

基质辅助激光解析质谱成像可视化分析桔梗皂苷空间分布

徐丽丽, 崔亚鹏, 刘娟, 陈双喜*

河南大学生命科学学院 分析测试中心, 河南 开封 475004

摘要: 目的 基质辅助激光解析质谱成像 (matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging, MALDI-MSI) 是一种新型的分子成像技术, 具有样本处理简单、免标记、空间分辨率高、检测范围广以及可视化的特点。通过 MALDI-MSI 技术探索皂苷类物质在桔梗 *Platycodon grandiflorum* 中的空间分布特征。方法 根据桔梗浸提液在 2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)、9-氨基吖啶 (9-aminoacridine, 9-AA) 3 种基质作用下采集的质谱信号响应强度, 选择 DHB 作为成像的喷涂基质。将厚度为 25 μm 的桔梗冷冻切片经真空干燥后, 使用基质喷涂仪在循环 60 次、湿度为 40%, 孵育时间为 30 s 的条件下, 将 DHB 均匀地覆盖于切片上。在正离子反射模式下采集质量范围为 m/z 200~1 600 的质谱信号用于 MALDI-MSI 分析。结果 在桔梗的周皮、韧皮部、形成层、木质部和髓部, 观察到 12 种具有显著空间分布差异的离子峰。经傅里叶变换离子回旋共振质谱 (fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FT-ICR MS) 分析其精确相对分子质量、分子式、同位素峰以及碎片离子, 最终确认为桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 C、桔梗皂苷 E 和桔梗皂苷 J 等 12 种桔梗皂苷。结论 为桔梗中皂苷类成分空间分布情况的表征提供了可视化的方法。

关键词: 基质辅助激光解析飞行时间质谱; 质谱成像; 桔梗; 桔梗皂苷 D; 桔梗皂苷 C; 桔梗皂苷 E; 桔梗皂苷 J; 傅里叶变换离子回旋共振质谱

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)07-2268-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.07.004

Visualization analysis of spatial distribution of saponins in *Platycodon grandiflorum* by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging

XU Lili, CUI Yapeng, LIU Juan, CHEN Shuangxi

Analytical and Testing Center, School of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: Objective Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) is an innovative technology, which has the characteristics of simple sample processing, absence of labeling, high spatial resolution, wide detection range and visualization capabilities. The spatial distribution characteristics of saponins in *Platycodon grandiflorum* were studied by MALDI-MSI technique. **Methods** Mass spectrometry signals were obtained from the mixtures of *P. grandiflorum* extract with three matrices, including 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), and 9-aminoacridine (9-AA). DHB was confirmed as the preferred imaging spray matrix. After 25 μm thick frozen sections of *P. grandiflorum* being vacuum dried, DHB was uniformly sprayed on the section surface using a matrix sprayer under conditions of 60 cycles, 40% humidity, and an incubation time of 30 s. Mass spectrum signals with a mass range of 200—1 600 m/z were collected in positive ion reflection mode for MALDI-MSI analysis. **Results** The results showed that 12 kinds of ion peaks with significant spatial distribution difference were observed in periderm, phloem, cambium, xylem and pith of *P. grandiflorum*. The precise molecular weight, molecular formula, isotopic peak and fragment ions were analyzed by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS), and 12 kinds of saponins were identified. **Conclusion** This study provided a visualization method for the characterization of the spatial distribution of saponins in *P. grandiflorum*.

Keywords: Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; Mass spectrometry imaging; *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC.; platycodin D; platycodin C; platycodin E; platycodin J; Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry

收稿日期: 2024-10-15

作者简介: 徐丽丽 (1999—), 硕士研究生, 研究方向为药学。E-mail: 2211692048@qq.com

*通信作者: 陈双喜 (1973—), 教授, 硕士生导师, 研究方向为微生物资源开发与利用。E-mail: csx1231@126.com

桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC 又名和尚帽、土人參、铃铛花、灯笼花^[1], 是桔梗科桔梗属的药食同源植物。据《中国药典》2020 年版记载, 其性味苦、辛、平, 具有宣肺利咽、祛痰排脓的功效^[2]。研究发现, 桔梗还具有抗氧化、抗肿瘤、抗糖尿病、心血管保护和肝保护作用等药理作用^[3-4]。桔梗根中的药效成分种类众多, 其中三萜皂苷类成分是其主要的药效成分^[5]。

桔梗根中皂苷类成分的研究常采用色谱-质谱联用的方法^[6-7], 但该类方法无法给出皂苷类成分的原位信息。基质辅助激光解吸质谱成像 (matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging, MALDI-MSI) 技术是一种创新型技术, 用于从组织或细胞水平上研究目标分子或离子的组成及分布情况, 在药物的临床监测、药动学研究、代谢物的成像分析、生物代谢标志物的发现及药物活性成分的鉴定等方面发挥着重要作用^[8-10]。研究人员使用 MALDI-MSI 技术对芍药根^[11]、甘草^[12]、银杏叶^[13-14]、人參^[15]、三七^[16]等中药进行相关代谢产物的分布研究, 揭示了中药代谢产物的空间分布特征和相对含量。

本研究选择 2,5-二羟基苯甲酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB) 作为喷涂基质, 对桔梗根进行冷冻切片, 采用 MALDI-MSI 技术获得桔梗皂苷的原位信息, 结合傅里叶变换离子回旋共振质谱 (fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FT-ICR MS) 对检测出的皂苷类成分进一步定性验证。建立了一种可视化分析桔梗中皂苷类成分空间分布特征的新方法, 为桔梗皂苷类成分的鉴定以及代谢物的研究提供重要的参考, 为中药材的鉴别和部分代谢物的生物合成途径提供了新的研究视角。

1 仪器与试剂

New ultrafle Xtreme™ 型基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪 (德国 Bruker 公司); SolariX XR 型傅里叶变换离子回旋共振质谱 (德国 Bruker 公司); ImagePrep 型自动基质喷涂仪 (德国 Bruker 公司); 氧化铟锡 (ITO) 导电载玻片 (德国 Bruker 公司); 超声清洗仪 (昆山小美超声仪器有限公司); Leica CM 1950 冷冻切片机 (德国 Leica Microsystems 公司)。

三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA, 批号 C13946209, 分析纯), 购于上海麦克林生化科技股份有限公司, 乙腈 (批号 F22M6E201, 分析纯)、

甲醇 (批号 F23NBR203, 分析纯), 购于赛默飞世尔科技中国有限公司; DHB (批号 WXBD9767V, 质量分数 ≥ 98%)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA, 批号 MKCN9036, 质量分数 ≥ 98%)、9-氨基吖啶 (9-aminoacridine, 9-AA, 批号 BCCJ0256, 质量分数 ≥ 99.5%), 均购于美国 Sigma 公司; 桔梗购买于内蒙古自治区两年生鲜桔梗, 经河南大学生命科学学院王子成教授鉴定为桔梗科植物桔梗 *P. grandiflorum* (Jacq.) A. DC。

2 方法

2.1 供试品和基质溶液的配制

鲜桔梗根经 80 °C 干燥处理, 粉碎后过 80 目筛。精密称量 0.5 g 干燥的桔梗粉末, 加入 5 mL 90% 乙醇, 经超声处理 60 min (功率 200 W、频率 40.0 kHz), 滤过, 得到粗提液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过后得供试品浸提液。DHB 用甲醇-水 (1:1) 及 0.2% TFA 混合溶剂配制成 30 mg/mL 的基质溶液, CHCA 用乙腈-水 (1:1) 及 0.2% TFA 混合溶剂配制成 10 mg/mL 的基质溶液, 9-AA 用乙醇-水 (7:3) 配成 10 mg/mL 的溶液。于 4 °C 冰箱保藏备用。

2.2 桔梗切片样品的制备

采用梯度冷冻法对清洗干净的鲜桔梗根进行冷冻处理, 最终于 -80 °C 冰箱储藏, 备用。于冷冻后的桔梗主根中段取材, 获得长度为 0.5 cm 的横切小段, 经蒸馏水包埋后使用冷冻切片机进行冷冻切片, 获得不同厚度的桔梗根组织切片。采用手指回温的方法将组织切片负载于 ITO 导电玻片上, 立刻真空干燥获得桔梗组织切片。

2.3 基质的喷涂

采用振动雾化法使用基质喷涂仪在循环 60 次, 湿度 40%, 孵育时间 30 s, 温度 25 °C 的条件下将 DHB 均匀地喷涂于桔梗组织切片上, 孵育结晶后取出获得待测玻片。

2.4 MALDI-MSI 数据采集

使用图像扫描仪扫描待测玻片, 获得初始的切片图像信息, 将待测切片固定于特定靶板上, 使用 MALDI-TOF-MS 型质谱, 在正离子反射模式下采集相关数据用于成像数据分析。采集参数: 激光直径 5_{ultra}, 空间分辨率 100 μ m × 100 μ m, 激光能量强度 70%, 激光频率 2 000 Hz, 激光照射次数 100, 离子采集质量范围 m/z 100~1 600, 样品电压 3.5 kV, 检测器电压 1.96 kV。采集完成后使用 SciLS Lab 软件将采集的质谱数据进行数据处理、归属和成像显示。

2.5 FT-ICR MS 数据采集

使用配备 7.0 T 超导磁体及 smart beamII 的 FT-ICR MS 对经 MALDI-MSI 分析后的同一桔梗切片的皂苷信号进行精确质量数、分子式、同位素峰的检测,对桔梗浸提液中的皂苷成分进行二级离子的检测,进一步对相关成分定性分析。采集参数为:样本测试离子源为 MALDI 源,激光能量强度 70%,激光频率 2 000 Hz,激光闪烁数 50,激光斑点大小 medium,偏转电压 200 V,扫描范围 m/z 100~1 600,离子累积时间 0.2 s,飞行时间 1.2 ms,使用 Isolation pattern 功能对目标离子进行筛选,隔离窗口大小 10,扫描次数为 10,采集字节为 1×10^6 Mb 字节,将采集后的数据使用 Data Analysis 软件进行分子式推测、同位素峰模拟和误差计算。

3 结果与分析

3.1 基质种类的选择

采集 DHB、CHCA、9-AA 3 种基质信号以及 3 种基质和桔梗浸提液经薄层沉积结晶后产生的质

谱信号,根据正离子模式下采集到的质谱信号分子量的大小、数量及信号强度,选择出适合桔梗切片进行 MALDI-MSI 的基质。检测结果见图 1、2。

由图 1 可知,DHB、CHCA 和 9-AA 的基质峰相对分子质量均在 700 以下,而桔梗皂苷类物质的相对分子质量主要集中在 700~17 600 的低分子区域^[7],故 3 种基质不会对桔梗皂苷的质谱信号产生较强的干扰。

由图 2 可知,当使用 9-AA 和 CHCA 作为基质时,采集的质谱信号种类较少且信号强度较弱,当使用 DHB 时,采集到的质谱信号不仅强度强且种类多,能够为后续进行 MALDI-MSI 分析提供更多的数据信息,因此综合质谱响应信号的强弱及信号种类的多少 2 个因素,最终选择 DHB 作为基质用于切片的喷涂。

3.2 桔梗切片厚度的确定

不同的切片厚度对质谱信号的采集产生直接影响,为确认最佳的切片厚度,获得更好的成像效果,以数据库中存在的 2 种皂苷离子桔梗皂苷 J (m/z

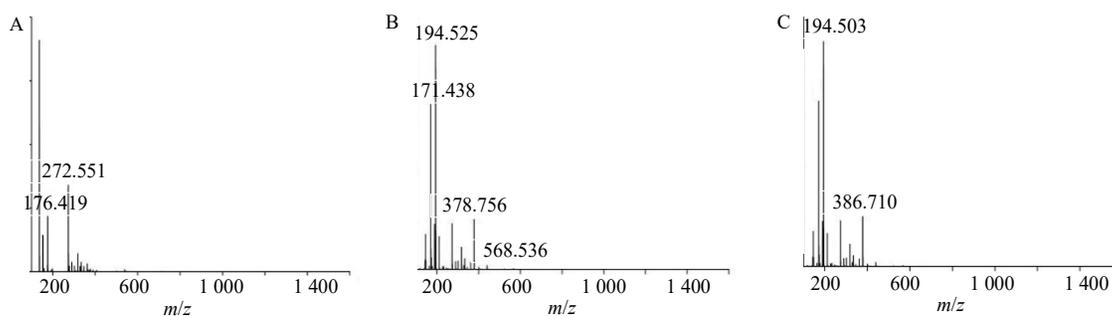
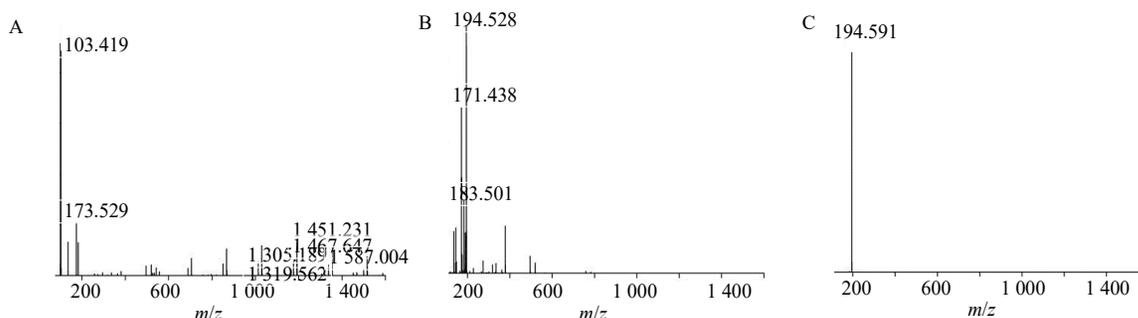


图 1 DHB (A)、CHCA (B)、9-AA (C) 3 种基质的质谱信号

Fig. 1 Mass spectral signals of three matrix blanks: 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB, A), α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA, B), and 9-aminoacridineare (9-AA, C)



A-桔梗浸提液+DHB; B-桔梗浸提液+CHCA; C-桔梗浸提液+9-AA。

A-*P. grandiflorum* extract + DHB; B-*P. grandiflorum* extract + CHCA; C-*P. grandiflorum* extract + 9-AA。

图 2 桔梗浸提液与 3 种基质的质谱信号

Fig. 2 Mass spectral signals of *P. grandiflorum* extract and three matrices

1 277.274) 和桔梗皂苷 E (m/z 1 588.990) 的质谱信号响应强度和空间分布情况为依据, 对不同厚度的组织切片进行数据采集和成像显示, 结果见图 3。

由图 3 可知, 当切片厚度为 20 μm 时, 采集到 2 种皂苷的质谱信号分布特征与样本的组织结构契合度较差; 当切片厚度大于 25 μm 时, 2 种皂苷的信号响应强度逐渐减弱且空间分布特征与样本的组织结构契合度变差; 当切片厚度为 25 μm 时, 2 种皂苷的信号响应强度最强且空间分布规律能与原始切片图

像很好的契合。因此选择 25 μm 为最佳的切片厚度。

3.3 MALDI-MSI 的结果分析

采用上述选定的实验条件, 对桔梗根的组织切片进行 MALDI-MSI 分析, 根据采集的质谱数据信息, 结合相关数据库以及文献报道^[6,16-17], 对采集的数据进行初步归属。其中存在显著分布差异的 12 种皂苷离子成像结果见图 4。12 种皂苷类成分的空间分布情况都能够较好地与桔梗根的组织结构契合, 其中桔梗皂苷 C、2''/3''-*O*-acetyl-platycodin D₂/D₃、

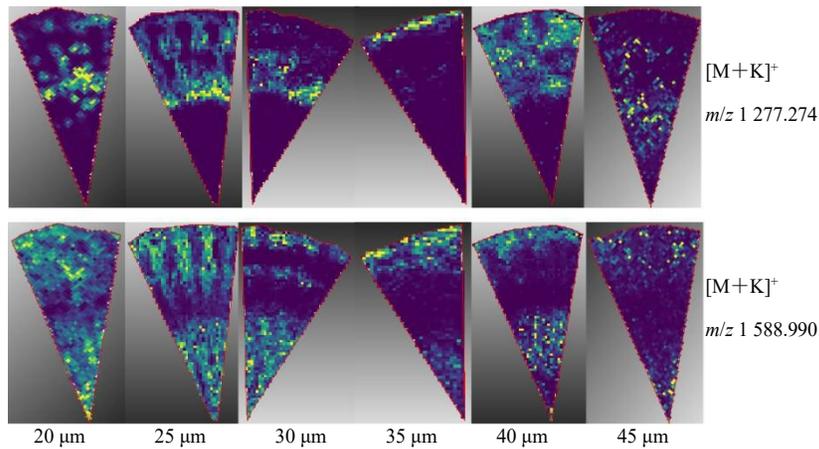
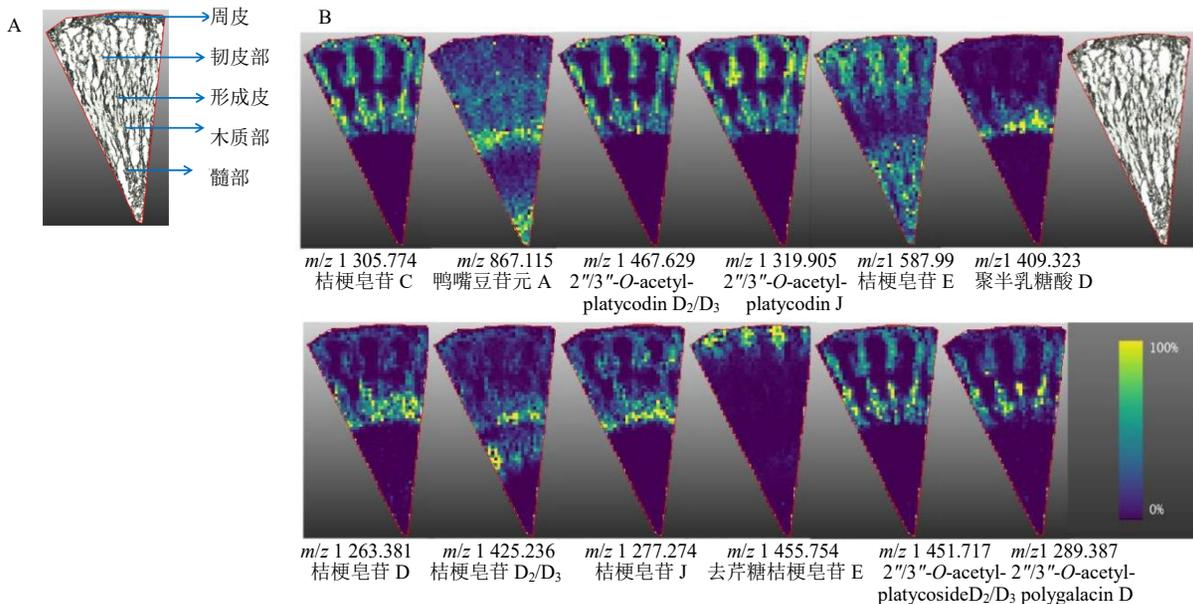


图 3 不同切片厚度条件下 2 种皂苷的质谱成像图

Fig. 3 Mass spectrometry image of two saponins under different section thickness



A-桔梗横切面的结构; B-皂苷类化合物的质谱成像图。

A-cross-sectional structure of *P. grandiflorum*; B-Mass spectrometry image of saponins.

图 4 桔梗切片中皂苷类成分的 MALDI-MSI 分析

Fig. 4 MALDI-MSI analysis of saponins in *P. grandiflorum* slices

2''/3''-*O*-acetyl-platycodin J、2''/3''-*O*-acetyl-platycoside D₂ 主要分布在周皮和韧皮部；桔梗皂苷 E 分布在周皮、韧皮部、木质部和髓部；桔梗皂苷 D 和 2''/3''-*O*-acetyl-polygalacin D 主要分布在韧皮部；去芹糖桔梗皂苷 E 主要分布在周皮和部分韧皮部；桔梗皂苷 J 和聚半乳糖酸 D₃ 主要分布在韧皮部和形成层；鸭嘴豆皂苷元 A 主要分布在形成层和髓部；桔梗皂苷 D₂/D₃ 主要分布在韧皮部和木质部。

3.4 桔梗皂苷 FT-ICR MS 的鉴定结果

为了进一步对初步归属的皂苷类化合物的准确性进行精准确认，使用 MALDI (ESI)-FT-ICR MS 对相关离子进行更加精确的数据采集和定性分析。分别从精确质量数、同位素峰分布以及同位素峰比例、精确分子式测定和碎片离子 4 个方面进行定性分析。由表 1 可知初步归属的结果基本准确，这 12 种皂苷成分的精确相对分子质量、同位素丰度及比例均与目标物质相符，且分子式推断的结果误差均

小于 2×10^6 。该结果证明使用 MALDI-MSI 技术实现了对桔梗中皂苷类物质准确的成像分析，结果可靠。采集离子类型为 $[M+K]^+$ 型，这极可能与植物根系的离子运输功能相关。

4 讨论

本研究以 DHB 作为喷涂基质，在正离子反射模式下，通过对桔梗根中皂苷类化学成分的质谱成像分析，得到了 12 种桔梗皂苷在桔梗根周皮、韧皮部、形成层、木质部和髓部的空间分布情况及其相对含量的差异。桔梗皂苷为桔梗根中主要活性成分，质谱成像分析的结果为深入研究其抗氧化、抑制炎症、镇痛解热等药理作用提供参考。进一步结合 FT-ICR MS 对相关物质的质谱信号进行精确质量数、分子式、同位素峰和碎片离子的检测，成功确认了 12 种皂苷类化合物。桔梗根切片质谱成像结果与桔梗根的组织结构契合度极高，能够准确的显示桔梗中皂苷类物质的分布情况，实现了桔梗皂

表 1 FT-ICR MS 对皂苷类化合物的鉴定结果

Table 1 Identification of saponins by FT-ICR MS

编号	化合物 (或其同分异构体)	$[M+K]^+$ (m/z)		分子式	误差 ($\times 10^{-6}$)	空间分布情况	碎片离子
		理论值	实测值				
1	桔梗皂苷 D	1263.5406	1263.5398	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₈	0.6	韧皮部	721.3517, 581.1451, 1129.4948
2	桔梗皂苷 C	1305.5512	1305.5504	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₉	0.6	周皮、韧皮部	623.1579, 721.3552, 1171.5122
3	桔梗皂苷 E	1587.6463	1587.6463	C ₆₉ H ₁₁₂ O ₃₈	-0.1	周皮、韧皮部、木 质部、髓部	621.4848, 1045.4601, 745.4768
4	去芹糖桔梗皂苷 E	1455.6040	1455.6024	C ₆₄ H ₁₀₄ O ₃₄	1.1	周皮、韧皮部	868.4377, 1045.4598, 484.5823
5	桔梗皂苷 J	1277.5199	1277.5189	C ₅₇ H ₉₀ O ₂₉	0.8	韧皮部、形成层	1145.4676, 607.1817, 796.5199
6	2''/3''- <i>O</i> -acetyl-polygalacin D	1289.5563	1289.5551	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₈	0.9	韧皮部	607.1840, 705.3816, 623.1578
7	2''/3''- <i>O</i> -acetyl-platycodin J	1319.5304	1319.5294	C ₅₉ H ₉₂ O ₃₀	0.8	周皮、韧皮部	1187.4860, 1143.4973, 1157.4765
8	2''/3''- <i>O</i> -acetyl-platycodin D ₂ /D ₃	1467.6040	1467.6033	C ₆₅ H ₁₀₄ O ₃₄	0.5	周皮、韧皮部	883.4020, 623.1556, 733.8471
9	2''/3''- <i>O</i> -acetyl-platycoside D ₂ /D ₃	1451.6091	1451.6077	C ₆₅ H ₁₀₄ O ₃₃	1.0	周皮、韧皮部	867.4340, 623.1581, 607.1839
10	鸭嘴豆皂苷元 A	867.4138	867.4136	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₆	0.3	形成层、髓部	705.3780, 805.4277, 365.1046
11	聚半乳糖酸 D ₃	1409.5985	1409.5974	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₃₂	0.8	韧皮部、形成层	867.4285, 469.9057, 1279.5230
12	桔梗皂苷 D ₂ /D ₃	1425.5934	1425.5924	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₃₃	0.7	韧皮部、木质部	883.4020, 1013.4846, 990.8946

苷的原位成像分析。该结果不仅为研究皂苷类化合物的空间分布特征提供了新的表征方法,而且为进一步研究桔梗代谢物的合成途径提供了新的视角,进而为桔梗的开发和利用提供新的理论支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang L L, Huang M Y, Yang Y, *et al.* Bioactive platycodins from *Platycodonis Radix*: Phytochemistry, pharmacological activities, toxicology and pharmacokinetics [J]. *Food Chem*, 2020, 327: 127029.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 289.
- [3] 常安, 孙婉萍, 郑一, 等. 桔梗药性功用历史沿革及药理作用研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(7): 73-79.
- [4] 陈丹丹, 洪挺, 王栋, 等. 桔梗的化学成分及其药理作用研究概况 [J]. *药品评价*, 2020, 17(15): 9-11.
- [5] Zhang L, Wang Y L, Yang D W, *et al.* *Platycodon grandiflorus* - an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164: 147-161.
- [6] Wang C Z, Zhang N Q, Wang Z Z, *et al.* Nontargeted metabolomic analysis of four different parts of *Platycodon grandiflorum* grown in NorthEast China [J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1280.
- [7] 许伟辰, 罗子宸, 何钰, 等. 基于液质联用技术的南北产地桔梗药材皂苷谱差异研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2022, 38(6): 541-549.
- [8] 杨迎晨, 陈企发, 夏炎. 更深度“照相”技术: 质谱成像的发展与应用 [J]. *大学化学*, 2020, 35(3): 47-53.
- [9] 谢旻臻, 王雪瑜, 王琦. 质谱成像技术在中药代谢领域的应用 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(10): 1382-1388.
- [10] 再帕尔·阿不力孜. 质谱分子成像技术与应用进展 [J]. *分析测试学报*, 2022, 41(9): 1335-1344.
- [11] Li B, Bhandari D R, Römpp A, *et al.* High-resolution MALDI mass spectrometry imaging of gallotannins and monoterpene glucosides in the root of *Paeonia lactiflora* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36074.
- [12] Li B, Bhandari D R, Janfelt C, *et al.* Natural products in *Glycyrrhiza glabra* (licorice) rhizome imaged at the cellular level by atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry imaging [J]. *Plant J*, 2014, 80(1): 161-171.
- [13] Beck S, Stengel J. Mass spectrometric imaging of flavonoid glycosides and biflavonoids in *Ginkgo biloba* L [J]. *Phytochemistry*, 2016, 130: 201-206.
- [14] Li B, Neumann E K, Ge J Y, *et al.* Interrogation of spatial metabolome of *Ginkgo biloba* with high-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization and laser desorption/ionization mass spectrometry imaging [J]. *Plant Cell Environ*, 2018, 41(11): 2693-2703.
- [15] Taira S, Ikeda R, Yokota N, *et al.* Mass spectrometric imaging of ginsenosides localization in *Panax ginseng* root [J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(3): 485-493.
- [16] 刘芳, 赵瀚森, 孙公伟, 等. 基质辅助激光解析质谱成像可视化分析三七皂苷空间分布 [J]. *分析化学*, 2020, 48(7): 881-888.
- [17] Ma X Q, Li S M, Chan C L, *et al.* Influence of sulfur fumigation on glycoside profile in *Platycodonis Radix* (Jiegeng) [J]. *Chin Med*, 2016, 11: 32.
- [18] Wang C Z, Zhang N Q, Wang Z Z, *et al.* Rapid characterization of chemical constituents of *Platycodon grandiflorum* and its adulterant *Adenophora stricta* by UPLC-QTOF-MS/MS [J]. *J Mass Spectrom*, 2017, 52(10): 643-656.

[责任编辑 王文倩]