

· 综述 ·

基质辅助激光解吸电离质谱法在中药领域的应用进展

张冠华^{1,2}, 刘小莉², 黄璐琦¹, 王晓^{1,3}, 刘伟³, 孙成龙³, 张华敏⁴, 马春霞^{1,3,5*}

(1. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;

2. 云南中医药大学 中药学院, 昆明 650500;

3. 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 山东省分析测试中心, 济南 250014;

4. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 5. 中国中医科学院 博士后管理办公室, 北京 100700)

[摘要] 中药具有丰富的化学成分和复杂的作用途径, 在治疗和预防疾病方面疗效显著, 为保证中药质量及开发新药, 一些分析检测方法应运而生。基质辅助激光解吸电离质谱法(MALDI-MS)是一种“软电离”的新型质谱技术, 具有高通量、高灵敏度、低成本、低样品消耗量、线性范围宽、电离温和、适用于热不稳定物质等特点, 为中药的分子水平研究提供了技术支撑。目前该技术被广泛用于中药成分分析和组学研究领域, 在药材真伪鉴别、分子实时筛选和构建活性成分的代谢网络途径方面发挥重要作用, 其中, 选择合适的基质和样品制备技术是保证检测效果的关键。随着新型基质的开发与优化、样品制备技术的不断完善, MALDI-MS与多种分析方法的联用, 将会大幅提高其检测效果。基于此, 笔者概述了MALDI-MS在中药领域的应用情况, 包括高通量检测中药活性成分、监测机体内药物及其代谢物状况、原位可视化表征中药活性成分组织分布信息等, 并探讨了MALDI-MS的应用前景和不足之处, 以期对中药成分鉴定、药物利用及代谢的相关研究提供技术支撑。

[关键词] 基质辅助激光解吸电离质谱法(MALDI-MS); 中药; 活性成分; 代谢物; 质谱成像; 原位可视化; 组织分布

[中图分类号] R22;R28;O657;G353.11 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)12-0247-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211848 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210729.1322.003.html>

[网络出版日期] 2021-07-29 15:51

Application of Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry in Analysis of Traditional Chinese Medicine: A Comprehensive Review

ZHANG Guan-hua^{1,2}, LIU Xiao-li², HUANG Lu-qi¹, WANG Xiao^{1,3}, LIU Wei³, SUN Cheng-long³,
ZHANG Hua-min⁴, MA Chun-xia^{1,3,5*}

(1. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for

Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

3. Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology

(Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China;

4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

5. Postdoctoral Management Office, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Traditional Chinese medicine (TCM), which owns abundant chemical components and complex action pathways, has been widely recognized in the prevention and treatment of diseases. Some analysis

[收稿日期] 2021-06-06

[基金项目] 中央本级重大增减支项目(2060302)

[第一作者] 张冠华, 在读硕士, 从事中药质量控制与评价研究, E-mail: ghzhang2020@163.com

[通信作者] * 马春霞, 助理研究员, 从事中药质量控制与评价研究, E-mail: machunxia8927@163.com

methods have been emerged in order to ensure the quality of TCM and to develop new TCM drugs. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) is a soft ionization mass spectrometric technique with the advantages of high throughput, high sensitivity, low cost and so on. It provides technical support for the molecular level study on TCM. At present, this technique has been used in the field of composition analysis and metabolomics research of TCM, and plays an important role in the identification of Chinese herbal medicines, real-time molecular screening and the construction of metabolic network pathway of active ingredients. Among them, the selection of appropriate matrix and sample preparation technology is the key to ensure the detection effect of MALDI-MS. With the development and optimization of new matrix, the continuous improvement of sample preparation technology and the combination of MALDI-MS with various analytical methods will greatly improve the detection effect. Based on this, this paper discusses the application of MALDI-MS in TCM, including high-throughput detection of active ingredients in TCM, monitoring of the original medicines and their metabolites *in vivo*, and *in situ* visualization and characterization of tissue distribution information of active ingredients in TCM. It also discusses the application prospect and existing problems of MALDI-MS in TCM, so as to provide technical support for the identification of active ingredients in TCM, drug utilization and metabolism.

[Keywords] matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS); traditional Chinese medicine; active ingredients; metabolites; mass spectrometry imaging; *in situ* visualization; tissue distribution

中药在治疗人类疾病方面具有几千年的历史,其活性成分丰富,通过多途径、多靶点同时发挥作用,但目前还有许多作用机制未被清晰阐明。在对其进行药理毒理研究、质量控制、成分鉴定时出现了不同的中药分析方法,运用这些方法能为中药活性成分及其作用机制研究提供依据。薄层色谱法(TLC)是一种传统的中药活性成分分析方法,具有操作简便、成本低、结果直观、耗时短的特点,常用于定性鉴别,但其重复性差、分离效果难控制,无法作为一项精准的定性分析手段^[1-2];气相色谱-质谱法(GC-MS)具有高分辨率、高选择性和高灵敏度,适用于挥发性成分的检测^[3-4];液相色谱-质谱法(LC-MS)是目前中药领域里应用较多的分析方法,适用于非挥发性和热稳定性化合物,具有灵敏度高、重复性好等优势^[5-6];毛细管电泳法和毛细管电泳-质谱法(CE-MS)具有分析效率高、用时短、样品用量少的优点,但该方法易受重复性、稳定性的影响;另外,光谱技术也常用于中药的质量分析^[7-9],包括傅里叶变换红外光谱、近红外光谱和核磁共振光谱。

随着中药研究的不断深入,部分传统分析技术已不能满足需求,寻求更简便、高分辨率和灵敏度的新型分析技术成为关键。基质辅助激光解吸电离质谱法(MALDI-MS)在1985年被首次提出^[10],该技术常见于原位分析,需要在真空环境下工作,具有较高的空间分辨率(光栅宽度 $<10\ \mu\text{m}$)^[11-12]。

MALDI-MS采用“软电离”的激光离子源,使样品离子能够较完整地进入质量分析器,常用来进行相对分子质量的测定。该技术具有以下特点:①操作简便,样品无需经过复杂的前处理,只需固定在特定靶板上;②高通量,分析速度快;③电离温和,不易打碎分子,可准确检测到准分子离子峰;④线性范围宽,既能检测小分子化合物也能分析大分子化合物,最大相对分子质量可达400 kDa;⑤可检测复杂的生物样本及环境样本,具有较好的耐盐性和耐蛋白性;⑥待分析样品用量少,仅需 $1\ \mu\text{L}$,可实现痕量检测;⑦适用于挥发性差和热不稳定性物质。另外, MALDI-MS结合质谱成像(MSI)能够对分子进行原位表征,有助于对中药进行更深入的研究。

近年来, MALDI-MS技术被多个领域关注和应用,在生物学领域,用于分析代谢组学和蛋白质组学^[13-14]、微生物鉴定^[15-16]、植物化合物筛选^[17-18];在医学领域,用于分析组织代谢物分布^[19-20]、肿瘤学的组织分析^[21-22]、疾病实时诊断研究^[23-24];在中药学领域,例如,中药鉴定学,用于痕量和快速地进行品种鉴定和区别真伪性^[25-27]、中药药理学,联合成像技术对中药活性成分在生物体的分布和机体代谢情况进行监测,可用于指导临床用药和研发^[28-30]、中药化学,用于检测氨基酸、糖类、黄酮类、皂苷类等活性成分,并在一些新型基质的辅助下优化了检测效果^[31-33]。已有文献报道了MALDI-MS在中药成分分析和药用植物领域的应用情况^[34-35],但其主要

针对中药单一组分、提取物的分析或者MSI技术方面的相关应用进行综述,在分析中药多组分及代谢物方面缺乏较为全面和系统的梳理。基于此,笔者拟总结MALDI-MS在中药领域的应用情况,分别从高通量检测中药活性成分、检测体内原药及代谢物、可视化原位表征中药相关成分3个方面进行阐述,并探讨其应用过程中存在的问题和前景,以期为后续的中药研究提供参考。

1 高通量检测中药活性成分

活性成分是中药发挥药效的物质基础,在药材中含量较低且组分复杂,是影响中药质量的最关键因素。在进行药效和作用机制的研究中,通常根据活性成分的理化性质来选择不同的定性或定量分析方法,传统的检测方法有TLC和LC-MS等,需要复杂的样品前处理程序来提取有效成分,这会导致成分损失,并且耗时较长、操作繁琐。MALDI-MS无需复杂的样品前处理,具有简单快速、高通量、可分析混合物和痕量检测等优点,有望成为检验中药质量的主流技术,相关研究汇总信息见增强出版附加材料^[25-27,33,36-55]。

1.1 蛋白质类 MALDI-MS由于其线性范围宽、电离温和、适用于耐热性差成分检测的特性,被广泛用于分析生物大分子,在中药研究中,常配备串联质谱来鉴定蛋白质和多肽类成分。如郑洁^[27]应用MALDI-MS建立了3种胶类中药(阿胶、龟甲胶、鹿角胶)的多肽指纹图谱,结合十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术实现了多肽差异性分析。顾芹英^[36]使用SDS-PAGE和MALDI-MS测定了香椿叶中的蛋白质,结果发现6个条带的蛋白质具有不同的相对分子质量分布,并且通过Mascot数据库匹配检索到6种可能的蛋白质。目前,MALDI-MS分析蛋白质类物质常采用2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)、芥子酸等传统有机小分子基质,具有稳定的化学性质和高信号强度^[37],但对于小分子多肽和氨基酸类物质的检测并不适用,由于基质的相对分子质量较小,这些物质的检测会受到小分子基质信号的干扰,因此需要开发适用于小分子多肽和氨基酸的新基质。黄良等^[38]研究发现低浓度异甘草素作为基质可用于精氨酸、甘露醇和苏氨酸-亮氨酸二肽等小分子物质的检测,在均匀度、重复性、耐盐性、背景干扰方面优于DHB和2,4,6-三羟基苯乙酮(THAP),为筛选适用于富含氨基酸成分中药的小分子有机基质奠定了基础。

1.2 多糖 多糖是中药中普遍存在的活性成分,此类成分的鉴定和结构解析常采用体积排阻色谱法、LC-MS、离子色谱法、核磁共振等技术。近年来,由于MALDI-MS可直接用于分析糖类对照品及混合物,无需进行衍生化步骤,因此在中药领域成为了多糖分子鉴定、推测结构和单糖组成的有效工具。如杨飞飞^[39]通过加入糖内标物,根据质谱图差异鉴别出北沙参、南沙参和山豆根的寡糖。王莹等^[40]先利用质荷比(m/z)鉴定出黄芪多糖,之后基于已有研究,通过碎片离子峰推断出糖残基团的组成,可为MALDI-MS在糖类结构中的应用提供参考。结构是多糖研究中的关键部分,由于其组成复杂,对其进行结构表征具有重要的研究价值。MALDI-MS在分析聚合物时,会出现规律性碎片离子峰^[17,41],能够帮助多糖结构判定。如屈亮亮^[25]在MALDI-MS的帮助下,通过对比聚糖质谱图在聚合度及分布趋势上的差异对蜂蜜进行了快速鉴定,同时建立了指纹图谱,可为糖类成分的质谱分析提供帮助。后续研究可致力于筛选特异性的多糖检测基质、建立多糖片段数据库,利用MALDI-MS筛选多糖相对分子质量和结构信息,并辅助传统多糖分析手段对其组分进行精准分离、纯化。此外,可通过MALDI-傅里叶变换质谱法(MALDI-FTMS)及采用新型电离源的基质辅助激光诱导后电离(MALDI-2)技术来提高多糖检测的灵敏度。

1.3 皂苷类 皂苷极性较大、紫外吸收弱,在分析前需要进行样品预处理,但分离纯化过程会造成含量损失,导致其主要检测方法如TLC和高效液相色谱法(HPLC)受到不同程度的限制。MALDI-MS的独特电离源和耐盐性在皂苷类成分的检视和中草药真伪性鉴定方面具有明显优势。有研究基于MALDI-MS的谱图差异,实现了黄芪药材的鉴别^[26]。随着中药材质量控制标准的提高,人们更加关注样品信息的全面性,MALDI-MS可直接检测药材的固体粉末,在极大程度上保留了样品的完整性。如LAI等^[42]利用MALDI-MS直接分析人参和西洋参样品粉末,通过质谱图差异及主成分分析(PCA)快速区别了人参与西洋参,检测结果用液相色谱-电喷雾串联质谱法(LC-ESI-MS)进行验证,发现MALDI-MS与LC-ESI-MS联用能检测到更多的小分子物质,二者互为补充,可得到更全面的分子信息及更高的可信度。此外,有研究对MALDI-MS检测效果进行优化,开发了具有富集性能的新型纳米材料基质,促进了样品分子的电离,提高了皂苷

类化合物的信号强度^[43]。另有研究表明,向传统有机基质中加入适量的金属离子,如Li⁺和Na⁺,可显著提高图谱质量^[44]。目前皂苷类成分的MALDI-MS分析已较为成熟,广泛应用于MSI领域,用来表征其在不同组织中的含量分布。

1.4 生物碱 生物碱是附子、马钱子、川乌等药材的活性成分,部分具有毒性,探索最佳的质量控制方法是生物碱研究的主要方向之一。MALDI-MS能快速鉴别生物碱类中药并研究其毒性,对生药和中药饮片的毒理学研究与安全性评价具有重要意义。WU等^[45]将毛细管气相色谱法与MALDI-MS联用,建立了一种直接、快速筛选马钱子生品和炮制品粉末中生物碱的方法,消除了溶剂提取后通过柱色谱分离等传统方法导致毒性成分发生改变的可能,可为生物碱现有的分析方法提供补充。此外,在中成药的生物碱类成分检测过程中,利用MALDI-MS进行定性分析可增强后续定量分析结果的确定性和全面性^[46]。由于中药组成成分复杂,混合物的离子峰会对目标离子造成干扰,因此,开发一种选择性检出生物碱单一组分的基质具有重要意义。有研究筛选出了生物碱的选择性基质,证明使用双噻吩类化合物作为基质可以直接从颠茄草药材粉末中检测出生物碱成分,无其他组分干扰,缩短了检测时间和成本^[47],为开发其他活性成分的选择性基质提供了理论和方法参考。

1.5 黄酮类 黄酮类化合物是以C6-C3-C6结构为基本母核衍生出的一系列物质,部分衍生物的相对分子质量较小,其作为一类重要的中药活性成分,分离、鉴定、表征和功能验证都是当前研究关注的热点。ILBOUDO等^[48]利用常规基质DHB对薄荷提取物中的黄酮苷成分进行鉴定,结果表明在低质量分数(1 mg·g⁻¹)下可识别到黄酮苷特征峰,并首次检测到了蒙花苷。随着纳米材料基质的不断创新,在性能及检测效果上提升明显,可以结合MALDI-MS的痕量检测特征用于低浓度样品分析。LIU等^[33]用石墨烯和氧化石墨烯作为基质鉴定半枝莲中汉黄芩素、野黄芩苷,结果发现在1 nmol·L⁻¹的低浓度下仍可检测到样品粗提取物中特征性化合物。FOUGÈRE等^[49]制备了一种核壳结构的硅基材料基质,对玫瑰花提取物中的类黄酮化合物进行检测,结果发现在不同检测模式下得到的分析物数量具有较大差异,因此,探索适合样品分子的最佳检测模式和不同检测模式下的专属基质具有重要意义。此外,黄酮类化合物多数存在结构异构现象。

有研究显示,添加合适的盐溶液可以区分结构异构体^[50],如果应用在黄酮类成分中,会大幅提高其鉴定和检测水平。

1.6 脂类 中药脂类成分主要包括磷脂类、糖脂、树脂等,其中磷脂与其他活性成分复合后可制备脂溶性新剂型,能增强活性成分的脂溶性及药物溶出量,使其能被组织更好的吸收,提高生物利用度^[51-53]。由于脂类中药较少,故MALDI-MS用于此方面的研究较少。如赵玥祯等^[54]利用纳米四氧化三铁作为基质分析甘油三酯类小分子化合物,该基质相比DHB具有更高的信号强度,可作为脂类的专属基质,具有广阔的应用潜力。此外,有研究将MALDI与传统脂类分析方法联用,对混合物中的脂类成分同时进行分离与检测。例如,FUCHS^[55]将MALDI结合TLC定性检测了磷脂和糖脂,其中TLC发挥组分分离的作用,在与MALDI-MS的联用下成功得到了被分析物的质谱特征峰。但将这2种技术联用会导致一些问题,如在薄层板上覆盖有机基质时可能会产生样品斑点的扩散现象,引起浓度稀释使定量分析产生误差。建议可改用多层混合板进行分离,有助于避免由于普通硅胶薄层板表面的不规则性而引起的分析误差。

2 体内原药及代谢物检测

中药治疗讲究整体性,一般为多成分协同作用,故常用各项体征指标来验证中药的性能。结合生物体内的原型药物及代谢分布情况来评估中药性能是可靠的,可用于监测药效、药物毒性、机体状况,同时能够帮助新药开发和指导临床用药。MALDI-MS技术在药物代谢方面的应用较多,通过追踪定位相对分子质量来监测生物体内的代谢过程,进而反映药物作用情况。如SHI等^[56]监测了葛根素在经腹腔给药的小鼠血液中的存在情况。TROENDLE等^[57]结合MALDI和四极杆离子阱质谱,利用其多级串联质谱能力在正常生理痕量水平下获得了完整肝组织中的紫杉醇信息,可为更精准的药物分布检测技术开发提供帮助。同时,鉴定体内的药物代谢酶能够对中药的个性化用药提供重要参考,从而提高药物作用的有效性^[58]。此外,机体组织中药物的实时监测和利用度也是保证药物药效的关键。如BARRY等^[59]利用红外基质辅助激光解吸电喷雾质谱法(IR-MALDESI-MS)和紫外线基质辅助激光解吸电离质谱法(UV-MALDI-MS)对肝脏中的母体药物及代谢物进行了原位检测,结果发现UV-MALDI-MS灵敏度和检测覆盖率更高,为

揭示药物与靶器官互作机制、评估药物疗效和药物毒理学提供了新的技术手段。MALDI-MS在检测体内的原药及代谢物方面多见于成像领域,但以中药活性成分为母体的高通量直接分析极少,还需进行更广泛的研究。

3 可视化表征中药相关成分

中药的活性成分及其代谢物常通过HPLC、原位衍生质谱法、LC-MS等进行分析,但利用这些方法之前需要对样品均质化,造成空间信息的严重损失,不具备可视化的特性。MSI作为一种新型的分子可视化技术,在中药领域受到越来越多的关注,常结合MALDI技术研究活性成分在中药不同组织结构的空间分布特征、阐明药物及机体代谢产物的合成与作用机制,是药物检识和分析方法的跨越性进步。MSI的原理是利用质谱峰信号强度,通过质谱离子扫描技术结合图像处理软件进行重构,对生物组织切片或中药材冷冻切片生成不同 m/z 化合物的二维离子密度图,可以检视组织中化合物的组成、空间分布、富集程度等。目前MSI技术主要分为探针型和面阵型,且以前者使用最多。MALDI-MSI在高真空环境下工作,一般分为组织切片、基质分散、质谱分析和图像处理4个步骤,见图1。该技术具有以下特点:①高空间分辨率;②重复性好,系统稳定且不随时间发生变化;③可靠性高,采用纯激光电离,无须液相色谱驱动;④速度快,使用方便,可进行原位分析。

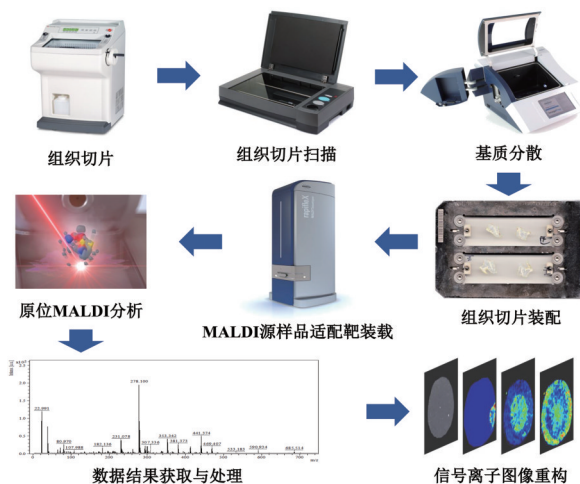


图1 MALDI-MSI的操作流程

Fig. 1 Flow chart of MALDI-MSI operation

3.1 活性成分空间分布 MALDI-MSI在中药成像领域的应用中,多以根茎类药材为研究对象,因其具有块根状型态容易制成冷冻切片,可通过选取连

续的切片来反映活性成分的位置动态变化。例如,刘芳等^[60]表征了三七根茎中的皂苷空间分布信息,根据成像图谱显示,人参皂苷 R_g 和三七皂苷 R_1 具有相同的空间分布模式,都集中分布在木栓层,印证了两者具有相同的合成途径,可为揭示三七中皂苷类化合物的合成规律提供理论依据。此外, MALDI-MSI还可用于观察黄芩^[61]、人参^[62]、芍药^[50]、甘草^[63]等中药材的活性成分的空间分布规律,对中药活性成分的鉴定分析、合成机制和特异性提取等方面研究具有一定的参考意义。本课题组基于该技术对不同中药进行了系列研究^[14, 61, 64-65]。其中1项研究表征了黄芩代谢物的空间代谢网络^[61],以黄芩中黄酮类化合物及其代谢产物为研究对象进行了成像分析。结果显示,黄酮类代谢物主要在其韧皮部被检测出,首次绘制了黄芩根部具有空间信息的黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷和汉黄芩苷的合成路线,见增强出版附加材料。在另一项研究中,选用1,5-二氨基萘(1,5-DAN)作为基质,在正离子模式下进行检测,实现了莲子中生物碱类、胆碱类、黄酮类、有机酸类、氨基酸类、磷脂类、脂肪酸类等化合物的组织原位可视化表征^[65]。这也验证了MALDI-MSI能表征植物代谢物、次生代谢物的代谢规律,可进行原位分析的特点。

近年来,药用植物的生长和代谢规律逐渐被关注, MALDI-MSI技术也更多地被应用于研究叶类和花类中药材的植株地上部分,如LI等^[66]利用高分辨MALDI-MS对银杏叶中的代谢产物进行成像分析,通过成像结果观察了黄酮类化合物在叶片表皮和叶肉中的分布情况,并对银杏内酯的合成及代谢机制进行了研究,揭示了银杏内酯的组织特异性分布信息。在同时对多种成分进行成像分析时,良好的分子覆盖率和响应值是保证检测效果的基本要素,由于传统有机基质与样品所产生的共结晶薄膜不均导致重复性差,以及基质在低相对分子质量区域有背景干扰的现象,导致部分小分子化合物不能被检测到,表面辅助激光解吸(SALDI)技术被开发以用于解决此类问题。该技术同样采用激光电离技术,然而在基质选取和制板上与MALDI不同,多采用无机纳米粒子或具有纳米结构的物质作为靶板上的底物从而替代有机基质,之后将样品放置在底物上进行制板。该底物基质检测覆盖率高,在低相对分子质量区域无明显基质峰干扰,并且样品电离程度较均匀,在根茎类和叶类药材检测中发挥重要作用。YANG等^[67]利用SALDI-MSI对玛咖根部

成分进行原位分析,能清晰显示咪唑类生物碱、酰胺类生物碱、氨基酸、糖类等38种成分,快速完成其空间定位,其检测到的活性成分种类高于使用传统基质(DHB、CHCA)的MALDI技术,为金属纳米材料底物在MSI领域的应用提供参考。WANG等^[68]创新性地开发了一种长春花的活性成分检测方法,通过物理压制的手段,将长春花中的活性成分“烙印”在纳米材料底物表面来进行SALDI-MSI分析,显示出了长春花碱、槲皮素、山柰酚等15种化合物的位置,为后续SALDI-MS在花类中药的应用提供了参考。总之,由于SALDI-MS概念较新、材料不成熟,尚有较大的改善空间,但可用作MALDI-MS的补充手段,有望成为检测小分子中药活性成分的最佳方案。

3.2 药物代谢与分布 通过分析给药后生物体内的代谢物及其动态变化,能够反映中药成分及其代谢物是否在不同组织部位积累,从而推断出药效和代谢物毒性,为评价药物的有效性和安全性提供参考。同时也能分析出药物分子引起的内源性分子变化,以及其干扰的代谢活动。例如,叶慧等^[69]以大黄酸为基质,利用MALDI-MSI获得了小鼠回肠-回盲瓣部位的内源性代谢物信息,可为后续开展中药代谢相关研究提供技术支撑。MENG等^[70]运用MALDI-MSI,通过在不同时间获取组织中的目标离子强度来反映红景天苷在小鼠不同组织的时-空变化规律,发现红景天苷在心脏和肾脏中分布不均匀,可能是由于器官中血液分布的差异等原因所导致,有待进一步研究。此外,中药活性成分的体内分布情况能够反映药物分散性与能否作用于相应靶器官,能够帮助研发中药新剂型、检测药物的有效性、探索最佳用药剂量。例如,聂宗秀等^[71]利用MALDI-MSI检验了一种新型纳米药物载体在组织中的分散情况,可为研究原药及其载体在生物体组织中的原位释放性能奠定基础。针对于药物的靶向分布现象,有研究将MALDI-MSI与靶器官的代谢组学结合,建立了一种药物分布与代谢组学协调研究的高效方法,分辨率达到亚细胞水平(10 μm),能帮助筛选新的生物标志物^[72]。MALDI-MSI目前多用于化学药的代谢研究,在中药领域应用相对较少,采用该技术获取中药活性成分在生物体内的分布信息将成为未来的重要研究方向。

4 总结与展望

MALDI-MS具有高通量、高灵敏度、稳定性好、电离温和、无需样品预处理、低成本、适用于热不稳

定样品检测的优点,是一种重要的中药研究手段。小分子有机物被认为是一种重要的活性成分,在中药研究中受到重视,MALDI-MS是研究小分子物质的有力工具,但其在中药领域应用较少,目前大多数研究致力于探索适用于小分子有机物的检测基质,但基质效率只能通过对比目前已研究的同类基质来判断,并未找到最佳基质,因此,对于最佳基质的发现尚有一定的研究空间。同时,传统有机基质分散性较差,常出现“咖啡环效应”,导致基质与样品分子结晶不均匀,在解吸和电离过程中离子数量发生变化而引起误差,为避免这种现象,新型有机和无机纳米材料基质逐渐被开发,其具有更好的分散性和电离效果,但同时可能也存在着一些问题,如成本高、无成型的制作标准、使用方法和贮存条件严格、浓度过大易造成离子源污染等,故建立统一的基质制作和检测标准、开发基于目标分子的特异性基质、筛选不同基质溶剂来提高样品吸附性、探索合适的基质浓度是重要的研究方向。

此外,有研究将其他分离技术与MALDI-MS联用,以减少样品分离操作步骤,如TLC-MALDI-MS已应用在黄酮、生物碱、多糖的分析,但对于此类研究尚存在一些问题,如硅胶板表面的不均匀性或结晶不均匀导致检测结果重复性差等问题,可尝试通过开发新型薄层板、更均匀的基质覆盖技术来解决。另外,目前MALDI-MS多用于定性分析,其定量分析报道较少,且定量分析多用于成像领域,定量分析的改进方法主要通过加入内标物、改善基质和尽可能制作较薄的切片来提高精确度,但后者存在一定缺陷,如激光不能深入照射到切片内部进行分析,进而导致实验误差。因此对于定量分析,未来的研究方向在于开发新型激光技术或制片技术。总之,MALDI-MSI能够对样品进行原位可视化分析,可以精准、快速地展现化合物的空间分布情况,实用性强,在中药领域具有较高的应用价值。

[参考文献]

- [1] 尹丽,宗兰兰,蒲晓辉,等.薄层色谱法在药物分析中的应用[J].河南大学学报:医学版,2016,35(2):77-80.
- [2] 邓哲,荆文光,刘安.薄层色谱法在当前中药质量标准中的应用探讨[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(7):201-206.
- [3] 梁晟,李雅文,赵晨曦,等.GC-MS结合保留指数对中药挥发油的定性[J].分析测试学报,2008,27(1):84-87.

- [4] 张辰露,吴三桥,秦文娟,等. GC-MS法分析中药索骨丹中脂肪酸成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 100-102.
- [5] 吴文杰,周伟娥,张元,等. LC-MS/MS技术在中药化学成分分析中的应用[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2735-2737.
- [6] 何宝坤,杨明会,高月. LC-MS联用技术在中药研究中的应用[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(9): 1497-1500.
- [7] 陈子林. 基于毛细管电泳-质谱联用的药物分析新方法[C]//中国化学会. 第三届全国质谱分析学术报告会摘要集: 2017年卷. 厦门: 中国化学会, 2017: 1.
- [8] 李佳佳,刘靖丽,靳如意,等. 激光拉曼光谱分析中药复方制剂中青蒿素含量的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, 39(8): 2403-2408.
- [9] 秦海林,赵天增. 核磁共振氢谱鉴别植物中药的研究[J]. 药学学报, 1999, 34(1): 59-63.
- [10] KARAS M, HILLEBKAMP F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons[J]. Anal Chem, 1988, 60(20): 2299-2301.
- [11] FEENSTARA A D, DUEÑAS M E, LEE Y J. Five micron high resolution MALDI mass spectrometry imaging with simple, interchangeable, multi-resolution optical system[J]. J Am Soc Mass Spectr, 2017, 28(3): 434-442.
- [12] KOMPAUER M, HEILES S, SPENGLER B. Atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging of tissues and cells at 1.4 μm lateral resolution[J]. Nat Methods, 2017, 14(1): 90-96.
- [13] URBAN C, BUCK A, SIVEKE J T, et al. PAXgene fixation enables comprehensive metabolomic and proteomic analyses of tissue specimens by MALDI MSI[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2017, 1862(1): 51-60.
- [14] SUN C L, LI Z C, MA C X, et al. Acetone immersion enhanced MALDI-MS imaging of small molecule metabolites in biological tissues[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 176: 112797.
- [15] PEREIRA E M, MATTOS C, SANTOS O, et al. Staphylococcus hominis subspecies can be identified by SDS-PAGE or MALDI-TOF MS profiles[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 11736.
- [16] STEVENSON L G, DRAKE S K, MURRAY P R. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 444-447.
- [17] SAMARAH L Z, TRAN T H, STACEY G, et al. Mass spectrometry imaging of bio-oligomer polydispersity in plant tissues by laser desorption ionization from silicon nanopost arrays[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2021, 60(16): 9071-9077.
- [18] WEI S D, ZHOU H C, LIN Y M, et al. MALDI-TOF MS analysis of condensed tannins with potent antioxidant activity from the leaf, stem bark and root bark of *Acacia confusa*[J]. Molecules, 2010, 15(6): 4369-4381.
- [19] CHEN B M, MARISSA V, RICHARD G, et al. Combining MALDI mass spectrometry imaging and droplet-base surface sampling analysis for tissue distribution, metabolite profiling, and relative quantification of cyclic peptide melanotan II[J]. Anal Chim Acta, 2020, 1125: 279-287.
- [20] XU Y, DENG Y Z, YE R R, et al. MALDI-MS imaging of lipids and small molecules in rat brain tissue based on graphene oxide film pre-coated matrix[J]. Int J Mass Spectrom, 2021, 464: 116573.
- [21] BALLUFF B, RAUSER S, MEDING S, et al. MALDI imaging identifies prognostic seven-protein signature of novel tissue markers in intestinal-type gastric cancer[J]. Am J Pathol, 2011, 179(6): 2720-2729.
- [22] SUN C L, LIU W, MU Y, et al. 1, 1'-Binaphthyl-2, 2'-diamine as a novel MALDI matrix to enhance the *in situ* imaging of metabolic heterogeneity in lung cancer[J]. Talanta, 2020, 209: 120557.
- [23] MAILHAC A, DURAND H, BOISSET S, et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid diagnosis of postoperative endophthalmitis[J]. J Proteomics, 2017, 152: 150-152.
- [24] SAUDEMONT P, QUANICO J, ROBIN Y M, et al. Real-time molecular diagnosis of tumors using water-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry technology[J]. Cancer Cell, 2018, 34(5): 697-699.
- [25] 屈亮亮. 基于MALDI的高通量蜂蜜糖浆掺假检测及植物源鉴别分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- [26] 袁湘林, 张玉奎, 邹汉法. 基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱用于中草药黄芪鉴别的研究[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(1): 7-10.
- [27] 郑洁. 胶类中药蛋白质的分析及鉴定研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017.
- [28] BEND J R, XUE Y X, CHEN D F, et al. Attenuation of oxidative stress in HEK 293 cells by the TCM constituents schisanhenol, baicalein, resveratrol or crocetin and two defined mixtures[J]. J Pharm Pharm Sci, 2015, 18(4): 661-682.

- [29] PRIDEAUX B, STAAB D, STOECKLI M. Applications of MALDI-MSI to pharmaceutical research[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 656:405-413.
- [30] ZHU S H, SHIMOKAWA S I, TANAKA H, et al. Development of an assay system for saikosaponin a using anti-saikosaponin a monoclonal antibodies [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(1):66-71.
- [31] KOULAKIOTIS N S, PITTENAUER E, HALABALAKI M, et al. Comparison of different tandem mass spectrometric techniques (ESI-IT, ESI- and IP-MALDI-QRTOF and vMALDI-TOF/RTOF) for the analysis of crocins and picrocrocins from the stigmas of *Crocus sativus* L [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012, 26(6):670-678.
- [32] SETHY N K, SINGH V K, SHARMA S, et al. Phytochemical and proteomic analysis of a high altitude medicinal mushroom *Cordyceps sinensis* [J]. *J Proteins Proteom*, 2016, 7(3):187-197.
- [33] LIU Y, LIU J Y, YIN P, et al. High throughput identification of components from traditional Chinese medicine herbs by utilizing graphene or graphene oxide as MALDI-TOF-MS matrix [J]. *J Mass Spectrom*, 2015, 46(8):804-815.
- [34] CAI Z, LEE F S, WANG X R, et al. A capsule review of recent studies on the application of mass spectrometry in the analysis of Chinese medicinal herbs [J]. *J Mass Spectrom*, 2002, 37(10):1013-1024.
- [35] 刘芳,张琳,张志信,等. 基质辅助激光解吸质谱成像在药用植物分析中的应用[J]. *分析化学*, 2019, 47(8):1125-1133.
- [36] 顾芹英. 中药香椿叶化学成分的分析与分离[D]. 镇江:江苏大学, 2016.
- [37] LI X H, YANG Y, YU Z, et al. Purification and identification of a novel protein isolated from *Panax quinquefolium* and evaluation of its *in vitro* antioxidant properties [J]. *WJTCM*, 2019, 5(4):236-242.
- [38] 黄良,杨洪梅,石磊,等. 以低浓度异甘草素为基质的MALDI-TOF MS用于小分子的检测研究[J]. *质谱学报*, 2015, 36(3):243-248.
- [39] 杨飞飞. 中药多糖控制降解寡糖在中药鉴定中的应用研究[D]. 保定:河北大学, 2016.
- [40] 王莹,许玮仪,李丽潇,等. 注射用黄芪多糖相对分子质量测定方法的比较及研究[J]. *药学学报*, 2019, 54(2):348-353.
- [41] SAITO T, WATANABE A, NAKANO M, et al. MALDI-TOF mass spectrometry imaging for N-glycans on FFPE tissue sections of mouse NASH liver through sialic acid benzylamidation [J]. *Glycoconjugate J*, 2021, 38(2):167-175.
- [42] LAI Y H, SO P K, LO S C, et al. Rapid differentiation of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 753:73-81.
- [43] ZHU Z P, SHEN J J, XU Y F, et al. The improved performance of MALDI-TOF MS on the analysis of herbal saponins by using DHB-GO composite matrix [J]. *J Mass Spectrom*, 2019, 54(8):684-692.
- [44] 鲁林,宋凤瑞,刘志强. 人参皂苷成分的MALDI-TOF质谱分析[C]//中国质谱学会. 中国有机质谱学第十四届全国学术大会会议论文集:2007年卷. 上海:中国质谱学会, 2007:2.
- [45] WU W, QIAO C F, LIANG Z T, et al. Alkaloid profiling in crude and processed *Strychnos nux-vomica* seeds by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45(3):430-436.
- [46] 王勇,邓晓春,夏博. 三种中成药中乌头生物碱飞行时间质谱分析[J]. *深圳大学学报:理工版*, 2009, 26(3):257-261.
- [47] JABER A, SERAPHIN D, GUILLET D, et al. Bithiophenic MALDI matrices as valuable leads for the selective detection of alkaloids [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(29):6791-6801.
- [48] ILBOUDO O, OUÈDRAOGO I W K, TAPSOBA I, et al. Analysis of flavonoid diglycosides in leaves of *Mentha piperita* L by MALDI-MS/MS and LC-MS [J]. *Nat Prod*, 2012, 8(8):321-327.
- [49] FOUGÈRE L, DA S D, DESTANDAU E, et al. TLC-MALDI-TOF-MS-based identification of flavonoid compounds using an inorganic matrix [J]. *Phytochem Anal*, 2019, 30(2):218-225.
- [50] LI B, GE J Y, LIU W, et al. Unveiling spatial metabolome of *Paeonia suffruticosa* and *Paeonia lactiflora* roots using MALDI MS imaging [J]. *New Phytol*, 2021, 231(2):892-902.
- [51] 杨爱霞,张力凡,鲁力. 黄芩苷磷脂复合物固体分散体的药动学研究[J]. *中国药师*, 2020, 23(7):1331-1334, 1362.
- [52] 铁红云,商云霞,尉小慧. 三七皂苷R₁磷脂复合物的制备及其质量评价[J]. *中国药学杂志*, 2020, 55(19):1609-1615.
- [53] 刘会珍,董丹丹,范明松. 不同厚朴酚制剂的制备、表征及其在SD大鼠体内药动学行为比较[J]. *中草药*, 2020, 51(17):4442-4448.
- [54] 赵玥祯,徐杨,龚灿,等. 纳米四氧化三铁基质用于基质辅助激光解吸电离质谱法分析小分子化合物[J].

- 分析化学, 2021, 49(1): 103-112.
- [55] FUCHS B. Analysis of phospholipids and glycolipids by thin-layer chromatography-matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2012, 1259: 62-73.
- [56] SHI R, DAI X, LI W F, et al. Hydroxyl-group-dominated graphite dots reshape laser desorption/ionization mass spectrometry for small biomolecular analysis and imaging [J]. ACS Nano, 2017, 11(9): 9500-9513.
- [57] TROENDLE F J, REDDICK C D, YOST R A. Detection of pharmaceutical compounds in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization and laser desorption/chemical ionization tandem mass spectrometry with a quadrupole ion trap [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 1999, 10(12): 1315-1321.
- [58] 叶阿里, 张海燕, 窦亚玲, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术检测药物代谢酶基因多态性平台的建立 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5): 30-33.
- [59] BARRY J A, GROSECLOSE M R, ROBICHAUD G, et al. Assessing drug and metabolite detection in liver tissue by UV-MALDI and IR-MALDESI mass spectrometry imaging coupled to FT-ICR MS [J]. Int J Mass Spectrom, 2015, 377: 448-155.
- [60] 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.
- [61] SUN C L, ZHANG M M, DONG H J, et al. A spatially-resolved approach to visualize the distribution and biosynthesis of flavones in *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 179: 113014.
- [62] WANG S J, BAI H R, CAI Z W, et al. MALDI imaging for the localization of saponins in root tissues and rapid differentiation of three *Panax* herbs [J]. Electrophoresis, 2016, 37(13): 1956-1966.
- [63] 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.
- [64] SUN C L, LIU W, MA S S, et al. Development of a high-coverage matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging method for visualizing the spatial dynamics of functional metabolites in *Salvia miltiorrhiza* Bge [J]. J Chromatogr A, 2020, 1614: 460704.
- [65] 孙成龙, 刘伟, 郭兰萍, 等. 基于MALDI质谱成像技术分析莲子中代谢物的组织分布 [J]. 分析测试学报, 2021, 40(1): 86-91.
- [66] 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.
- [67] YANG S H, ZHAN L P, LIU C Z, et al. Mass spectrometry imaging of small molecule *in situ* in *Lepidium meyenii* (Maca) using gold nanoparticles matrix [J]. Microchem J, 2019, 150: 104190.
- [68] WANG X N, TANG W W, GORDON A, et al. Porous TiO₂ film immobilized with gold nanoparticles for dual-polarity saldi ms detection and imaging [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12(38): 42567-42575.
- [69] 叶慧, 王赟, 王琳, 等. 基于MALDI-MS技术的新基质大黄酸在代谢组学研究中的应用 [J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(6): 727-733.
- [70] MENG X Y, FU W Q, HUO M L, et al. In situ label-free visualization of tissue distributions of salidroside in multiple mouse organs by MALDI-MS imaging [J]. Int J Mass Spectrom, 2020, 453: 116347.
- [71] 聂宗秀, 薛晋娟, 刘会会. 质谱成像技术对纳米载体原位药物释放的可视化研究 [C]//中国化学会. 第三届全国质谱分析学术报告会摘要集: 2017年卷. 厦门: 中国化学会, 2017: 1.
- [72] 刘佳琦, 杨琪, 王沛, 等. 质谱成像技术在神经系统疾病药物研发中的应用 [J]. 神经药理学报, 2019, 9(4): 60-61.

[责任编辑 刘德文]