

## 基于解吸电喷雾质谱成像技术分析番红花球茎中代谢物的组织分布

陈希, 谢星光, 冯坤苗, 陆颖洁, 韩婷

### Analysis of tissue distribution of metabolites in *Crocus sativus* L. corms based on DESI mass spectrometry imaging technique

CHEN Xi, XIE Xingguang, FENG Kunmiao, LU Yingjie, HAN Ting

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202310055>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

不同比活度<sup>11</sup>C-氟马西尼体内代谢的差异分析

The metabolic analysis of <sup>11</sup>C-flumazenil in different specific radioactivity

药学实践与服务. 2020, 38(4): 318-321 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202003141

HPLC法测定人血浆中伏立康唑及其代谢物的浓度

Determination of voriconazole and its metabolites in human plasma by HPLC

药学实践与服务. 2019, 37(2): 162-165 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.012

HPLC法测定条叶旋覆花不同部位中线叶旋覆花内酯A的含量

Determination of britanin content in different parts of *Inula linariifolia* Turcz by HPLC

药学实践与服务. 2020, 38(3): 245-249 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202001049

高效液相色谱法测定不同产地假中的 $\alpha$ -细辛脑含量

Determination of content of  $\alpha$ -Asarone in *Piper sarmentosum* Roxb. from different habitats by HPLC

药学实践与服务. 2019, 37(4): 348-351 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.012

不同产地藤茶中二氢杨梅素含量及其与牛蒡子配伍的药效学研究

Therapeutic effects study on the contents of dihydromyricetin in ampelopsis grossedentata from different places and their compatibility with fructus arctiine

药学实践与服务. 2021, 39(3): 255-258, 266 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202103084

基于UPLC-Q-TOF/MS平台的结晶肾损伤小鼠的尿液代谢组学研究

Urinary metabolomics study on mice renal injury caused by calcium oxalate crystal based on UPLC-Q-TOF/MS platform

药学实践与服务. 2019, 37(2): 126-134 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.006



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

## 基于解吸电喷雾质谱成像技术分析番红花球茎中代谢物的组织分布

陈 希, 谢星光, 冯坤苗, 陆颖洁, 韩 婷 (海军军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的** 探究不同产地番红花球茎中内源性代谢物的分布特征。**方法** 利用解吸电喷雾(DESI)质谱成像技术, 通过优化样品前处理, 建立了一种对番红花球茎内源性代谢物可视化分析的方法。**结果** 实现了黄酮、有机酸、氨基酸、类胡萝卜素和环烯醚萜苷等代谢物的原位表征; L-瓜氨酸、苯乙酰甘氨酸、紫苜蓿酚和梔子苷等特异性分布在球茎中; 芹菜素 7-(6"-O-乙酰基)-葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、蜀黍甙 6'-葡萄糖苷、芹菜素 7-O-二葡萄糖醛酸主要分布在顶芽中; 对于在球茎部位分布的化合物, 产于上海的番红花球茎丰度最高, 浙江次之, 安徽最低。**结论** 番红花球茎在不同产地及同一产地不同部位的代谢物分布存在显著差异, 黄酮和黄酮衍生物如异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、芹菜素衍生物主要分布于顶芽中, 此外, 天然植物保护剂蜀黍甙 6'-葡萄糖苷也主要在顶芽分布, 而作为能量和物质供应的氨基酸则主要积累在球茎。

**[关键词]** 番红花球茎; 解吸电喷雾质谱成像; 不同产地; 不同部位; 代谢物分布

**[文章编号]** 2097-2024(2024)04-0169-04

**[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202310055

## Analysis of tissue distribution of metabolites in *Crocus sativus* L. corms based on DESI mass spectrometry imaging technique

CHEN Xi, XIE Xingguang, FENG Kunmiao, LU Yingjie, HAN Ting (Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the distribution characteristics of endogenous metabolites in *Crocus sativus* L. corms from different origins. **Methods** A method based on desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging and optimized sample pretreatment was developed for directly visualize metabolites in *C. sativus* corms. **Results** In situ characterization of metabolites such as flavonoids, organic acids, amino acids, carotenoids, and cyclic enol ether terpene glycosides was achieved. L-Citrusine, phenylacetyl-glycine, sativol, and geniposide were specifically distributed in the corms. Apigenin 7-(6"-O-acetyl)-glucoside, isorhamnetin-3-O-β-D-Glucoside, dhurrin 6'-glucoside, and Apigenin 7-O-diglucuronide were mainly distributed in the terminal bud. For compounds distributed in the corms, the highest abundance was found in corms from Shanghai, followed by Zhejiang and the lowest from Anhui. **Conclusion** The distribution of metabolites in different parts of *C. sativus* corms from different origins and the same origin varies significantly. Flavonoids and flavonoid derivatives such as isorhamnetin-3-O-β-D-Glucoside and apigenin derivatives are mainly distributed in the terminal buds, in addition, the natural plant protection agent dhurrin 6'-glucoside is also mainly distributed in the terminal corms, whereas amino acids, which are used as energy and material supplies, are mainly accumulated in the corms.

**[Key words]** *Crocus sativus* L. corms; desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging; different origins; different parts of *C. sativus* corms; metabolite distribution

西红花, 为鸢尾科多年生植物番红花 (*Crocus sativus* L.) 的干燥柱头, 具有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神等功效<sup>[1]</sup>。番红花是三倍体不育植物, 只能通过被称为球茎的块状球茎无性繁殖。西红花

的产量和品质与球茎大小直接相关<sup>[2]</sup>。而球茎中包含的有机酸、脂肪酸、萜类等化合物<sup>[3]</sup>与球茎生长代谢过程密切相关, 并在很大程度上影响球茎的大小。然而, 目前球茎中内源性代谢物的分析方法均需要将样本进行匀浆后检测, 这就会造成空间信息的丢失, 无法实现原位分析。因此, 利用新的技术手段研究番红花球茎中内源性代谢物的空间分布规律至关重要。

解吸电喷雾电离质谱成像 (DESI-MSI) 无需复杂的预处理步骤, 可直接对样品进行可视化分析<sup>[4]</sup>。目前已在解析植物内源性代谢物的空间定位方面

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(82174091); 上海市崇明区“可持续发展科技创新行动计划”(CK2021-03)

**[作者简介]** 陈 希, 硕士研究生, 研究方向: 生药品质优化, Tel: 19997980354, Email: traxichen@163.com

**[通信作者]** 陆颖洁, 讲师, 研究方向: 中药活性物质的原位表征, Email: fgbddxc@126.com; 韩 婷, 教授, 研究方向: 中药活性物质及品质调控, Email: hanting@smmu.edu.cn

显示出强大的分析能力。本研究通过优化切片厚度,建立了一种灵敏、高覆盖的质谱成像分析方法,以可视化番红花球茎中内源性代谢物在不同产地及同一产地不同部位的空间分布,实现了番红花球茎中黄酮、有机酸、氨基酸、类胡萝卜素和环烯醚萜苷的原位表征。为探究番红花全生命周期内的生长过程和开展番红花球茎种质筛选提供了新的技术支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器和试剂

1900-冷冻切片仪(浙江益迪医疗科技有限公司);SYNAPT G2-Si HDMS 质谱成像仪、HD Imaging 质谱成像数据分析软件(Waters 公司);标准级显微镜载玻片(上海泰坦科技股份有限公司)。

OCT 包埋剂(美国樱花 SAKURA 公司);甲醇(HPLC 级,美国 Merck 公司)。

### 1.2 样品收集和前处理

番红花球茎分别购自上海崇明、浙江建德和安徽亳州西红花种植合作社,批号分别为 20230901SH、20230830ZJ、20230830AH,经海军军医大学韩婷教授鉴定。将新鲜球茎置于冷冻切片仪中预冷 30 min 之后,用 OCT 包埋剂固定于切片仪样品托上。连续切片,分别制备成 20、30、40、50  $\mu\text{m}$  的切片,黏附于载玻片上,在室温下干燥 20 min 后备用。

### 1.3 DESI 质谱成像分析

将准备好的组织切片置于 X 轴和 Y 轴二维操控台上,使用 SYNAPT G2-Si HDMS 质谱成像仪在正离子模式下进行检测。检测的质荷比( $m/z$ )范围设定为 50 ~ 650;空间分辨率为 200  $\mu\text{m}$ ;施加在电喷雾针上的电压为 3.0 kV;电喷雾针与二维操控台的角度为 38°;离子传输管温度为 100 °C;二维操控平台移动速度为 200  $\mu\text{m}/\text{s}$ 。质谱成像原始数据文件利用 HD imaging 软件转化成图片,用总离子流图进行归一化。

## 2 结果和讨论

### 2.1 切片厚度的优化

组织切片是获得高质量质谱成像图像的关键步骤<sup>[5]</sup>。组织切片的厚度会影响切片的完整性,如果碎裂就无法获得完整的空间分布图像<sup>[6]</sup>。质谱成像在动物、人体内源性代谢物的可视化分布研究起步较早。对于哺乳动物组织,推荐 5 ~ 20  $\mu\text{m}$  作为检测低分子量的最优厚度<sup>[7]</sup>。然而受限于植物组织富含水分,组织容易破碎的特点,难以制成薄

片。为了获得高质量质谱图片,本研究进行了切片厚度的优化。在番红花球茎中,除了水分之外,淀粉是其干物质的重要组成部分之一<sup>[8]</sup>,因此切片时成形性较差,极易造成组织破碎、结构不完整。本研究选用在 20 ~ 50  $\mu\text{m}$  之间的浙江建德球茎,以 10  $\mu\text{m}$  为梯度,进行了 4 个不同的切片厚度探索。结果表明,切片厚度为 20  $\mu\text{m}$  时,顶芽部位存在大部分缺失,球茎部分也存在部分碎裂;30  $\mu\text{m}$  和 40  $\mu\text{m}$  时,顶芽的部位切片完整,但球茎部分仍然不完整,其中 40  $\mu\text{m}$  球茎完整度好于 30  $\mu\text{m}$ ;而 50  $\mu\text{m}$  切片整体完整度较高,能良好的呈现球茎和顶芽形态(图 1)。因此本研究选择 50  $\mu\text{m}$  切片厚度进行后续质谱成像检测。

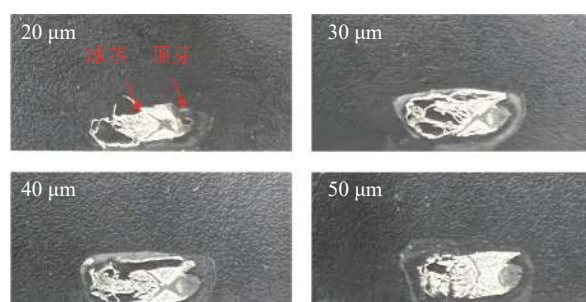


图 1 不同切片厚度的优化

### 2.2 代谢物在球茎不同部位中的分布特征

使用优化的条件直接进行 DESI-MSI 检测,获得球茎切片在正离子模式下的平均质谱图,如图 2 所示,可以观测到丰富的信号峰,其中,  $m/z$  范围在 150 ~ 400 之间信号丰度较高,在 450 ~ 650 范围内也观察到不少代谢物,但是丰度较低。用总离子流图进行归一化后在 HD imaging 软件中提取质荷比,结合数据库和已报道文献检索,共获得了 66 种化合物的空间分布信息。其中,观察到代谢物在球茎的不同部位具有不同的分布特征。

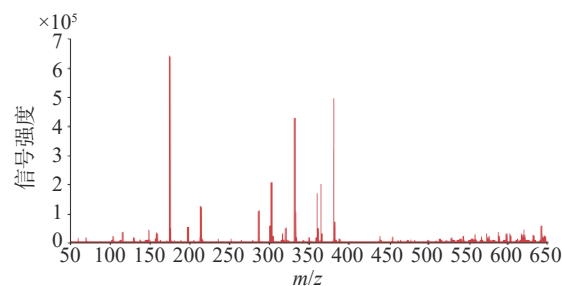


图 2 番红花球茎在正离子模式下的 DESI 质谱图

值得关注的是,芹菜素 7-(6"-O-乙酰基)-葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、蜀黍氰苷 6'-葡萄糖苷几乎只分布在顶芽中;芹菜素 7-O-二葡萄糖醛酸

同样主要分布在顶芽中,球茎部分也有少量分布(图3)。蜀黍氰苷是广泛分布于植物界的一种含氮化合物,通过在食草动物的组织破裂时释放氰化氢而起到化学防御作用<sup>[9]</sup>。在萌发的高粱种子中,发现蜀黍氰苷主要积累在萌发的胚芽中<sup>[10]</sup>。本研究中观察到蜀黍氰苷主要在番红花球茎萌发的顶芽

中分布,与文献报道一致,其分布的特异性可能是由于对抗食草动物从而保护新兴的组织。黄酮类化合物作为中药成分的重要药效部分,具有一定的抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡等作用<sup>[11]</sup>。异鼠李素-3-O-葡萄糖苷在西红柿中已有检测,本次发现其在顶芽中丰度较高,推测与芽承担运输功能有关。

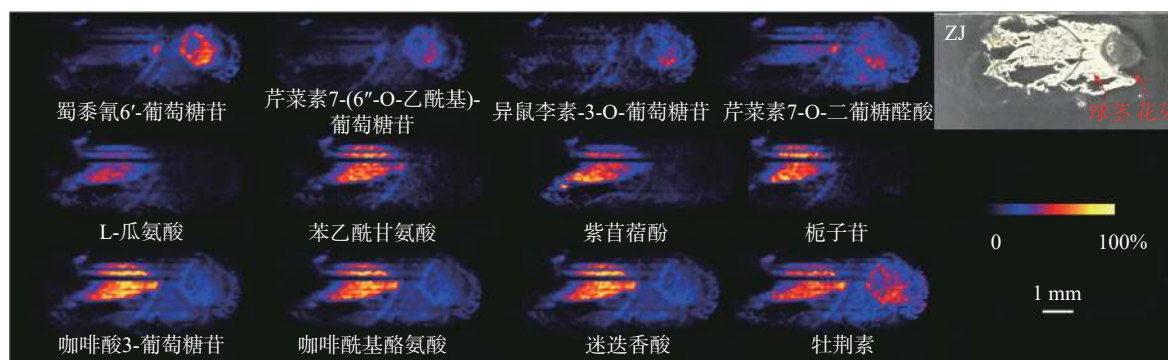


图3 浙江建德番红花球茎中不同部位代表性代谢物的质谱成像图

在球茎中,主要观察到氨基酸和部分次生代谢物的分布,如L-瓜氨酸、苯乙酰甘氨酸、紫苜蓿酚和栀子苷等均只特异性分布在球茎中(图3)。氨基酸作为一种重要的初生代谢物,不仅在植物生长发育过程中发挥着不可或缺的角色,还是生物碱合成的重要前体<sup>[12]</sup>。因球茎是番红花的营养器官,故氨基酸主要积累于球茎部位,为其生长提供所需物质和能量。

某些化合物在顶芽和球茎中均可以观察到,如咖啡酸3-葡萄糖苷、咖啡酰基酪氨酸、迷迭香酸和牡荆素(图3)。有趣的是,酪氨酸除了分布于球茎部分,在顶芽中也有不少分布。研究表明,酪氨酸参与植物色素合成且是生物碱合成的重要前体<sup>[12]</sup>,其在球茎和顶芽中均有分布,说明球茎在萌发过程中已经开始色素和生物碱合成的准备。

### 2.3 代谢物在不同产地番红花球茎中的分布特征

总体来说,大多数化合物都呈现出一致的分布规律。对于在球茎部位分布的化合物来说,在上海的球茎中丰度最高,浙江次之,安徽最低,但是浙江球茎检测到的化合物种类最多。此外,我们还观察到了某些化合物在不同产地具有不同的分布规律。如栀子苷、蜀黍氰苷6'-葡萄糖苷和芹菜素7-(6'-O-乙酰基)-葡萄糖苷在上海球茎中未观察到分布,而异鼠李素-3-O-葡萄糖苷在安徽球茎中未观察到分布(图4)。番红花喜凉怕酷热、怕严寒、喜湿润,对生长环境要求较高<sup>[13]</sup>。上海崇明地处中国最大河流长江入海口,气候温和湿润,年平均气温

16.5℃,年平均降雨量1128.9mm;浙江建德年平均气温17.8℃,年降水量1905.1mm,气候同样温暖湿润;而安徽亳州年平均气温14.9℃,属温带半湿润气候区,年平均降雨量仅831mm。与安徽亳州相比,上海崇明和浙江建德的气候特点显然更适于番红花生长。同时,从光学照片可以发现,浙江球茎的顶芽分化早于上海和安徽球茎,这可能是浙江球茎内代谢物较为丰富的原因之一。

## 3 结论

本文通过优化切片厚度,利用DESI质谱成像技术对不同产地番红花球茎内源性代谢物的分布特征进行了可视化研究,实现了黄酮、类胡萝卜素、氨基酸和有机酸的原位表征。不同化合物在球茎不同部位显示出不同分布,其中蜀黍氰苷6'-葡萄糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、芹菜素衍生物主要分布于顶芽中,而作为能量和物质供应的氨基酸则主要积累在球茎。此外,不同产地的番红花球茎也存在较大差异。从成像丰度来看,上海的球茎物质丰度较高,其次是浙江,安徽丰度最低。就化合物的分布规律而言,大部分代谢物在不同产地球茎中分布是一致的,但也观察到了一些差异。如栀子苷、蜀黍氰苷6'-葡萄糖苷和芹菜素7-(6'-O-乙酰基)-葡萄糖苷在上海未观察到分布,而异鼠李素-3-O-葡萄糖苷仅在上海和浙江产地观察到分布。我们推测,这可能是由于不同地域的温度、湿度等环境因素所致。本研究首次可视化了不同产地番红

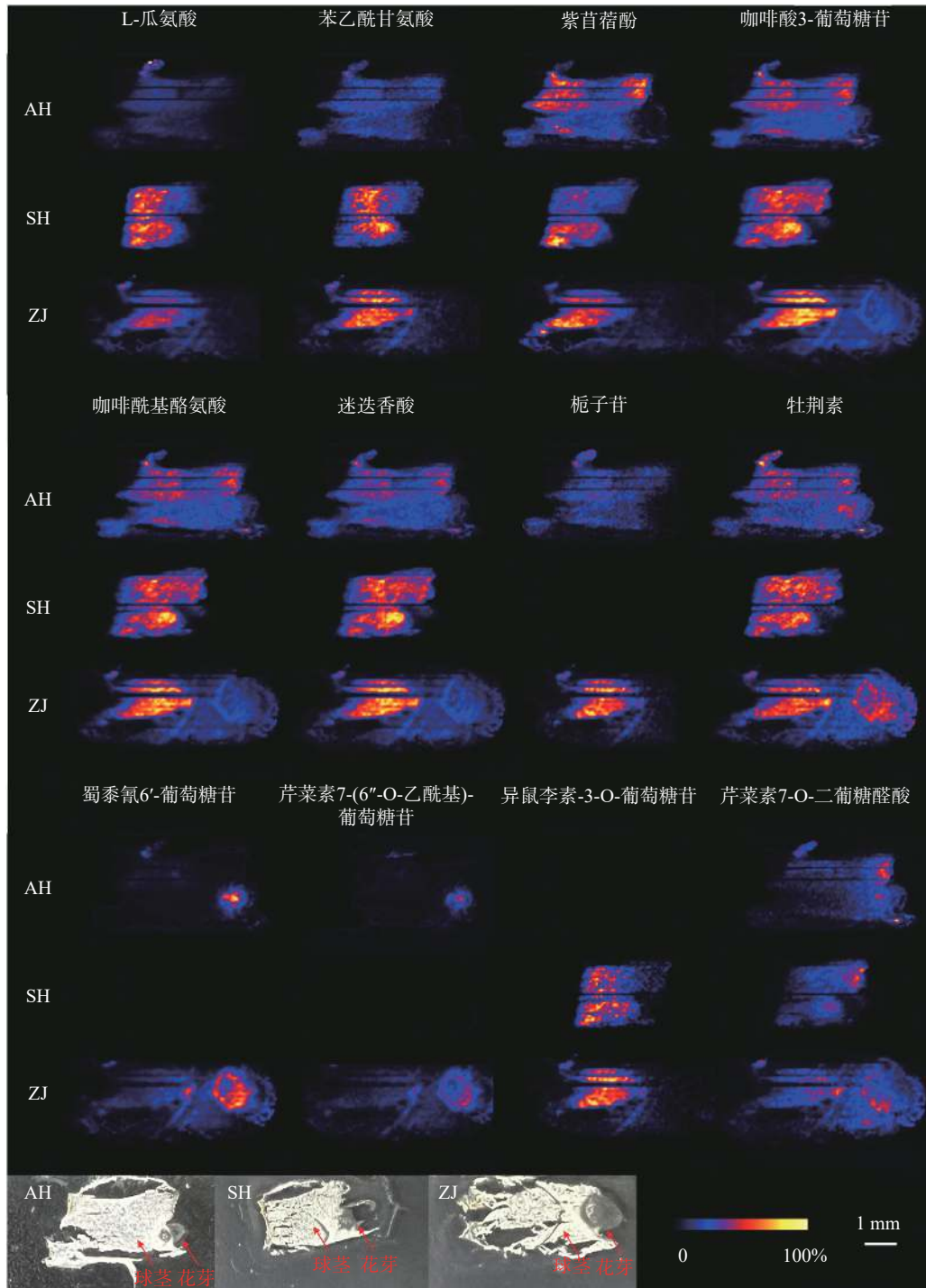


图4 不同产地番红花球茎中代表性代谢物的质谱成像图

AH. 安徽亳州; SH. 上海崇明; ZJ. 浙江建德

花球茎中不同物质在不同部位的分布特征,为探究番红花全生命周期内的生长过程和开展番红花球茎种质筛选提供了新的技术支持。

#### 【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)2020年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] AHRAZEM O, RUBIO-MORAGA A, NEBAUER S G, et al. Saffron: its phytochemistry, developmental processes, and biotechnological prospects[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(40): 8751-8764.
- [3] MOHTASHAMI L, AMIRI M S, RAMEZANI M, et al. The genus *Crocus* L.: a review of ethnobotanical uses, phytochemistry and pharmacology[J]. *Ind Crops Prod*, 2021, 171: 113923.
- [4] WISEMAN J M, IFA D R, SONG Q Y, et al. Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(43): 7188-7192.

(下转第180页)

- of the cAMP signaling pathway[J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(1): 278-309.
- [39] WANG Y N, LIU Q, KANG S G, et al. Dietary bioactive ingredients modulating the cAMP signaling in diabetes treatment[J]. *Nutrients*, 2021, 13(9): 3038.
- [40] SADEK M S, CACHORRO E, EL-ARMOUCHE A, et al. Therapeutic implications for PDE2 and cGMP/cAMP mediated crosstalk in cardiovascular diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7462.
- [41] 张晓因, 孙长鑫, 陈纪焯, 等. 基于“异病同治”理论探讨四妙勇安汤在心血管疾病中的应用 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(5): 946-949.
- [收稿日期] 2023-05-22 [修回日期] 2023-11-23  
[本文编辑] 崔俐俊
- ~~~~~

(上接第 172 页)

- [5] WANG X F, ZHANG L, XIANG Y H, et al. Systematic study of tissue section thickness for MALDI MS profiling and imaging[J]. *Analyst*, 2023, 148(4): 888-897.
- [6] DONG Y H, LI B, MALITSKY S, et al. Sample preparation for mass spectrometry imaging of plant tissues: a review[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 60.
- [7] SUGIURA Y, SHIMMA S, SETOU M. Thin sectioning improves the peak intensity and signal-to-noise ratio in direct tissue mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrom Soc Jpn*, 2006, 54(2): 45-48.
- [8] 张永珊. 藏红花球茎生物学特性及繁育增殖初步研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- [9] YADAV M, SINGH I K, SINGH A. Dhurrin: a naturally occurring phytochemical as a weapon against insect herbivores[J]. *Phytochemistry*, 2023, 205: 113483.
- [10] MONTINI L, CROCOLLO C, GLEADOW R M, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging of metabolites during Sorghum germination[J]. *Plant Physiol*, 2020, 183(3): 925-942.
- [11] WEN K M, FANG X C, YANG J L, et al. Recent research on flavonoids and their biomedical applications[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(5): 1042-1066.
- [12] 王广莘, 韩翠婷, 葛珈铭, 等. 氮的吸收同化以及在药用植物组织培养中的应用 [J]. *中药材*, 2023(9): 2353-2560.
- [13] 杨芙蓉, 冉家栋, 齐耀东, 等. 西红花全球生态适宜区预测及生态特征 [J]. *中国现代中药*, 2021, 23(9): 1534-1541.
- [收稿日期] 2023-10-30 [修回日期] 2024-01-30  
[本文编辑] 陈盛新