

半夏炮制过程中毒性凝集素蛋白的 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析

黄益曼^{1,2}, 李春晖³, 柏家辉², 陆颖洁^{1,2}, 李添^{1,2}, 董志颖³, 苏越¹, 郭寅龙²

(1. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203;

2. 中国科学院上海有机化学研究所, 金属有机化学国家重点实验室, 上海 200032;

3. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘要: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)受灵敏度和重复性的影响, 对完整蛋白的定量分析存在困难。本研究采用纤维素纳米晶体(CNC)辅助 MALDI-TOF MS, 结合内标法定量分析半夏炮制过程中半夏凝集素(PTL), 通过优化 CNC 辅助样本制备的时长和比例, 以麦胚凝集素(TVL)为内标, 直接分析不同炮制程度半夏各炮制品及其浸泡上清液中 PTL 含量。结果表明, CNC 辅助 MALDI 样本制备有效提升了 MALDI-TOF MS 定量分析的线性和重复性。随着炮制时间的延长, 姜半夏、清半夏和法半夏炮制品的 PTL 含量逐渐下降, 浸泡上清液中 PTL 含量逐渐上升。其中, 由于 pH 值的改变, 法半夏炮制品浸泡上清液中 PTL 含量呈先上升后下降的趋势。此外, 将该方法应用于不同饮片生产企业的多批次半夏炮制品饮片中, 均未检出 PTL。该方法操作简便, 可有效分析半夏炮制过程中 PTL 含量的变化, 为研究半夏炮制过程对 PTL 的影响提供了参考。

关键词: 半夏; 炮制方法; 半夏凝集素(PTL); 纤维素纳米晶体(CNC); 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)02-0226-11

doi: 10.7538/zpxb.2023.0133

Analysis of *Pinellia ternata* Toxic Lectin Protein During Processing by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

HUANG Yi-man^{1,2}, LI Chun-hui³, BAI Jia-hui², LU Ying-jie^{1,2}, LI Tian^{1,2},

DONG Zhi-ying³, SU Yue¹, GUO Yin-long²

(1. Institute for Interdisciplinary Medicine Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. State Key Laboratory of Organometallic Chemistry,

Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China;

3. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: *Pinellia ternata* lectin (PTL) is considered as the toxic substance of *Pinellia ternata*, and is the main cause of irritation in raw *Pinellia* tubers. The content of PTL

decreases after processing. *Pinellia* tubers are processed with ginger extract, liquorice or alum to reduce the toxicity and get processed products, such as Jingbanxia, Qingbanxia and Fabanxia. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method has the advantages of low cost, rapid and automated operation, which is suitable for the detection of intact proteins. However, MALDI-TOF MS is difficult to perform quantitative analysis of intact protein due to its low sensitivity and repeatability. It is important to establish a rapid analysis method for the detection of PTL by improving the sensitivity and repeatability of MALDI-TOF MS. Cellulose nanocrystal (CNC) is one of the nano materials with rod-like structure, which has wide applications due to its large specific surface area, abundant hydroxyl groups. It has the ability to reduce protein aggregation, so can reduce the aggregated protein ion $[nM+H]^+$ signals in MALDI-TOF MS. In this study, CNC assisted MALDI-TOF MS combined with internal standard method was used to quantitative analyze PTL during processing of *Pinellia ternata*. The preparation time and proportion of CNC-assisted samples were optimized, and *Triticum vulgare* lectin (TVL) was used as internal standard to directly analyze PTL in processed products and their supernatant. Good repeatability of MALDI-TOF MS analysis could be successfully achieved by adding CNC to the protein sample solution. CNC-assisted MALDI sample preparation could effectively solve the quantitative analysis problem of MALDI-TOF MS, improve the sensitivity, linearity and repeatability. During the processing of raw *Pinellia* tubers, the PTL in raw tubers was gradually dissolved in the *Pinellia* tubers extract. As the processing time increased, the content of PTL in the three types of processed products gradually decreased, and gradually increased in their supernatant. The content of PTL in the soak supernatant tended to increase and then decrease due to pH change. In addition, PTL was not detected in many batches of processed products from different manufacturers. Instead, PTL was detected at high levels in raw *Pinellia* tubers. The method provides a scientific basis for the mechanism of *Pinellia ternata* processing on toxic PTL, as well as for the optimization of processing production and technological innovation.

Key words: *Pinellia ternata*; processing method; *Pinellia ternata* lectin (PTL); cellulose nanocrystals (CNC); matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

半夏是天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎^[1],已作为一种传统中药在我国使用上千年之久。由于未经加工的生品对口腔和咽喉黏膜具有强烈的刺激性^[2-3],故临床内服配方用药均为半夏炮制品。《中国药典》记载的半夏炮制品有清半夏、姜半夏及法半夏。

半夏凝集素(*Pinellia ternata* lectin, PTL)是从半夏块茎中发现的一种蛋白^[4-5],占总蛋白含量的 2/3,与半夏毒性密切相关^[6-7],经聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate poly-

acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)分析,其相对分子质量为 12 093.3 u^[4]。PTL 被认为是造成生半夏化学刺激性的主要原因^[8-10],生半夏经炮制加工后的 PTL 含量下降^[11-14]。目前,已有半夏炮制过程对毒性物质 PTL 影响的报道。程砚秋等^[12]使用蛋白质印迹法检测清半夏、法半夏及姜半夏炮制品中麦胚凝集素(TVL),均未检出 PTL。陶兴宝等^[15]解

释了法半夏炮制过程中石灰水(pH>12)浸泡可使 PTL 发生不可逆变性,其含量显著下降。半夏块茎中存在多种植物蛋白^[16],目前特异性检测 PTL 的方法主要有 SDS-PAGE 法测定蛋白质相对分子质量、蛋白质印迹法测定蛋白质含量^[12-13]、免疫荧光染色分析^[11]和酶联免疫吸附试验法测定 PTL 含量^[17],但这些方法存在过程耗时复杂、价格昂贵、操作步骤繁琐,以及易出现假阳性等问题。因此,需要建立一种快速检测 PTL 的方法,以有效分析半夏炮制过程中毒性的变化。

MALDI-TOF MS 法具有成本低、快速、自动化操作等优点,适用于完整蛋白质的检测^[18-19]。Zuo 等^[4]使用 MALDI-TOF MS 法分析了完整 PTL 的相对分子质量,但要获得完整蛋白质的高质量信号仍存在挑战。为了提高 MALDI-TOF MS 对大质量离子的检测灵敏度,最常见的方法是自下而上策略,即酶切完整的蛋白质以产生较小的多肽片段^[20-21]。但这种间接分析方法会不可避免地影响结果的准确性,不适合完整蛋白质的定量研究^[22]。另一方面,基质是吸收激光能量对样品进行解吸/电离的前提。然而,在基质结晶过程中,由于溶液蒸发与体积减小的不匹配性,分子从液滴中心向边缘流动形成不均匀的环状晶体,即咖啡环现象^[23],使 MALDI-TOF MS 分析的重复性受到影响,进一

步增加了蛋白质分析的难度。在过去的研究中,已使用多种方法提高 MALDI 的灵敏度和重复性,例如,通过添加水溶性聚合物、添加纳米材料^[24]、调节液滴蒸发方式^[25]等改善物理和化学性质。同时,开发了新的样品制备方法,包括使用新型基质^[26]、结晶均匀技术和样品沉积方法^[27-28],通过提高基质-分析物结晶分布的均匀性以提高解吸/电离效率,但这些技术主要用于小分子分析,而使用 MALDI-TOF MS 分析完整蛋白的灵敏度和重复性问题仍需进一步解决。纤维素纳米晶体(cellulose nanocrystal, CNC)是一种极细棒状结构的纳米纤维素,因其比表面积大、羟基丰富且无毒无刺激性而广泛应用于医药、材料等行业。有研究^[29]表明,CNC 具有结合大分子蛋白质的能力,这与溶液 pH 值和蛋白质表面电荷相关。基于此,研究 CNC 是否可以通过抑制蛋白聚集来提高 MALDI-TOF MS 分析的灵敏度和重复性是非常有意义的。

本工作拟使用 CNC 辅助 MALDI 蛋白制样,以克服 MALDI-TOF MS 分析完整蛋白灵敏度低、重复性差的问题。使用 MALDI-TOF MS 结合内标法直接定量分析半夏块茎和半夏炮制上清液中 PTL 含量,其示意图示于图 1,希望为半夏炮制过程中 PTL 的检测提供可靠方法,为中药炮制过程中蛋白质含量的分析提供方法参考。

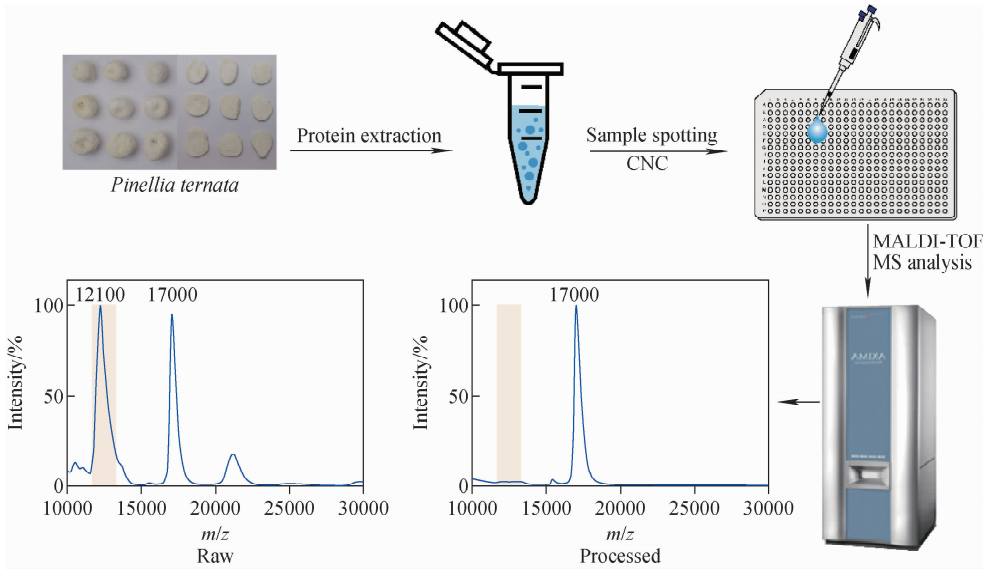


图 1 CNC 辅助 MALDI-TOF MS 分析半夏凝集素示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the proposed CNC-assisted MALDI-TOF MS analysis for PTL

1 实验部分

1.1 仪器与装置

Axima performance 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪:日本 Shimadzu 公司产品;5810r 冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;Milli-Q 超纯水系统:美国 Millipore 公司产品;高通量组织研磨仪:上海万柏生物科技有限公司产品;恒温磁力搅拌机:上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司产品。

1.2 材料、试剂及样品

乙腈:色谱纯,德国 Merck 公司产品;芥子酸、三氟乙酸、麦胚凝集素:美国 Sigma-Aldrich 公司产品;牛血清白蛋白:上海碧云天生物技术有限公司产品;超纯去离子水:采用 Milli-Q 超纯水系统净化;纳米微晶纤维素:北京闪思科技有限公司产品;植物蛋白提取试剂盒:美国 Invent 公司产品。

生姜(产地浙江):购自超市;白矾、生石灰、甘草:由饮片生产企业提供;生半夏和姜半夏:收集自浙江、上海地区,共3家生产企业8批次样品;生半夏(Y2305121、Y230731、20220715、220712),制半夏(20230714-1、20230522-1、20230116、221129):经上海中医药大学董志颖教授鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎。

1.3 实验条件

正离子模式采样;KRATOS ANALYTICAL 进样靶板384孔; N_2 激光波长337 nm,激光能量70%;质量扫描范围 m/z 1 000~100 000;采用牛血清白蛋白进行质量矫正。

2 实验部分

2.1 不同炮制程度半夏炮制品及其浸泡上清液的制备

2.1.1 姜半夏 取180 g鲜生姜榨汁,添加适量的水反复压榨,定容至180 mL,备用。取1 kg净半夏,在10 L 8%白矾水中浸泡0.5、1、2、3、4、5天,取出,洗净白矾,晾至半干;加入姜汁拌润,待姜汁吸净,干燥,切片,即得姜半夏。分别取炮制过程的0.5、1、2、3、4、5天姜半夏炮制品和浸泡上清液,备用。

2.1.2 清半夏 取1 kg净半夏,在10 L 8%白矾水中浸泡0.5、1、2、3、4、5天,取出,洗净白矾,干燥,切片,即得清半夏。分别取炮制过程

的0.5、1、2、3、4、5天清半夏炮制品和浸泡上清液,备用。

2.1.3 法半夏 取150 g生甘草,煎煮2遍,每次30 min,合并煎液,得1 500 mL水煎液;另取100 g生石灰,加200 mL水拌匀,与凉后的甘草水煎液混合,定容至10 L,即得甘草石灰水。取1 kg净半夏,浸泡0.5、1、2、3、4天,再投入已制备的甘草石灰水中,5天时保持浸液 $pH > 12$,浸泡5、6、7天,取出,洗净,干燥,切片,即得法半夏。分别取炮制过程的0.5、1、2、3、4、5、6、7天法半夏炮制品和浸泡上清液,备用。

2.2 不同炮制程度半夏总蛋白提取

将获得的半夏炮制品用研磨仪粉碎,称取50 mg样品在含有1%苯甲基磺酰氟(PMSF)的植物裂解缓冲液中均质,匀浆4℃下裂解40 min,以12 000 r/min离心30 min,取蛋白上清液,−80℃保存。

2.3 CNC辅助MALDI样本制备对MALDI-TOF MS分析灵敏度的影响

将50 μ L半夏蛋白提取液加入到50 μ L内标TVL标准溶液中,混合后加入100 μ L基质溶液,再加入不同混合比例的CNC溶液,搅拌,考察搅拌时间对TVL信号的影响。

2.4 CNC辅助MALDI样本制备对MALDI-TOF MS分析线性和重复性的影响

取TVL标准品,配制成10.0 g/L标准品溶液,逐级稀释,制备浓度分别为5.0、2.0、1.0、0.5、0.1、0.01 g/L的一系列TVL标准品溶液。获得不同浓度标准品溶液的质谱峰面积,进行回归分析并考察其线性关系。以信噪比(S/N)为3确定MALDI-TOF MS法的检测限。取同一浓度的标准品溶液,每个实验设置14个重复孔,以评价重复性。

2.5 MALDI-TOF MS法检测不同炮制程度半夏炮制品中PTL含量变化

取制备好的半夏蛋白提取液,以芥子酸为基质进行MALDI-TOF MS分析。芥子酸在水-乙腈-三氟乙酸(49.95:49.95:0.1, V/V/V)中完全溶解,终浓度为10 g/L。将半夏蛋白样品和TVL标准溶液混合后加入基质溶液,分析前,取1 μ L混合样品滴至MALDI靶板上,室温干燥;随后将MALDI靶板送入仪器进行数据采集,使用Axima performance进行光谱采

集。所有的测量均在线性模式下进行,用 N₂ 激光实现离子化。所有的谱图是 100 次激光射击后用外部标准校准的平均质谱图,每个质谱图中以 PTL 峰面积除以内标 TVL 峰面积作为归一化。

2.6 MALDI-TOF MS 法检测不同炮制程度半夏浸泡上清液中 PTL 含量变化

按照 2.5 节方法制备基质溶液,将半夏浸泡上清液和 TVL 标准溶液混合后加入基质溶液,然后采用 MALDI-TOF MS 法分析。

2.7 数据分析

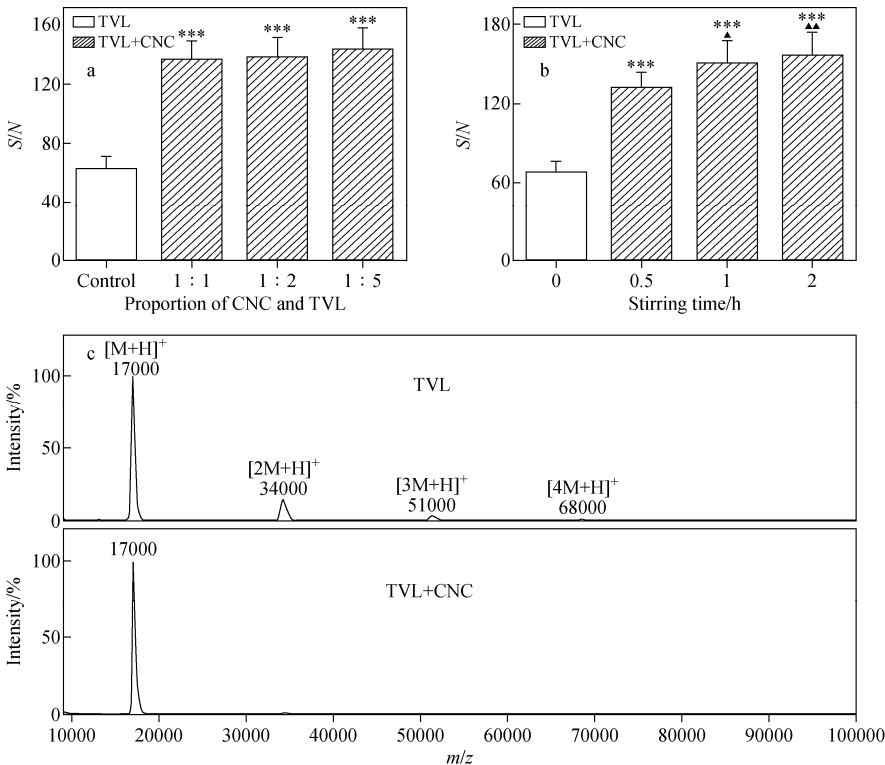
采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用独立样本 *t* 检验,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 CNC 辅助制样提高 MALDI-TOF MS 分析灵敏度

近年来,MALDI-TOF MS 已被用于直接

分析从生物样品中提取的蛋白质,而对于复杂样品中完整蛋白分析的灵敏度和重复性则有待进一步提高。本工作以 TVL 和 PTL 为模型,研究 CNC 对 MALDI-TOF MS 检测完整蛋白灵敏度的影响。合适的基质对 MALDI-TOF MS 分析获得稳定的质谱图至关重要,本实验对 α -氰基-4-羟基肉桂酸、芥子酸和 2,5-二羟基苯甲酸等基质进行了比较。结果发现, α -氰基-4-羟基肉桂酸和 2,5-二羟基苯甲酸作为基质时的样品信号较差;而芥子酸可以产生更高质量的质谱峰,适合大分子蛋白质的分析,示于附图 1(请登录《质谱学报》网站 <http://zpxb.xmljournal.net> 下载)。因此,为了保证实验的重复性,选择芥子酸作为基质。与对照组相比,添加 CNC 辅助样本制样的 TVL 信噪比提高了 2 倍;不同比例混合的 TVL 与 CNC 信噪比无显著差异,示于图 2a。搅拌对 TVL 信号的影响具有时间依赖性,即信噪比随搅拌时间的延长而不断增大;当搅拌时间达到 1 h 后,增加搅拌时长



注:a. *n* = 8, $\bar{x} \pm s$, *** *P* < 0.001 vs 对照组;b. *n* = 8, $\bar{x} \pm s$, *** *P* < 0.001 vs 0 h, ▲ *P* < 0.05, ▲▲ *P* < 0.01 vs 0.5 h

图 2 不同比例混合的 CNC 与 TVL(a)和不同 CNC 搅拌时长(b)获得的谱图信噪比统计结果, 不经 CNC 和经 CNC 处理的 TVL 谱图(c)

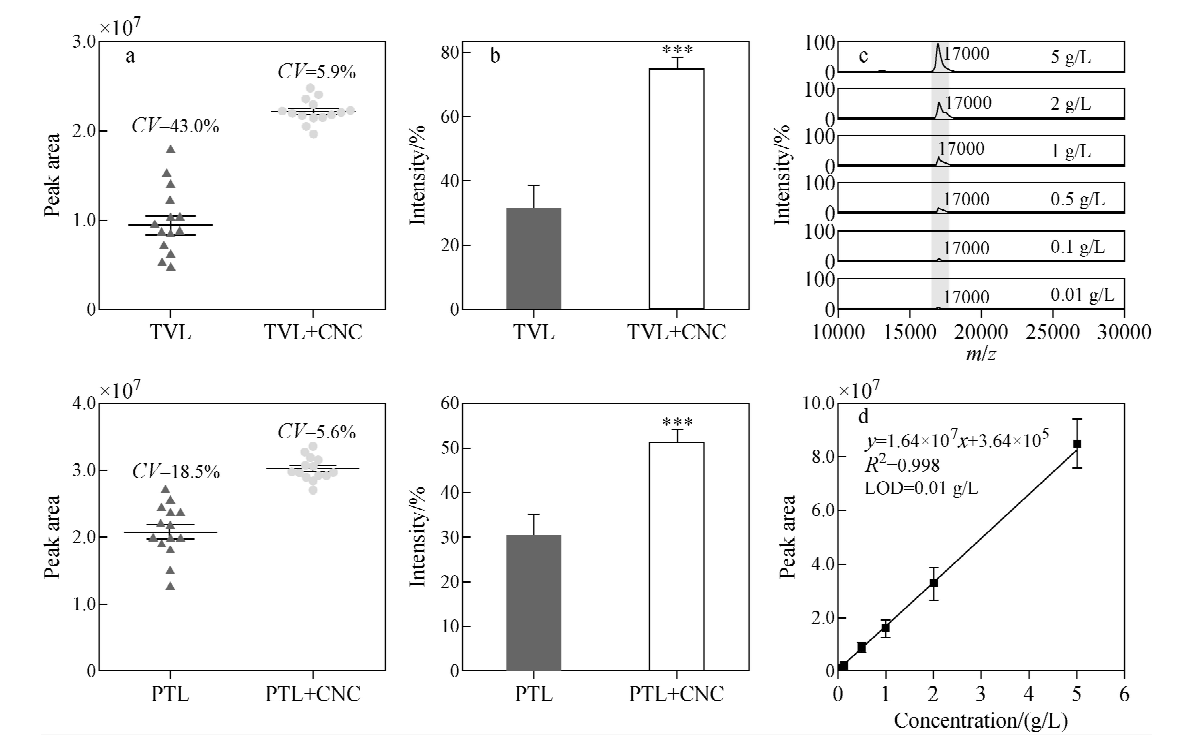
Fig.2 Statistical results of *S/N* of different proportions of CNC and TVL (a) and different stirring time (b), spectra of TVL with or without adding CNC (c)

而信噪比无明显提升,示于图 2b)。为了研究添加 CNC 辅助样本制样对 MALDI-TOF MS 分析完整蛋白灵敏度的影响,以 S/N 为 3 确定方法的检测限。结果表明,TVL 检测限为 10 mg/L,本方法用于完整蛋白分析具有较高的灵敏度。在未使用 CNC 的 TVL 谱图中,不仅可以观察到 m/z 17 000,还可观察到明显的多聚体峰,如 m/z 34 000 二聚体峰、 m/z 51 000 三聚体峰和 m/z 68 000 四聚体峰;而使用 CNC 处理后,这些多聚体峰的强度和数量显著降低,只检测到 m/z 34 000 二聚体峰,示于图 2c)。由于 $[nM+H]^+$ 峰可以诱导产生明显的离子抑制效应并阻碍蛋白 $[nM+H]^+$ 峰的特征,因此,在样品溶液中加入 CNC 以抑制蛋白质的聚集是提高 MALDI-TOF MS 灵敏度的原因之一。

3.2 CNC 辅助制样提高 MALDI-TOF MS 分析重复性和线性

不适当的样品制备方法会导致蛋白分布不

均匀,使 MALDI-TOF MS 分析具有较大的异质性。使用 CNC 处理后,TVL 离子信号的变异系数(coefficient of variation, CV)从 43.0% 降低至 5.9%,PTL 离子信号的 CV 从 18.5% 降低至 5.6%,表明 CNC 处理有利于 MALDI-TOF MS 分析获得较好的重复性,示于图 3a)。此外,使用 CNC 处理后,TVL 和 PTL 的离子信号强度显著提高($P<0.05$),示于图 3b)。为了探讨使用 MALDI-TOF MS 进行定量分析的可行性,检测不同浓度(0.01、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 g/L)的 TVL 标准溶液,结果示于图 3c)。每种浓度的样品平行分析 7 次,得到 7 次检测的平均峰面积,TVL 标准曲线的相关系数(R^2)为 0.998,示于图 3d),表明该方法对 TVL 具有良好的线性关系和进行定量分析的潜力。离子信号的不均匀性会导致数据重复性差,在蛋白质样品溶液制备过程中使用 CNC 辅助样品制备,可以提高 MALDI-TOF MS 分析的重复性,有利于定量分析。

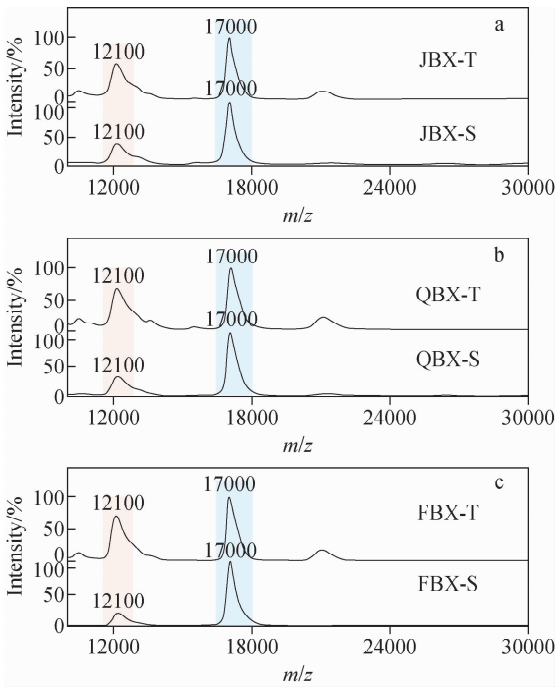


注:a. 经 CNC 处理后的 TVL 和 PTL 离子信号的重复性分析;b. 经 CNC 处理后的 TVL 和 PTL 离子信号强度分析($n=8, \bar{x} \pm s$, *** $P<0.001$ vs TVL 和 PTL);c. 不同浓度的 TVL 标准品谱图;d. CNC 辅助制样 MALDI-TOF MS 法测定 TVL 标准品溶液的线性关系($n=7$)

图 3 不同浓度 TVL 标准品的重复性和线性关系
Fig. 3 Repeatability and linear relationship of TVL standard with different concentrations

3.3 不同炮制程度半夏炮制品中 PTL 含量测定

以 TVL(其相对分子质量接近 PTL,且均为凝集素类蛋白)作为内标,3 种不同半夏炮制过程中块茎和浸泡后上清液的代表性 MALDI-TOF MS 谱图示于图 4,可以清楚地区分 PTL 和 TVL 特征峰。为提高定量的准确性,对 PTL 峰面积进行归一化处理。



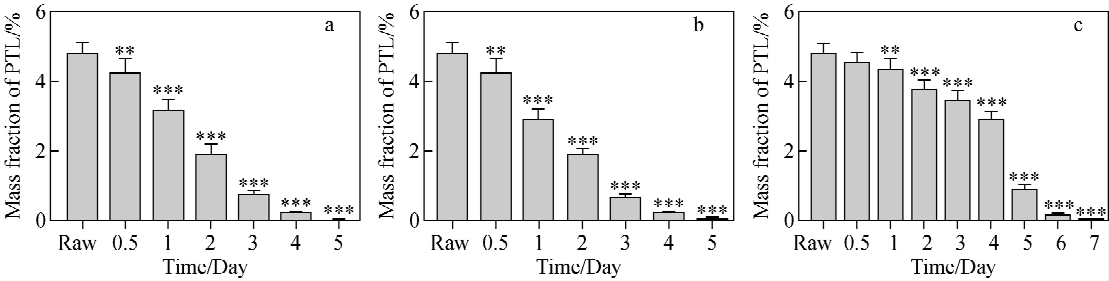
注:JBX-T:姜半夏块茎;JBX-S:姜半夏浸泡上清液;
QBX-T:清半夏块茎;QBX-S:清半夏浸泡上清液;
FBX-T:法半夏块茎;FBX-S:法半夏浸泡上清液

图 4 3 种不同半夏炮制过程中块茎和浸泡后上清液的代表性 MALDI-TOF MS 谱图
Fig. 4 Representative MALDI-TOF MS spectra of tubers and their supernatants during the processing of different *Pinellia ternate*

采用 MALDI-TOF MS 法分析姜半夏、清半夏和法半夏不同炮制程度炮制品中 PTL 含量,以半夏生品组 and 不同炮制时间组的 PTL 质量分数做柱状图,结果示于图 5。与半夏生品组相比,炮制 0.5、1、2、3、4、5 天的 PTL 质量分数均显著下降($P<0.01$),表明随着炮制时间的延长,3 种半夏炮制品的 PTL 含量均显著下降。其中,姜半夏和清半夏炮制 3 天后,PTL 质量分数显著下降($P<0.01$),5 天后未检出 PTL,示于图 5a、5b;法半夏炮制 5 天后,PTL 质量分数显著下降($P<0.01$),7 天后未检出 PTL,示于图 5c。在分别使用白矾水浸泡、甘草石灰水浸泡的方法炮制半夏饮片过程中,由于溶液渗透压高低的差异,半夏块茎中 PTL 逐渐向炮制溶液中渗透,这可能是造成半夏炮制后块茎中 PTL 含量显著下降的原因之一。

3.4 不同炮制程度半夏炮制品浸泡上清液中 PTL 含量测定

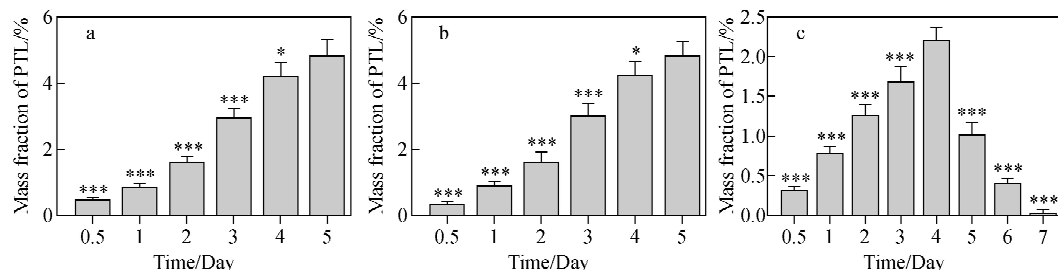
采用 MALDI-TOF MS 法分析姜半夏、清半夏和法半夏不同炮制程度浸泡后上清液中 PTL 含量,以不同炮制时间组半夏炮制上清液 PTL 质量分数做柱状图,结果示于图 6。姜半夏和清半夏炮制 0.5 天时,上清液中 PTL 含量最低,随着炮制时间的延长,2 种半夏浸泡上清液中 PTL 含量均显著上升($P<0.001$),在第 5 天时,浸泡上清液中 PTL 含量最高,示于图 6a、6b;在法半夏炮制 0.5~4 天期间,浸泡上清液中 PTL 含量显著上升,4 天后浸泡上清液中 PTL 含量显著下降($P<0.001$),7 天后上清液中未检测出 PTL,示于图 6c。植物凝集素蛋白的结构稳定性通常受到 pH 值和温度变化的干扰^[30-31],推测造成该现象的原因是法半夏炮制过



注:a. 姜半夏块茎;b. 清半夏块茎;c. 法半夏块茎; $n=8, \bar{x} \pm s$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图 5 不同炮制方法及程度对半夏炮制过程中块茎 PTL 含量的影响

Fig. 5 Statistical results of PTL mass fraction of tubers at different processing methods with different processing time



注:a. 姜半夏上清液;b. 清半夏上清液;c. 法半夏上清液; $n=8, \bar{x} \pm s$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$

图6 不同炮制方法及程度对半夏炮制过程中浸泡后上清液中 PTL 含量的影响

Fig. 6 Statistical results of PTL mass fraction of supernatant at different processing methods with different processing time

程中使用饱和石灰水控制溶液 $\text{pH}>12$,破坏了 PTL 空间结构,使 PTL 变性沉淀。本实验结果与文献^[15]一致,验证了本实验的推测。此外,也有报道^[13]认为,甘草汁是促使 PTL 变性沉淀的原因之一。

总的来说,随着炮制时间的延长,3 种半夏炮制品中 PTL 含量显著下降,其浸泡上清液中 PTL 含量显著上升。由于 pH 值的改变,法半夏浸泡上清液中 PTL 含量呈先上升后下降的趋势。通过检测炮制过程中 PTL 含量的变化,分析了半夏炮制过程对毒性物质 PTL 的影响。该研究为半夏炮制过程中 PTL 的检测提供了可靠方法,也为半夏炮制解毒提供了科学依据。

3.5 不同饮片生产企业生半夏和姜半夏炮制品饮片中 PTL 检测

采用 MALDI-TOF MS 法检测不同饮片生产企业的生半夏和姜半夏炮制品饮片中 PTL,结果示于图 7。可见,3 种不同饮片生产企业的 8 批次生半夏样品中 PTL 含量均较高,而所有姜半夏炮制品饮片中均未检测出 PTL,该实验结果与图 5a 一致。

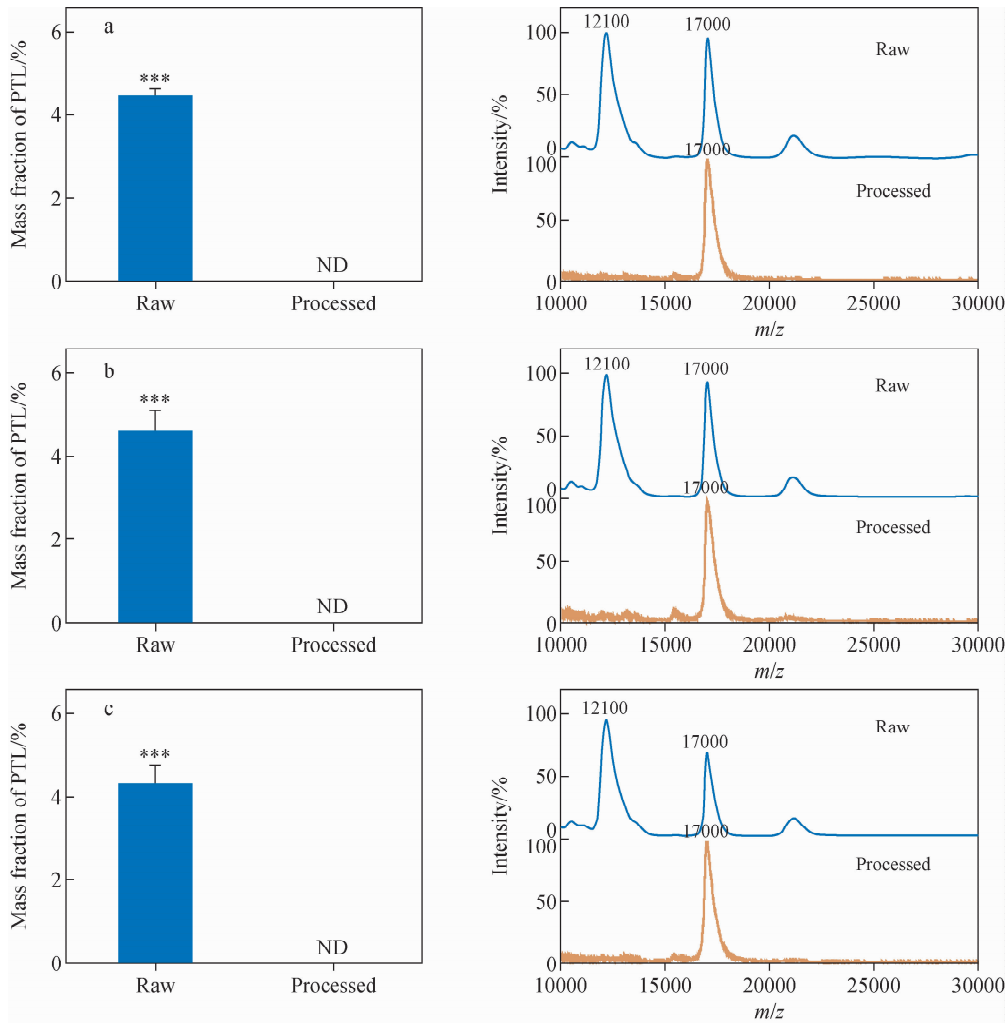
4 结论

本研究使用 MALDI-TOF MS 法检测不同炮制程度半夏炮制品及其浸泡上清液中 PTL 含量,研究半夏不同炮制品炮制过程中 PTL 含量变化。使用与 PTL 相对分子质量接近的 TVL 作为内标进行归一化。结果表明,随着炮制时间的延长,姜半夏、清半夏炮制品中 PTL 含量显著下降,浸泡上清液中 PTL 含量显著上升。由于 pH 值的改变,法半夏浸泡上清液中

PTL 含量呈先上升后下降的趋势。通过检测炮制过程中 PTL 含量的变化,阐释了半夏炮制过程对毒性物质 PTL 的影响。此外,本实验检测了 8 批次不同饮片生产企业的生半夏和半夏炮制品,在生半夏中检测到较高含量的 PTL,而半夏炮制品饮片中未检测出 PTL。该方法可为研究半夏炮制过程中炮制解毒机理,半夏的炮制生产优化、工艺技术创新提供科学依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] ZHANG Z H, ZHAO Y Y, CHENG X L, LIN R C, DAI Z, ZHOU C. Metabonomic study of biochemical changes in the rat urine induced by *Pinellia ternata* (Thunb.) Berit[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 85: 186-193.
- [3] PENG W, LI N, JIANG E, ZHANG C, HUANG Y, TAN L, CHEN R, WU C, HUANG Q. A review of traditional and current processing methods used to decrease the toxicity of the rhizome of *Pinellia ternata* in traditional Chinese medicine[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 299: 115 696.
- [4] ZUO Z, FAN H, WANG X, ZHOU W, LI L. Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity[J]. SpringerPlus, 2012, 1(1): 13.
- [5] LIU X, TIAN X, LIU T, LIANG J. Disclosure of the tuberous lectin composed of homogeneous tetramers in *Pinellia Pedatisceda* Schott[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(4): 1 214-1 223.



注:a. 企业 1;b. 企业 2;c. 企业 3;n=5, $\bar{x}\pm s$,*** $P<0.001$

图 7 不同饮片生产企业生半夏和姜半夏炮制品饮片中 PTL 检测

Fig. 7 Determination of PTL in raw tubers and JBX from different manufacturers

[6] YU H, PAN Y, WU H, GE X, ZHANG Q, ZHU F, CAI B. The alum-processing mechanism attenuating toxicity of Araceae *Pinellia ternata* and *Pinellia pedatisecta*[J]. Archives of Pharmacal Research, 2015, 38(10): 1 810-1 821.

[7] WANG C, BI Q, HUANG D, WU S, GAO M, LI Y, XING L, YAO S, GUO D A. Identification of *Pinelliae* Rhizoma and its counterfeit species based on enzymatic signature peptides from toxic proteins[J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2022, 107: 154 451.

[8] 朱法根, 郁红礼, 吴皓, 史润均, 陶文婷, 邱韵紫. 半夏凝集素蛋白与半夏毒针晶毒性的相关性研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7): 1 007-1 011. ZHU Fagen, YU Hongli, WU Hao, SHI Runjun, TAO Wenting, QIU Yunying. Correlation of *Pinellia ternata* agglutinin and *Pinellia ternata* raphides' toxicity[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(7): 1 007-1 011 (in Chinese).

[9] LI J, WANG W, YUAN Y, CUI X, BIAN H, WEN H, ZHANG X, YU H, WU H. *Pinellia ternata* lectin induces inflammation through TLR4 receptor and mediates PI3K/Akt/mTOR axis to regulate NF- κ B signaling pathway[J]. Toxicology, 2023, 486: 153 430.

[10] YU H L, ZHAO T F, WU H, PAN Y Z, ZHANG Q, WANG K L, ZHANG C C, JIN Y P. *Pinellia ternata* lectin exerts a pro-inflammatory effect on macrophages by inducing the release of pro-inflammatory cytokines, the acti-

- vation of the nuclear factor- κ B signaling pathway and the overproduction of reactive oxygen species[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2015, 36(4): 1 127-1 135.
- [11] LIU Y, NOSE I, TERASAKA K, FUEKI T, MAKINO T. Heating or ginger extract reduces the content of *Pinellia ternata* lectin in the raphides of *Pinellia tuber*[J]. Journal of Natural Medicines, 2023, 77(4): 761-773.
- [12] 程砚秋, 郁红礼, 吴皓, 陶兴宝, 谢雨薇, 陈盛君, 张萍, 李松, 王彩霞, 王贺鹏, 曾平, 刘冰冰. 半夏不同炮制品刺激性毒性变化及凝集素蛋白检测研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(17): 4 627-4 633.
- CHENG Yanqiu, YU Hongli, WU Hao, TAO Xingbao, XIE Yuwei, CHEN Shengjun, ZHANG Ping, LI Song, WANG Caixia, WANG Hepeng, ZENG Ping, LIU Bingbing. Irritant toxicity and lectin content of different processed products of *Pinelliae Rhizoma*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(17): 4 627-4 633(in Chinese).
- [13] 李书晖, 郁红礼, 吴皓, 张元斌, 王卫. 法半夏炮制过程对半夏中毒蛋白凝集素蛋白的影响[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(11): 2 546-2 551.
- LI Shuhui, YU Hongli, WU Hao, ZHANG Yuanbin, WANG Wei. Effect of *Pinelliae Rhizoma* processed with lime and licorice on toxic lectin protein[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(11): 2 546-2 551(in Chinese).
- [14] FUEKI T, TANAKA K, OBARA K, KAWAHARA R, NAMIKI T, MAKINO T. The acrid raphides in tuberous root of *Pinellia ternata* have lipophilic character and are specifically denatured by ginger extract[J]. Journal of Natural Medicines, 2020, 74(4): 722-731.
- [15] 陶兴宝, 吴皓. 石灰水炮制半夏对毒性成分凝集素蛋白的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(4): 951-957.
- TAO Xingbao, WU Hao. Effect of lime water processing of *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* on toxic component lectin protein[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(4): 951-957(in Chinese).
- [16] WU X, XIONG E, AN S, GONG F, WANG W. Sequential extraction results in improved proteome profiling of medicinal plant *Pinellia ternata* tubers, which contain large amounts of high-abundance proteins[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50497.
- [17] 谢雨薇, 郁红礼, 吴皓, 陶兴宝, 王贺鹏, 程砚秋, 王彩霞, 曾平, 刘冰冰, 张萍, 崔小兵. 半夏凝集素蛋白单克隆抗体的制备及双抗夹心 ELISA 的建立[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6 076-6 081.
- XIE Yuwei, YU Hongli, WU Hao, TAO Xingbao, WANG Hepeng, CHENG Yanqiu, WANG Caixia, ZENG Ping, LIU Bingbing, ZHANG Ping, CUI Xiaobing. Preparation of monoclonal antibodies against *Pinellia ternata* lectin protein and establishment of double-antibody sandwich ELISA[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(22): 6 076-6 081(in Chinese).
- [18] SHAN L, GAO H, ZHANG J, LI W, SU Y, GUO Y. Plasma and serum exosome markers analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry coupled with electron multiplier[J]. Talanta, 2022, 247: 123 560.
- [19] SHAN L, XU X, ZHANG J, CAI P, GAO H, LU Y, SHI J, GUO Y, SU Y. Increased hemoglobin and heme in MALDI-TOF MS analysis induce ferroptosis and promote degeneration of herniated human nucleus pulposus[J]. Molecular Medicine, 2021, 27(1): 103.
- [20] MAUS A, MIGNON R, BASILE F. Enhanced protein identification using graphite-modified MALDI plates for offline LC-MALDI-MS/MS bottom-up proteomics[J]. Analytical Biochemistry, 2018, 545: 31-37.
- [21] CUPP-SUTTON K A, WU S. High-throughput quantitative top-down proteomics[J]. Molecular Omics, 2020, 16(2): 91-99.
- [22] SMITH L M, KELLEHER N L, LINIAL M, GOODLETT D, LANGRIDGE-SMITH P, GOO Y A, SAFFORD G, BONILLA L, KRUPPA G, ZUBAREV R, RONTREE J, CHAMOT-ROOKE J, GARAVELLI J, HECK A, LOO J, PENQUE D, HORNSHAW M, HENDRICKSON C, PASA-TOLIC L, BORCHERS C, CHAN D, YOUNG N, AGAR J, MASSELON C, GROSS M, McLAFFERTY F, TSYBIN Y,

- GE Y, SANDERS I, LANGRIDGE J, WHITELEGGE J, MARSHALL A. The consortium for top down proteomics. Proteoform; a single term describing protein complexity[J]. Nature Methods, 2013, 10: 186-187.
- [23] HUANG C, WANG J, LV X, LIU L, LIANG L, HU W, LUO C, WANG F, YUAN Q. Redefining molecular amphipathicity in reversing the “coffee-ring effect”: implications for single base mutation detection[J]. Langmuir; the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2018, 34(23): 6 777-6 783.
- [24] WU Z, KHAN M, MAO S, LIN L, LIN J M. Combination of nano-material enrichment and dead-end filtration for uniform and rapid sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. Talanta, 2018, 181: 217-223.
- [25] ZHANG C, WU Z, GAO X, WANG X, LI H, LIN J M. Ion addition by electrolysis to improve the quantitative analysis of bacteria with MALDI-TOF MS[J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(2): 739-746.
- [26] LIU H, HAN M, LI J, QIN L, CHEN L, HAO Q, JIANG D, CHEN D, JI Y, HAN H, LONG C, ZHOU Y, FENG J, WANG X. A caffeic acid matrix improves *in situ* detection and imaging of proteins with high molecular weight close to 200 000 Da in tissues by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(35): 11 920-11 928.
- [27] LI S, ZHANG Y, LIU J, HAN J, GUAN M, YANG H, LIN Y, XIONG S, ZHAO Z. Electrospray deposition device used to precisely control the matrix crystal to improve the performance of MALDI MSI[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37 903.
- [28] LUO Y, SONG C, MAO J, PENG Z, SUN S, ZHANG Y, YU A, ZHANG W, ZHAO W, OUYANG G. Developing a noncontact heating matrix spraying apparatus with controllable matrix film formation for MALDI mass spectrometry imaging[J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(35): 12 136-12 143.
- [29] LOMBARDO S, EYLEY S, SCHÜTZ C, van GORP H, ROSENFELDT S, van den MOOTER G, THIELEMANS W. Thermodynamic study of the interaction of bovine serum albumin and amino acids with cellulose nanocrystals[J]. Langmuir; the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2017, 33(22): 5 473-5 481.
- [30] CHEHÍN R, ILORO I, MARCOS M J, VILLAR E, SHNYROV V L, ARRONDO J L. Thermal and pH-induced conformational changes of a beta-sheet protein monitored by infrared spectroscopy[J]. Biochemistry, 1999, 38(5): 1 525-1 530.
- [31] SOBRAL P A, PALAZOLO G G, WAGNER J R. Thermal behavior of soy protein fractions depending on their preparation methods, individual interactions, and storage conditions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(18): 10 092-10 100.

(收稿日期:2023-11-28;修回日期:2024-01-12)