化合物
1	723.264 6	624.467 2, 480.168 7	kansuinin B/kansuinin C
2	731.293 4	754.301 3, 694.210 9, 612.478 8	kansuinin A
3	778.305 3	779.534 8, 762.490 2, 438.051 9, 302.010 8	kansuinin E
4	794.300 6	695.416 2, 328.017 9, 310.031 2, 282.011 7	kansuinin D
5	687.445 9	650.339 3, 492.177 6	3- <i>O</i> -(2,3-dimethylbutanoyl)-13- <i>O</i> -dodecanoyl-20- <i>O</i> -acetylingenol
6	541.314 8	481.353 2, 373.018 8, 314.031 7	3- <i>O</i> -(2' <i>E</i> ,4' <i>E</i> -decadienoyl)-20- <i>O</i> -acetylingenol/3- <i>O</i> -(2' <i>E</i> ,4' <i>Z</i> -decadienoyl)-20- <i>O</i> -acetylingenol
7	645.435 1	669.002 3, 529.170 7	3- <i>O</i> -(2,3-dimethylbutanoyl)-13- <i>O</i> -dodecanoylingenol/20- <i>O</i> -(2,3-dimethylbutanoyl)-13- <i>O</i> -dodecanoylingenol
8	483.310 3	426.100 9, 262.002 4	3- <i>O</i> -(2' <i>E</i> ,4' <i>Z</i> -decadienoyl)-20-deoxyingenol/3- <i>O</i> -(2' <i>E</i> ,4' <i>E</i> -decadienoyl)-20-deoxyingenol
9	437.234 4	460.077 3, 338.284 5	5- <i>O</i> -benzoyl-20-deoxyingenol/3- <i>O</i> -benzoyl-20-deoxyingenol

(m/z 313) 等碎片离子。又如化合物 20-*O*-(2,3-dimethylbutanoyl)-13-*O*-dodecanoylingenol/3-*O*-(2,3-dimethylbutanoyl)-13-*O*-dodecanoylingenol 失去十二烷酰基、2,3-二甲基丁酰基侧链, 得到 m/z 528、 m/z 444 等碎片离子。与醋甘遂醇提物及醇提加水提物总离子流图比较, 醋甘遂水提物大部分质谱峰消失或降低。醋甘遂醇提物中检测出化合物 1、3~6、8~9; 醋甘遂醇提加水提物中检测出化合物 1~9, 醋甘遂水提物中只检测出化合物 5、6。

4 讨论

丸散剂是现代中医临床常用剂型, 可有效减少煎煮时药物功效成分的丢失, 缓和药物的毒副作用, 减轻长期服药的痛苦。本实验从药效层面挖掘醋甘遂临床多入丸散的科学根据, 以期为其临床应用提供理论依据。

癌性腹水是晚期恶性肿瘤常见的并发症之一, 癌症患者的腹水一旦出现, 病情进展较快, 预后较差。腹水增加到一定程度时, 腹部膨隆, 大量腹水压迫肾脏, 降低肾脏平衡体液酸碱的能力同时出现少尿症状, 影响体内钠、钾、氯离子交换, 从而导致体液电解质紊乱。此外, 肺、胃肠道及腹腔内静脉、淋巴系统均受压^[12], 出现四肢浮肿现象。肾的球旁细胞感受钠量减少的刺激, 分泌肾素增多, 肾素作用于血管紧张素原, 生成血管紧张素 I (Ang I), Ang I 在血管紧张素转换酶的催化下生成 Ang II, 刺激肾上腺皮质球状带分泌 ALD^[13], 并对 ALD 产生细胞样作用^[14]增加其产生。ALD 的增高, 使肾脏重吸收钠离子增加, 水重吸收增加, 细胞外液容量增多, 尿量排出减少, 水液停留而加重水肿。

本实验中, 各给药组较模型组大鼠有不同程度腹水量减少, 尿量增加的趋势, 各组腹水量减少无显著性差异可能与用药周期较短有关。各给药组大鼠尿液中钠、钾、氯离子水平和尿液 pH 值均较模型组趋于正常, 血清 PRA、Ang II、ALD 水平也有不同程度的降低。提示醋甘遂粉末及各提取部位均具有一定的利尿作用, 且可不同程度抑制腹水产生, 减轻癌性腹水引起的电解质紊乱现象, 平衡体液酸碱, 并对血清肾素-血管紧张素 II-醛固酮系统 (RAAS) 有一定调节作用, 可减少肾脏水分重吸收, 缓解水肿。可见, 醋甘遂粉末及各提取部位对癌性腹水模型大鼠有不同程度泻水逐饮的功效。其中醋甘遂粉

末组和醋甘遂醇提加水提组各指标效果最为显著, 均具统计学意义, 且两组间无显著性差异, 而醋甘遂水提物组效果则不明显, 从一定层面上验证了醋甘遂临床用药多入丸散的合理性。采用液质联用手段分析醋甘遂不同提取部位获得提取物的成分差异, 结果表明醋甘遂醇提及醇提加水提物中均检测到巨大戟烷型及假白榄烷型二萜, 醋甘遂水提物中这 2 类二萜成分较少, 推测醋甘遂泻水逐饮功效可能与其二萜类成分有关。此外, 本研究亦提示醋甘遂泻水逐饮功效的机制可能是通过降低肾内血管渗透压而利尿, 调节体内外液体交换, 缓解水液电解质紊乱及酸碱失衡, 调节 RAAS 减轻水肿来实现的。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 曹雨诞, 张丽, 李媛, 等. 甘遂的毒性成分、炮制方法及炮制减毒机制的研究进展 [J]. 中国药房, 2011, 22(19): 1817-1818.
- [3] 李春发. 醋制甘遂的化学成分研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [4] 赵雪艳, 蔡霞, 胡正海. 甘遂生物学、化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(20): 3029-3033.
- [5] 耿婷, 黄海燕, 丁安伟, 等. 甘遂炮制前后各部位刺激性和泻下作用研究 [J]. 中南药学, 2008, 6(4): 385-388.
- [6] Aston R A. Rat diuretic screening procedure [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1959, 1(3): 277-282.
- [7] 刘悦, 刘志强, 李慧琳, 等. 传统中药甘遂根中二萜类化学成分的电喷雾质谱研究 [J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(9): 1727-1735.
- [8] 王立岩. 甘遂的化学成分及其生物活性的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.
- [9] 邵霞, 林家红, 张丽. 甘遂的化学成分及其活性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3383-3386.
- [10] 吴晓磊, 潘勤. 甘遂化学成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 877-881.
- [11] Peng Q, Li G Y, Ma Y P, et al. Chemical constituents of *Euphorbia kansui* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2012, 8(43): 64-66.
- [12] 金瑞. 肝硬化腹水发病机制与治疗进展 [J]. 中国医刊, 2003, 38(9): 22-24.
- [13] 张林. 腹水的病因和发病机制 [J]. 中华外科杂志, 2003, 8(2): 96-98.
- [14] 柳海艳, 钟赣生, 刘云翔, 等. 接近临床应用剂量下甘遂半夏汤加减甘遂甘草反药组合对腹水大鼠利尿作用的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14): 2726-2731.