

1) 大阪大学研究生院工学研究科
2) S&B 食品株式会社

利用质谱显微镜实现干姜黄中姜黄素分布的可视化

Microscopic Mass Spectrometry Imaging Reveals Specific Distributions of Curcumin Species Insides Dried Turmeric

新闻秀一¹、佐川岳人²

关键词：质谱成像，iMScope，姜黄，姜黄素，硬组织，预处理



■摘要

植物体内含有各种各样的次级代谢物。这些植物体内所含的次级代谢产物有很多是广为人知的有用物质，代表性的物质包括调味品和天然药物，然而，至今为止，很少有报告说明这些物质呈现何种三维分布。在本文中，以干姜黄为试样，对其主要组分之一姜黄素的空间分布进行了可视化。由于干姜黄是一种非常硬质的试样，因此无法使用现有的低温薄片切片机制作切片，所以构建了新的切片化的方法。对使用本方法获得的不同方向内截面的二维分布结果进行了解析，结果发现姜黄素在姜黄体内具有管状间隔。此外，还获得了姜黄素同源体的分布，与姜黄素呈现相同分布。由此可以通过使用质谱显微镜 iMScope™ (图 1 为新型 iMScope QT) 进行高分辨率的空间质谱成像，明确此类植物中次级代谢产物的分布这一新观点。

此外，还可以期待未来通过掌握此类植物有效组分的体内分布，实现改善有效组分的提取方法等，为生产工序改良做出贡献。



图 1 iMScope™ QT

1. 前言

可以通过使用显微镜，将植物内部的结构可视化。但是，对植物体内所含分子分布这一技术性难题做出回答并非易事。仅依靠显微镜是很难回答这一问题的。可以考虑采用断层成像法（CT）作为观察内部结构的方法之一。图2所示为实际采用X射线CT拍摄姜黄的示例。图2A鲜姜黄的内部结构看起来较为均匀。而图2B干姜黄的内部则可以看见有节状结构，实际切开确认界面之后，也发现的确如此。但是所得信息仅局限于结构信息，并未了解到组分分布。

质谱成像（MSI: Mass Spectrometry Imaging）是一种直接将试样中的组分电离，进行质谱分析，二维展开分析的结果，根据多个部位的分析数据获得组分分布信息的方法。据报告称，近年来还扩展到动物试样之外的应用，对植物¹⁻⁴、昆虫⁵⁻⁷、微生物⁸⁻¹³等各种对象应用了MSI。例如，平等人报告了高丽参中人参皂苷的详细分布，发现人参皂苷浓缩于根尖部分¹⁴。虽然像这样关于植物体次级代谢产物积蓄的报告有很多¹⁵⁻²¹，但是其中并没有调查三维分布的情况。本文中提出如下方法，针对干姜黄使用MSI，推测次级代谢产物的三维空间分布²²。

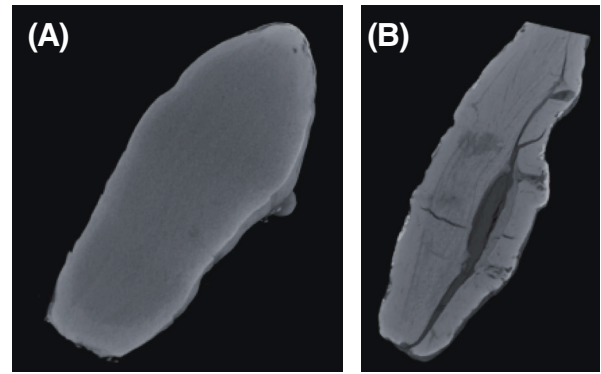


图2 利用X射线CT对姜黄素内部结构进行观察的结果

(A) 鲜姜黄 (B) 干姜黄

调味料和天然药物原料存在有多种形态，例如以生姜为代表的复杂形态等。验证组织中的空间分布时，需要在各种角度的截面上进行MSI。此前，原田等人报告了使用鲜生姜，发现6-gingerol的分布为颗粒状²³。实际比较长轴方向（轴向剖面）的切片（图3A）和短轴方向（径向剖面）的生姜切片（图3B）中6-gingerol的分布后发现，相同颗粒中的面积也存在差异（图3C）。由此可知其为椭圆状颗粒，而非完全的球状颗粒。即通过使用所得不同角度的截面影像进行解析，可知植物体中的次级代谢产物呈现何种三维分布。

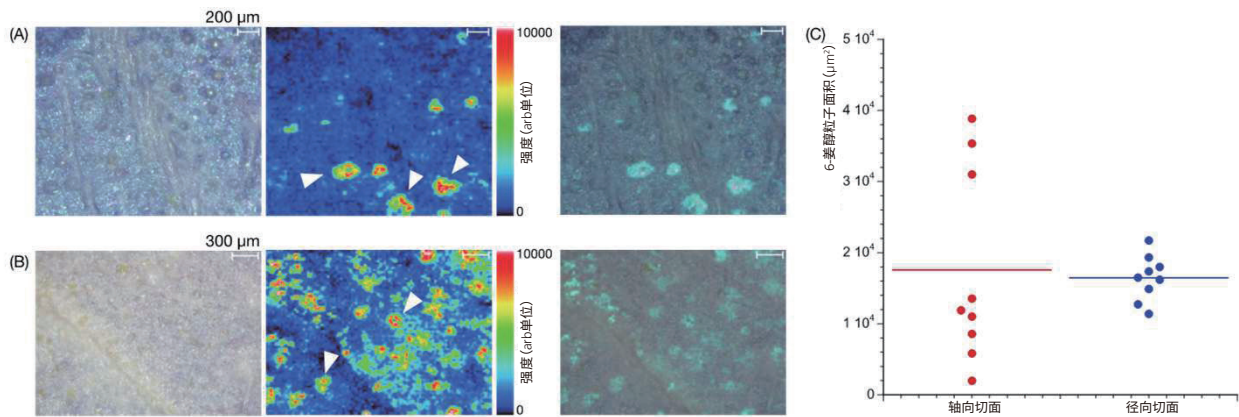


图3 生姜中6-gingerol的分布

(A) 纵切时的分布 (B) 片切时的分布 (C) 所得粒子形状的面积图

纵切时，广泛分布着很多大大小小的粒子，而片切时，则分布着面积较为平均的粒子。

箭头：6-gingerol 积蓄部位

本研究中也提出了针对干调味料的新的试样预处理方法。以干调味料为目标对象的原因在于可以以新鲜状态获得的原料十分有限。使用干试样时，试样极其坚硬，需要解决难以实现 MSI 中必需的切片化的问题。本应用尝试 2 种制作切片的方法，选出最佳方法，作为本问题的解决方法。

2. 实验

2-1：试剂

9-氨基吡啶 (9-AA) 购于东京化成 (东京)。甲醇购于富士胶片和光纯药 (大阪)。超纯水采用 GenPure™ UVTOC xCAD PLUS (赛默飞世尔科技公司) 制造的产品。

2-2：切片试样制作

干姜黄由 S&B 食品提供。本应用中采用切块机 (YACDAStech, 埼玉) 和刨子 (松作商店, 静冈) (图 4A 及图 4B) 制作硬质干姜黄的切片。使用切块机时，试样的厚度为 500 μm，使用刨子时，为 75 μm (以微米为单位的测定值)。所得切片使用导电双面胶固定在 ITO 载玻片 (无 MAS 涂层，表面阻力 100 W/m²，松浪玻璃，大阪)。导电双面胶购于 3M (美国)。

2-3：基质供给

检测姜黄中的姜黄素时，使用 iMLayer™ (岛津制作所) 将 9-AA 蒸镀在试样表面后，进行重结晶²⁴⁻²⁵。蒸镀的基质膜厚为 0.5μm，向重结晶的溶媒内加入 5% 甲醇。

2-4：质谱分析成像

使用 iMScope (岛津制作所) 实施 MSI。激光照射次数为每点 100 次，在负离子模式下进行测定。测定范围为 m/z 250-450，为确认姜黄素，还进行了 [M-H]-367.11 的 MS/MS (未显示数据)。激光强度为 45，在测定中，检测器电压为 2.1kV。

2-5：图像再构成和解析

使用 Imaging MS Solution™ (岛津制作所) 进行图像再构成，使用 Image J 和解析软件 R 进行所得图像的离子形状解析。此外，所得分布图像通过总离子流 (TIC: Total Ion Current) 形成统一化处理。

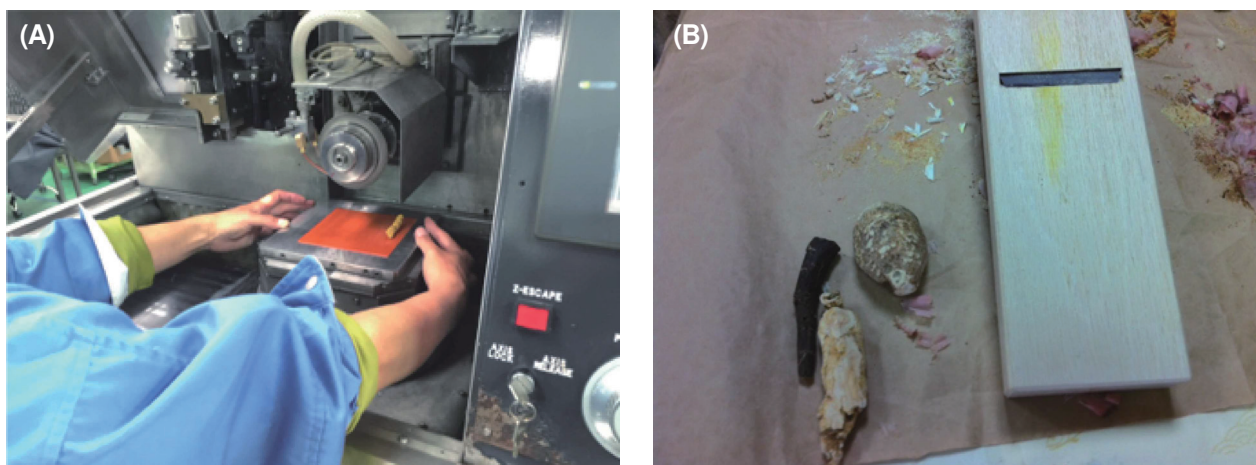


图 4 本研究中使用的干姜黄切片制作方法

(A) 切块机 (B) 刨子

3. 结果

3-1：切片制作方法的评价和姜黄素分布的评价

确认 MALDI 的电离方式时，在数据库 (METLIN <https://metlin.scripps.edu/>) 中检索姜黄素的质谱发现，使用负离子进行检测的结果良好。因此，本研究中使用 9-AA 尝试负离子检测姜黄素。此外，还使用其它一般基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 和 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 确认了峰强度，结果表明使用 9-AA 时的峰强度更好。

图 5 所示姜黄素化学结构式和切片制作评价结果及图像解析结果。姜黄素为图 5A 所示结构，使用 9-AA 在负离子模式下进行测定后，检测出去质子的分离离子的 m/z 367.11。图 5B 及图 5C 所示为使用切块机及刨子制作所得的切片的姜黄素分布。图 5B 中，切块机制作的试样表面全部分布有姜黄素，而刨子制作的为颗粒状分布。图 5C 中，从两者的切片均得到颗粒状分布。使用切块机制作的切片，无论纵切还是片切，其分布均不明确。

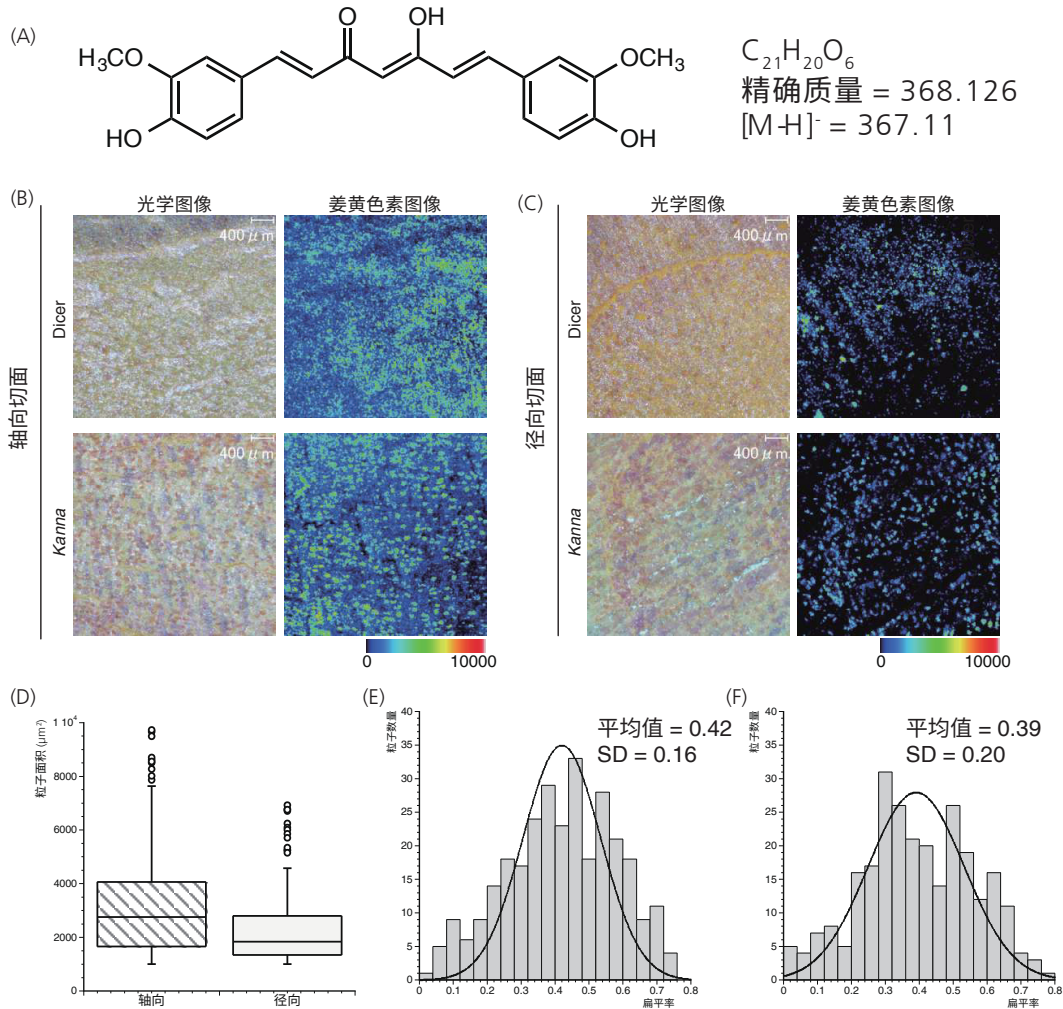


图 5 姜黄素的化学结构式和使用切块机及刨子制作切片的评价以及图像解析

- (A) 姜黄素的化学结构式
- (B) 纵切时切块机与刨子的比较
- (C) 片切时切块机与刨子的比较
- (D) 使用刨子制作的纵切及片切切片中所得粒子的面积比较
- (E) 纵切切片中所得粒子的扁平率分布
- (F) 片切切片中所得粒子的扁平率分布

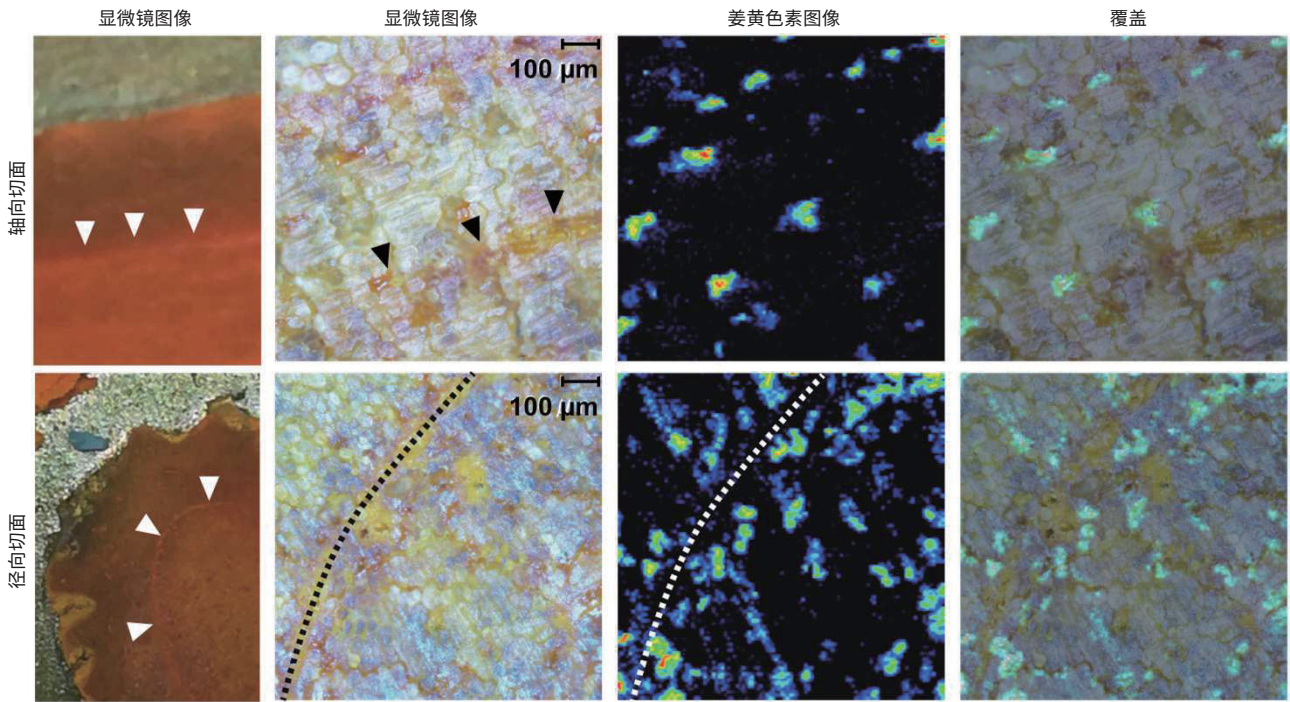


图 6 高分辨率姜黄素分布

(上段)：纵切时的姜黄素分布 (下段)：片切时的姜黄素分布图 (像素大小: 5 μm) 纵切时, 姜黄素粒子呈规则性分布, 片切时, 姜黄素粒子沿圆环内侧分布。

观察使用刨子制作所得纵切切片及片切切片的分布结果可以发现, 所得粒子形状在两者间存在差异。为进行定量评价, 而对粒子形状进行了图像解析。具体如图 5D 所示, 纵切的粒子面积相比片切的更大。此外, 根据粒子形状计算扁平率时, 发现切片中纵切切片所得粒子具有平均值 0.42(标准差:0.16)的分布, 片切切片具有平均值 0.39(标准差 :0.20)的分布。

3-2：利用高空间分辨率 MSI 对姜黄素的分布评价

由于使用 iMScope 可以以 5 μm 进行成像, 因此将姜黄微小领域中的姜黄素分布进行了可视化。图 6 所示为所得结果。图 6 上段所示为纵切时低倍率图像 (广视角) 和高倍率图像 (窄视角)、以及高倍率图像中的姜黄素分布。图 6 下段是切片的结果。在纵切的光学像中, 可以看到横向的特征结构 (箭头), 而姜黄素与这个结构无关, 看起来是有规律地排列着。

另一方面, 片切当中也发现具有特征的圆环结构 (虚线表示), 但是姜黄素并未分布于此圆环上, 该圆环内侧的姜黄素粒子密度非常高。

3-3：纵切切片中有特征的姜黄素粒子分布

可以看出纵切切片中姜黄素呈规则性分布。为对此进行定量评价, 将图 6 所得的纵切切片中姜黄素分布的像素信息投射在坐标中, 计算粒子重心的像素位置, 绘制出近似曲线。图 7 所示为其结果。根据所得重心像素的近似曲线的判定系数, 可以看出这些粒子排列在直线上。此外, 所得倾斜度也非常接近, 姜黄组织内部具有非常规则的结构。图 8 所示在长轴方向的切片中, 接近表皮部位的成像结果。也可看出颗粒状的分布, 还有呈线状分布的姜黄素。

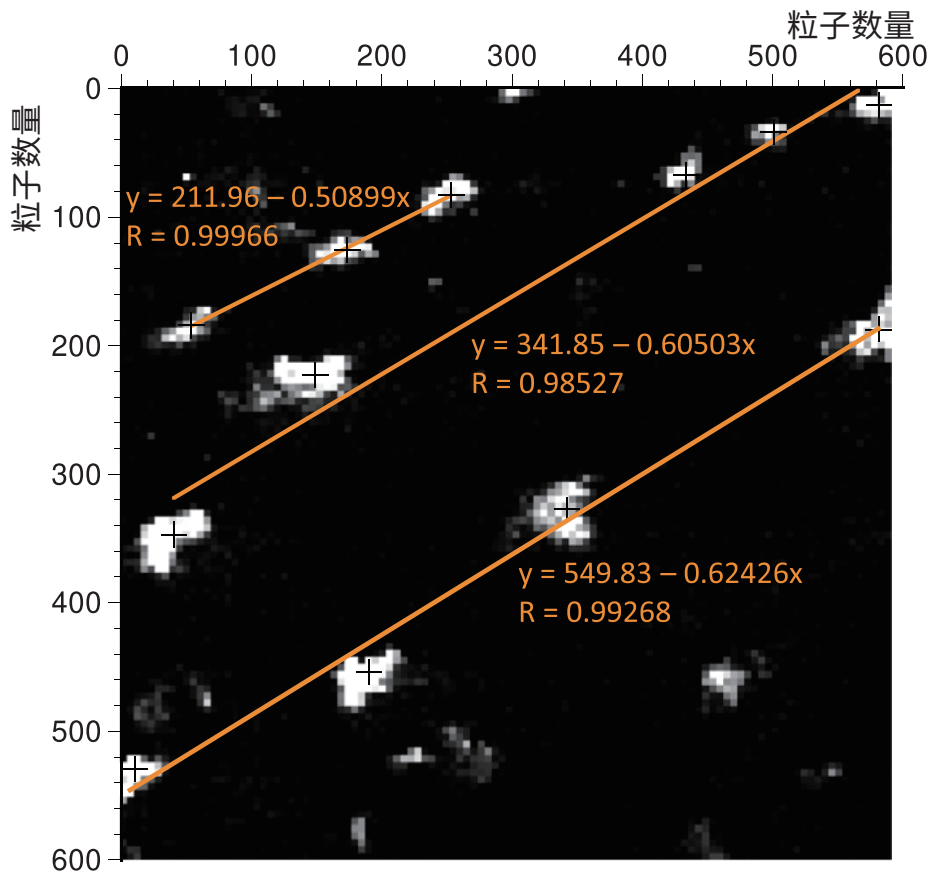


图7 纵切切片所得高分辨率姜黄素分布的解析

计算得到的粒子的重心，进行通过该重心的直线回归，结果显示姜黄素粒子以较高的判定系数呈直线排列。图像内部的十字标志表示重心位置。

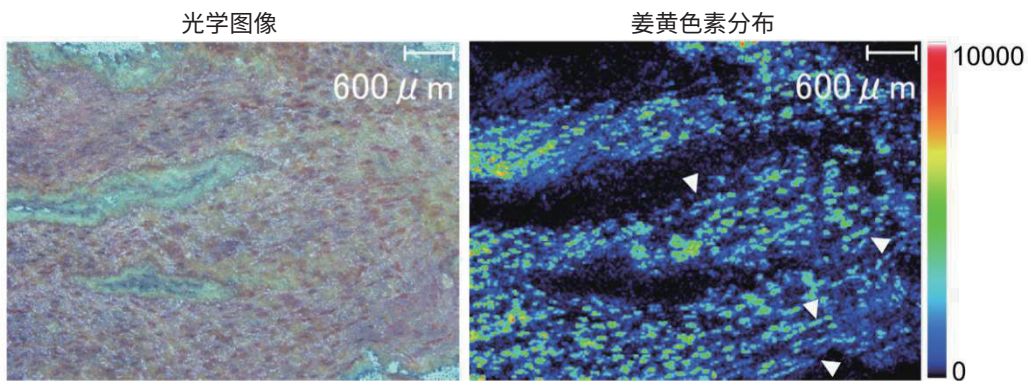


图8 长轴发现姜黄素分布

在接近试样表面的切片的长轴方向，不仅发现粒子状分布，还发现线状的姜黄素分布（箭头）。

3-2：纵切切片中姜黄素同源体及甜没药姜黄醇分布

本试验以 $C_{21}H_{20}O_6$ 的姜黄素为中心进行了讨论，图9A所示为 m/z 251.16 的甜没药姜黄醇的分布信息，图9B-9D所示为不同侧链结构的姜黄素同源体的分布信息。此外，图9E所示为根据姜黄切片所得的质谱。

除甜没药姜黄醇的所有分子，其它分子在纵切切片中呈相同分布，

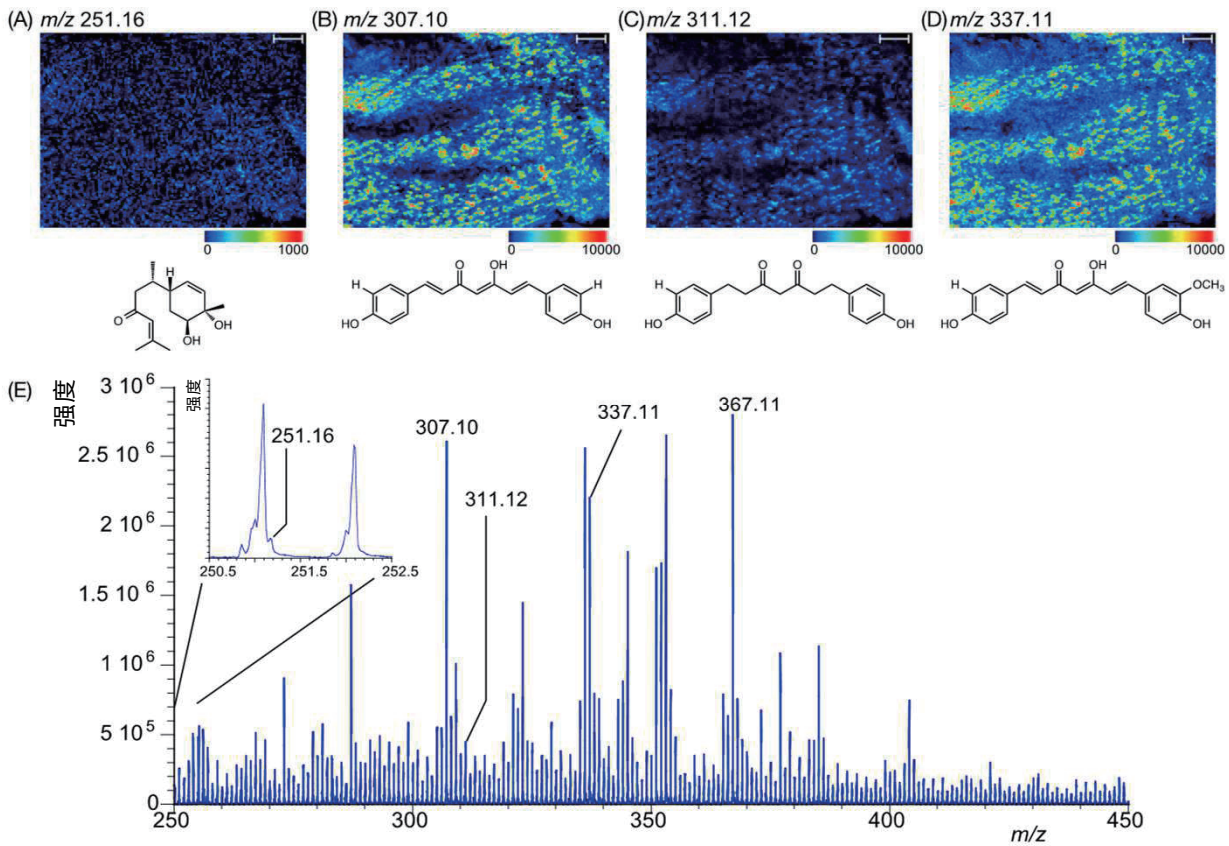


图9 长轴方向切片中甜没药姜黄醇及姜黄素同源体的分布结果

(A) 甜没药姜黄醇的分布 (B-D) 不同侧链结构的姜黄素同源体的分布 (E) 姜黄切片上所得质谱的姜黄素可以发现呈现部分线状分布的部分, 因此姜黄内部存在管状间隔, 其中封入了姜黄素。另一方面, 甜没药姜黄醇没有发现有特征的分布, 而是相同的分布。

由此可以看出, 姜黄素同源体也被封入管状间隔当中。与此同时, 也发现甜没药姜黄醇未呈现有特征的累积。

4. 结论

本研究中, 为将干姜黄的分布信息可视化, 使用了用于切断工业材料的切块机和刨子。使用切块机时, 虽然在短轴方向的截面上保持了姜黄素分布, 但是在长轴方向上, 该分布却消失了。而在短轴方向上, 发现使用刨子制作的切片的粒子状分布也不明确。

其原因可能在于, 使用切块机制作切片时, 高速旋转的刀刃持续接触试样表面, 因而会不断产生摩擦, 这种持续的摩擦使得详细的分布结构消失。根据此结果, 可以说作为试样制作方法, 采用刨子制作切片更加有效, 而不是切块机。

通过使用刨子制作的切片, 对得到的颗粒状区域的面积值进行测量, 如图 5d 所示, 在长轴方向上中央值有变大的倾向。也就是说, 与图 3 所示的 6-gingerol 的结果一样, 提示不是完全的球状颗粒。另外, 从得到的分布来看, 不仅是粒子的大小, 形状也有所差异。使用扁平率评价此形状的不同, 发现长轴方向粒子的扁平率为 0.42。在短轴方向, 虽然可以看出双向性分布, 但是在扁平率 0.3 附近有峰值。即可以说粒子在短轴方向上近似圆形, 在长轴方向上近似椭圆形。

此外, 根据图 6 所示 5 μm 的成像结果, 在长轴方向以及短轴方向上显示出非常规律分布。也就是说, 在长轴方向上排列着规则的椭圆, 在短轴方向上, 姜黄的中心部分的粒子分布密度较高。这一结果支持了在姜黄的内部, 姜黄素分布具有特异性结构的结果。特别是在长轴方向上有规则性粒子的整列, 根据图 7 所示的图像解析结果也可得出结论。根据所得的匹配结果, 最令人深思的一点是粒子构成的直线倾斜度是一定的。在长轴方向上, 图 5 为椭圆状粒子, 图 6 为直线排列这一点来看, 暗示了姜黄内部中央部分具有管状的构造。图 8 的结果也支持了这一点, 长轴切片的成像结果中发现有很多呈线状分布的部分。此外, 姜黄素同源体也呈现同样的分布, 而甜没药姜黄醇却并未呈现特征性分布。因此, 短轴方向的成像结果和长轴方向的成像结果, 暗示了含有姜黄素的管状结构存在于姜黄内部。

综上所述, 本研究中采用干姜黄试样, 开发了姜黄素分布可视化的方法以及对姜黄素的分布进行了详细解析。通过使用刨子制作纵切切片和片切切片, 发现在姜黄内部有非常规则性的结构体, 即管状结构, 其中封入了姜黄素。本研究是首个将 MSI 适用于硬质干试样的示例, 表明可以将各种试样中次级代谢产物的分布信息可视化。也可以像这样通过获得有效组分的空间分布信息, 获得对象中有效组分含有率较高的粉碎物。这些信息不仅限于直接使用粉碎物作为原材料的情况, 作为提取特定有效组分时的预处理工序也十分有效。

参考文献

1. Taira, S et al. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63 (27), 6109-12.
2. Shroff, R et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105 (16), 6196-201.
3. Grassl, J. et al. *Plant Methods* **2011**, 7 (1), 21.
4. Mullen, A. K et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19 (18), 2507-16.
5. Ohtsu, S et al. *Analytical Sciences* **2018**, 34 (9), 991-996.
6. Niehoff, A. C et al. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (22), 11086-92.
7. Urban, P. L et al. *Anal. Chem.* **2011**, 83 (10), 3918-25.
8. Nguyen, T. B et al. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, 84 (9).
9. Dunham, S. J. B et al. *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50 (1), 96-104.
10. Kompauer, M et al. *Nat. Methods* **2017**, 14 (1), 90-96.
11. Moree, W. J et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, 109 (34), 13811-13816.
12. Phelan, V. V et al. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, 26 (6), 873-7.
13. Yang, Y. L et al. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5 (12), 885-7.
14. Taira, S et al. *Am. J. Chin. Med.* **2010**, 38 (3), 485-93.
15. Miyoshi, K et al. *Analytical Sciences* **2018**, 34 (9), 997-1001.
16. Franceschi, P et al. *J. Exp. Bot.* **2012**, 63 (3), 1123-33.
17. Crecelius, A. C et al. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65 (17), 3559-3568.
18. Dalisay, D. S et al. *J. Nat. Prod.* **2015**, 78 (6), 1231-42.
19. Holscher, D et al. *Plant J.* **2009**, 60 (5), 907-18.
20. Soares, M. S et al. *Phytochemistry* **2015**, 115, 161-170.
21. Taira, S et al. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* **2012**, 1 (1), 61-65.
22. Shimma, S et al. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, 67 (34), 9652-9657.
23. Harada, T et al. *Anal. Chem.* **2009**, 81 (21), 9153-9157.
24. Nakamura, J et al. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, 409 (6), 1697-1706.
25. Yang, J et al. *Anal. Chem.* **2011**, 83 (14), 5728-34.

iMScope、iMLayer 和 Imaging MS Solution 是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。
GenPure 是 Thermo Fisher Scientific 的商标。
本资料中出现的其他公司名称、产品名称、服务标记和徽标是其各公司的商标和注册商标。
此外, TM、® 标志可能未在文中明确说明。

岛津应用云



岛津企业管理(中国)有限公司
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2020年9月