

不同炮制方法对补骨脂中手性成分含量变化的影响

姚雅琦¹, 陈妍妍^{1#}, 汤露环¹, 张晓曼², 吴梦茹¹, 漆敏^{3*}, 李遇伯^{1*}

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617

2. 天津中医药大学中药制药工程学院, 天津 301617

3. 天津泰普沪亚医药科技有限公司, 天津 300392

摘要: **目的** 考察经不同方法炮制前后补骨脂中补骨脂甲素 (bavachin, BC)、补骨脂二氢黄酮甲醚 (bavachinin, BVC)、补骨脂酚 (bakuchiol, BAK) 3 种手性成分含量变化的差异, 并结合分子对接技术初步明确此 3 种手性成分的对映异构体在毒性机制上的潜在差异。**方法** 采用高效液相色谱-手性固定相 (high performance liquid chromatography-chiral stationary phase, HPLC-CSP) 法, 通过改变流动相的比例, 建立了补骨脂中 3 种手性成分的最佳分离方法, 并比较来源于河南、四川、云南、辽宁 4 个产地的补骨脂经清炒法、盐炙法、酒浸法炮制前后各个对映异构体的含量差异。以前期筛选出的补骨脂致肝毒性作用靶标原癌基因酪氨酸激酶 ABL1 (Abelson tyrosine-protein kinase ABL1, ABL1) 为对接主体, 利用 AutoDock Tools 1.5.7 软件, 对各个对映异构体分别进行分子对接。**结果** 采用 Chiralpak IG 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 在以乙腈-纯水 (50 : 50) 为流动相, 体积流量为 0.5 mL/min, 柱温为 35 °C 的条件下, 实现了补骨脂中各个对映异构体的最佳分离。在 4 个产地的补骨脂生品中, (R)-BC、(S)-BVC、(S)-BAK 为其主要构型, 经清炒法、盐炙法、酒浸法炮制后, (R)-BC 含量降低, (S)-BC 含量升高, (R)-BVC、(S)-BAK 的含量降低率分别高于其 S、R 构型。分子对接结果显示, (R)-BC、(R)-BVC、(S)-BAK 与毒性靶标的结合能力分别强于其对映异构体。**结论** 补骨脂中 3 种手性成分的对映异构体的含量存在显著差异, 经不同方法炮制后其含量变化也呈现明显区别, 表明清炒法、盐炙法、酒浸法均能对补骨脂起到减毒作用。各个对映异构体与毒性靶标的相互作用能力及作用强度存在立体选择性差异。

关键词: 补骨脂; 手性成分; 含量差异; 炮制减毒; 毒性机制; 补骨脂甲素; 补骨脂二氢黄酮甲醚; 补骨脂酚; 分子对接技术; 对映异构体; 清炒; 盐炙; 酒浸; 肝毒性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)15-5104-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.010

Effect of different processing methods on content change of chiral components in *Psoraleae Fructus*

YAO Yaqi¹, CHEN Yanyan¹, TANG Luhuan¹, ZHANG Xiaoman², WU Mengru¹, QI Min³, LI Yubo¹

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. Tipr HUYA Advancing Innovative Medicines Ltd., Tianjin 300392, China

Abstract: **Objective** The content changes of bavachin (BC), bavachinin (BVC), and bakuchiol (BAK) in Buguzhi (*Psoraleae Fructus*, PF) before and after processing with different methods were investigated to preliminarily identify the potential differences in the toxicity mechanism of the enantiomers of these three chiral components combined with molecular docking technology. **Methods** The best separation method of three chiral components in PF was established based on high performance liquid chromatography-chiral stationary phase (HPLC-CSP) method by changing the proportion of mobile phase, and the contents of each enantiomer of PF from

收稿日期: 2024-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204760); 天津市科技局重大专项与工程计划项目 (21ZXJBSY00040)

作者简介: 姚雅琦, 女, 博士, 研究方向为药物分析学。E-mail: yaopharmacy@163.com

#共同第一作者: 陈妍妍, 女, 硕士, 研究方向为中药学。E-mail: cyy2862029638@163.com

*通信作者: 漆敏, 女, 博士, 副研究员, 研究方向为药理学。E-mail: qim@tjpr.com

李遇伯, 女, 博士, 教授, 研究方向为药物分析学、中药学。E-mail: yaowufenxi001@sina.com

Henan, Sichuan, Yunnan and Liaoning were compared before and after the stri-frying, salt-roasting and wine immersion. Abelson tyrosine-protein kinase ABL1 (ABL1), a previously screened target of hepatotoxicity induced by PF, was used as the docking body, and the molecular docking of the three chiral compounds enantiomers was carried out separately by using AutoDock Tools 1.5.7.

Results The optimum separation of each enantiomer in PF was achieved on Chiralpak IG column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-pure water (50:50) as the mobile phase at a flow rate of 0.5 mL/min and column temperature of 35 °C. (*R*)-BC, (*S*)-BVC and (*S*)-BAK were the main configurations of the PF from the four producing areas. After being processed by stri-frying, salt-roasting, and wine immersion, the content of (*R*)-BC was reduced, the content of (*S*)-BC was elevated, and the content reduction rates of (*R*)-BVC and (*S*)-BAK were higher than those of their *S* and *R* conformations, respectively. Molecular docking results showed that (*R*)-BC, (*R*)-BVC and (*S*)-BAK had stronger binding ability to toxic targets than their enantiomers, respectively. **Conclusion** There were significant differences in the contents of enantiomers of the three chiral components in PF, and the changes of the contents were also obvious after different processing methods, which indicated that stri-frying, salt-roasting and wine immersion methods could reduce the toxicity of PF. There were stereoselective differences in the interaction ability and intensity of each enantiomer with the toxic target.

Key words: *Psoraleae Fructus*; chiral compounds; content difference; detoxification through preparation; mechanisms of toxicity; bavachin; bavachinin; bakuchiol; molecular docking technology; enantiomers; stri-frying; salt-roasting; wine immersion; hepatotoxicity

补骨脂为豆科补骨脂属植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* Linn. 的干燥成熟果实^[1], 是临床上常用的中药之一, 具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻的功效^[1]。首载于《雷公炮炙论》: “性本大燥, 毒”, 说明其具有一定的毒副作用, 不宜久服^[2]。据报道, 在服用补骨脂及其相关制剂后, 胆红素显著升高并出现急性肝损伤^[3]。Gao 等^[4]对盐制补骨脂乙醇提取物中的 107 个化合物进行分析, 发现其可能作用于核苷酸结合和寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) /凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) /胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1 (cysteine-containing aspartate-specific proteases-1, Caspase-1) /消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 信号通路引起肝损伤。

中药减毒增效的方式主要有炮制和配伍。在临床上补骨脂炮制后入药, 古代本草及医学典籍中记载的补骨脂炮制方法较多, 包括盐制、酒制、醋制、炒制、童便制等^[5]。《中国药典》2020 年版收载的补骨脂炮制方法为盐炙法, 其他现代常见的炮制方法有雷公法、清炒法、酒浸炒、盐蒸等^[6]。目前, 已有研究建立了补骨脂中成分的含量测定方法。王娟等^[7]通过建立补骨脂药材的 UPLC 指纹图谱, 对其中 12 种成分进行了含量测定, 陈李东等^[8]以补骨脂素、异补骨脂素和补骨脂酚为测定指标, 用 HPLC 法测定比较了补骨脂生品和各种炮制品中的含量变化, 以筛选最佳炮制方法。然尚未有研究关注补骨脂中的手性成分, 并建立对其同时进行分离的分析方法。手性分子具有一对互为镜像又不能够完全重合的对

映异构体, 其在结构上的差别很小, 但在与酶、受体或其他手性分子相互作用时会产生立体选择性, 发生不同的生物响应, 从而导致对映异构体在药理学、毒理学和药动学等方面的表现不一致^[9-10]。例如, *R*-构型的沙利度胺具有镇静作用, 而 *S*-构型的沙利度胺具有强烈的致畸作用^[11]; Christodoulou 等^[12]在用 H460 细胞进行的体外抗增殖试验中, 发现 *S*-(+)-吴茱萸碱的效力约是其对映体的 5 倍。已有研究表明, 补骨脂甲素 (bavachin, BC)、补骨脂二氢黄酮甲醚 (bavachinin, BVC)、补骨脂酚 (bakuchiol, BAK) 具有肝毒性^[13], 同时此 3 种成分具有手性特征, 然而, 对其对映体的毒性潜在差异的研究尚未见报道。

基于上述原因, 本实验采用高效液相色谱-手性固定相 (high performance liquid chromatography-chiral stationary phase, HPLC-CSP) 法同时测定了补骨脂中 BC、BVC、BAK 3 种毒性成分兼手性成分的含量, 比较了来源于河南、四川、云南、辽宁 4 个产地的补骨脂经清炒法、盐炙法、酒浸法炮制前后各个手性成分的对映体含量变化差异, 明晰了炮制过程中这 3 种成分的动态变化过程, 为揭示补骨脂的炮制减毒机制提供了科学依据, 并为后续深入研究补骨脂中 3 种手性化合物对映体的毒性机制差异奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 分析型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; EX225DZH 型十万分之一电子天平, 奥豪斯仪器有限公司; JP-060S 型超声波清洗

机, 深圳市洁盟清洗设备有限公司; Chiralpak IG 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 日本大赛璐公司。

1.2 材料

BVC 对照品, 质量分数≥98%, 批号 AB0798-0020, 成都埃法生物科技有限公司; BC、BAK 对照品, 批号 RFS-B05002009029、RFS-B04002009007, 质量分数均≥98%, 成都瑞芬思生物科技有限公司; 河南产补骨脂, 安徽汉盛药业有限公司; 四川产补骨脂, 洪雅县瓦屋山药业有限公司; 辽宁产补骨脂, 江西臻药堂药业股份有限公司; 云南产补骨脂, 安徽惠丰国药有限公司; 屈臣氏饮用水, 屈臣氏集团(香港)有限公司; 女儿红清纯三年黄酒, 绍兴女儿红酿酒有限公司; 食盐, 山东盐业集团; 色谱纯甲醇、乙腈, 天津市康科德科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 补骨脂炮制品的制备

2.1.1 清炒品 参考《圣惠方》中的“微炒”。取净补骨脂, 置炒制容器中炒至膨胀、有噼啪声响, 放凉, 即得^[14]。

2.1.2 盐炙品 盐补骨脂按照《中国药典》2020 年版盐炙法(通则 0213)标准炮制加工。取净补骨脂, 加入适量盐水拌匀, 闷润 4 h, 至盐水被吸尽, 置已加热炒制容器内, 用文火炒至表面微鼓起, 并有香气溢出时, 取出, 晾凉, 即得。每 100 克补骨脂, 用食盐 2 g^[15]。

2.1.3 酒浸品 仿照《洪氏集验方》:“麋茸丸: 破故纸酒浸一宿, 炒”。取净补骨脂, 加入黄酒浸泡过夜, 滤去余液, 置炒制容器内文火炒至微鼓起, 有噼啪声响, 放凉, 即得。每 100 克补骨脂, 用黄酒 15 g^[16]。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 BC 对照品 5.00 mg、BVC 对照品 5.00 mg 分别于 10 mL 量瓶中, BAK 对照品 5.00 mg 于 1 mL 量瓶中, 甲醇定容, 分别制成含(S)-BC 41.67 μg/mL、(R)-BC 458.33 μg/mL、(R)-BVC 217.39 μg/mL、(S)-BVC 282.61 μg/mL、(R)-BAK 151.52 μg/mL、(S)-BAK 4848.48 μg/mL 的对照品储备液。

2.2.2 混合对照品储备液的制备 精密量取 BC、BVC、BAK 对照品储备液各 0.2 mL 于 1 mL 量瓶中, 甲醇定容, 制成分别含(S)-BC 8.33 μg/mL、(R)-BC 91.67 μg/mL、(R)-BVC 43.48 μg/mL、(S)-BVC 56.52 μg/mL、(R)-BAK 30.30 μg/mL、(S)-BAK 969.70

μg/mL 的混合对照品储备液。

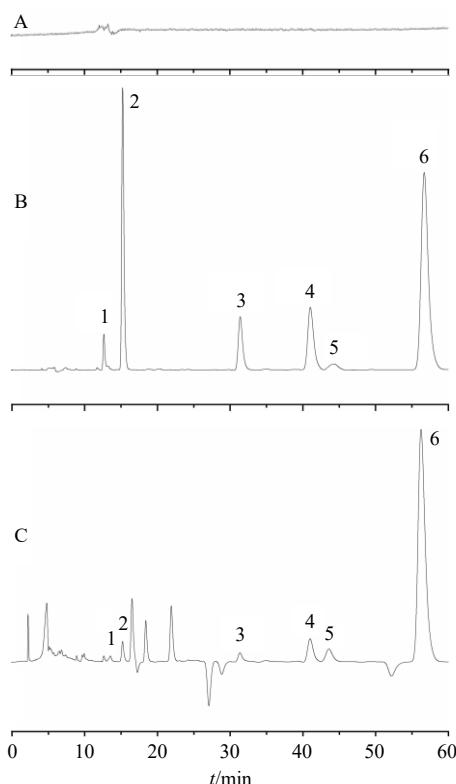
2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取补骨脂生品及不同炮制品药材粉末 0.1 g (过三号筛), 置 20 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 密塞, 35 °C 超声提取 30 min, 放冷, 加入甲醇补足减失的质量, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液^[17]。

2.3 HPLC-CSP 法测定补骨脂中各个对映体含量

2.3.1 色谱条件的优化 色谱柱 Chiralpak IG 的固定相为硅胶表面共价键合有直链淀粉-三(3-氯-5-甲基苯基氨基甲酸酯), 3-氯取代基的存在使其具有较好的偶极-偶极诱导相互作用和氢键作用, 5-甲基的存在有利于与补骨脂 3 种手性成分的对映体上的羰基官能团的相互作用^[18]。因此, 选用 Chiralpak IG 色谱柱对补骨脂中的手性成分进行分离。为了提高对映体分离度, 本实验考察了不同流动相体系及比例的分离效果, 在甲醇-乙腈的体系中未能观察到手性分离现象, 而在以乙腈-水作为流动相的条件下, 3 种对映体能够实现部分或完全分离, 这可能是因为甲醇可以和 CSP 上的氨基甲酸酯基团形成氢键作用, 与被分离化合物竞争氢键位点^[19], 导致对映体不能实现手性分离。随后对不同比例的乙腈-水的流动相系统(50:50、60:40、70:30)进行了考察, 通过改变水和有机相的比例发现, 当有机相比例逐渐增大时, 对映体的保留时间缩短, 同时分离度也减小, 根据相似相溶原理, 该化合物在极性小的溶剂中出峰速度更快, 但这也使得对映体未能得到充分保留, 分离效果不理想^[20]。最终在乙腈-水(50:50)的条件下, 可实现补骨脂中 3 个手性成分的基线分离, 结果见图 1。

2.3.2 专属性试验 将空白溶剂、混合对照品溶液和云南生品供试品溶液各进样 10 μL, 按上述优化条件测定。结果供试品溶液中色谱峰与相邻峰分离度均大于 1.5, 本方法分离度良好; 空白溶剂对测定无干扰, 表明方法专属性良好, 结果见图 1。

2.3.3 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 配制成一系列质量浓度梯度的混合对照品溶液, 分别进样 10 μL, 记录峰面积, 以质量浓度为横坐标(X), 以峰面积为纵坐标(Y), 用最小二乘线性回归法拟合绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程: (S)-BC $Y=35\,959X-7.076\,9$, $R^2=0.999\,8$, 线性范围 0.42~5.00 μg/mL; (R)-BC $Y=33\,099X+16.380$, $R^2=0.999\,6$, 线性范围 4.58~55.00 μg/mL; (R)-BVC $Y=32\,506X-30.444$, $R^2=$



1-(S)-BC; 2-(R)-BC; 3-(R)-BVC; 4-(S)-BVC; 5-(R)-BAK; 6-(S)-BAK.

图 1 空白溶剂 (A)、混合对照品溶液 (B) 和补骨脂生品供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank solution (A), mixed reference substances solution (B) and *Psoraleae Fructus* (PF) crude sample test solution (C)

0.999 5, 线性范围 1.09~43.48 $\mu\text{g/mL}$; (S)-BVC $Y=32\,031\,X-19.597$, $R^2=0.999\,4$, 线性范围 1.41~56.52 $\mu\text{g/mL}$; (R)-BAK $Y=52\,457\,X-41.287$, $R^2=0.999\,2$, 线性范围 1.52~24.24 $\mu\text{g/mL}$; (S)-BAK $Y=50\,820\,X+206.430$, $R^2=0.999\,7$, 线性范围 48.48~775.76 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明补骨脂中各个成分的对映体在规定的对照品质量浓度范围内, 峰面积与对照品质量浓度线性关系良好。

2.3.4 精密度试验 采用“2.3.1”项下色谱条件, 取云南生品供试品溶液连续进样 6 次, 记录峰面积, 并计算出(S)-BC、(R)-BC、(R)-BVC、(S)-BVC、(R)-BAK、(S)-BAK 各个对映体峰面积的 RSD 分别为 0.50%、0.51%、0.46%、0.34%、0.83%、0.62%, 表明仪器的精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 采用“2.3.1”项下色谱条件, 取云南生品供试品溶液 10 μL , 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样检测, 计算出(S)-BC、(R)-BC、(R)-BVC、(S)-BVC、(R)-BAK、(S)-BAK 色谱峰峰面积

的 RSD 值分别为 0.14%、1.18%、0.24%、0.17%、1.53%、0.39%, 表明供试品溶液在制备后 12 h 内稳定性良好。

2.3.6 重复性实验 采用“2.3.1”项下色谱条件, 取同一批云南生品供试品溶液 6 份, 进样测定, 并计算各手性成分的对映体质量分数的 RSD 值, 结果 (S)-BC、(R)-BC、(R)-BVC、(S)-BVC、(R)-BAK、(S)-BAK 分别为 0.95%、0.15%、1.13%、0.84%、0.66%、0.21%, 结果表明该方法重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 精密称取一定量的 BC、BVC、BAK, 配制成含(S)-BC 19.01 $\mu\text{g/mL}$ 、(R)-BC 209.11 $\mu\text{g/mL}$ 、(R)-BVC 240.03 $\mu\text{g/mL}$ 、(S)-BVC 312.04 $\mu\text{g/mL}$ 、(R)-BAK 195.75 $\mu\text{g/mL}$ 、(S)-BAK 6263.87 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。精密称取 9 份已知 3 种手性成分含量的云南生品补骨脂 0.05 g, 置 20 mL 量瓶中, 精密加入由上述混合对照品溶液稀释的低、中、高 3 种不同质量浓度的混合对照品溶液, 每个质量浓度按“2.2.3”项下方法制备 3 份供试品溶液。按照上述色谱条件进样测定, 计算得 3 种成分对映体(S)-BC、(R)-BC、(R)-BVC、(S)-BVC、(R)-BAK、(S)-BAK 的平均加样回收率分别为 99.81%、100.10%、99.77%、101.47%、98.88%、97.69%, RSD 分别为 2.37%、2.70%、2.81%、2.71%、2.52%、2.21%, 结果表明该法准确性良好。

2.3.8 含量测定 取各产地补骨脂药材(生品/炮制品)粉末, 按“2.2.3”项下方法制备各供试品溶液, 在上述色谱条件下进行检测, 记录峰面积, 由回归方程计算 BC、BVC、BAK 的异构体含量。选取的不同产地补骨脂中 2 种对映体的总含量顺序为(R)-BC>(S)-BC, (S)-BVC>(R)-BVC, (S)-BAK>(R)-BAK; 经清炒法、盐炙法、酒浸法炮制后, 3 种成分的总含量均降低。BVC 和 BAK 的对映异构体含量降低, 但降低率不同, 而(S)-BC 炮制后含量升高, (R)-BC 含量降低。各产地补骨脂炮制前后, 3 种手性成分的对映体含量测定结果及含量变化结果如表 1 所示。

2.4 分子对接

在 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中下载(S)-BC、(S)-BVC 以及(S)-BAK、(R)-BAK 3D 结构的 SDF 格式, 同时, 由此构型在 Chemdraw 20.0 画出对应的(R)-BC、(R)-BVC 结构, 并保存为 SDF 格式文件, 然后使用 Openbabel 2.4.1 将化合物的 SDF 格式转化为 PDB 格式。在 PDB

表 1 不同产地补骨脂经不同方法炮制前后对映体含量

Table 1 Content of enantiomers of PF from different origins before and after processing by different methods													
产地	炮制方法	质量分数/(mg·g ⁻¹)						变化率/%					
		(S)-BC	(R)-BC	(R)-BVC	(S)-BVC	(R)-BAK	(S)-BAK	(S)-BC	(R)-BC	(R)-BVC	(S)-BVC	(R)-BAK	(S)-BAK
河南	生品	0.11	4.85	2.33	10.70	2.98	69.15	—	—	—	—	—	—
	清炒	0.67	4.01	0.48	7.24	2.71	58.82	519.39 ↑	17.30 ↓	79.22 ↓	32.34 ↓	8.94 ↓	14.95 ↓
	盐炙	0.48	4.29	1.47	8.17	2.83	61.73	339.37 ↑	11.56 ↓	37.17 ↓	23.64 ↓	4.93 ↓	10.74 ↓
	酒浸	0.31	4.56	0.59	9.68	2.81	60.01	185.90 ↑	5.98 ↓	74.49 ↓	9.56 ↓	5.53 ↓	13.22 ↓
四川	生品	0.21	4.19	1.90	9.74	2.69	59.47	—	—	—	—	—	—
	清炒	0.54	2.89	0.35	7.33	2.56	52.27	151.54 ↑	30.98 ↓	81.57 ↓	24.82 ↓	4.88 ↓	12.11 ↓
	盐炙	0.21	3.50	0.63	9.45	2.53	51.51	0.04 ↑	16.40 ↓	67.02 ↓	3.05 ↓	6.02 ↓	13.40 ↓
	酒浸	0.27	2.93	1.28	7.96	2.43	51.11	23.89 ↑	29.92 ↓	32.69 ↓	1.21 ↓	9.85 ↓	14.06 ↓
辽宁	生品	0.12	3.27	2.28	8.99	2.36	58.40	—	—	—	—	—	—
	清炒	0.49	2.02	0.73	5.97	2.23	49.29	313.54 ↑	38.18 ↓	68.06 ↓	33.61 ↓	5.15 ↓	15.61 ↓
	盐炙	0.23	2.57	0.80	7.67	2.23	48.16	96.09 ↑	21.40 ↓	64.89 ↓	14.67 ↓	5.50 ↓	17.53 ↓
	酒浸	0.21	3.12	0.85	8.47	2.28	46.46	74.14 ↑	4.65 ↓	62.67 ↓	5.73 ↓	3.65 ↓	20.45 ↓
云南	生品	0.20	2.26	2.01	7.25	2.39	52.20	—	—	—	—	—	—
	清炒	0.42	1.82	0.81	5.79	1.91	37.48	112.52 ↑	19.67 ↓	59.63 ↓	20.15 ↓	20.03 ↓	28.19 ↓
	盐炙	0.25	2.06	0.91	6.46	2.07	39.50	24.94 ↑	9.13 ↓	54.98 ↓	10.86 ↓	13.49 ↓	24.32 ↓
	酒浸	0.26	2.18	1.07	6.92	2.28	44.04	30.02 ↑	3.46 ↓	46.91 ↓	4.53 ↓	4.53 ↓	15.63 ↓

↑ 表示变化率上升; ↓ 表示变化率下降。
↑ indicated that the rate of change increased; ↓ indicated that the rate of change decreased.

(<https://www.rcsb.org/>) 数据库中下载原癌基因酪氨酸激酶 ABL1 (Abelson tyrosine-protein kinase ABL1, ABL1) 靶点蛋白文件, 利用 PyMOL 2.6.0 对蛋白进行去水、去原有配体的预处理。最后, 利用 AutoDock Tools 1.5.7 将各手性化合物分别与靶点蛋白 ABL1 进行分子对接。

结果 (表 2) 表明, (R)-BC、(R)-BVC、(S)-BAK 与毒性靶标的结合能力分别强于 (S)-BC、(S)-BVC、(R)-BAK, 提示其可能有更强的毒性作用。将结合活性强的对接结果导入 PyMOL 2.6.0, 绘制三维图谱, 进行对接结果的可视化, 结果显示, (R)-BC 与氨基酸残基 TYR253 形成 1 条氢键, 并与 ALA269、LEU248、LEU370、TYR253 等氨基酸残基发生了 π - π 堆积; (S)-BC 与 ASP381、ILE360 等氨基酸残基

表 2 补骨脂中 3 种手性成分与 ABL1 的分子对接结果

Table 2 Molecular docking results of three chiral components contained in PF with ABL1			
化合物	结合能/(kcal·mol ⁻¹)	化合物	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
(R)-BC	-8.3	(S)-BVC	-8.0
(S)-BC	-8.1	(R)-BAK	-6.2
(R)-BVC	-10.5	(S)-BAK	-6.9

形成 3 条氢键, 并与 ASP381、MET290、VAL289 等氨基酸残基发生了 π - π 相互作用; (R)-BVC 被 ALA397、TYR449、ALA395、LEU411 等氨基酸残基包围, 并与 ALA397、TYR449、ALA395 和 LEU411 等氨基酸残基形成了 4 条氢键, 与 ILE403、ALA395、LEU411 等氨基酸残基发生了 π - π 堆积; (S)-BVC 被 LYS271、ALA380、THR315、VAL299、PHE382、ILE293 和 MET290 等氨基酸残基包围, 与 LYS271、ALA380、VAL299 和 PHE382 形成 4 条氢键, 同时与 VAL289 和 MET290 等氨基酸残基发生了 π - π 相互作用; (R)-BAK 与 HLS316、PHE359、LEU354 和 VAL289 等氨基酸残基形成 4 条氢键, 与氨基酸残基 MET290 发生了 π - π 堆积; (S)-BAK 与 LEU248、THR315、TYR253 等氨基酸残基形成 3 条氢键, 并与 LEU248、LEU370、TYR253、PHE382、ALA269 等氨基酸残基发生了 π - π 相互作用。

以上说明各成分的对映体均主要通过氢键作用和范德华力与靶点结合, 并辅以多种 π - π 堆积进一步稳定与对接位点处氨基酸残基的结合能力, 但各成分的 2 种异构体与毒性靶标的对接位点均存在立体选择性差异。结果见图 2。

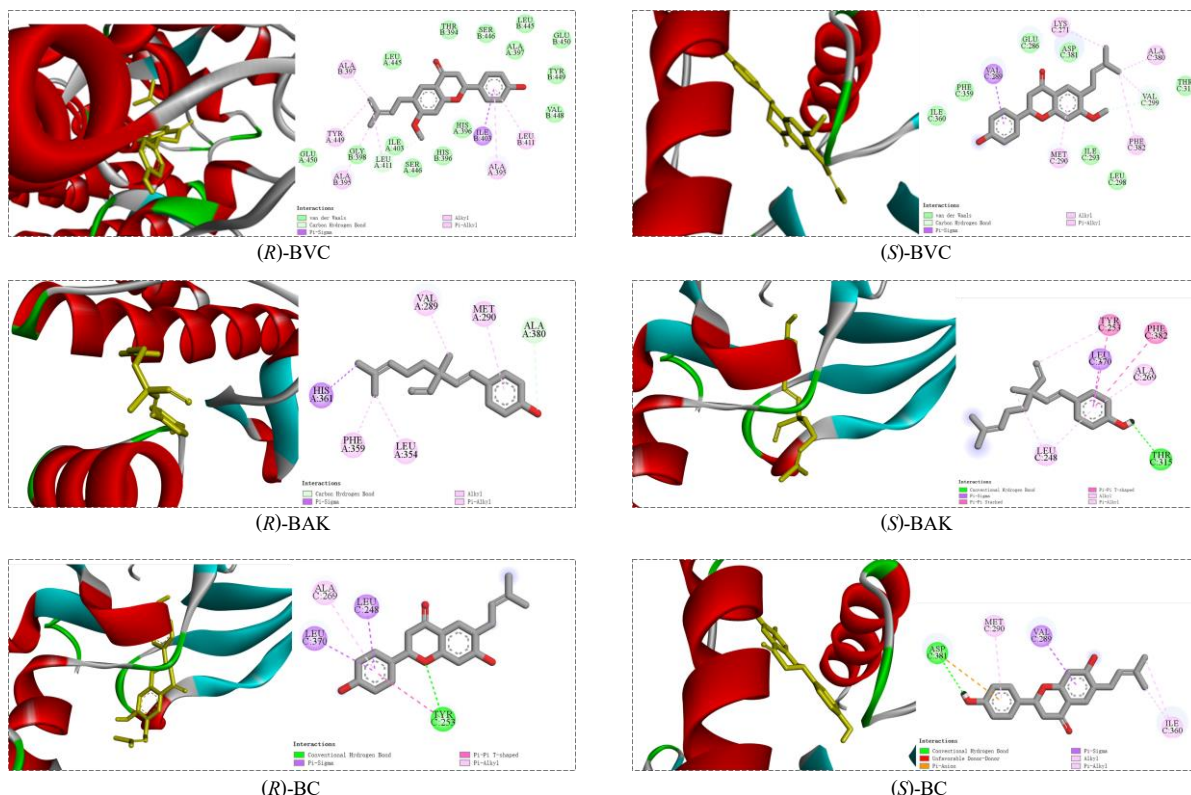


图 2 (R)-BVC、(S)-BVC、(R)-BAK、(S)-BAK、(R)-BC、(S)-BC 与 ABL1 的分子对接图

Fig. 2 Molecular docking diagrams of (R)-BVC, (S)-BVC, (R)-BAK, (S)-BAK, (R)-BC, (S)-BC and ABL1

3 讨论

近年来, 尽管中药中对映异构体的药理及毒理机制的差异正在被广泛研究^[20], 但极少有人对中药中的手性成分炮制前后的含量、毒性、体内代谢差异等方面进行研究。BC、BVC、BAK 作为补骨脂中的 3 种手性成分, 亦为补骨脂潜在的肝毒性成分^[21-22], 目前尚未有人从手性角度对此 3 种成分的肝毒性展开研究。

本实验选取了清炒法、盐炙法、酒浸法作为炮制方法对 3 种成分的对映体含量进行研究, 结果表明, 在补骨脂生品中, (R)-BC、(S)-BVC、(S)-BAK 的含量分别大于另 1 种构型; 经 3 种不同方法炮制后, BC、BVC、BAK 的总含量均降低, 说明 3 种炮制方法均对补骨脂起到了减毒作用。推测是由于 BVC 和 BC 为二氢黄酮类化合物, 在高温下不稳定, A 环开环发生降解所致, 且酒浸品在炮制过程中, 加入黄酒长时间浸泡, 溶于乙醇也可使其含量降低; 而 BAK 为补骨脂中挥发油的主要成分^[23], 在炒制加热的过程中挥发导致其含量下降。此外, 通过对比各个成分异构体的含量变化, 发现 2 种对映体的变化率也存在显著差异, (R)-BVC 的含量往往要比其 S 构型的含量下降的多; (S)-BAK 的含量比其 R

构型下降的多; (R)-BC 的含量降低, 而 (S)-BC 的含量升高, 这可能是由于炮制过程中 (R)-BC 转化为 (S)-BC。

结合中药炮制解毒的作用, 推测对映体含量变化的差异可能与其潜在毒性作用差异有关, (R)-BC、(R)-BVC、(S)-BAK 的毒性可能强于其另外一种构型。而 ABL1 蛋白是补骨脂致肝毒性作用的关键靶标^[24], 其与补骨脂中 3 种手性成分分子对接的结果进一步验证了各手性成分的异构体在毒性强度上存在立体选择性差异, 即 (R)-BC、(R)-BVC、(S)-BAK 可能有更强的毒性作用。这提示对此 3 种具有手性异构现象的化合物进行更深入的研究, 或可以起到减少药物不良反应及增强疗效的作用, 有利于其药效及毒性物质基础的进一步明确, 也为现行补骨脂及其他中药材质量标准的改善提供新思路。

补骨脂广泛种植于云南、四川、广西、河南、安徽、辽宁等地区^[2]。为避免实验偶然性, 更全面地验证补骨脂手性成分的含量差异, 探究其炮制规律, 选取河南、四川、云南、辽宁 4 个产地的补骨脂药材进行含量测定。结果表明, 不同来源的补骨脂所含的手性成分具有相同的主要构型, 经不同方法炮制后, 其含量变化亦呈现相同的趋势。此外, 通过

对比不同产地补骨脂所含手性成分的含量,发现来源于河南的补骨脂中 3 种手性成分的含量均为最高,四川、辽宁次之,云南最低,说明不同产地补骨脂的质量有所不同,这可能与各产地的土壤、气候及采收时间有关,对补骨脂的品种选育具有指导意义。

由于中药成分的复杂性,实验以 BC、BVC、BAK 3 个毒性指标成分评价炮制减毒工艺存在一定的局限性,有关补骨脂更多毒性物质基础还有待进一步研究。目前仅通过补骨脂炮制前后手性成分各个对映体含量的变化以及与其毒性靶蛋白的分子对接初步探究了其潜在的毒性作用机制的差异,如何通过药物体内外代谢、药动学等研究进一步揭示补骨脂炮制前后 3 种手性成分的对映体肝毒性差异,确定各成分在临床用药的限度范围,保证药效与用药安全性,是后续亟待解决的问题。

4 结论

本实验采用高效液相色谱法建立了补骨脂中 3 种手性成分的对映体分离方法,并对补骨脂炮制前后各个对映体进行了含量测定。结果表明,(R)-BC、(S)-BVC、(S)-BAK 为补骨脂生品中的主要构型;清炒品、盐炙品、酒浸品中的 3 种成分的总含量均降低,各成分对映体的含量变化率存在差异,说明此 3 种炮制方法均对补骨脂起到了减毒作用。3 种手性化合物与毒性靶标 ABL1 分子对接氨基酸位点的不同表明各个对映体在毒性机制上存在立体选择性差异。

本研究基于中药炮制理论和分子对接技术初步揭示了补骨脂中 3 种手性成分的对映体在毒性作用上的差异性,为补骨脂炮制工艺改进奠定了基础,为后续 BC、BVC 以及 BAK 对映体的体内外代谢、毒性机制的深入研究提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 195.
- [2] Chen L L, Chen S G, Sun P, *et al.* *Psoralea corylifolia* L.: A comprehensive review of its botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicology, quality control and pharmacokinetics [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 4.
- [3] Cheung W I, Tse M L, Ngan T, *et al.* Liver injury associated with the use of *Fructus Psoraleae* (Bol-gol-zhee or Bu-Gu-Zhi) and its related proprietary medicine [J]. *Clin Toxicol*, 2009, 47(7): 683-685.
- [4] Gao C, Liu C, Wei Y Y, *et al.* The acute oral toxicity test of ethanol extract of salt-processed *Psoraleae Fructus* and its acute hepatotoxicity and nephrotoxicity risk assessment [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309: 116334.
- [5] 刘想晴, 赵宝林, 钱枫, 等. 补骨脂炮制的历史沿革考证 [J]. *中国民族民间医药*, 2022, 31(19): 29-36.
- [6] 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.
- [7] 王娟, 周植星, 杨莉, 等. 补骨脂药材 UPLC 指纹图谱建立及 12 种主要成分含量测定 [J]. *中草药*, 2021, 52(2): 552-557.
- [8] 陈李东, 朱日然, 张学顺, 等. 补骨脂炮制方法优选的研究 [J]. *食品与药品*, 2021, 23(3): 197-202.
- [9] Wong C S. Environmental fate processes and biochemical transformations of chiral emerging organic pollutants [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386(3): 544-558.
- [10] Zhu W T, Dang Z H, Qiu J, *et al.* Stereoselective toxicokinetics and tissue distribution of ethofumesate in rabbits [J]. *Chirality*, 2007, 19(8): 632-637.
- [11] Chai T T, Cui F, Song Y, *et al.* Enantioselective toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*) induced by chiral PCB91 through multiple pathways [J]. *Environ Sci Technol*, 2018, 52(9): 5448-5458.
- [12] Christodoulou M S, Sacchetti A, Ronchetti V, *et al.* Quinazolinecarboline alkaloid evodiamine as scaffold for targeting topoisomerase I and sirtuins [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(22): 6920-6928.
- [13] Liu T T, Xu G, Li Y R, *et al.* Discovery of bakuchiol as an AIM2 inflammasome activator and cause of hepatotoxicity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298: 115593.
- [14] 李红伟, 曹彦刚, 田连起, 等. 5 种炮制方法对补骨脂脂溶性和挥发性成分的影响 [J]. *中成药*, 2021, 43(9): 2418-2427.
- [15] 麦丽克姆·麦图如孜, 高姝燕, 努尔玛娜提·胡安别克, 等. 补骨脂生品及不同炮制品水提物小鼠急性毒性试验 [J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(19): 2617-2627.
- [16] 杨健, 陆定艳, 彭潇, 等. 不同来源、不同炮制方法的补骨脂对成骨细胞 SaOS-2 骨形成功能的影响 [J]. *海南医学*, 2018, 29 (15): 2140-2143.
- [17] 洪丽, 王哲, 汤小涵, 等. 基于雷公法结合盐炙法对补骨脂的炮制及肝毒性评价 [J]. *中草药*, 2021, 52(22): 6983-6989.
- [18] Choppari T, Gunnam S, Chennuru L N, *et al.* Evaluation of chiral liquid chromatographic method for separation and quantification of isomers of brivacetam [J]. *J Chromatogr Sci*, 2022, 60(3): 250-259.
- [19] Raja R, Alam S D, Mukhopadhyay D, *et al.* Chiral separation of calcium channel antagonists by SFC and

- HPLC using different immobilized chiral stationary phases [J]. *Chirality*, 2022, 34(3): 514-520.
- [20] Gao Y Y, Zhao X J, Sun X F, *et al.* Enantioselective detection, bioactivity, and degradation of the novel chiral fungicide oxathiapiprolin [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(11): 3289-3297.
- [21] Silva B, Fernandes C, Guedes de Pinho P, *et al.* Chiral resolution and enantioselectivity of synthetic cathinones: A brief review [J]. *J Anal Toxicol*, 2018, 42(1): 17-24.
- [22] 郑燕, 江媛, 缪雨静, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的补骨脂炮制机理研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 600-604.
- [23] Xu Q X, Lv Q, Liu L, *et al.* New bakuchiol dimers from *Psoraleae Fructus* and their inhibitory activities on nitric oxide production [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 98.
- [24] 孙思彤, 王硕, 王曼姝, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨补骨脂毒性起始靶点及潜在机制研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(6): 753-768.

[责任编辑 郑礼胜]