

摘除花蕾对林下参不同部位中人参皂苷和植物激素含量的影响

罗嘉仪¹, 罗旖璐¹, 韩红亮¹, Galina Ramskaya², 徐娟³, 林学镁³, 申玲玲⁴, 何新^{1*}, 纪瑞锋^{1*}

1. 广东药科大学, 广东 广州 510006

2. 莫斯科国立谢东诺夫第一医科大学, 莫斯科 119991

3. 拉芳家化股份有限公司, 广东 汕头 515041

4. 岛津企业管理(中国)有限公司广州分公司, 广东 广州 510640

摘要:目的 考察摘除花蕾对林下参 *Panax ginseng* 叶片、叶柄、茎顶端、茎中部、茎基部、芦头、根皮、根心、侧根及须根主要人参皂苷和植物激素水杨酸、脱落酸含量的影响, 研究人参皂苷含量变化与植物激素的相关性, 为林下参的种植方式优化提供依据。方法 基于 UPLC-MS/MS 技术分别建立含量测定方法, 对林下参 10 个部位主要人参皂苷和植物激素进行测定, 运用单因素分析评价林下参摘蕾与否的质量差异, 并采用 Spearman 相关性分析方法探讨植物激素与人参皂苷含量的相关性。结果 所建立的含量测定方法稳定可行; 摘蕾组林下参地下部位中参皮 ($P < 0.05$) 和侧根部位 ($P < 0.001$) 中人参总皂苷含量显著增加, 地上部位包括林下参叶、叶柄与茎总人参皂苷含量均显著降低 ($P < 0.001$); 摘蕾组人参皂苷 R_d 在芦头 ($P < 0.05$)、根皮 ($P < 0.01$) 中的含量显著上升。摘蕾组参皮和参心中水杨酸含量显著降低 ($P < 0.001$)。水杨酸与人参皂苷 R_{b1}、人参皂苷 R_{g1} 含量呈正相关, 与人参皂苷 R_{g3}、人参皂苷 F₁ 含量呈负相关。结论 摘除花蕾可显著提高林下参除须根外地下部位主要人参皂苷总含量, 并使地上部位人参皂苷含量降低, 提高林下参综合经济价值。摘除花蕾可引起内源性水杨酸含量变化, 且该变化人参皂苷含量与人参皂苷含量变化有相关性。

关键词: 林下参; 摘蕾栽培; 人参皂苷 R_{b1}; 人参皂苷 R_{g3}; 人参皂苷 R_d; 水杨酸; 脱落酸; UPLC-MS/MS

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)04-1243-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.04.025

Influence of buds removal on content of ginsenosides and phytohormones in different part of similar wild *Panax ginseng*

LUO Jia-yi¹, LUO Yi-lu¹, HAN Hong-liang¹, Galina Ramskaya², YU Juan³, LIN Xue-mei³, SHEN Ling-ling⁴, HE Xin¹, JI Rui-feng¹

1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow 119991, Russia

3. Lafang China Co., Ltd., Shantou 515041, China

4. Guangzhou Analytical Applications Center, Shimadzu (China) Co., Ltd., Guangzhou 510640, China

Abstract: Objective To provide basis for the optimization of planting mode of *P. ginseng*, and investigate the effects of buds removal on the contents of main ginsenosides and plant hormones like salicylic acid and abscisic acid in various parts of similar wild ginseng, including aerial part: leaf, petiole, stem tip, middle part stem base, and underground part: rhizome, root bark, root heart, lateral root and fibrous root. Moreover, the further study focus on the correlation of content between ginsenosides and plant hormones. **Methods** The major ginsenosides and plant hormones of *P. ginseng* in 10 parts were accurately quantified using UPLC-MS/MS technology. The quality of *P. ginseng* affected by buds removal was evaluated using one-way ANOVA, and the correlation between the content of plant hormones and

收稿日期: 2022-08-06

基金项目: 2022 年广东省科技创新战略专项资金 (“攀登计划”专项资金) (pdjh2022a0260); 2021 年汕头市精细化工企业引进科技领军人才团队及进口替代攻关专项资金项目 (STLT2021007); 广东省中医药局科研项目 (20212125); 2021 年度广东省科技创新战略专项资金 (“攀登计划”) (pdjh2021b0262)

作者简介: 罗嘉仪 (1997—), 女, 在读硕士, 从事中药分析及药效物质基础研究。E-mail: logaga2@163.com

***通信作者:** 何新, 博士生导师, 教授, 从事中药药理与中药药理学研究。E-mail: hexintn@gdpu.edu.cn

纪瑞锋, 博士, 讲师, 从事中药物质基础与质量控制研究。E-mail: jiruifeng@edpu.edu.cn

ginsenosides was investigated using Spearman correlation analysis. **Results** The methodologies that had been established were reliable and practical. Total ginsenosides in root bark ($P < 0.05$) and lateral root ($P < 0.001$) of similar wild ginseng in the buds removed group were significantly increased, whereas total ginsenosides in aboveground parts of similar wild ginseng, including leaves, petioles, and stems, were significantly decreased ($P < 0.001$). The contents of ginsenoside Rd in rhizome ($P < 0.05$) and root bark ($P < 0.01$) in buds removed group were significantly increased. The contents of salicylic acid in the root bark and root heart of ginseng in buds removed group were significantly decreased ($P < 0.001$). Salicylic acid was positively correlated with ginsenoside Rb₁ and Rg₁, and negatively correlated with ginsenoside Rg₃ and F₁ contents. **Conclusion** Removal of buds significantly increased the content of total ginsenosides in the underground parts of *P. ginseng* except fibrous roots, but decreased in the above-ground part, leading to an increase in the comprehensive value of forest cultivated ginseng. Furthermore, buds removal can cause changes in salicylic acid content, which was correlated to the change of ginsenoside contents.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Meyer; buds removal; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rg₃; ginsenoside Rd; salicylic acid; abscisic acid; UPLC-MS/MS

人参为五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的干燥根和根茎, 人参叶为其干燥叶, 两者均具有补气、益肺、生津的功效^[1]。播种或移栽于森林之下的人参称之为林下参, 林下参全株均含有人参皂苷, 其种类和含量是影响林下参药理作用和药材质量的主要因素, 其中人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg₁ 为《中国药典》2020 年版规定的林下参药材质量控制的重要指标^[1]。

在中药栽培生产实践中, 摘除花蕾可以节约药用植物生殖活动所消耗的能量及物质使其更多地被用于营养生长, 从而提高药用植物的总生物量^[2-3]。20 世纪 80~90 年代^[4-5], 我国即有摘蕾可以提高人参产量 10%~30%, 西洋参摘蕾有效提高单产 37% 的报道, 在国家标准《人参优质种植技术规范》中明确规定园参的种植“除留种田外, 应及时掐掉花蕾”, 但是对于林下参现有的国家标准、地方标准及团体标准中并无摘蕾的规定^[6-9]。近年来在林下参的栽培生产过程中, 出现了摘蕾以进一步提高产量的现象, 但是摘蕾对林下参不同部位人参皂苷含量影响的研究尚不多^[10]。

植物激素是植物体内的小分子化合物, 调控着植物的休眠、生殖以及次生代谢物合成^[11]等几乎所有生命活动。水杨酸、脱落酸是目前研究较为深入的影响植物次生代谢物合成的植物激素, 已有研究表明外源水杨酸、脱落酸可引起人参、西洋参中人参皂苷含量变化^[12-13]。因此, 外界刺激引起的人参皂苷含量变化可能与水杨酸、脱落酸等植物激素的含量变化呈现较高的相关性, 即外界刺激可能通过影响水杨酸、脱落酸等植物激素含量, 继而引起人参皂苷的含量变化。

综上所述, 目前摘蕾对林下参不同部位人参皂苷

和植物激素影响的研究尚不多, 本实验基于 UPLC-MS/MS 技术探讨摘蕾引起的林下参不同部位主要人参皂苷含量和植物激素的变化, 并初步探讨了人参皂苷与水杨酸、脱落酸 2 种植物激素含量变化的相关性, 为林下参栽培过程中是否摘蕾提供参考依据。

1 材料、仪器与试剂

1.1 仪器

QUINTIX125D-1CN 型十万分之一电子分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 岛津 LC-40D X3plus 四元泵, 岛津 SIL-40C X3 自动进样器, 岛津 CTO-40S 柱温箱, 岛津 LCMS-8045 三重四极杆质谱仪, 日本岛津公司; Sigma 3-30K 型高速台式离心机, 德国默克公司; MD200-2 氮吹仪, 杭州奥盛仪器有限公司; ZQTY-50V 台式全温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; SB-5200DTD 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 材料

将同一年播种且生长环境及日常管理完全一致的林下参分为 2 组, 其中未摘蕾 (CK) 组林下参种植年限为 21 年, 自然生长, 无额外干预; 摘蕾 (BR) 组林下参在种植的第 15 年开始连续摘蕾 7 年直至其年限为 21 年。本研究所用上述 2 组药材于 2021 年 8 月采自吉林省集安市, 经广东药科大学纪瑞锋博士鉴定为五加科人参属植物人参 *P. ginseng* C. A. Meyer 林下参鲜样, 所有样品留样于广东药科大学中药学院。

1.3 试剂

对照品人参皂苷 Rb₁ (批号 DSTDR000601)、人参皂苷 Rd (批号 DST200703-015)、人参皂苷 Re (批号 DSTDR001401)、人参皂苷 F₁ (批号 DST200302-025)、人参皂苷 Rg₁ (批号

DST200722-009)、人参皂苷 Rg_2 (批号 DST200518-010)、人参皂苷 Rg_3 (批号 DST191107-011), 均购自成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$; 水杨酸 (批号 H31A10B96366)、脱落酸 (批号 A09N11L130206), 购自上海源叶生物; 质谱级甲醇 (批号 I1101035028), 购自德国 Merck 公司; 甲酸 (批号 L2300107, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海安谱实验科技股份有限公司。

2 方法

2.1 样品前处理

CK 组和 BR 组各 3 个生物学平行, 全株采挖, 快速擦拭表面泥土, 切分为 10 个部位, 分别为地上部位: 叶片、叶柄、茎顶端 (自叶柄开始的茎上段部位, 约为茎总长度的 1/3)、茎中部 (茎中间部分的 1/3)、茎基部 (自芦头开始的茎下段部位, 约为茎总长度的 1/3), 地下部位: 芦头、根皮、根心、侧根、须根。以上 10 个部位锡箔纸包裹后放入液氮, 备用。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 人参皂苷溶液^[14] 林下参样品快速液氮研磨, 精密称取 0.1 g 研碎的样品, 加入 2 mL 70% 甲醇水溶液, 超声提取 30 min (100 Hz、50 °C), 超声后补足损失体积, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.2.2 植物激素溶液^[15] 林下参样品快速液氮研磨, 精密称取 50 mg 研碎的样品, 平行 3 份, 分别加入 500 μL 提取溶液 (异丙醇-纯水-浓盐酸 2:1:0.002), 摇床振荡提取 (100 r/min、30 min、4 °C); 加入 1 mL 二氯甲烷, 摇床振荡萃取 (100 r/min、30 min、4 °C); 离心机离心 (13 000 r/min、5 min、4 °C); 吸取 900 μL 有机相至 2 mL 离心管; 氮吹仪吹干, 150 μL 初始流动相复溶, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.3 对照品溶液的制备

分别称取人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rd 、人参皂苷 Re 、人参皂苷 F_1 、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Rg_2 、人参皂苷 Rg_3 对照品, 精密称定, 加入色谱甲醇配制成人参皂苷检测成分混合对照品溶液, 质量浓度分别为 0.162、0.185、0.075、0.110、0.077、0.050、0.050 mg/mL, 加入色谱甲醇逐级稀释, 配制成 7 种质量浓度梯度的标准曲线工作溶液。

分别称取水杨酸和脱落酸对照品, 精密称定, 加入色谱甲醇配制成植物激素检测成分混标溶液, 水杨酸和脱落酸的质量浓度分别为 2.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 2.16 $\mu\text{g/mL}$; 加入色谱甲醇逐级稀释制成 7 个质量

浓度梯度的标准曲线工作溶液。

2.4 色谱与质谱条件

2.4.1 人参皂苷检测条件 (1) 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC ACQUITY BEH 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-甲醇 (B), 洗脱梯度为 0~1 min, 10% B; 1~9 min, 10%~60% B; 9~12 min, 60%~65% B; 12~14 min, 65%~70% B; 14~23 min, 70%~80% B; 23~26 min, 80%~85% B; 26~29 min, 85%~95% B; 体积流量为 0.5 mL/min; 柱温为 40 °C, 进样量为 1 μL 。

(2) 质谱条件 ESI 离子源; 扫描模式为正负离子切换, 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式检测; 雾化气流量 3.0 L/min; 干燥气流量 10.0 L/min; 加热气流量 10 L/min; 接口温度 300 °C; 去溶剂管温度 (desolvation line, DL) 250 °C; 加热块温度 400 °C; 碰撞诱导解离电压 (collision induced dissociation, CID) 270 kPa。人参皂苷成分 MRM 参数见表 1。

2.4.2 植物激素检测条件 (1) 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC ACQUITY BEH 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-甲醇 (B), 洗脱梯度为 0~1 min, 10% B; 1~6 min, 10%~15% B; 6~16 min, 15%~66% B; 16~19 min, 66%~95% B; 体积流量为 0.5 mL/min; 柱温为 40 °C, 进样量为 5 μL 。

(2) 质谱条件: ESI 离子源; 扫描模式为正负离子切换, MRM 模式检测; 雾化气流量 3.0 L/min; 干燥气流量 10.0 L/min; 加热气流量 10 L/min; 接口温度 300 °C; DL 温度 250 °C; 加热块温度 400 °C; CID 270 kPa。植物激素成分 MRM 参数见表 1。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 取“2.3”项下制备的梯度质量浓度混合对照品工作溶液, 按上述色谱质谱条件进行样品分析, 记录色谱图及峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归; 结果表明, 在考察范围内, 7 种人参皂苷成分与 2 种植物激素的浓度与峰面积呈良好的线性关系, r 均大于 0.990, 见表 2。取上述混合对照品适量, 用 70% 甲醇稀释成浓度为梯度由高到低的系列溶液, 进样, 取信噪比 (S/N) 为 3 和 S/N 为 10 的混合对照品溶液作为待测成分的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。

表 1 植物激素与人参皂苷的 MRM 优化结果

Table 1 Mass spectrum parameters of components

化合物	离子化方式	检测离子对(<i>m/z</i>)	预杆电压 Q1/V	碰撞能量/V	预杆电压 Q3/V
人参皂苷 Rb ₁	[M+Na] ⁺	1131.60>365.10	-32.0	-55.0	-24.0
人参皂苷 Rd	[M+Na] ⁺	969.70>789.30	-28.0	-51.0	-38.0
人参皂苷 Re	[M+COOH] ⁻	991.60>119.05	22.0	54.0	12.0
人参皂苷 F ₁	[M+Na] ⁺	661.35>203.05	-32.0	-37.0	-21.0
人参皂苷 Rg ₁	[M+Na] ⁺	823.55>203.10	-24.0	-44.0	-20.0
人参皂苷 Rg ₂	[M-H] ⁻	783.50>475.30	30.0	42.0	14.0
人参皂苷 Rg ₃	[M+COOH] ⁻	829.50>783.40	24.0	20.0	30.0
水杨酸	[M-H] ⁻	137.25>93.00	10.0	16.0	10.0
脱落酸	[M-H] ⁻	263.35>153.05	19.0	11.0	27.0

表 2 人参皂苷成分与植物激素的回归方程、*r*、线性范围、LOD 和 LOQ

Table 2 Linear regression, correlation coefficient, range, LOD and LOQ of components

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
人参皂苷 Rb ₁	$Y=84.1025X+1036.80$	0.9991	0.051~50.000	10.8	50.00
人参皂苷 Rd	$Y=231.096X-88079.5$	0.9983	0.015~30.000	1.42	4.31
人参皂苷 Re	$Y=52.7233X+1754.14$	0.9992	2.5×10^{-3} ~50.0	0.65	1.97
人参皂苷 F ₁	$Y=70.9828X+14112$	0.9994	0.01~50.00	2.06	6.23
人参皂苷 Rg ₁	$Y=166.177X-48069.9$	0.9994	0.51~50.00	0.30	0.87
人参皂苷 Rg ₂	$Y=21.5234X+5832.42$	0.9993	0.028~55.000	7.51	9.89
人参皂苷 Rg ₃	$Y=981.649X+18107.7$	0.9998	5.0×10^{-3} ~10.0	0.60	1.85
水杨酸	$Y=5789.64X+4731.95$	0.9992	0.010~0.200	0.30	0.95
脱落酸	$Y=6272.7X-1497.42$	0.9997	1.0×10^{-3} ~0.2.0	0.02	0.08

2.5.2 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液，按“2.4”项下条件连续进样 6 次，记录待测成分的峰面积，并计算峰面积的 RSD 值，考察精密度。人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Re、人参皂苷 F₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rg₂、和人参皂苷 Rg₃ 的精密度分别为 4.77%、1.25%、1.20%、2.96%、1.19%、1.9%、3.89%；水杨酸、脱落酸的精密度为 2.99%、1.72%。

2.5.3 稳定性试验 取 CK 组林下参叶样品，按按“2.2”项下植物激素以及人参皂苷供试品制备方法分别平行制备 6 份供试品，室温放置，分别于 0、2、4、6、12、24 h 按“2.4”项下条件进样，记录待测成分的峰面积，并计算峰面积的 RSD 值，考察稳定性。人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Re、人参皂苷 F₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rg₂、和人参皂苷 Rg₃ 分别为 2.23%、1.84%、2.55%、4.22%、1.09%、2.37%、2.61%；水杨酸和脱落酸分别为 2.87%、2.89%。

2.5.4 重复性试验 取 CK 组林下参叶样品，按“2.2”项下植物激素以及人参皂苷供试品制备方法分别平行制备 6 份供试品，按“2.4”项下条件进行测定，记录待测成分的峰面积，并计算峰面积的 RSD 值。人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Re、人参皂苷 F₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rg₂、和人参皂苷 Rg₃ 分别为 1.81%、2.41%、1.31%、

1.58%、3.43%、2.54%、2.79%；水杨酸和脱落酸分别为 2.99%、1.72%，表明重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 称取已测定的液氮研碎样品（CK 组林下参叶）6 份，每份约 0.05 g，精密加入一定量的混合对照品溶液，分别按“2.2”项制备供试品，按“2.4”项条件进样测定各成分含量，计算其回收率。人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Re、人参皂苷 F₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rg₂、和人参皂苷 Rg₃ 的平均回收率分别为 101.83%、114.69%、109.51%、105.53%、104.70%、103.95%、98.23%；RSD 分别为 2.3%、1.3%、4.3%、2.3%、5.3%、2.3%、1.3%；水杨酸和脱落酸的平均回收率分别为 94.26%和 100.57%；RSD 分别为 2.3%、1.3%。

2.6 数据处理

采用 Labsolutions 工作站进行测定物浓度计算，用 Excel 进行数据整理，用 SPSS 24.0 进行统计分析，用 R 语言（ggplot2 package、corrplot package）进行图表绘制。

3 结果与分析

3.1 UPLC-MS/MS 定量分析结果

2 种 UPLC-MS/MS 定量分析方法可分别使 7 种人参皂苷（图 1-A）和 2 种植物激素分离（图 1-B），可用于林下参不同部位人参皂苷及植物激素的含量检测。

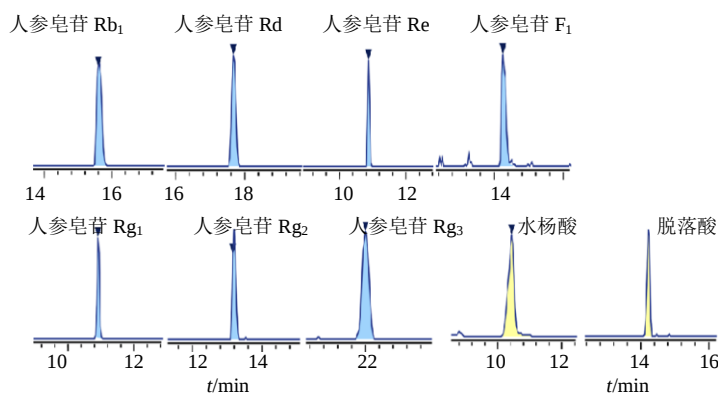


图 1 目标化合物总离子流图

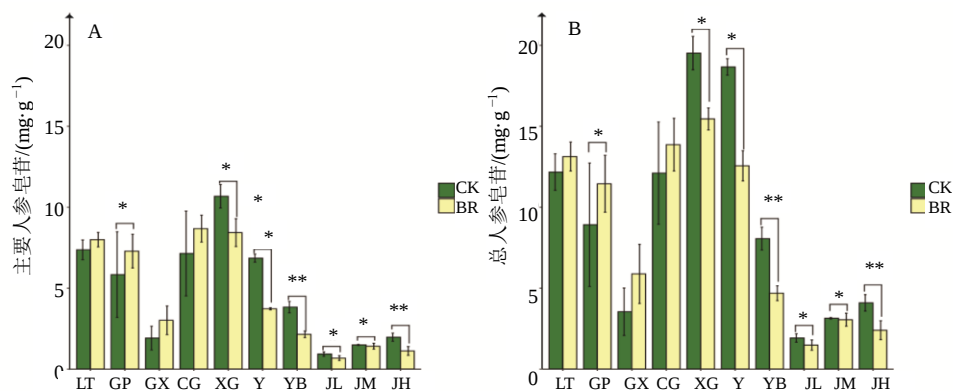
Fig. 1 Total ionization chromatogram (TIC) of compounds

3.2 摘除花蕾对林下参质量的影响

3.2.1 摘除花蕾对林下参不同部位主要人参皂苷含量的影响 按“2.1”项下方法处理样品，“2.2”项下方法制备人参皂苷供试品，“2.4”项下色谱质谱条件进行检测。人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Re 为人参药材质量的主要指标成分^[1]，三者含量之和计为主要人参皂苷，2 组样品主要人参皂苷见图 2-A；所测 7 种人参皂苷含量之和计为总人参皂苷，2 组样品中总人参皂苷比较见图 2-B。

BR 组林下参地下部位中主要人参皂苷和总人参皂苷含量均高于 CK 组林下参，其中根皮 ($P < 0.05$)、须根 ($P < 0.05$) 2 个部位具有显著性差异，芦头及根心部位无显著性差异；然而，对于地上部位而言，BR 组主要人参皂苷和总人参皂苷含量均显著低于 CK 组 ($P < 0.0001$)。2 组林下参根皮中的人参皂苷含量均明显高于根心 ($P < 0.05$)。

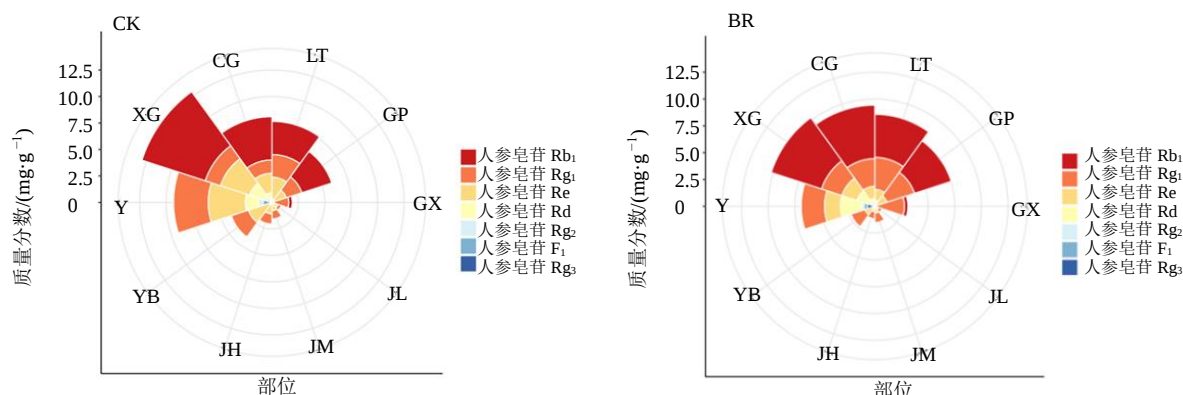
3.2.2 摘除花蕾对林下参不同部位单体人参皂苷含量的影响 林下参各部位人参皂苷含量见图 3 及表 3，与 CK 组比较，BR 组人参皂苷 Rb₁ 在芦头和侧根中含量显著增加 ($P < 0.05$)，在须根和叶中显著降低 ($P < 0.05$)。BR 组人参皂苷 Rg₁ 在侧根以及须根中含量显著升高 ($P < 0.01$)，在叶中的含量显著降低 ($P < 0.05$)。BR 组中，人参皂苷 Re 在芦头、叶、叶柄以及须根中均显著下降 ($P < 0.05$)，均少于 CK 组的 50%。BR 组人参皂苷 Rd 在芦头 ($P < 0.05$)、根皮 ($P < 0.01$) 中的含量显著上升，其中芦头中的 Rd 增至 CK 组的 12 倍以上。与 CK 组比较，BR 组人参皂苷 Rg₂ 含量在侧根、须根和叶中的含量显著升高 ($P < 0.05$)。BR 组人参皂苷 Rg₃ 在叶中的含量显著升高，增至 CK 组 ($P < 0.01$) 的 10 倍以上，在其他部位无显著性差异。2 组间人参皂苷 F₁ 含量无显著性差异。



LT-芦头 GP-根皮 GX-根心 CG-侧根 G-须根 Y-叶 YB-叶柄 JL-茎基部 JM-茎中部 JH-茎顶端 BR 与 CK 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
LT-rhizome GP-root bark GX-root heart CG-lateral root XG-fibrous root Y-leaf YB-petiole JL-stem(stem base) JM-stem (middle part)
JH-stem (stem tip) * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs CK group

图 2 摘蕾对不同部位总人参皂苷 (A) 与主要人参皂苷 (B) 含量的影响

Fig. 2 Effect of ginsenosides distribution on the buds removal of total ginsenosides (A) and main ginsenosides (B)



LT-芦头 GP-根皮 GX-根心 CG-侧根 G-须根 Y-叶 YB-叶柄 JL-茎基部 JM-茎中部 JH-茎顶端

LT-rhizome GP-root bark GX-root heart CG-lateral root XG-fibrous root Y-leaf YB-petiole JL-stem (stem base) JM-stem (middle part)

JH-stem (stem tip)

图3 摘蕾对不同部位7种人参皂苷含量的影响

Fig. 3 Effect of seven ginsenosides content on flower buds removal

表3 林下参不同部位单体人参皂苷含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Content of ginsenosides in different parts of ginseng ($\bar{x} \pm s, n=3$)

部位	人参皂苷 Rb ₁ /(mg·g ⁻¹)		人参皂苷 Rd/(mg·g ⁻¹)		人参皂苷 Re/(mg·g ⁻¹)		人参皂苷 F ₁ /(mg·g ⁻¹)	
	CK	BR	CK	BR	CK	BR	CK	BR
芦头	3.131±0.288	4.022±0.385*	0.163±0.019	0.443±0.246*	2.104±0.445	1.006±0.098*	0.006±0.001	0.004±0.000
根皮	2.970±1.582	3.631±0.515	0.009±0.005	0.120±0.076**	1.324±0.493	0.989±0.066	0.003±0.001	0.002±0.001
根心	0.332±0.087	0.328±0.086	0.016±0.001	0.083±0.071	0.192±0.048	0.029±0.025	0.002±0.000	0.001±0.000
侧根	4.080±1.834	4.985±0.202*	0.689±0.470	0.541±0.105	1.807±0.700	1.126±0.202	0.009±0.004	0.004±0.001
须根	6.301±0.725	4.965±0.797*	1.598±0.116	1.335±0.407	2.879±0.159	1.463±0.032*	0.021±0.007	0.015±0.006
叶	0.068±0.012	0.053±0.014*	1.223±0.067	1.982±0.419	3.504±0.161	1.480±0.607*	0.802±0.051	0.319±0.013
叶柄	0.007±0.001	0.007±0.000	0.019±0.003	0.023±0.005	2.131±0.191	0.800±0.018*	0.088±0.015	0.072±0.016
茎-近根端	0.007±0.000	0.005±0.000	0.007±0.000	0.008±0.001	0.593±0.138	0.329±0.035	0.002±0.000	0.006±0.001
茎-中部	0.006±0.000	0.006±0.001	0.006±0.000	0.016±0.003	0.721±0.076	0.534±0.253	0.032±0.008	0.038±0.013
茎-近叶端	0.006±0.000	0.005±0.000	0.014±0.002	0.013±0.004	1.037±0.143	0.428±0.078	0.021±0.009	0.024±0.008
部位	人参皂苷 Rg ₁ /(mg·g ⁻¹)		人参皂苷 Rg ₂ /(mg·g ⁻¹)		人参皂苷 Rg ₃ /(mg·g ⁻¹)			
	CK	BR	CK	BR	CK	BR		
芦头	2.135±0.356	2.969±0.421	0.106±0.036	0.125±0.025	0.006±0.001	0.006±0.001		
根皮	1.544±0.650	2.669±0.476	0.089±0.040	0.124±0.018	0.005±0.001	0.005±0.000		
根心	1.388±0.779	2.659±0.795	0.003±0.000	0.002±0.001	0.004±0.000	0.004±0.000		
侧根	1.257±0.438	2.567±0.627**	0.245±0.156	0.195±0.018*	0.008±0.001	0.006±0.000		
须根	1.507±0.050	2.006±0.095**	0.575±0.055	0.410±0.047*	0.039±0.011	0.018±0.005		
叶	3.283±0.104	2.196±0.100*	0.425±0.033	0.205±0.017*	0.063±0.009	0.720±0.016**		
叶柄	1.694±0.169	1.342±0.184	0.084±0.013	0.093±0.029	0.012±0.001	0.012±0.002		
茎-近根端	0.333±0.004	0.348±0.114	0.019±0.004	0.043±0.008	0.005±0.000	0.005±0.001		
茎-中部	0.771±0.440	0.877±0.158	0.034±0.001	0.050±0.014	0.005±0.000	0.008±0.001		
茎-近叶端	0.931±0.110	0.689±0.190	0.036±0.008	0.038±0.010	0.007±0.001	0.007±0.001		

与CK组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs CK group

3.3 摘蕾对人参影响的机制

3.3.1 摘蕾对林下参不同部位植物激素含量的影响 取“2.1”项下同样的林下参植株,按“2.2”项下制备方法制备植物激素供试品,按“2.4”项下色

谱质谱条件进行检测,BR组和CK组不同部位植物激素的含量分布结果见表4和图4。

2组林下参中的水杨酸在参皮、参心间含量无显著差异性,其他部位均具有显著性差异($P <$

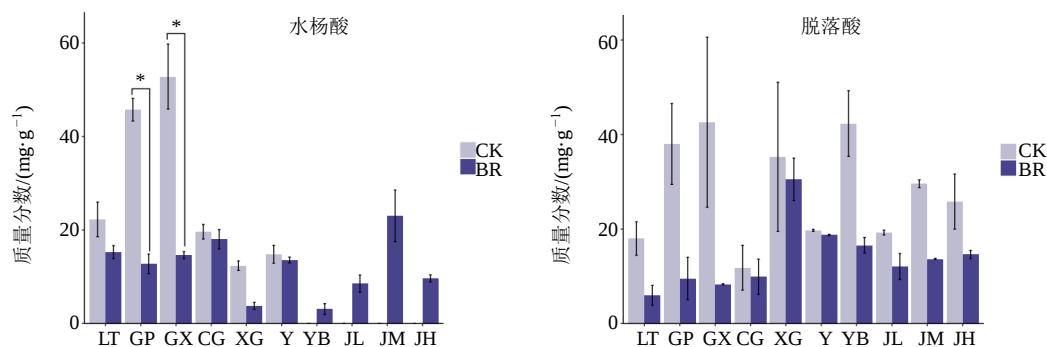
表 4 CK 组与 BR 组中不同部位植物激素的含量分布 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Determination results of plant hormones in normal cultivated and buds-picked ginseng with different part ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

部位	质量分数/(ng·g ⁻¹)			
	水杨酸		脱落酸	
	CK	BR	CK	BR
芦头	22.278±3.699b	15.286±1.633ab	17.995±2.994a	5.979±2.770b
根心	45.736±2.434a	12.759±2.091abc	38.008±8.577a	9.544±4.488b
根皮	52.812±6.939a	14.625±0.754abc	42.607±17.791a	8.303±0.131b
侧根	19.632±1.561bc	18.033±2.091a	11.816±4.756a	9.905±3.733b
须根	12.365±1.014d	3.782±0.744d	35.292±15.781a	30.516±4.487a
叶	14.824±1.914cd	13.573±0.631abc	19.734±0.221a	18.755±0.131ab
叶柄	—	3.093±1.173d	42.332±6.960a	16.585±1.657ab
茎-近根部端	—	8.534±1.845c	19.260±0.507a	12.067±2.749ab
茎-中部	—	23.025±5.530a	29.595±0.825a	13.678±0.131ab
茎-近叶端	—	9.651±0.757ba	25.808±5.825a	14.610±0.874ab

“—”表示含量低于检测限；同列数据不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)

The symbol “—” means below LOQ; Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$)



LT-芦头 GP-根皮 GX-根心 CG-侧根 G-须根 Y-叶 YB-叶柄 JL-茎基部 JM-茎中部 JH-茎顶端; BR 组与 CK 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.001$
LT-rhizome GP-root bark GX-root heart CG-lateral root XG-fibrous root Y-leaf YB-petiole JL-stem (stem base) JM-stem (middle part),
JH-stem (stem top) * $P < 0.05$ ** $P < 0.001$ vs CK group

图 4 摘除花蕾对不同部位主要植物激素的影响

Fig. 4 Effect of plant hormones distribution on buds removal

0.05)。CK 组林下参中脱落酸在不同部位间的分布无显著性差异，但在 BR 组中，地上部位与地下部位含量分布具有显著性差异 ($P < 0.05$)，须根与其他部位的脱落酸含量均具有显著性差异 ($P < 0.05$)。林下参茎中每段间的植物激素含量无显著性差异。

相比于 CK 组，BR 组根皮、根心水杨酸含量显著降低 ($P < 0.05$)；CK 组中，叶柄和茎中水杨酸含量低于检测限，BR 组中水杨酸含量显著升高；其他部位水杨酸含量在两组间无显著性差异。2 组间林下参不同部位脱落酸含量变化无显著性差异。

3.3.2 水杨酸、脱落酸与人参皂苷含量分布相关性
采用 IBM SPSS 26 和 R Studio 软件，对 2 组样品人参皂苷以及植物激素含量进行 Spearman 相关性分

析、双尾显著性检验，从而分析林下参中脱落酸和水杨酸与人参皂苷的含量分布相关性，结果见图 5。

水杨酸与人参皂苷 Rb₁ ($r = 0.467, P < 0.01$)、人参皂苷 Rg₁ ($r = 0.294, P < 0.05$) 呈正相关，与人参皂苷 Rg₃ ($r = -0.257, P < 0.05$) 和人参皂苷 F₁ ($r = -0.355, P < 0.01$) 呈负相关。脱落酸与人参皂苷 Re ($r = 0.257, P < 0.05$)、人参皂苷 F₁ ($r = 0.258, P < 0.05$) 呈正相关。水杨酸与总人参皂苷含量 ($r = 0.266, P < 0.05$) 呈正相关，与主要人参皂苷含量 ($r = 0.304, P < 0.05$) 呈正相关。

4 讨论

4.1 色谱条件考察

高效液相色谱质谱联用法具有专属性强、定量

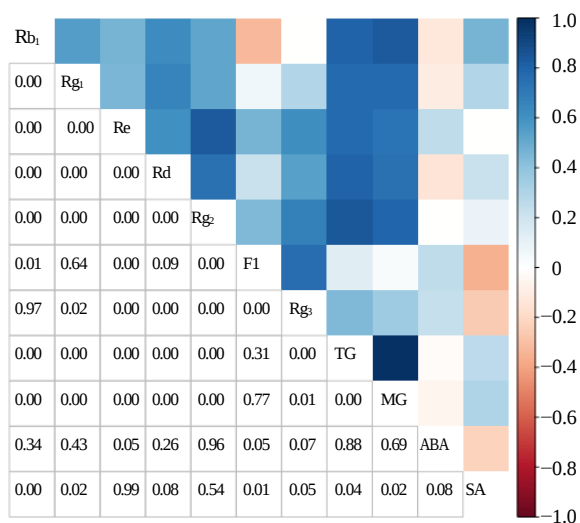


图 5 林下参中植物激素与人参皂苷的相关性分析气泡图
 Fig. 5 Reveal the correlation between determined components by bubble plot

图 5 林下参中植物激素与人参皂苷的相关性分析气泡图
 Fig. 5 Reveal the correlation between determined components by bubble plot

限低和分析时间短等优点，近年来越来越多地用于人参药材中人参皂苷和植物激素的含量测定^[16-17]。人参体内植物激素水杨酸与脱落酸含量极低，数量级约为 $10^{-8} \sim 10^{-7}$ ，因此适合使用高效液相色谱质谱联用法进行测定。针对人参皂苷和植物激素检测，本实验比较了甲醇-水、甲醇-水（0.05%甲酸）、甲醇-水（0.1%甲酸）洗脱系统，结果表明采用甲醇-水作为洗脱系统时，人参皂苷及植物激素的离子化效果差；采用甲醇-0.1%甲酸水溶液作为洗脱系统时，人参皂苷时离子响应效果最好；而采用甲醇-0.05%甲酸水溶液与甲醇-0.1%甲酸水溶作为液洗脱系统，植物激素响应效果无差别，因此选用甲醇-0.1%甲酸水溶液进行洗脱。

本实验成功建立了可用于人参皂苷含量测定及人参内源植物激素含量测定的 UPLC-MS/MS 方法，并对林下参 10 个不同部位中的 7 种人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rg₃、人参皂苷 Rg₂、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Re、人参皂苷 F₁ 及 2 种植物激素水杨酸、脱落酸进行了含量测定，所建立的方法稳定可行。

4.2 林下参不同部位人参皂苷的分布规律及摘蕾对其的影响

研究表明摘蕾可显著提高园参、三七及西洋参

的产量及人参皂苷含量^[4-5, 18]。为了考察摘蕾对林下参品质的影响，本实验对未摘蕾及摘蕾林下参中 7 种人参皂苷含量进行测定。人参皂苷含量部位间分布差异大^[19]，且分布差异与运输密切相关^[20-21]，Schramek 等^[20]用 ¹³C 标记的同位素示踪法发现，人参皂苷合成的前体存在从叶子转移到根中的现象。Kim 等^[22]与 Han 等^[23]研究小组发现，人参皂苷分布与基因表达并不一致，由此可以推测，人参皂苷含量在叶片、叶柄、茎顶端、中部、基部、芦头、根皮、根心、侧根与须根的空间分布可能呈依次递增或递减规律。因此本实验将林下参切分为 10 个部位并对其含量分别进行检测。本实验结果表明，正常生理状态下，地上部分人参皂苷总含量叶 > 叶柄 > 茎顶端 > 茎中部 > 茎基部，即人参皂苷总含量在叶、叶柄与茎中呈递减规律，这可能是人参皂苷由叶片合成然后运输到根造成的，与前期文献报道相符^[22-23]。摘蕾后人参皂苷在地上部位的含量均降低，但其含量递减现象与正常组基本一致。

与未摘蕾组相比，摘蕾组林下参地下部位除须根部位外中主要人参皂苷和总人参皂苷含量均上升，地上部位主要人参皂苷和总人参皂苷含量均显著降低。考虑到须根在林下参植株总生物量中占比较少，因此摘除花蕾可提高林下参药材整体质量，但是林下参来源的人参叶药材品质却有所下降。

4.3 摘除花蕾对林下参影响的植物激素相关机制

研究表明外源水杨酸及脱落酸处理对人参皂苷的含量有显著影响，例如，外源水杨酸处理可以提高林下参根中人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 等人参皂苷的含量^[12]。

研究表明水杨酸及脱落酸均参与调控植物人参皂苷的生物合成，例如水杨酸通过提高人参合成酶活性，促进人参皂苷积累^[12]，脱落酸通过上调人参皂苷合成酶相关基因启动子的表达，影响西洋参人参皂苷的积累^[13, 24]。因此，本实验对林下参不同部位水杨酸及脱落酸的含量进行了检测。摘蕾对不同部位水杨酸的含量变化有显著影响。植物在受到外界环境刺激时可通过调控水杨酸、脱落酸等植物激素，促进次生代谢物的合成来抵御环境胁迫^[25]。水杨酸通过影响关键酶活性、关键酶基因差异表达、调控转录因子和启动子活性、植物激素间协同交互影响人参皂苷的生物合成和积累^[26]。因此，摘蕾改变林下参中内源性水杨酸的含量，可能通过调控三萜类化合物在生物合成中的关键酶活性或基因差异

表达, 进而影响人参皂苷的合成与运输。

摘除花蕾可提高林下参除须根外地下部位人参皂苷含量, 并使地上部位人参皂苷含量降低, 因此摘除花蕾可提高林下参药材整体质量, 但是林下参来源的人参叶药材品质却有所下降。但林下参根和根茎经济价值更高, 因此摘除花蕾可以提高林下参的综合经济价值。摘除花蕾可能通过改变内源性水杨酸的含量, 从而调控林下参的生理活动, 最终引起人参皂苷的含量变化。本研究阐明了摘除花蕾对林下参中人参皂苷和植物激素含量的影响, 为林下参种植方式选择提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 8-9.
- [2] 缪媛媛, 朱再标, 郭巧生, 等. 摘蕾和人工授粉对老鸦瓣生长和产量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2016-2018.
- [3] Kołodziej B, Sugier D, Kwiatkowski C. Phosphorus fertilization and inflorescence removal in American ginseng culture [J]. *Ind Crops Prod*, 2015, 74: 619-627.
- [4] 王化民, 王铁生, 孟繁莹, 等. 西洋参摘蕾效应的研究 [J]. 特产研究, 1994, 16(3): 26.
- [5] 潘日新, 陈一兵. 人参摘除花蕾能增产 [J]. 中药材科技, 1983, 6(2): 20.
- [6] 野山参人工繁衍培育操作规程: GB/T 22531—2015 [S]. 2015: 263.
- [7] 林下山参生产技术规程: DB21/T 3012—2018 [S]. 2018: 236.
- [8] 桓仁山参生产技术规程: DB21/T 2887—2017 [S]. 沈阳: 2017, 395.
- [9] 宽甸山参栽培技术规程 [S]. 2018: 25.
- [10] 田景鑫, 蔡明, 原庆贺. 摘蕾和采收期对桓仁山参品质的影响研究 [J]. 中国林副特产, 2021(4): 22-24.
- [11] 黎家, 李传友. 新中国成立 70 年来植物激素研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(10): 1227-1281.
- [12] 曹伍林, 孟祥才, 马伟. 水杨酸对春季全光照下人参光合特性、生理生化及皂苷含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(18): 3553-3559.
- [13] Kochan E, Balcerzak E, Szymczyk P, et al. Absciscic acid regulates the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene promoter and ginsenoside production in *Panax quinquefolium* hairy root cultures [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1310.
- [14] 汪静静. 不同产地和年限人参样品皂苷类成分的比较

研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2015.

- [15] Pan X Q, Welti R, Wang X M. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(6): 986-992.
- [16] 陈树东, 胡文军, 孔祥词, 等. 固相萃取/超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定人参、人参叶与人参花中 10 种人参皂苷含量 [J]. 分析测试学报, 2021, 40(9): 1348-1354.
- [17] Xiu Y, Li X, Sun X L, et al. Simultaneous determination and difference evaluation of 14 ginsenosides in *Panax ginseng* roots cultivated in different areas and ages by high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometer in the multiple reaction-monitoring mode combined with multivariate statistical analysis [J]. *J Ginseng Res*, 2019, 43(4): 508-516.
- [18] Liu S Q, Ren Y Y, Xu H B. Effect of thinning flower buds on fruit and seed traits and root yield of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Ind Crops Prod*, 2011, 33(3): 559-565.
- [19] Lee J W, Choi B R, Kim Y C, et al. Comprehensive profiling and quantification of ginsenosides in the root, stem, leaf, and berry of *Panax ginseng* by UPLC-QTOF/MS [J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2147.
- [20] Schramek N, Huber C, Schmidt S, et al. Biosynthesis of ginsenosides in field-grown *Panax ginseng* [J]. *JSM Biotechnol Biomed Eng*, 2014, 2: 1033.
- [21] Fukuda N, Shan S J, Tanaka H, et al. New staining methodology: Eastern blotting for glycosides in the field of Kampo medicines [J]. *J Nat Med*, 2006, 60(1): 21-27.
- [22] Kim Y J, Lee O R, Oh J Y, et al. Functional analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase encoding genes in triterpene saponin-producing ginseng [J]. *Plant Physiol*, 2014, 165(1): 373-387.
- [23] Han J Y, In J G, Kwon Y S, et al. Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(1): 36-46.
- [24] Xia P G, Guo H B, Ru M, et al. Accumulation of saponins in *Panax notoginseng* during its growing seasons [J]. *Ind Crops Prod*, 2017, 104: 287-292.
- [25] Isah T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production [J]. *Biol Res*, 2019, 52(1): 39.
- [26] 代红洋, 柏旭, 李晓岗, 等. 植物激素在三萜类化合物生物合成中的作用及调控机制研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(20): 6391-6402.

[责任编辑 时圣明]