补骨脂炮制品水提和醇沉物化学成分及肝毒性研究Δ

李卓柯[1,2*]，刘　洋[2]，李　晔[2]，王春柳[2]，刘　峰[3]，孙婷婷[2#a]，张　红[1,2#b]（1.陕西中医药大学药学院，陕西 咸阳 712046；2.陕西省中医药研究院，西安　710003；3.陕西步长制药有限公司，西安　710075）

中图分类号　R283.1　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）12-1443-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.12.07

摘　要　目的　研究补骨脂不同炮制品水提及醇沉物中5种化学成分的含量变化情况，并初步评价其肝毒性。**方法**　制备补骨脂生品和雷公法、流水漂洗法、盐炙法炮制品的水提样品，以及雷公法、盐炙法炮制品的醇沉样品，采用高效液相色谱法测定其中补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚的含量并进行比较；以不同质量浓度补骨脂生品、流水漂洗法、雷公法、盐炙法水提样品和雷公法、盐炙法醇沉样品作用72 h，计算各样品对野生型斑马鱼的半数致死浓度（LC_{50}）和最大非致死浓度（MNLC）；以对乙酰氨基酚为阳性对照，以上述样品（MNLC）作用72 h，观察野生型斑马鱼的基本形态和转基因斑马鱼的肝脏表型。采用Pearson相关性分析评价成分含量与肝毒性的相关性。**结果**　与生品水提物比较，不同炮制品水提样品中补骨脂苷、异补骨脂苷的含量均显著降低（$P<0.05$），而雷公法、盐炙法醇沉样品中补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚的含量均显著升高（$P<0.05$）。生品、流水漂洗法、雷公法、盐炙法水提样品和雷公法、盐炙法醇沉样品的LC_{50}分别为2.45、5.00、5.38、1.55、2.36、0.64 g/L（以生药量计），MNLC分别为2.21、4.53、5.02、1.37、2.13、0.53 g/L（以生药量计）；与空白对照组比较，各样品处理组斑马鱼幼鱼均表现出不同程度的畸形，肝脏相对荧光强度均显著减弱（$P<0.05$或$P<0.01$）。补骨脂酚、异补骨脂素、补骨脂素等脂溶性成分与肝脏相对荧光强度的相关性较高（$R^2>0.7$）。**结论**　补骨脂炮制品经水提后以补骨脂苷、异补骨脂苷为主，经醇沉后补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚的含量增加；醇沉样品的肝毒性更强，且肝毒性与补骨脂脂溶性成分的含量呈正相关。

关键词　补骨脂；炮制品；水提物；醇沉物；肝毒性；成分含量

Study on chemical compositions and hepatotoxicity of water extract and ethanol precipitate of processed products of *Psoralea corylifolia*

LI Zhuoke[1,2], LIU Yang[2], LI Ye[2], WANG Chunliu[2], LIU Feng[3], SUN Tingting[2], ZHANG Hong[1,2]（1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China; 2. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China; 3. Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an 710075, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the content changes of 5 chemical compositions in water extract and ethanol precipitate of different processed products of *Psoralea corylifolia*, and to preliminarily evaluate its hepatotoxicity. **METHODS** The water extracts from crude product of *P. corylifolia* and processed products by Leigong method, running water rinsing method, and salt stir-frying method were prepared, as well as the ethanol precipitates of processed products by Leigong method and salt stir-frying method were prepared. The contents of psoralenoside, isopsoralenoside, psoralen, isopsoralen and bakuchiol were determined by high-performance liquid chromatography and compared. The median lethal concentration (LC_{50}) and maximum non-lethal concentration (MNLC) of each sample to wild-type zebrafish juveniles were calculated after 72 h of treatment with different concentrations of water extracts from raw product and processed products by running water rinsing method, Leigong method and salt stir-frying method, different concentrations of ethanol precipitates from processed products by Leigong method and salt stir-frying method, and the acetaminophen was used as the positive control. The basic morphology of wild-type zebrafish juveniles and the liver phenotype of transgenic zebrafish juveniles were observed after 72 h of treatment with the above samples (MNLC). Pearson correlation analysis was used to evaluate the correlation between component content and hepatotoxicity. **RESULTS** Compared with the water extract of raw products, the contents of psoralenoside and isopsoralenoside in the water extract of different processed products were generally decreased ($P<0.05$), while the contents of psoralen, isopsoralen and bakuchiol in the ethanol precipitate of Leigong method and salt stir-frying products were significantly increased ($P<0.05$). The LC_{50} of water extracts of crude product and processed products by running water rinsing

Δ**基金项目**　陕西省重点研发计划项目（No.2021ZDLSF04-06，No.2022ZDXM-SF-06，No.2022SF-183）

＊**第一作者**　研究实习员，硕士。研究方向：中药药效物质基础与质量控制。E-mail：yc020630vv@163.com

#a **通信作者**　副研究员，博士。研究方向：中药炮制机制及饮片质量标准。E-mail：sttlt@126.com

#b **通信作者**　研究员，博士。研究方向：中药药效物质基础与质量控制。E-mail：zhanghong919919@163.com

method, Leigong method, salt stir-frying method, and ethanol precipitates of processed products by Leigong method and salt stir-frying method were 2.45, 5.00, 5.38, 1.55, 2.36, 0.64 g/L (calculated by crude drug), and MNLC were 2.21, 4.53, 5.02, 1.37, 2.13, 0.53 g/L (calculated by crude drug). Compared with the blank control group, the zebrafish juveniles in each sample treatment group showed different degrees of deformity, the liver relative fluorescence intensity was significantly weakened ($P<0.05$ or $P<0.01$). Fat-soluble components such as bakuchiol, isopsoralen and psoralen were highly correlated with liver fluorescence intensity ($R^2>0.7$). **CONCLUSIONS** The processed products of *P. corylifolia* mainly compose of psoralenoside and isopsoralenoside after water extraction, the contents of psoralen, isopsoralen and bakuchiol increase after alcohol precipitation, and the hepatotoxicity is positively correlated with the contents of liposoluble compositions in *P. corylifolia*.

KEYWORDS *Psoralea corylifolia*; processed products; water extract; ethanol precipitate; hepatotoxicity; component content

补骨脂为豆科植物补骨脂*Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实，始载于《开宝本草》，有“破故纸”“胡故子”“黑故子”之称。该药性温、味辛，入肾、脾经，具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻的功效，为临床常用中药[1]。近年来，补骨脂及相关制剂的临床不良反应/事件（以肝损伤为主）日益增多，已成为制约其开发及应用的关键，故其用药安全性问题亟待解决[2]。

有关补骨脂毒性及减毒方法的论述可追溯到南北朝时期的《雷公炮炙论》，该书记载“凡使，性本大燥，毒，用酒浸一宿，漉出，却用东流水浸三日夜，却蒸从巳至申出，日干用”[3]。现代研究表明，雷公炮制法（以下简称“雷公法”）中的酒浸步骤可去除部分补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚等脂溶性毒性成分；水浸、隔水蒸等步骤可去除部分补骨脂苷、异补骨脂苷等水溶性成分，并有少量苷类成分被转化，从而使得补骨脂的毒性有所下降[4]。除雷公法外，补骨脂炮制方法还包括盐炙、清炒、酒浸等，临床常以盐炙品入药。研究表明，盐炙后补骨脂的药性得以改变，可用于降逆、补益肝肾，并可通过祛燥而缓和药性[5]。目前，补骨脂致肝毒性的物质基础仍不明确，学界认为香豆素类和单萜酚类成分可能是该药致肝毒性的主要成分，其中补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚具有潜在的肝毒性[6]。本课题组前期研究发现，不同方法制备的补骨脂炮制品中上述潜在肝毒性成分的含量差异显著；同时，含补骨脂处方的不同提取方式（如水提、醇沉等）对上述成分的含量亦有影响[7]。现有研究大多集中在补骨脂炮制前后的化学成分变化及单个成分致肝毒性等方面，而不同炮制品的提取方式（水提、醇沉）对补骨脂中5种潜在致肝毒性成分的影响尚未明确。基于此，本研究以补骨脂为对象，采用高效液相色谱（HPLC）法对其不同炮制品水提和醇沉样品中补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂酚5种化学成分的含量进行测定；采用斑马鱼模型初步评价补骨脂不同炮制品水提和醇沉样品的肝毒性，并进一步分析上述成分与肝毒性的相关性，为补骨脂致肝毒性的物质基础及其炮制减毒研究提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括1260型HPLC仪（美国Agilent公司），SMZ25型荧光立体显微镜（日本Nikon公司），BS210S、BT25S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]等。

1.2 主要药品与试剂

补骨脂药材（批号200501）购自亳州市中药饮片厂，经陕西省中医药研究院张红研究员鉴定为豆科植物补骨脂*P. corylifolia* L.的干燥成熟果实。

补骨脂素对照品（批号110739-201918，纯度99.6%）、异补骨脂素对照品（批号110738-202016，纯度99.4%）均购自中国食品药品检定研究院；补骨脂苷对照品（批号CHB-B-163）、异补骨脂苷对照品（批号CHB-Y-280）、补骨脂酚对照品（批号CHB-B-099）均购自成都克洛玛生物科技有限公司，纯度均不低于98%；瓜渚湖黄酒（酒精度14.5%）购自绍兴柯桥第三酒厂；对乙酰氨基酚对照品（阳性对照，批号SP9520，纯度≥98%）购自北京索莱宝科技有限公司；甲基纤维素（货号M0262）购自美国Sigma公司；甲醇、乙腈均为色谱纯，甲酸、二甲基亚砜（DMSO）等其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

1.3 实验动物

实验中所用到的斑马鱼为受精后3 d（3 days post fertilization，3 dpf）的AB系野生型斑马鱼和Tg（lfabp：mcherry）肝脏荧光转基因斑马鱼。所有斑马鱼均饲养于斑马鱼养殖饲养系统（照明14 h/黑暗10 h交替，水温28 ℃，pH7.5，用NaCl调节电离度至500）中。取健康性成熟的雌雄AB系野生型斑马鱼或Tg肝脏荧光转基因斑马鱼按1∶1比例放入交配盒中，用透明挡板将雌雄斑马鱼分开；次日清晨，除去挡板，斑马鱼交配产卵，于产卵后10 min收集鱼卵，并将鱼卵移入装有胚胎培养水的无菌培养皿中，每天换水，于28 ℃恒温培养箱中培养，备用。所有斑马鱼的饲养管理均符合国际实验室动物评估和认可委员会的认证要求。

2 方法与结果

2.1 补骨脂供试样品的制备

2.1.1 补骨脂生品及不同炮制品的水提样品 按本课题组前期建立的方法制备雷公法、流水漂洗法、盐炙法炮制品[8]。称取补骨脂生品及上述不同炮制品各100 g，加8倍量水，煎煮提取1 h×2次，过滤，合并滤液，冻干，即得补骨脂生品和雷公法、流水漂洗法、盐炙法炮制品的水提样品（每1 g样品分别相当于生药6.226 7、15.479 9、13.966 5、5.452 6 g）。

2.1.2 补骨脂不同炮制品的醇沉样品 称取雷公法、盐炙法炮制品各100 g，加8倍量水，煎煮提取1 h×2次，过滤，合并滤液并浓缩至一定体积，加乙醇至醇体积分数为70%，于4 ℃下静置24 h，过滤，回收溶剂，冻干，即得雷公法和盐炙法炮制品的醇沉样品（每1 g样品分别相当于生药5.494 5、13.054 8 g）。

2.2 补骨脂样品中5种成分的含量测定

采用HPLC法进行测定。

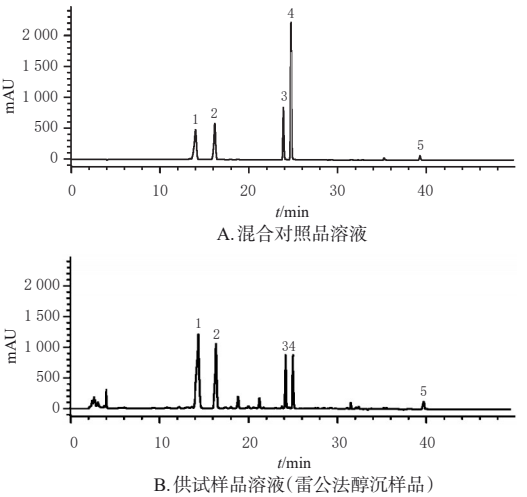
2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚对照品适量，加甲醇溶解并定容，摇匀，得上述成分质量浓度分别为0.582 5、0.502 5、0.240 0、0.567 5、0.330 0 mg/mL的混合对照品溶液，备用。

2.2.2 供试样品溶液的制备 分别精密称取“2.1”项下各样品0.25 g，置锥形瓶中，加甲醇30.0 mL，称定质量，超声（功率600 W，频率40 kHz）40 min，放冷，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，过滤，取续滤液以0.45 μm滤膜过滤，即得各供试样品溶液。

2.2.3 色谱条件 以Kromasil 100-5-C_{18}（4.6 mm×250 mm，2.5 μm）为色谱柱，以甲醇（A）-0.1%甲酸溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0～10 min，30% A→40% A；10～30 min，40% A→90% A；30～50 min，90% A；50～52 min，90% A→30% A；52～60 min，30% A）；柱温为30 ℃；流速为1.0 mL/min；检测波长为246 nm；进样量为10 μL。

2.2.4 专属性考察 取混合对照品溶液、供试样品溶液（雷公法醇沉样品）、阴性对照溶液（甲醇）各适量，按“2.2.3”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果显示，各待测成分色谱峰分离度较好，阴性对照无干扰。具体色谱图如图1所示（阴性对照溶液HPLC图略）。

2.2.5 线性关系与检测限、定量限考察 分别取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.2、2.0、6.0、10.0、20.0、25.0 mL，分别用甲醇稀释至25 mL，混匀，制得系列混合对照品溶液。分别吸取上述溶液10 μL，按“2.2.3”项下色谱条件测定，以对照品进样量为横坐标（X）、峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归，得回归方程（表1）。结果表明，5种成分在各自进样量范围内与峰面积的线性关系均良好（r>0.999）。分别以信噪比3∶1、10∶1计算各成分的检测限、定量限，结果显示，补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚的检测限分别为0.05、0.04、0.02、0.02、0.09 μg/mL，定量限分别为0.16、0.13、0.06、0.05、0.38 μg/mL。



A. 混合对照品溶液

B. 供试样品溶液（雷公法醇沉样品）

1：补骨脂苷；2：异补骨脂苷；3：补骨脂素；4：异补骨脂素；5：补骨脂酚

图1 5种成分含量测定的HPLC图

表1 补骨脂5种成分线性关系考察结果

待测成分	回归方程	r	线性范围/μg
补骨脂苷	Y=4 827.4X−190.42	0.999 8	0.046 6～5.825 0
异补骨脂苷	Y=5 008.6X+71.84	0.999 8	0.040 2～5.025 0
补骨脂素	Y=8 945.4X−48.42	0.999 3	0.019 2～2.400 0
异补骨脂素	Y=7 451.3X+732.95	0.999 7	0.045 4～5.675 0
补骨脂酚	Y=755.5X+0.35	0.999 6	0.026 4～3.300 0

2.2.6 精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件连续进样6次，记录各成分峰面积，计算得补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚峰面积的RSD分别为1.09%、1.36%、1.34%、1.28%、2.05%（n=6），表明仪器精密度良好。

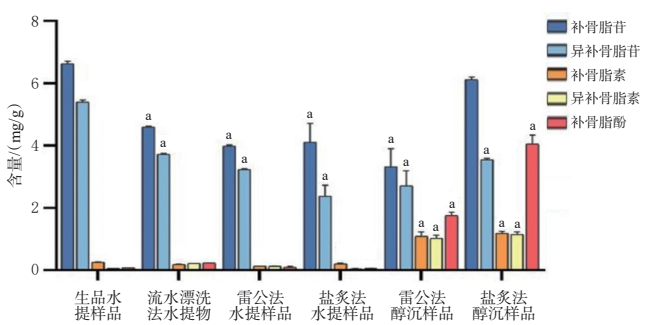
2.2.7 重复性试验 精密称取同一补骨脂供试样品（雷公法醇沉样品）6份，每份0.25 g，按照“2.2.2”项下方法制备供试样品溶液，再按“2.2.3”项下色谱条件进样分析，记录峰面积并代入回归方程计算补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚的含量。结果显示，上述成分含量的RSD分别为0.96%、1.25%、2.11%、2.43%、2.84%（n=6），表明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一补骨脂供试样品溶液（雷公法醇沉样品），按“2.2.3”项下色谱条件，依次于室温下放置0、2、4、8、10、12、24 h时进样10 μL，记录峰面积，计算得补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚峰面积的RSD分别为1.90%、2.63%、2.70%、2.72%、2.77%（n=7），表明样品在室温下放置24 h内稳定。

2.2.9 加样回收率试验 取“2.1”项下补骨脂样品（雷公法醇沉样品）6份，每份约0.125 g，精密称定，分别加入5种对照品各适量。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.3”项下色谱条件进样分析，计算得补骨脂苷、

异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚的平均加样回收率分别为96.45%、98.74%、96.52%、102.26%、100.74%，RSD分别为2.35%、2.49%、1.94%、1.32%、2.14%（n=6），表明该方法准确度较好。

2.2.10　样品测定　精密称取“2.1”项下各样品0.25 g，按“2.2.2”项下方法制备供试样品溶液，再按“2.2.3”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并代入回归方程计算样品中5种成分的含量。每样品平行测定3次，数据以$\bar{x}\pm s$表示，并采用SPSS 25.0软件进行单因素方差分析，检验水准α=0.05。结果见图2。由图2A可知，与生品水提样品比较，不同炮制品水提样品中补骨脂苷、异补骨脂苷的含量均显著降低（P<0.05），而雷公法、盐炙法醇沉样品中补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚的含量均显著升高（P<0.05）。由图2B（以平均含量表示）可知，与生品比较，补骨脂炮制品不同供试样品中的苷类成分含量均有所降低，其中雷公法醇沉样品的苷类含量下降最多（下降49.8%）。由图2可以看出，水提样品以补骨脂苷、异补骨脂苷为主，其中两者总量最高的为生品水提样品（平均12.023 mg/g），最低为盐炙法水提样品（平均6.490 mg/g）；同时，与生品比较，雷公法、盐炙法醇沉样品中这两种苷类成分的总量均有所降低，而脂溶性成分补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚的总量均大幅增加，分别是生品的10.0、16.5倍。



A.柱形图（$\bar{x}\pm s$，n=3）

	补骨脂苷	异补骨脂苷	补骨脂素	异补骨脂素	补骨脂酚	补骨脂苷+异补骨脂苷	补骨脂素+异补骨脂素	补骨脂素+异补骨脂素+补骨脂酚	合计
生品水提样品	6.627	5.396	0.261	0.055	0.072	12.023	0.315	0.388	12.411
流水漂洗法水提样品	4.593	3.718	0.186	0.212	0.231	8.311	0.398	0.629	8.940
雷公法水提样品	3.985	3.229	0.139	0.128	0.095	7.214	0.268	0.362	7.576
盐炙法水提样品	4.113	2.377	0.206	0.036	0.054	6.490	0.241	0.295	6.785
雷公法醇沉样品	3.317	2.714	1.087	1.026	1.755	6.030	2.113	3.868	9.898
盐炙法醇沉样品	6.122	3.544	1.186	1.153	4.052	9.666	2.339	6.391	16.057

最大值　最小值

B.热图[平均含量/(mg/g)]

a：与生品水提物比较，P<0.05

图2　补骨脂不同供试样品中5种成分的含量

2.3　补骨脂样品的肝毒性评价

2.3.1　药液配制　称取“2.1”项下各样品适量，用DMSO溶解后，再用斑马鱼培养液（称取NaCl 0.29 g、KCl 0.012 g、$CaCl_2$ 0.036 g、$MgSO_4$ 0.04 g，用水补足至1 L，高温灭菌后即得）稀释至相应质量浓度，备用。

2.3.2　补骨脂样品的急性毒性实验　选取正常3 dpf野生型斑马鱼幼鱼，随机放置于24孔培养皿中。根据前期预实验结果，设置生品水提组（质量浓度分别为360、380、400、420、430 μg/mL）、流水漂洗法水提组（质量浓度分别为290、300、310、320、340 μg/mL）、雷公法水提组（质量浓度分别为350、360、370、380、400 μg/mL）、盐炙法水提组（质量浓度分别为250、260、270、290、300 μg/mL）、雷公法醇沉组（质量浓度分别为170、180、185、190、200 μg/mL）、盐炙法醇沉组（质量浓度分别为420、435、440、450、460 μg/mL）和空白对照组（等体积水），每组16条。每24 h更换药液，连续给药72 h，记录每组斑马鱼幼鱼的死亡情况并计算死亡率（%）。采用Origin 8.0软件进行相关回归分析[在一定范围内，药液质量浓度（X）与幼鱼死亡数（Y）呈正相关，即得相应回归方程]，并计算半数致死浓度（half lethal concentration，LC_{50}）和最大非致死浓度（maximum non-lethal concentration，MNLC），结果见表2。由表2可见，以生药量计，雷公法、盐炙法水提样品对斑马鱼幼鱼的LC_{50}值分别为其对应醇沉样品的2.28、2.42倍，可见这两种炮制品醇沉样品对斑马鱼幼鱼的毒性大于其对应水提样品；与生品水提样品比较，流水漂洗法水提样品和雷公法水提样品的毒性均有所降低（LC_{50}、MNLC升高），但盐炙法水提样品和醇沉样品的毒性均有所增强（LC_{50}、MNLC降低）。

表2　各药物组的回归方程和LC_{50}、MNLC

组别	回归方程	LC_{50}/(g/L)	MNLC/(g/L)
生品水提组	Y=0.200 3X−70.940 0	2.45	2.21
流水漂洗法水提组	Y=0.262 9X−76.943 0	5.00	4.53
雷公法水提组	Y=0.312 2X−112.320 0	5.38	5.02
盐炙法水提组	Y=0.243 5X−61.000 0	1.55	1.37
雷公法醇沉组	Y=0.469 4X−76.714 0	2.36	2.13
盐炙法醇沉组	Y=0.401 9X−39.084 0	0.64	0.53

2.3.3　补骨脂样品对斑马鱼幼鱼基本形态的影响　选取正常3 dpf野生型斑马鱼幼鱼，以急性毒性实验中各样品的MNLC作为其干预质量浓度，同时设置空白对照组和阳性对照组（对乙酰氨基酚1.2 g/L[9]），每组16条。每24 h更换药液，连续给药72 h，观察各组斑马鱼幼鱼的基本形态。结果显示，连续给药72 h后，与空白对照组比较，阳性对照组斑马鱼幼鱼心包肿大，腹部肿胀，心率降低，脊柱弯曲，畸形严重；补骨脂不同样品处理组斑马鱼幼鱼均表现出不同程度的畸形，如不同程度的心包肿大，雷公法醇沉组和盐炙法醇沉组的斑马鱼幼鱼均表现出不同程度的尾部弯曲，而雷公法水提组斑马鱼幼鱼的畸形相对不明显。结果见图3。

2.3.4　补骨脂样品对斑马鱼幼鱼肝脏表型的影响　选取正常3 dpf的Tg肝脏荧光转基因斑马鱼幼鱼，以急性毒性实验中各样品的MNLC作为其干预质量浓度，同时设置空白对照组和阳性对照组（对乙酰氨基酚1.2 g/L[9]），每组16条。每24 h更换药液，连续给药72 h。随后将斑马鱼幼鱼放入5%甲基纤维素溶液中，使用显微镜进行肝脏表型观察并记录图像，使用Nikon NIS-Elements

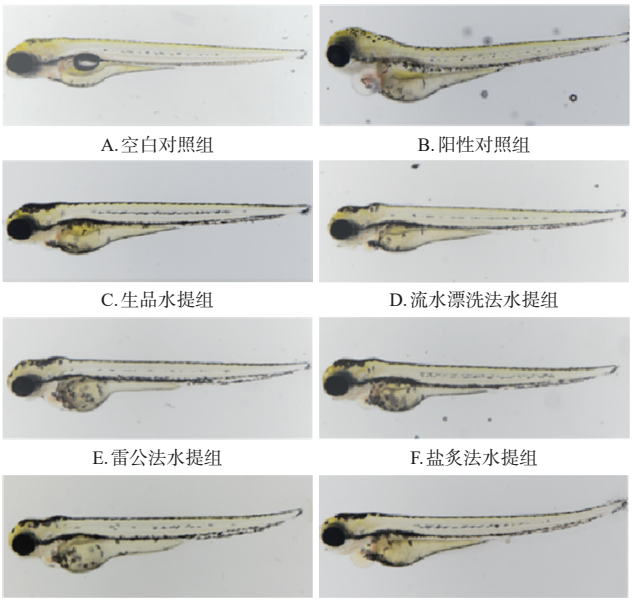


图3　AB系野生型斑马鱼幼鱼经补骨脂不同样品处理72 h后的基本形态（×4）

BR Analysis软件测定每个视野中斑马鱼幼鱼的肝脏相对荧光强度（以空白对照组为参照）以评估其肝损伤程度（两者成反比）。各组数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用Graphpad Prism 8.0软件进行单因素方差分析，检验水准为$\alpha=0.05$，结果见图4、图5。由图4可见，空白对照组斑马鱼幼鱼肝脏形态完整，红色荧光最强；与空白对照组比较，阳性对照组斑马鱼幼鱼的肝脏显著变小，不同补骨脂样品组斑马鱼幼鱼均表现出不同程度的肝脏畸形，其中以雷公法醇沉组、盐炙法醇沉组斑马鱼幼鱼的肝脏畸形较为严重。由图5可见，与空白对照组比较，各干预组斑马鱼幼鱼的肝脏相对荧光强度均显著减弱（$P<0.05$或$P<0.01$），其中雷公法、盐炙法水提组的肝毒性相对较弱，而雷公法、盐炙法醇沉组的肝毒性相对较强。

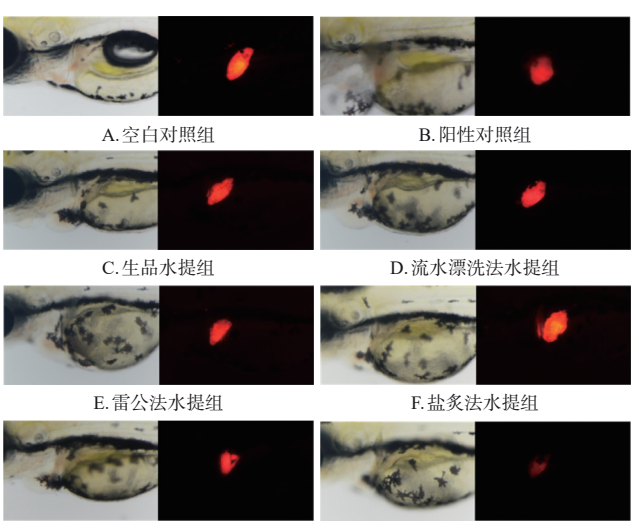
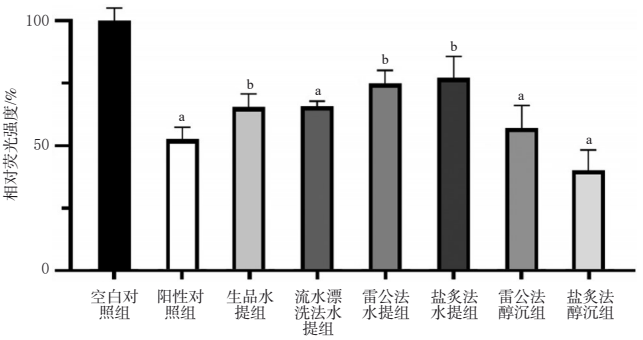


图4　Tg肝脏荧光转基因斑马鱼幼鱼经补骨脂不同样品处理72 h后的肝脏表型（×15）



a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与空白对照组比较，$P<0.05$

图5　Tg肝脏荧光转基因斑马鱼幼鱼经补骨脂不同样品处理72 h后肝脏的相对荧光强度（$\bar{x}\pm s$，$n=16$）

2.4　补骨脂潜在肝毒性成分与肝毒性的相关性分析

使用Graphpad Prism 8.0软件，分别将6种补骨脂样品中水溶性成分（补骨脂苷和异补骨脂苷）含量、脂溶性成分（补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚）含量以及5个成分（补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂酚）含量与“2.3.4”项下斑马鱼幼鱼的肝脏相对荧光强度进行Pearson相关性分析。结果显示，补骨脂中脂溶性成分与斑马鱼幼鱼肝脏相对荧光强度的相关性较高（$R^2=0.885\ 2$），提示脂溶性成分的含量越高，斑马鱼幼鱼的肝脏相对荧光强度越弱，该类成分的肝毒性较强；而水溶性成分与斑马鱼幼鱼肝脏相对荧光强度的相关性较低（$R^2=0.096\ 4$），表明水溶性成分补骨脂苷、异补骨脂苷与肝毒性的相关性有限。补骨脂中5种成分与斑马鱼幼鱼肝脏相对荧光强度的相关性由高到低依次为补骨脂酚（$R^2=0.890\ 9$）、异补骨脂素（$R^2=0.790\ 8$）、补骨脂素（$R^2=0.782\ 9$）、补骨脂苷（$R^2=0.177\ 0$）和异补骨脂苷（$R^2=0.020\ 5$）。

3　讨论

补骨脂为临床常用中药，所含化学成分丰富，以香豆素类、黄酮类、单萜酚类等为主[10]。本课题组前期通过对补骨脂不同炮制品的化学成分进行分析发现，补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚5种成分的含量较高，其峰面积之和超过总峰面积的80%。基于此，本研究采用HPLC法测定了上述5种成分的含量。方法学考察结果显示，本研究所建方法操作简便、准确性高、专属性强。含量测定结果显示，补骨脂苷、异补骨脂苷主要集中于水提样品中，而经醇沉处理后，样品中补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚的溶出大幅增加；同时，与生品比较，各炮制品水提和醇沉样品中，补骨脂苷、异补骨脂苷及其总量均有不同程度降低。

相关研究报道，补骨脂有明确的肝毒性，主要以肝细胞损伤为主，其致肝损伤的成分主要包括补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚等脂溶性成分[11]。本课题组调研发现，在含补骨脂的常用复方制剂中，使用补骨脂生品的占37.8%，涉及醇沉处理（醇沉体积分数45%～75%）

的占29.7%。醇沉处理后，脂溶性成分的溶出增加，进而可能使复方制剂致肝损伤的风险增加，这可能是近年来含补骨脂复方制剂相关肝毒性报道日益增多的主要原因。目前，国内外关于补骨脂肝毒性的研究主要集中在其单个成分（如补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚、补骨脂定等）与肝毒性的相关性[6,12-14]，但补骨脂不同炮制品水提和醇沉处理对成分含量和肝毒性的影响尚缺少系统研究。为此，本研究以斑马鱼幼鱼为对象，初步探讨了补骨脂生品和流水漂洗法、雷公法、盐炙法炮制品水提样品，以及雷公法、盐炙法炮制品醇沉样品的肝毒性，并评价了5种潜在毒性成分与肝毒性的相关性。结果显示，补骨脂水提样品的肝毒性普遍低于醇沉样品；其中，补骨脂苷、异补骨脂苷含量与肝毒性的相关性较低，而补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚含量与肝毒性的相关性较高，推测后3种成分为补骨脂致肝毒性的主要化学成分。

本研究结果表明，炮制加工及提取方式对5种潜在毒性成分的含量和肝毒性有一定影响，补骨脂经雷公法炮制再经水提处理后，肝毒性较生品明显降低，提示减毒效果明显。宋迪等[15]采用酒浸水漂法处理补骨脂后，其肝毒性也明显降低，与本研究结果基本一致。这提示雷公法炮制过程虽复杂，但其具有一定的科学性。盐补骨脂为临床常用炮制品，本研究结果显示，与生品比较，补骨脂盐炙法水提、醇沉样品对斑马鱼幼鱼的急性毒性和发育毒性均强于生品水提样品，对斑马鱼幼鱼心、肝等脏器的综合影响更加明显，可能与盐中所含的Na^+促进了补骨脂中某些成分的吸收，或与某些成分发生了相互作用有关[16]。

近年来，补骨脂的毒性机制已成为研究热点之一。Wang等[17]研究发现，补骨脂中的苷类成分可在肠道菌群的作用下转化为香豆素类成分，从而导致肝损伤性；刘欣欣等[18]发现，（异）补骨脂苷在斑马鱼幼鱼（3 dpf）体内以原型为主，经4～6 dpf体内动态转化为（异）补骨脂素后可致鱼中毒。值得注意的是，目前报道的部分具有肝毒性的成分同时也是补骨脂的有效成分，其“量-效-毒”关系仍是药理毒理研究领域亟待解决的关键问题。

综上所述，补骨脂炮制品经水提后以补骨脂苷和异补骨脂苷为主，醇沉后补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚的含量增加；醇沉样品的肝毒性较强，且肝毒性与补骨脂脂溶性成分的含量呈正相关。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S].2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：195.

[2] 郭兆娟，张晶璇，涂灿，等. 关于中药潜在肝毒性若干问题的思考[J]. 中华中医药杂志，2020，35(11)：5399-5402.

[3] 雷敦. 雷公炮炙论[M]. 合肥：安徽科学技术出版社，1991：69.

[4] 吕彬，谭旺晓，刘潇，等. 补骨脂“雷公炮制法”减毒的科学内涵[J]. 天津中医药，2020，37(9)：976-983.

[5] 夏亚楠，余凌英，王德健，等. 补骨脂盐炙对肾阳虚、脾虚模型动物燥性影响研究[J]. 亚太传统医药，2016，12(4)：5-8.

[6] 李佳妍，刘欣欣，宁青，等. 基于斑马鱼模型的补骨脂毒性相关成分群的高效辨识研究[J]. 中草药，2021，52(1)：129-136.

[7] 陈颖，王茉，宋捷，等. 补骨脂水煎液和醇提物对斑马鱼骨骼发育的影响及其毒性作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2017，31(6)：661-669.

[8] 李卓柯，孙婷婷，刘洋，等. 基于潜在肝毒性成分分析的补骨脂炮制减毒机制[J]. 中药材，2021，44(9)：2085-2088.

[9] 付晓春，沈小莉，俞航萍，等. 雷公藤多苷促进斑马鱼肝细胞凋亡的实验研究[J]. 中国医院药学杂志，2019，39(10)：1032-1038.

[10] 魏蒙蒙，王树瑶，杨维，等. 补骨脂的化学成分及主要毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(7)：207-219.

[11] 王海征，林晓兰，张鹏. 13例补骨脂致肝损害的特点分析[J]. 北京中医药，2018，37(10)：999-1000，1004.

[12] 周昆，王安红，柴丽娟，等. 补骨脂酚对HepG2的细胞毒性及BSEP、NTCP、FXR、CYP7A1的影响[J]. 毒理学杂志，2015，29(3)：193-196.

[13] 王晓艳，李伟霞，张辉，等. 补骨脂及其主要成分对人正常肝细胞L02的损伤作用研究[J]. 中医研究，2020，33(4)：59-63.

[14] YANG L，YU Y L，CHENG L Y，et al. The accumulation of psoralen contributes to its hepatotoxicity revealed by pharmacokinetic and toxicokinetic study after repeated administration[J]. ACS Omega，2020，5(13)：7307-7315.

[15] 宋迪，陈帅帅，李朋彦，等. 补骨脂潜在肝毒性的修制减毒方法研究：酒浸水漂法[J]. 药学学报，2020，55(2)：276-282.

[16] 蔡涛涛，黄娜娜，王亮，等. 补骨脂不同炮制方式对正常小鼠急性毒性实验比较研究[J]. 中国药物警戒，2017，14(12)：730-736.

[17] WANG Y F，LIU Y N，XIONG W，et al. A UPLC-MS/MS method for *in vivo* and *in vitro* pharmacokinetic studies of psoralenoside，isopsoralenoside，psoralen and isopsoralen from *Psoralea corylifolia* extract[J]. J Ethnopharmacol，2014，151(1)：609-617.

[18] 刘欣欣，宁青，王茉，等. 斑马鱼毒性-代谢关联分析法评价补骨脂香豆素及其糖苷成分安全性[J]. 中国药学杂志，2020，55(24)：2000-2005.

（收稿日期：2022-12-13　修回日期：2023-05-08）

（编辑：张元媛）