

# 三叶青块根中黄酮类及酚酸类化合物的空间分布研究

## IMSCope-003

**摘要：**黄酮类及酚酸类等多酚类化合物是三叶青主要的有效活性成分，本文应用成像质谱显微镜 iMScope QT 对三叶青块根中黄酮类及酚酸类等多种成分的空间分布进行了原位可视化分析，可以直接观测到这些化合物在植物组织内部的分布特征和趋势，为三叶青药材的质量评价及内源性次级代谢产物的研究提供参考。

**关键词：**成像质谱显微镜 iMScope QT 三叶青 黄酮 空间分布

### 技术特点：

- ❖ 对三叶青块根中黄酮类及酚酸类等多种活性成分的空间分布进行原位可视化分析。
- ❖ 同时进行化合物质谱成像以及原位定量分析。

三叶青药用历史悠久，具有清热解毒、祛风化痰、活血止痛、抗肿瘤、保肝、消炎等功效，其有效活性成份包括黄酮类、酚酸类、多糖等化合物。本文应用成像质谱显微镜 iMScope QT 结合 IMAGEREVEAL MS 软件对三叶青块根中黄酮类、酚酸类等多种活性

成分的空间分布进行了原位可视化分析，可以直接观测到这些化合物在植物组织内部的分布特征和趋势，为三叶青药材的质量评价及内源性次级代谢产物的研究提供参考，同时表明成像质谱显微镜是进行化合物质谱成像以及原位定量分析的可靠的研究手段。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

成像质谱显微镜 iMScope QT

### 1.2 仪器参数

分析模式：正离子模式 / 负离子模式

像素间距：20  $\mu\text{m}$  \* 20  $\mu\text{m}$

激光能量：68 (范围 0-100)

扫描频率：2000 Hz

检测器电压：2.50 kV

激光器：355 nm YAG 激光器

激光照射直径：10  $\mu\text{m}$

激光照射次数：700 shots

扫描范围：m/z 100-800

### 1.3 试剂与样品

基质：CHCA ( $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸)、1,5-DAN (1,5-二氨基萘)

### 1.4 样品前处理

组织切片制作：将样品使用 10% 明胶水溶液包埋，液氮速冻，制作冰冻切片（厚度为 40  $\mu\text{m}$ ）；将冰冻切片转移至导电载玻片上，真空干燥后拍摄光学照片。

基质涂敷：CHCA 基质使用自动基质喷雾仪喷敷，1,5-DAN 基质使用手动喷枪进行基质喷涂。将涂敷基质后的载玻片送入成像质谱显微镜进行分析。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 基质的选择与优化

在组织区域上划分不同的区域(图1),使用移液枪分别滴加 2~5  $\mu\text{L}$  不同的基质溶液(CHCA、9-AA、1,5-DAN, DHB, DCTB)。应用 iMScope QT 进行质谱采集,使用 IMAGEREVEAL MS 检索由 25 种代表性活性成分组成的数据库。

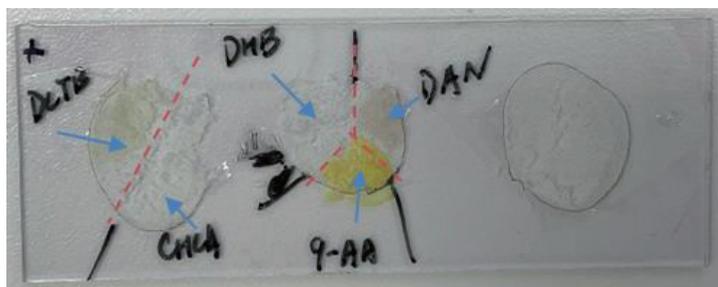


图1 三叶青块根切片及基质区域划分

以目标化合物质谱成像图谱的响应强度及分布特异性、均匀性作为评估标准,确认使用 CHCA 进行正离子扫描,使用 1,5-DAN 进行负离子扫描。在此基础上进行质谱参数的优化。

水杨酸(salicylic acid)在负离子模式下响应较好,其他 24 种化合物在正离子模式下响应较好。确认使用 CHCA 在正离子模式下进行除水杨酸外的 24 种化合物的质谱采集,使用 1,5-DNA 在负离子模式下进行水杨酸的质谱采集。

### 2.2 样品的光学图像、ROI 设定与平均质谱图

以 CHCA 为基质,在正离子模式下进行三叶青块根切片  $m/z$  100-800 的质谱采集。以 1,5-DAN 为基质,在负离子模式下进行  $m/z$  100-800 范围的质谱采集。样品的平均质谱图见图 2。在三叶青切片上进行 ROI(感兴趣区域)设定,使用 IMAGEREVEAL MS 软件对质谱数据进行分析,分析误差设定为 10 ppm。三叶青块根切片的光学图像、ROI 区域设定与 TIC 图见图 3。IMAGEREVEAL MS 软件定量分析结果见表 1。

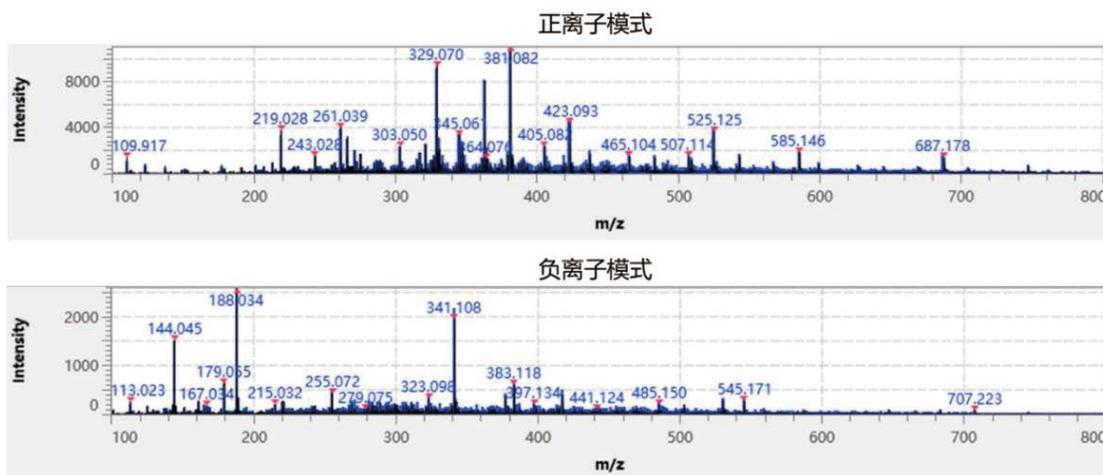


图2 三叶青块根切片平均质谱图

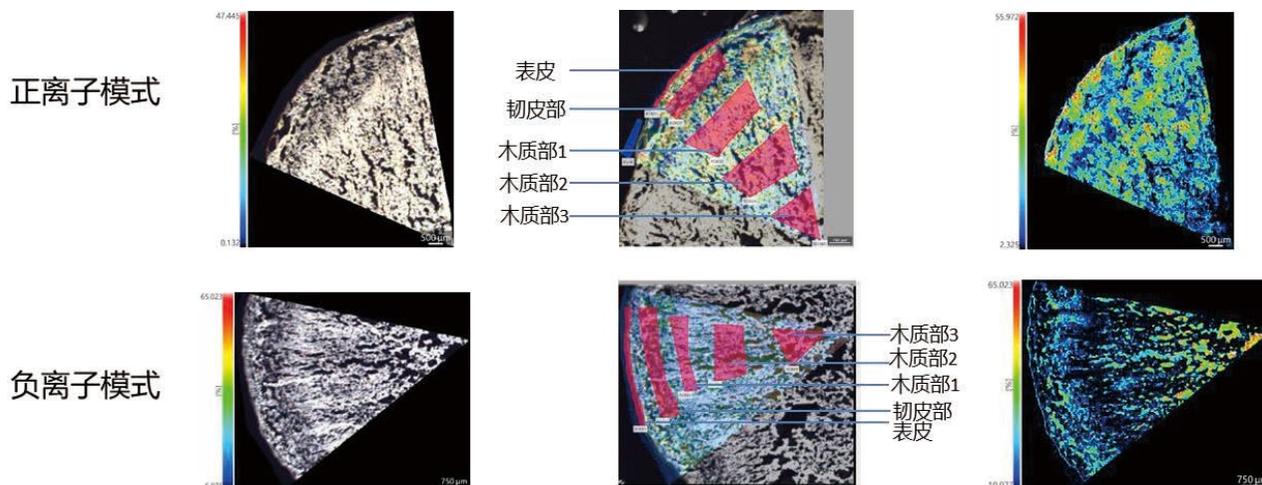


图3 野生型及突变体叶子的光学图像、ROI 区域设定与 TIC 图示例

表1 IMAGEREVEAL MS 软件分析结果

No.	Compounds	m/z	Formula	Adduct Ion	表皮	韧皮部	木质部 1	木质部 2	木质部 3
黄酮类	quercetin	341.0064	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	M+K	2107	1277	1672	1163	477
黄酮类	kaempferide	301.0707	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	M+H	2960	2204	2765	2135	869
黄酮类	epicatechin/Catechin	329.0428	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	M+K	1509	1019	2087	1168	389
黄酮类	rutin	633.1426	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	M+Na	964	515	1006	581	241
黄酮类	kaempferol	287.055	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	M+H	4086	5101	6207	5034	2227
黄酮类	hyperoside/querce- tin-3-O-glucoside	503.0592	C <sub>21</sub> H <sub>2</sub> O <sub>12</sub>	M+K	1926	1245	1935	1206	533
黄酮类	procyanidin dimmer	617.1061	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	M+K	1000	362	822	430	143
黄酮类	apigenin	271.0601	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	M+H	1606	1331	1770	1324	489
黄酮类	daidzein	255.0652	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	M+H	2640	1333	1719	1341	525
黄酮类	biochanin A	307.0577	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	M+Na	1285	1056	1331	1019	409
黄酮类	protocatechuic acid hexoside	355.0431	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	M+K	1968	1610	2135	2182	1137
黄酮类	apiosylglucosyl-4- hydroxybenzoate	455.116	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	M+Na	1810	1708	3470	2066	1055
黄酮类	kaempferol-3-O- glucopyranoside	487.0643	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	M+K	2033	1104	1732	1086	431
黄酮类	(Epi) catechin glucopyranoside isomer	475.1211	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	M+Na	1686	2263	2413	2097	1355
黄酮类	apigenin-7-rhamnoside	485.1054	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	M+Na	1734	1338	2080	1493	749
黄酮类	kaempferol-3-sambubioside	619.1065	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	M+K	1074	527	999	551	228
黄酮类	isorhamnetin-3-rutinoside	647.1583	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	M+Na	809	602	1035	670	348
黄酮类	robinin	779.1801	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	M+K	391	105	263	112	42

黄酮类	3-O-β-D-(2''-O-β-D-api- ofuranosyl)glucopyranoside -7-O-α-L- rhamnopyranoside	749.19	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>19</sub>	M+Na	362	591	833	553	382
酚酸	salicylic acid	137.0244	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	M-H	237	276	172	107	83
酚酸	protocatechuate	192.9903	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	M+K	207	79	101	77	18
酚酸	quinic acid	231.0271	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	M+K	4795	2802	3167	2553	826
酚酸	5-p-coumaroylquinic acid	361.0894	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	M+Na	2362	1430	2009	1448	626

### 2.3 黄酮类化合物的质谱成像结果

黄酮类化合物具有多种药理作用，如抗氧化、抗肿瘤及抗菌消炎等，广泛存在于中草药中，是三叶青的主要活性成分之一。三叶青中的主要黄酮类化合物包括槲皮素 (quercetin)、山柰素 (kaempferide)、儿茶素 (catethin)、芦丁 (rutin)、山柰酚 (kaempferol)、原花青素 (procyanidin dimmer)、金丝桃苷 (hyperoside)、芹菜素 (apigenin) 等。应用 iMScope QT 对其进行原位可视化分析发现，多数黄酮类化合物在表皮含量较高，韧皮部中的含量相比表皮有所下降；木质部中靠近韧皮部的区域（木质部 1）含量较高，木质部中黄酮类化合物由外到内含量依次降低（木质部 1 到木质部 3）。三叶青块茎表皮中黄酮类化合物含量较高，可能与其为植株提供保护，使其对抗或免受各类生物及非生物胁迫反应有关，如抵御病虫害的侵入等。黄酮类化合物的质谱成像图谱示例见图 4。

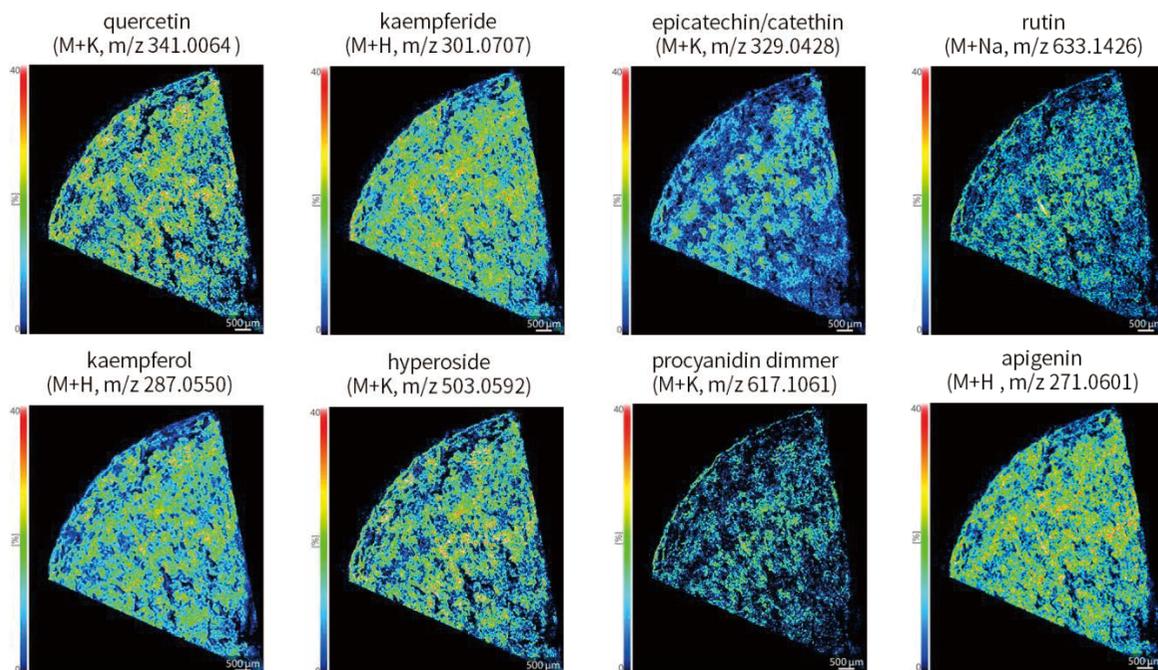


图 4 三叶青根茎中黄酮类化合物质谱成像图示例

少数化合物呈现出不同趋势的空间分布，如 3-O-β-D-(2''-O-β-D-apiofuranosyl) glucopyranoside-7-O-α-L- rhamnopyranoside 在韧皮部中的含量高于表皮，可能与化合物的性质有关。

## 2.4 酚酸类化合物的质谱成像结果

酚酸是一类含有酚环的有机酸，具有抗氧化、杀菌的功效，也是三叶青质量评价的重要指标成分。应用成像质谱显微镜对水杨酸（salicylic acid）、原儿茶酸（protocatechuic acid）、奎宁酸（quinic acid）、肉桂酰奎宁酸（5-p-coumaroylquinic acid）等四种酚酸类物质进行原位成像分析（图 5），发现四类化合物在表皮含量最高，可能与对植物的保护作用有关。除表皮外，水杨酸在韧皮部具有较高含量，而其他三种化合物在木质部含量相对较高。

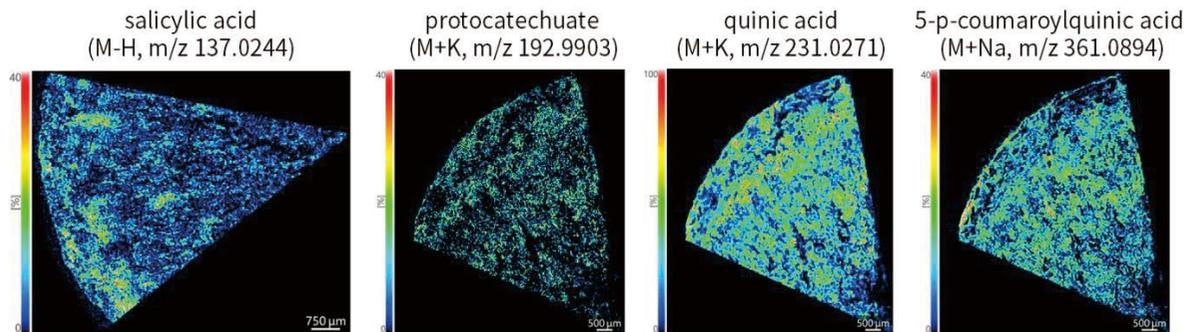


图 5 三叶青根茎中酚酸类化合物质谱成像图示例

## ■ 结论

本文应用岛津成像质谱显微镜 iMScope QT 对三叶青块根切片中黄酮类及酚酸类等多酚类化合物的空间分布进行分析，发现多数化合物在植物表皮和木质部的含量较高，为三叶青药材质量评价及次级代谢产物研究提供了参考。iMScope QT 融合了组织切片高分辨光学显微观察及化合物质谱成像分析，无需繁复的化合物提取前处理，可直接对植物内源代谢产物及各类活性分子进行原位可视化分析，为内源性代谢产物的可视化研究及其生理功能的探索提供新的探究方向和技术手段。

岛津应用云

