

基于指纹图谱、主成分分析及正交偏最小二乘判别分析评价不同生长年限实生芍药特征

李 钰, 叶 霄, 黄位年, 曾 静, 杨 晓, 张 超, 尹存平, 赵馨怡, 邓洁琼*

四川省农业科学院经济作物研究所, 四川 成都 610300

摘 要: **目的** 建立不同生长年限实生芍药 *Paeonia lactiflora* 指纹图谱, 同时测定 6 种差异标志物成分含量及 15 种农艺性状, 筛选实生芍药与生长年限关联的关键化学成分和主要农艺性状特征属性, 以了解不同生长年限实生芍药的生长发育规律。**方法** 5 组实生芍药材料, 每组随机取样 10 株, 共建立 50 株不同生长年限的实生芍药 HPLC 指纹图谱, 并测定没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、五没食子酰葡萄糖、苯甲酰芍药苷 6 种差异标志物含量; 同时测定 15 种农艺性状(株高、冠幅、分枝数、叶片数、叶面积、地上鲜质量、开花数、主根长、主根粗、主根数、须根长、须根数、地下鲜质量、主根鲜质量、须根鲜质量)。利用层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)和 Spearman 相关性分析, 筛选与生长年限关联的关键化学成分和主要农艺性状。**结果** 50 株实生芍药共有 27 个共有峰, 其中 S0、S1、S2、S3、S4 分别标定出 10、10、13、16、19 个特征峰; 通过 PCA 和 OPLS-DA 分析, 筛选出 7 个差异性化学成分标志物, 其变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值依次为峰 12(芍药苷)>峰 10(芍药内酯苷)>峰 24>峰 3(没食子酸)>峰 23>峰 19(五没食子酰葡萄糖)>峰 22(VIP>1)。含量测定结果表明, 芍药苷、氧化芍药苷、五没食子酰葡萄糖含量随生长年限呈显著增加趋势; 芍药内酯苷含量先降低后升高, 苯甲酰芍药苷缓慢升高但差异不显著, 趋于稳定; 没食子酸含量在第 1 年显著增加, 之后均趋于稳定; 其中 VIP 值为芍药苷>芍药内酯苷(VIP>1)。实生芍药的农艺性状分析表明, PCA 和 OPLS-DA 筛选出 3 个差异标志性农艺性状, 其 VIP 值依次为须根长>开花数>主根粗(VIP>1)。**结论** 随着生长年限的增加, 实生芍药根部药材的共有峰数量增多, 相似度提高, 化学组成的稳定性和一致性增强; 农艺性状方面, 地上部分体积增大, 地下部分根系生长、分枝、扩展, 芍药总生物量快速积累。芍药苷可作为区分不同生长年限实生芍药的关键差异性化学成分标志物; 须根长、开花数、主根粗可作为区分不同生长年限实生芍药的重要农艺性状标志物。

关键词: 芍药; 种子繁育; 生长年限; HPLC; 指纹图谱; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 没食子酸; 氧化芍药苷; 芍药内酯苷; 芍药苷; 五没食子酰葡萄糖; 苯甲酰芍药苷

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)07-2505-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.07.024

Evaluation of characteristics of *Paeonia lactiflora* of different ages based on fingerprint, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis

LI Yu, YE Xiao, HUANG Weinian, ZENG Jing, YANG Xiao, ZHANG Chao, YIN Cunping, ZHAO Xinyi, DENG Jieqiong
Industrial Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610300, China

Abstract: Objective To establish fingerprint profiles of *Paeonia lactiflora* in different growth ages and measure six differential marker compounds content and 15 agronomic traits. To screen the key chemical components and main agronomic characteristics of *P. lactiflora* related to the growth ages in order to understand the growth and development law of *P. lactiflora* in different growth ages. **Methods** For five groups of *P. lactiflora* (10 plants per group), HPLC fingerprint profiles were created for 50 plants of different growth durations. The content of six differential marker compounds (gallic acid, oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, pentagalloylglucose and benzoylpaeoniflorin) and 15

收稿日期: 2024-11-09

基金项目: 四川省“十四五”农作物及畜禽育种攻关项目(2021YFYZ0012); 四川省科技计划资助(2023YFQ0112); 四川省财政自主创新专项项目(2022ZZCX077); 国家现代农业产业技术体系建设专项项目(CARS-21)

作者简介: 李 钰, 女, 助理研究员, 主要从事中药材遗传育种与质量控制研究。E-mail: 258694939@qq.com

*通信作者: 邓洁琼, 女, 博士, 主要从事中药材遗传育种与代谢调控。E-mail: deng.dawn@gmail.com

agronomic traits (plant height, crown width, number of branches, number of leaves, leaf area, above ground fresh quality, number of flowers, length of taproot, thickness of taproot, number of taproot, length of fibril, number of fibril, underground fresh quality, fresh quality of taproot, fresh quality of fibril) were measured. Hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) and Spearman correlation analysis were used to identify key chemical components and major agronomic traits associated with growth duration. **Results** Among the 50 *P. lactiflora*, 27 common peaks were identified. S0, S1, S2, S3 and S4 had 10, 10, 13, 16 and 19 characteristic peaks, respectively. PCA and OPLS-DA identified seven differential chemical markers, and their variable importance in projection (VIP) values were peak 12 (paeoniflorin) > peak 10 (albiflorin) > peak 24 > peak 3 (gallic acid) > peak 23 > peak 19 (pentagalloylglucose) > peak 22 (VIP > 1). The results of content determination showed that the content of paeoniflorin, oxypaeoniflorin and pentagalloylglucose significantly increased with growth duration. Albiflorin decreased initially then increased, benzoylpaeoniflorin increased slowly but not significantly and tended to be stable, and gallic acid increased significantly in the first year then stabilized. The VIP value was paeoniflorin > albiflorin (VIP > 1). The analysis of agronomic traits of *P. lactiflora* showed that PCA and OPLS-DA selected three differential signature agronomic traits, and their VIP values were length of fibril > number of flowers > thickness of taproot (VIP > 1). **Conclusion** With increased growth duration, *P. lactiflora* show more common peaks, increased similarity, and increased stability and consistency of chemical composition. In terms of agronomic traits, the volume of the above-ground part increases, the roots of the underground part grow, branch and expand, and the total biomass accumulated rapidly. Paeoniflorin can be used as a key differential chemical marker to distinguish *P. lactiflora* in different growth durations, while length of fibril, number of flowers, thickness of taproot are important agronomic markers to distinguish *P. lactiflora* in different growth durations.

Key words: *Paeonia lactiflora* Pall.; seed breeding; growth years; HPLC; fingerprint profile; PCA; OPLS-DA; gallic acid; oxypaeoniflorin; albiflorin; paeoniflorin; pentagalloylglucose; benzoylpaeoniflorin

芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 在我国具有悠久的栽培历史, 为芍药科芍药属的多年生草本植物。芍药用途广泛, 芍药花被称为“花中二绝”之一的“花相”, 芍药根是我国常用大宗药材之一, 芍药种子是用于制涂料或制皂的工业油料^[1-2]。安徽亳州、四川中江、浙江磐安和山东菏泽是我国药用芍药 4 大主要产区, 市场上分别称为亳白芍、川白芍、杭白芍和菏泽白芍^[3]。生产上, 芍药常用的繁殖方法包括芍头无性繁殖和种子繁殖。芍头无性繁殖主要采用生长 3~5 年的芍药植株作为母株, 采挖母株后, 将芍头切割成带 3~4 个芽点的小块, 用作种苗。一株母株可以被分成 2~5 个种苗。这些种苗种植后, 需要 3~5 年的时间才能再次进行分株繁殖, 繁育耗时长, 繁殖系数低^[4]。且长期无性分根繁殖, 容易导致品种退化^[5-7]。研究发现, 长期采用芽头无性繁殖, 亳白芍种质质量逐年下降, 病虫害问题严重^[8]; 杭白芍主根短, 侧根多, 芍头大而中空, 药材品相差^[9]。

种子有性繁殖在维持物种的遗传多样性中起着至关重要的作用, 也是物种在自然界中提高种群进化适应能力的重要策略^[10]。由于基因的重组, 种子繁殖的植株间具有更高的遗传多样性, 农艺性状和化学成分含量个体间差异更大, 为品种改良、定向育种、优良品种选育奠定了丰富的种质资源^[11-12]。研究发现种子繁殖的杭白芍主根粗长, 侧根少, 芍头中空少, 产量远高于无性繁殖芍药, 活性成分

白芍总苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、芍药内酯苷均显著增高; 能加工成可供出口的 1~2 等白芍占比大, 经济效益高于分根繁殖, 且种子繁殖还可改善长期分根繁殖带来的品种退化问题^[6,9]。种子繁殖作为芍药种苗规模化繁育以及芍药杂交新品种选育的重要途径之一, 且相关研究报道较少, 主要集中在芍药种子破眠萌发方面, 种子萌发后不同生长年限的实生芍药生长特征相关研究报道极少。基于此, 本研究利用指纹图谱、主成分分析及正交偏最小二乘判别分析对不同生长年限种子繁殖实生芍药特征进行综合评价, 为进一步了解实生芍药生长发育特征, 指导保障药材质量提供科学依据, 也为芍药种子种苗繁育及品种改良选育等工作提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 AUW220D 电子天平, 日本岛津公司; Agilent 1200 HPLC, 美国 Agilent 公司; Milli-Q®超纯水仪, 美国 Millipore 公司; KQ-250VDB 型双频数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 材料

对照品没食子酸 (批号 PS000688, 质量分数 ≥ 98.0%)、氧化芍药苷 (批号 PS010199, 质量分数 ≥ 98.0%)、芍药内酯苷 (批号 PS011455, 质量分数 ≥ 95.0%)、芍药苷 (批号 PS000825, 质量分数 ≥ 98.0%)、

苯甲酰芍药苷(批号 PS000157, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、 β -1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖(批号 PS011427, 质量分数 $\geq 98.0\%$)。上述对照品均由成都普思生物科技有限公司提供。水为超纯水, 对照品、磷酸、甲醇、乙腈均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

统一采用山西紫红色单瓣芍药种子, 播种于四

川省农科院经作所简阳石盘科研基地同一育苗地, 于 2022 年 5 月取不同生长年限(0.5 年、1 年、2 年、3 年未开花、3 年开花)的实生芍药随机取样调查各 10 株。植物材料信息见表 1。经四川省农业科学院经济作物研究所杨晓研究员鉴定, 50 株芍药均为芍药科植物芍药 *P. lactiflora* Pall. 植株。

表 1 种子繁育不同生长年限芍药样品信息

Table 1 Sample information of *P. lactiflora* in different growth ages of seed breeding

编号	批号	播种时间	生长年限
S0-1~S0-10	SY20211009001~SY20211009010	2021-10	0.5 年生
S1-1~S1-10	SY20210009001~SY20210009010	2020-09	1 年生
S2-1~S2-10	SY20201009001~SY20201009010	2019-10	2 年生
S3-1~S3-10	SY20191009001~SY20191009010	2018-09	3 年生, 未开花
S4-1~S4-10	SY20191009011~SY20191009020	2018-09	3 年生, 开花

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品, 使用甲醇为溶剂, 制成含没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酰芍药苷的混合对照品溶液, 质量浓度为 20.48、10.68、309.6、510.50、68.36、20.02 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.2 供试品溶液的制备 取芍药根, 洗净、烘干后粉碎, 通过 4 号筛(65 目, 250 μm 孔径), 称取粉末 0.2 g, 加入稀乙醇 25 mL, 精确称定质量, 超声提取 30 min(功率 240 W, 频率 45 kHz), 冷却至室温, 补充质量, 摇匀后 0.22 μm 有机滤头滤过, 即得供试品溶液^[13]。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Athena C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶, 梯度洗脱: 0~10 min, 5%~18%乙腈; 10~25 min, 18%~20%乙腈; 25~30 min, 20%~25%乙腈; 30~45 min, 25%~40%乙腈; 45~50 min, 40%~45%乙腈; 50~57 min, 5%乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL ; 波长切换检测: 0~6 min, 270 nm; 6~10.5 min, 258 nm; 10.5~15 min 和 30~50 min, 230 nm; 15~30 min, 280 nm^[14]。

2.3 HPLC 指纹图谱方法学考察及指纹图谱建立

2.3.1 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下同一供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件, 连续自动进样 6 针, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, 分别为 0.08%~0.37%和 0.72%~1.77%。

2.3.2 重复性试验 精密称定同一芍药样品 6 份,

按“2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, 分别为 0.07%~0.41%和 1.39%~3.21%。

2.3.3 稳定性试验 精密吸取“2.1.2”项下同一供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样检测, 测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, 分别为 0.07%~0.38%和 0.85%~2.86%。

2.3.4 HPLC 指纹图谱建立 将 50 株样品按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进行测定, 记录各色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012 版, 中位数法, 时间窗宽度设为 0.5 min, 进行多点校正和 Mark 峰匹配, 得到不同生长年限实生芍药的叠加指纹图谱和对照指纹图谱(图 1)。5 个生长年限共 50 批芍药共标记了 27 个共有峰, 经混合对照品(图 1-A)的色谱结果指认, 鉴定出其中 6 个色谱峰, 分别为: 3 号峰没食子酸、6 号峰氧化芍药苷、10 号峰芍药内酯苷、12 号峰芍药苷、19 号峰五没食子酰葡萄糖、26 号峰苯甲酰芍药苷。S0 共标定了 10 个特征峰(图 1-F), S1 共标定了 10 个特征峰(图 1-E), S2 共标定了 13 个特征峰(图 1-D), S3 共标定了 16 个特征峰(图 1-C), S4 共标定了 19 个特征峰(图 1-B)。

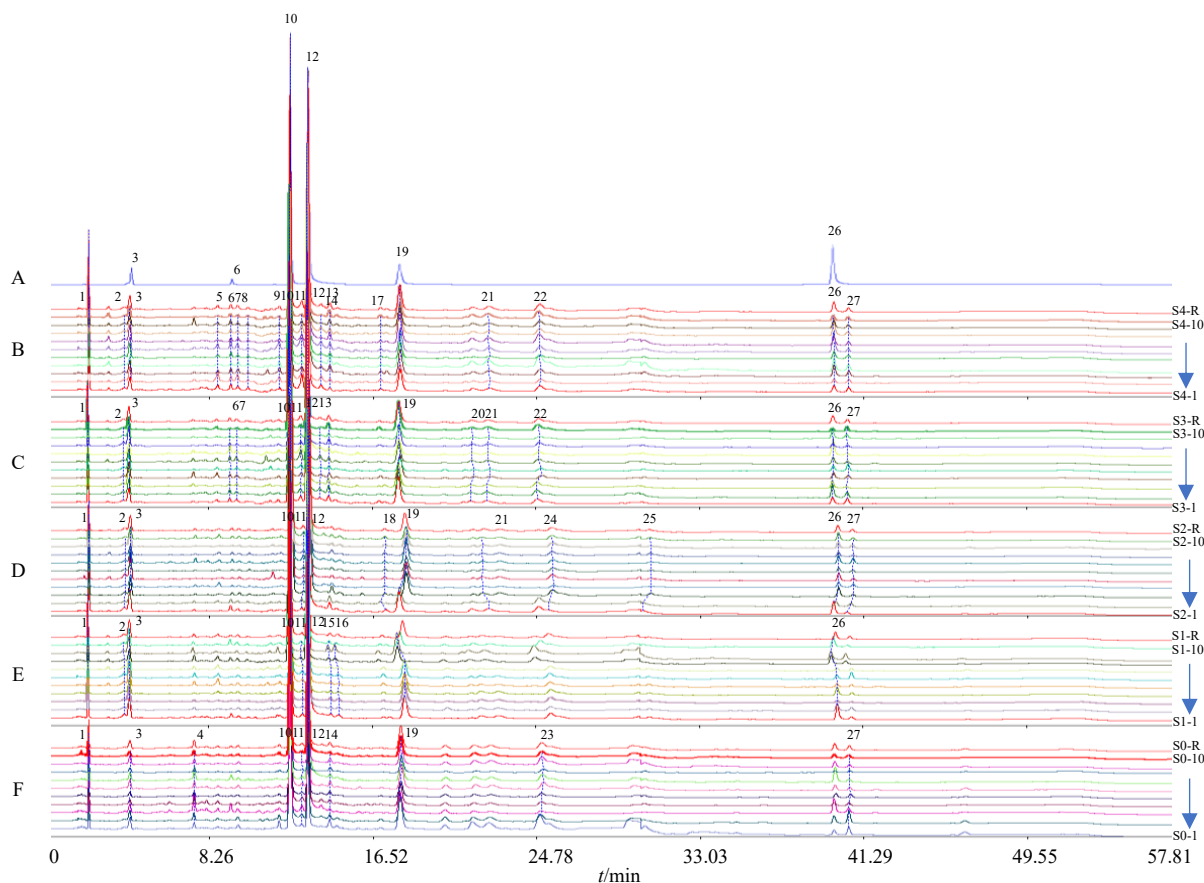
2.4 不同生长年限实生芍药 HPLC 指纹图谱分析

2.4.1 相似度分析 将不同生长年限的实生芍药与其各自的对照指纹图谱进行比较, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012 版计算相似度,

Excel 绘制箱型图, 结果见图 2。0.5 年生 (S0) 相似度为 0.679~0.997, 1 年生 (S1) 相似度为 0.714~0.995, 2 年生 (S2) 相似度为 0.681~0.999, 3 年生未开花株 (S3) 相似度为 0.822~0.998, 3 年生开花株 (S4) 相似度为 0.850~0.997, 随着生长年限的增加, 实生芍药的相似度逐渐增高, 且开花后的实

生芍药成分更为统一, 表现出较强的一致性和较小的差异, 而其他生长年限的实生芍药相则表现出较大个体差异。

2.4.2 层次聚类分析 (hierarchical cluster anal, HCA) 将不同生长年限实生芍药各自指纹图谱中的特征峰峰面积作为变量, 导入 TBtools 分析软件,



3-没食子酸; 6-氧化芍药苷; 10-芍药内酯苷; 12-芍药苷; 19-1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖; 26-苯甲酰芍药苷。
3-gallic acid; 6-oxypaeoniflorin; 10-albiflorin; 12-paeoniflorin; 19-1,2,3,4,6-pentagalloylglucose; 26-benzoylpaeoniflorin.

图 1 混合对照品 (A)、S4 (B)、S3 (C)、S2 (D)、S1 (E)、S0 (F) 的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), S4 (B), S3 (C), S2 (D), S1 (E), S0 (F) and their reference fingerprints

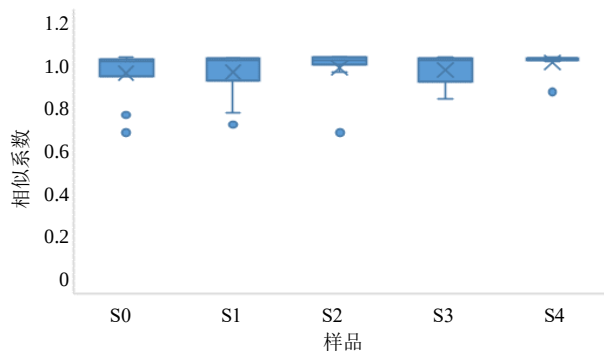


图 2 不同生长年限实生芍药相似度箱型图

Fig. 2 Boxplot of similarity for *P. lactiflora* in different growth ages

进行 HCA。结果见图 3, 不同生长年限的实生芍药主要聚为 3 类, 0.5 年生 (S0) 单独聚为一类, 1 年生 (S1) 和 2 年生 (S2) 聚为一类, 3 年生未开花株 (S3) 和开花株 (S4) 与少量 2 年生 (S2) 聚为一类。这表明, 不同生长年限的实生芍药在化学成分的含量上存在较大差异, 有少量 2 年生植株 (S2) 在化学成分特征上更接近 3 年生植株 (S3、S4), 显示出一定的个体差异。

2.4.3 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 用 SIMCA14.1 分析软件对不同生长年限的实生芍药的 27 个特征峰进行 PCA 分析, 结果如图 4 所示, 0.5 年生 (S0) 相对较为聚集; 1 年生 (S1)

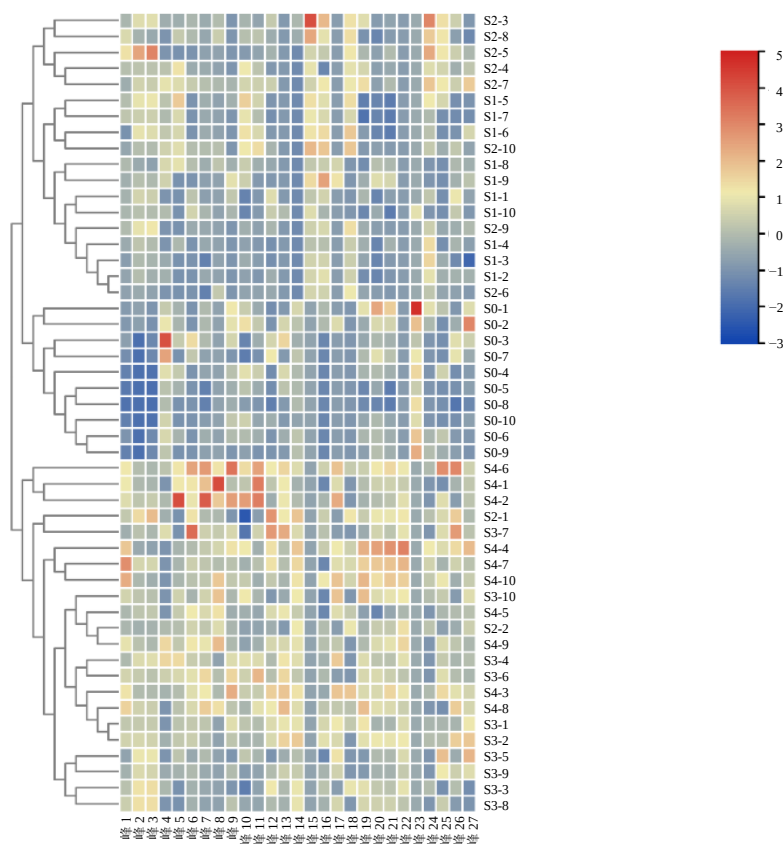


图 3 不同生长年限实生芍药特征峰 HCA 树状图

Fig. 3 HCA dendrogram of characteristic peaks for *P. lactiflora* in different growth ages

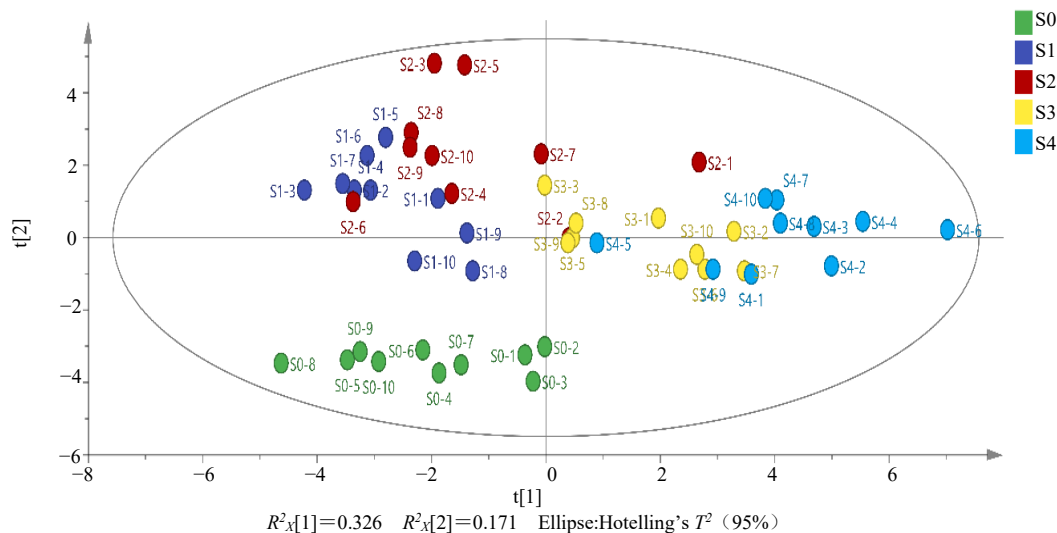


图 4 不同生长年限实生芍药特征峰 PCA 得分图

Fig. 4 PCA score plot of characteristic peaks for *P. lactiflora* in different growth ages

和 2 年生 (S2) 有一定重叠, 2 年生 (S2) 较为分散; 3 年生未开花株 (S3) 和开花株 (S4) 有一定的重叠, 且 S3 和 S4 分布在 X 轴方向, 表明它们的化学成分与其他生长年限组明显不同。分类结果与

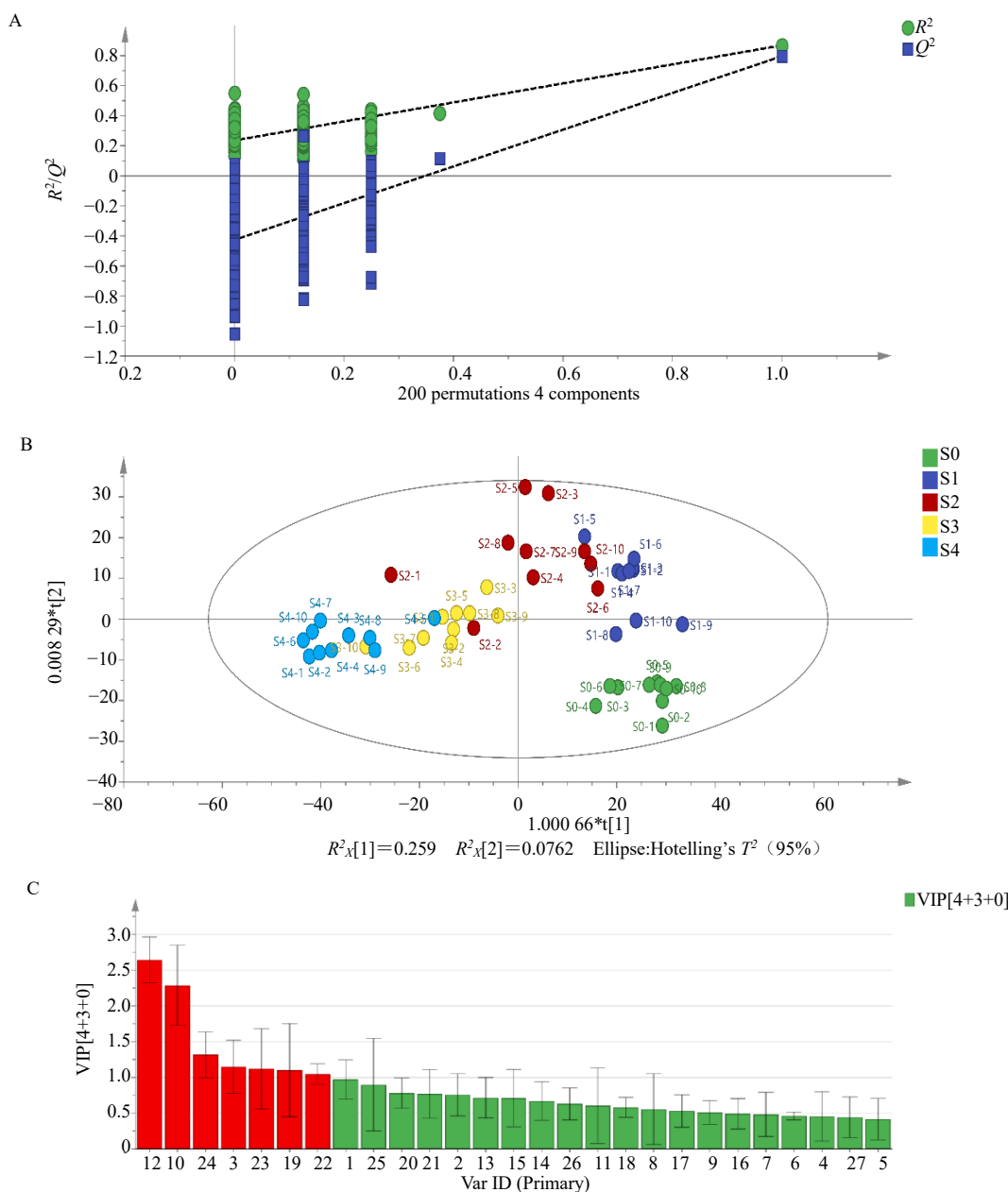
HCA 分析结果一致, 说明不同生长年限实生芍药的化学成分存在较大差异。

2.4.4 正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)

OPLS-DA 是一种基于偏最小二乘法的监督学习技术,可用于在多重共线性下对 2 组或多组数据进行分类,并识别对分类有重要影响的变量。为进一步分析引起不同生长年限实生芍药根部药材成分差异的原因,筛选出对差异贡献较大的成分,基于 HCA 和 PCA 结果,建立 OPLA-DA 模型进行有监督的判别分析。将 50 个样品中的 27 个特征峰面积数据导入 SIMCA14.1 软件,自动拟合建立 OPLS-

DA 模型,结果见图 5。模型累积解释能力参数(R^2_X)和(R^2_Y)分别为 0.916 和 0.686,预测能力参数(Q^2)为 0.508,均 >0.5 ,说明模型稳定可靠,预测能力良好。

对建立的 OPLS-DA 模型进行置换 200 次检测,结果如图 5-A 所示, R^2 和 Q^2 的回归线斜率均较大, R^2 拟合直线 Y 轴截距小于 0.3, Q^2 拟合直线 Y 轴截距为负值,左侧随机排列得到的 R^2 和 Q^2 均小于右



A-置换检验图; B-OPLS-DA 图; C-共有峰 VIP 图。

A-displacement test chart; B-OPLS-DA diagram; C-VIP plot of common peaks.

图 5 不同生长年限实生芍药特征峰 OPLS-DA 统计分析图

Fig. 5 OPLS-DA statistical analysis diagram of characteristic peaks for *P. lactiflora* in different growth ages

侧的原始值,提示 OPLS-DA 模型不存在过度拟合,可用于进一步数据分析。

由图 5-B 所示,50 组不同生长年限实生芍药被大致分为 3 类,0.5 年生(S0)相对聚集,1 年生(S1)、2 年生(S2)较为接近,3 年生未开花株(S3)、3 年生开花株(S4)较为接近。2 年生(S2)较为分散,3 年生未开花株(S3)、3 年生开花株(S4)中个别样本分散较远。

变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)是筛选差异性化合物的重要指标,表示差异成分对各组样品分类的影响强度和解释能力, VIP 值越大,对差异的影响越大,通常以 VIP 值>1 作为筛选标准。经 OPLS-DA,生成的 27 个

成分的 VIP 得分图,结果见图 5-C: 峰 12(芍药苷)、峰 10(芍药内酯苷)、峰 24、峰 3(没食子酸)、峰 23、峰 19(1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖)、峰 22 的 VIP 值分别为 2.643、2.285、1.316、1.147、1.120、1.101、1.046,均大于 1,表明这 7 个成分在 50 组实生芍药聚类分组时具有显著重要性,可作为区分不同生长年限实生芍药的潜在化学特征差异标志物。

2.5 多成分含量测定

2.5.1 线性关系考察 取“2.2”项下混合对照品溶液适量,采用二倍稀释法,分别稀释 0、2、4、8、16、32 倍,按照“2.1”项下色谱条件进行测定。以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,进行线性回归,见表 2。

表 2 各对照品回归方程及线性范围

Table 2 Regression equation and linear range of each standard

成分	回归方程	相关系数	线性范围/(mg·L ⁻¹)
没食子酸	$Y=15.6 X-5.167 9$	0.999 2	0.64~20.48
氧化芍药苷	$Y=7.745 5 X-0.976 6$	0.999 2	0.33~10.68
芍药内酯苷	$Y=5.543 2 X-12.251$	0.999 9	9.68~309.60
芍药苷	$Y=7.729 7 X-60.098$	0.999 2	15.95~510.50
五没食子酰葡萄糖	$Y=12.26 5 X-35.493$	0.999 1	2.14~68.36
苯甲酰芍药苷	$Y=59.608 X-14.537$	0.999 7	0.63~20.02

2.5.2 精密度试验 精密吸取“2.1”项下同一供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续自动进样 6 针,得没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、五没食子酰葡萄糖和苯甲酰芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.83%、0.95%、0.74%、1.11%、0.65%和 1.21%,表明该仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取“2.1”项下同一供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样检测,得没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、五没食子酰葡萄糖和苯甲酰芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.97%、0.69%、1.21%、0.74%、0.98%和 0.72%,结果表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 精密称定同一芍药样品 6 份,按“2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续自动进样,结果样品中没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、五没食子酰葡萄糖和苯甲酰芍药苷质量分数平均值分别为 1.375、0.398、32.764、24.732、3.766 和 0.251 mg/g, RSD 分别为 1.11%、0.76%、0.92%、1.02%、0.87%、0.69%,表明重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 取已知待测成分含量的

供试品(S2)储备样,精密称取 0.2g,加入混合对照溶液(没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、五没食子酰葡萄糖和苯甲酰芍药苷的质量浓度分别为 20.48、10.68、309.6、510.50、68.36、20.02 μg/mL) 10mL,精密加入稀乙醇 15mL,按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续自动进样,得没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、五没食子酰葡萄糖和苯甲酰芍药的加样回收率分别为 98.52%、101.04%、95.64%、102.67%、100.39%和 98.71%, RSD 分别为 0.95%、1.24%、1.12%、0.91%、1.25%和 1.13%,符合《中国药典》2020 年版四部“通则 9101 分析方法验证指导原则”项下规定范围。

2.5.6 样品含量测定 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条进样分析,通过标准曲线计算样品中没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、五没食子酰葡萄糖、苯甲酰芍药苷的含量。采用 SPSS19.0 对成分含量进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA), $P<0.05$ 即为差异具有统计学意义,结果见表 3。实生芍药根中,成分含量芍药内酯苷>芍药苷>五没食子酰葡萄糖>没食子酸>氧化芍药苷>苯甲

表 3 种子繁育不同生长年限芍药成分含量 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 3 Component content of *P. lactiflora* in different growing ages of seed breedin ($\bar{x} \pm s, n=10$)

生长年限	没食子酸/(mg·g ⁻¹)	氧化芍药苷/(mg·g ⁻¹)	芍药内酯苷/(mg·g ⁻¹)	芍药苷/(mg·g ⁻¹)	五没食子酰葡萄糖/(mg·g ⁻¹)	苯甲酰芍药苷/(mg·g ⁻¹)
S0	0.570±0.098 a	0.148±0.327 b	40.570±15.038 a	17.588±10.651 b	3.849±0.559 ab	0.189±0.088 a
S1	1.175±0.220 b	0.153±0.250 b	36.009±13.650 a	16.675±8.252 b	2.755±0.655 b	0.190±0.088 a
S2	1.380±0.495 b	0.397±0.245 ab	32.947±13.478 a	24.765±12.693 ab	3.847±0.916 ab	0.249±0.088 a
S3	1.372±0.217 b	0.569±0.452 a	33.263±12.151 a	27.865±13.269 ab	4.408±1.104 a	0.268±0.133 a
S4	1.124±0.162 b	0.754±0.268 a	41.539±12.433 a	33.639±7.679 a	4.800±1.279 a	0.315±0.138 a

同行不同小写字母表示 $P<0.05$ 。Different lowercase letters in the same row indicate $P<0.05$.

酰芍药苷。整体上, 氧化芍药苷、芍药苷、五没食子酰葡萄糖含量随生长年限呈现显著增加的趋势; 芍药内酯苷先降低后升高, 苯甲酰芍药苷缓慢升高, 没食子酸先升高后降低, 但芍药内酯苷和苯甲酰芍药苷变化小, 在统计学上差异不显著, 表现为趋于稳定; 没食子酸含量在第 1 年中显著增加, 之后变化不显著, 均趋于稳定。

2.5.7 成分 OPLS-DA 相关分析 进一步将含量数据导入 SIMCA14.1 软件进行 OPLS-DA, VIP>1.0 的差异化化合物有 2 个, 分别为芍药苷 (VIP 值 1.649 36)、芍药内酯苷 (VIP 值 1.575 09)。

2.6 不同生长年限实生芍药农艺性状测定分析

2.6.1 农艺性状测定 于 2022 年 5 月, 芍药植株生长旺盛期, 每种生长年限 (0.5 年生、1 年生、2 年生、3 年生未开花、3 年生开花) 随机选择 10 株植株, 对其株高、冠幅、发枝数、叶片数、叶面积、地上鲜质量、开花数、主根长、主根粗、主根数、须根长、须根数、地下鲜质量、主根鲜质量、须根鲜质量共 15 种农艺性状进行测定, 各取平均值。其中叶面积的测量选取主茎从下往上第 3 片复叶 (成熟稳定叶片), 未满 3 片的按生长贡献最大的最大

叶片测量。选择主根茎横切面, 采用间苯三酚染色法辅助判别芍药生长年限^[13]。

在四川盆地及平原地区, 芍药花期 4 月下旬至 5 月上旬, 果期 7 月, 种子成熟后, 9 月、10 月播种, 此时秋季低温解除芍药种子下胚轴休眠, 胚根发育生根, 经过长时间低温越冬后, 上胚轴解除休眠, 春季萌芽出苗生长, 此时根未形成完整的次生木质部, 间苯三酚染色无年轮 (S0)。随后冬天地地上部分茎秆全部枯萎, 根颈上的丛生芽在地底越冬, 随次年春季气温上升再次萌芽出土生长, 形成 1 个生长年轮 (S1)。以此反复, 形成不同个数生长年轮。由图 6 可知, 芍药的根茎生长轮能够反映其实际生长年限。

农艺性状特征见表 4, 随着生长年限的增加, 实生芍药的农艺性状普遍呈增长趋势, 包括植株的大小、分枝能力、叶片数量和大小、生物量等。其中, 鲜质量 (地上部分鲜质量、地下部分鲜质量、主根鲜质量、须根鲜质量) 在相连生长年限间为显著增加, 反应出芍药生物量的快速积累。在芍药种子萌芽到第 1 年阶段中, 叶面积、主根粗、须根长显著增加; 第 1 年到第 2 年时, 叶片数、株幅显著



图 6 不同生长年限实生芍药植株及其根茎生长年轮

Fig. 6 Seed propagation plants of *P. lactiflora* with different growth ages and their rhizome growth rings

表 4 种子繁育不同生长年限芍药植株外观农艺性状 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

农艺性状	S0	S1	S2	S3	S4
株高/cm	15.40±2.27 a	17.70±2.21 ab	22.20±4.25 bc	31.10±7.63 c	52.90±6.38 d
冠幅/cm	9.20±0.94 a	12.00±2.77 a	19.90±4.24 b	30.60±5.30 c	34.60±6.92 c
发枝数	1.00±0.00 a	1.10±0.32 a	1.50±0.97 ab	2.30±1.42 ab	2.32±0.95 b
叶片数	1.00±0.00 a	1.40±0.52 a	3.40±1.43 b	6.70±3.06 b	12.60±3.98 c
叶面积/cm ²	12.80±2.40 a	27.70±11.7 b	40.20±8.68 bc	77.70±29.40 d	93.90±47.01 cd
地上鲜质量/g	0.87±0.22 a	1.90±0.88 b	5.27±1.91 c	17.28±9.31 d	43.14±15.51 e
开花数	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	1.50±0.53 b
主根长/cm	8.00±1.00 a	9.90±2.39 ab	10.00±1.70 a	13.20±2.29 b	18.60±3.77 c
主根粗/mm	5.38±0.96 a	8.98±2.11 b	11.48±1.89 b	11.68±3.16 b	17.02±3.77 c
主根数	1.00±0.00 a	1.00±0.00 a	2.10±0.99 ab	4.50±2.17 bc	6.00±2.49 c
须根长/cm	3.10±0.97 a	5.30±1.32 b	14.10±3.44 c	13.40±2.56 c	14.60±3.12 c
须根数	13.60±1.90 a	17.30±6.50 a	33.20±12.41 b	41.80±12.88 b	52.40±17.49 b
地下鲜质量/g	0.75±0.33 a	2.46±1.23 b	7.98±3.02 c	21.95±10.85 d	50.46±26.35 d
主根鲜质量/g	0.60±0.24 a	2.32±1.17 b	6.73±2.80 c	18.42±8.47 d	44.39±24.93 d
须根鲜质量/g	0.02±0.01 a	0.11±0.07 b	1.01±0.38 c	2.620±1.79 cd	4.26±1.76 d

同行不同小写字母表示 $P<0.05$ 。

Different lowercase letters in the same row indicate $P<0.05$.

增加，须根长继续快速增长，须根数显著增多，之后须根长和须根数增长放缓，趋于稳定；第 3 年时，株幅继续显著增大，叶面积显著增大，主根显著增长。此时，生长健壮的芍药植株初次进行生殖生长，开花。3 年生开花植株比未开花植株在株高、叶片数、地上部分鲜质量、主根长、主根粗上均有显著增强。

2.6.2 层次聚类分析 (hierarchical cluster anal,

HCA) 将 50 株芍药的 15 个农艺性状数据导入 TBtools 软件，列标准化，使用 Euclidean 距离度量，Complete 聚类分析。如图 7 所示，不同生长年限的实生芍药主要分为 3 类：1 年以下 (S0 和 S1) 聚为一类；2 年生 (S2) 聚为一类；大多数 3 年生 (S3 和 S4) 聚为一类，其中 3 年生中开花株 (S4) 和未开花株 (S3) 也能有所区分。表明相同生长年限的

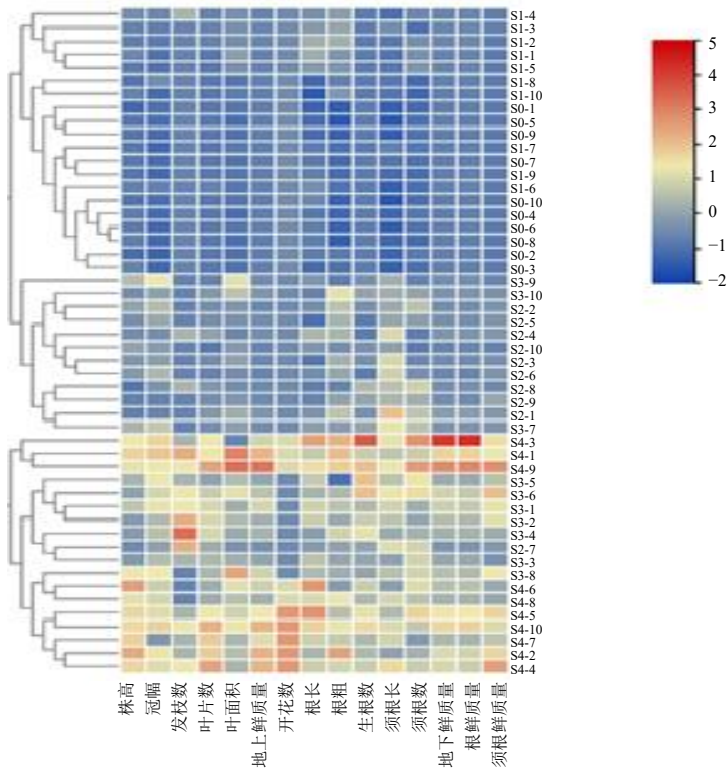


图 7 不同生长年限实生芍药农艺性状 HCA 树状图

Fig. 7 HCA dendrogram of agronomic traits for *P. lactiflora* in different growth ages

实生芍药在很多农艺性状上表现出高度的相似性,反映了同一生长阶段植株的普遍特性。然而,仍然存在少量个体差异,使少部分植物在生长同一阶段具有性状差异。

2.6.3 农艺性状主成分分析 (principal component analysis, PCA) 用 SIMCA14.1 分析软件对不同生长年限的实生芍药的 15 个农艺性状进行 PCA, 结

果如图 8 所示: 0.5 年生 (S0) 和 1 年生 (S1) 在图中紧密聚集在一起, 说明它们在农艺性状上非常相似; 2 年生 (S2) 则稍有分散, 表明植株开始展现出个体差异; 3 年生未开花株 (S3) 和 3 年生开花株 (S4) 位于 X 轴右侧, 未开花株和开花株也有明显的分离, 显示出农艺性状在开花株和未开花株也有较大的差异, 分类结果与 HCA 结果一致。

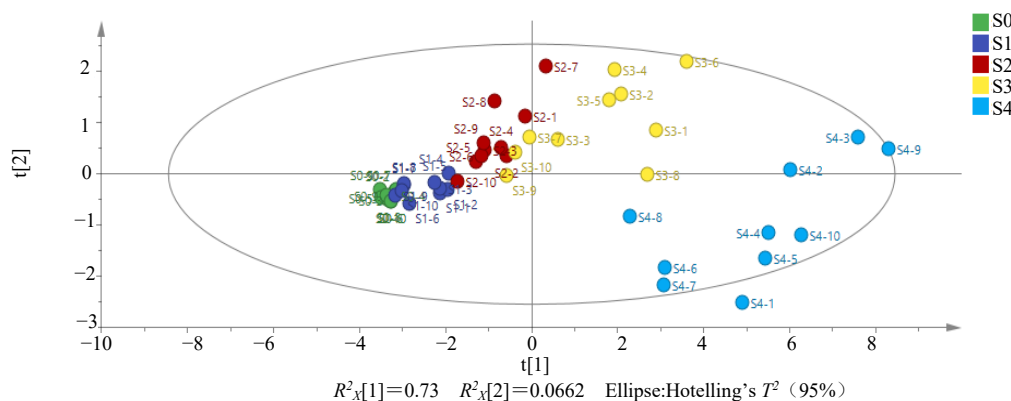


图 8 不同生长年限实生芍药农艺性状 PCA 得分图

Fig. 8 PCA score plot of agronomic traits for *P. lactiflora* in different growth ages

2.6.4 OPLS-DA 为进一步分析引起不同生长年限实生芍药农艺性状差异的原因, 筛选出对差异贡献较大的成分, 将 50 个样品中的 15 组农艺性状数据导入 SIMCA14.1 软件, 建立 OPLS-DA 模型进行有监督的判别分析。建立的 OPLS-DA 模型, 结果见图 9。模型累积解释能力参数 (R^2_X) 和 (R^2_Y) 分别为 0.88 和 0.59, 预测能力参数 (Q^2) 为 0.64, 均 >0.5 , 说明模型稳定可靠, 预测能力良好。

对建立的 OPLS-DA 模型进行置换 200 次检测, 结果如图 9-A 所示, 模型不存在过度拟合, 可用于进一步数据分析。

变量重要性投影如图 9-C 所示, VIP 值 >1 的有须根长、开花数、主根粗, 表明这 3 个指标可作为区分不同生长年限实生芍药农艺性状的重要标志物。

2.7 Spearman 相关分析

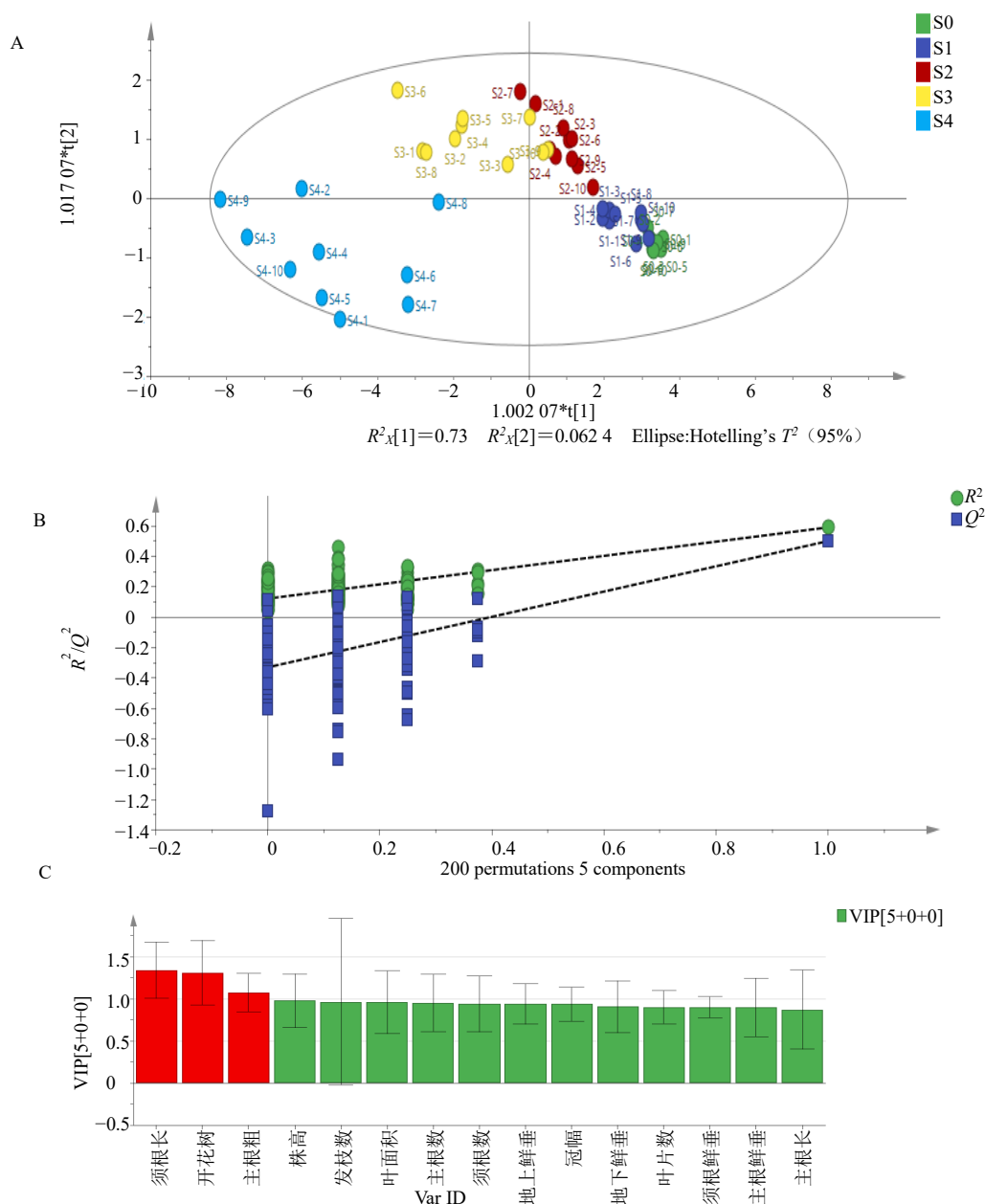
Spearman 相关分析是一种非参数统计方法, 用于衡量 2 个变量间的关联强度。相关系数的取值范围是从 $-1 \sim 1$, 不同的值表明了不同强度的相关性, 一般绝对值大于 0.6 则认为具有相关性。将测得的多指标成分和农艺性状运用 SPSS19.0 进行 Spearman 相关性分析, 将具有相关性的指标绘制网络图。如图 10 所示, 多数农艺性状间彼此呈现较强的正相关, 这揭示了植物生长发育的复杂性, 植物

在生长过程中各部分协调发展, 通过资源分配策略, 彼此促进; 某些化学成分如氧化芍药苷与多数农艺性状也显示出显著相关性, 尤其是与地上鲜质量、地下鲜质量、株高、生根数、根鲜质量和须根鲜质量, 这可能表明氧化芍药苷的合成可能与植株的整体生长状况紧密相关; 化学成分间, 芍药苷与苯甲酰芍药苷、芍药苷与氧化芍药苷、氧化芍药苷与苯甲酰芍药苷相关系数分别为 0.825、0.773、0.708, 具有极显著正相关, 表明这些化学成分可能在生物合成路径上具有紧密的联系或在生理功能上相互依赖。

3 讨论

3.1 不同生长年限实生芍药成分差异性分析

3.1.1 HPLC 指纹图谱差异性分析 在不同生长年限实生芍药的指纹图谱差异性研究中发现: (1) 随着生长年限的增加, 实生芍药根的特征峰数量逐渐增加, 从 S0 的 10 个增加到 S4 的 19 个; (2) 不同生长年限的实生芍药根中均含峰 1、3、10、11、12、19, 为共有特征峰; (3) 不同生长年限实生芍药特征峰具有各自特异性, 区别于其他生长年限, 峰 4、23 为 S0 特有, 峰 15、16 为 S1 特有, 峰 18、24、25 为 S2 特有, 峰 20 为 S3 特有, 峰 5、8、9、17 为 S4 特有。以上结果表明不同生长年限的芍药根



A-OPLS-DA 图; B-置换检验图; C-共有峰 VIP 图。

A-OPLS-DA diagram; B-displacement test chart; C-VIP plot of common peaks.

图 9 不同生长年限实生芍药农艺性状 OPLS-DA 统计分析图

Fig. 9 OPLS-DA statistical analysis diagram of agronomic traits for *P. lactiflora* in different growth ages

化学成分基本组成相似,但在不同生长阶段,某些成分的含量或种类可能发生变化,存在各自差异。总体上,随着生长年限的增加,共有峰数量增多,相似度增高,根中化学成份趋于稳定一致,这与同株不同生长年限亳白芍化学成分指纹图谱变化相似^[13]。根据结果,实生芍药需栽培至少 3 年待其开花后再采挖较好,此时其根中代谢产物相似度更高,药材化学成分较为稳定,主要活性成分含量也高,整体

性、一致性好,更有利于保障药材品质的有效性和稳定性。本研究主要集中在芍药实生苗生长至开花成熟阶段的生长特征,之后生长年限实生芍药的化学成分仍需进一步研究探讨。

3.1.2 多成分含量测定差异性分析 在传统中医中,白芍用于养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳;现代药理学研究表明白芍具抗炎、镇痛、保肝、促进造血功能、抗血栓、抗肿瘤以及抗氧化

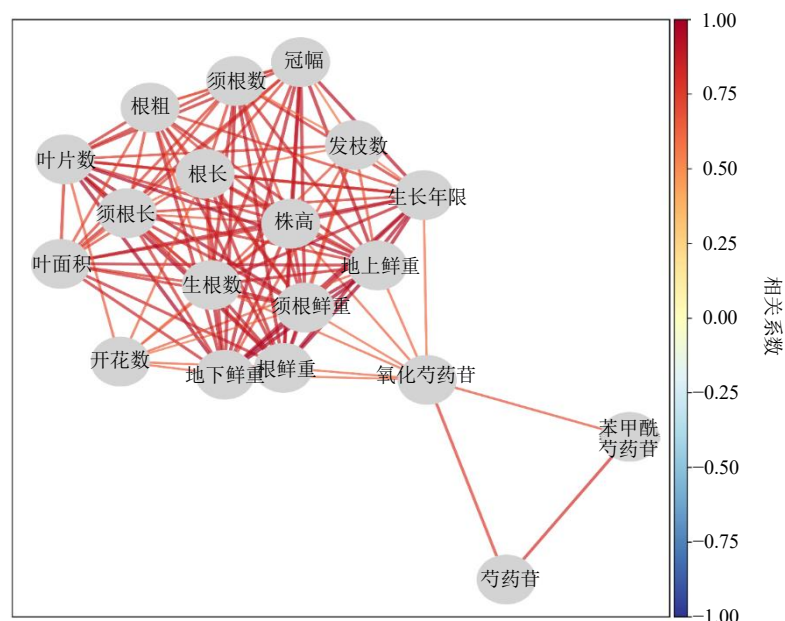


图 10 不同生长年限实生芍药 Spearman 相关性网络图

Fig. 10 Spearman correlation network diagram for *P. lactiflora* in different growth ages

等效果^[15-17], 其中白芍苷类成分对治疗自身免疫性疾病如风湿性关节炎、银屑病、口腔扁平苔藓、干燥综合征等具有显著疗效^[18]。《中国药典》2020 年版规定的指标成分仅有单萜类化合物芍药苷。本研究综合白芍药理, 对其 6 种主要差异标志物^[19-21]进行含量测定分析。本研究发现, 随着生长年限的增加, 根中氧化芍药苷、芍药苷、五没食子酰葡萄糖增加趋势显著, 这与徐超等^[13]及马家福等^[22]、禚雪梅^[23]的研究结果相同; 而芍药内酯苷的含量随生长年限变化存在差异, 本研究表现为先降低后升高, 但统计学上无显著差异, 趋于稳定, 徐超等^[13]和王巧^[24]研究为下降, 马福家等^[22]研究为上升。这些差异可能与栽培环境或研究品种等因素有关。

3.2 不同生长年限实生芍药农艺性状差异性分析

植株生长年龄或个体大小对植物营养生长和生殖生长的资源分配具有重要影响^[25-26]。当阳光成为植物生长的限制因子时, 植物会将更多资源分配到光合器官, 如叶片, 以获取更多的光资源^[27]。当水分和矿质营养元素限制植物生长时, 植物会将更多资源分配到根部, 促进根的生长, 从而增加水分和矿质营养的吸收^[28]。在养分充足的环境下, 植物倾向于将更多的资源分配到地上部分, 以增加有性繁殖的投入^[29]。与本研究结果一致, 实生芍药在前 2 年主要进行营养生长, 地下部分资源投入较多, 表现为主根的膨大增粗和须根的伸长与增多; 到第 3 年,

资源分配开始平衡, 地上部分的光合载体 (叶片数和叶面积) 和地下部分的矿质营养吸收 (主根的伸长和分枝数) 都出现了显著变化。光合产物和矿质营养的充足使部分实生芍药在第 3 年进入成熟阶段, 开始有性繁殖, 开花并结实。随着生长年限的增加, 实生芍药地上部分体积增大, 地下根系的生长、分枝和扩展能力也随之增强。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郑守如, 王连祥, 庞建新, 等. 菏泽市芍药产业现状分析与发展建议 [J]. 农业科技通讯, 2023(11): 32-34.
- [2] 张洁, 韩叶萍, 陈涛. 白芍 [J]. 分子植物育种, 2024, 22(6): 2094.
- [3] 孙晓. 不同产地芍药品质形成的分子机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2023.
- [4] 蔡宏宇. 川白芍优质高效栽培技术的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2023.
- [5] 梁卫青. 浙江道地药材白芍种质资源的评价研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2015.
- [6] 梁德勤. 亳白芍药材生产过程质量控制研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018.
- [7] 苟丽琼. 药用芍药根段与种子繁殖特性研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- [8] 于娇, 陈娜, 龚欢, 等. 芍药属植物种子和花器官研究进展 [J]. 现代农业科技, 2020(21): 73-75.
- [9] 李祖德, 裴仲华, 胡黎光, 等. 白芍繁殖方法初步研究

- [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(4): 214-214.
- [10] Sweetman A C, Kettenring K M, Mock K E. The pattern and structure of genetic diversity of *Schoenoplectus maritimus*: Implications for wetland revegetation [J]. *Aquat Bot*, 2013, 104: 47-54.
- [11] Albert A, Brisson J, Belzile F, *et al.* Strategies for a successful plant invasion: The reproduction of *Phragmites australis* in north-eastern North America [J]. *J Ecol*, 2015, 103(6): 1529-1537.
- [12] Liu H Y, Lin Z S, Qi X Z, *et al.* The relative importance of sexual and asexual reproduction in the spread of *Spartina alterniflora* using a spatially explicit individual-based model [J]. *Ecol Res*, 2014, 29(5): 905-915.
- [13] 徐超, 林杰, 金传山, 等. HPLC 指纹图谱结合化学计量学比较同株不同生长年限亳白芍化学成分差异 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2408-2413.
- [14] 于慧, 王梦晴, 刘鑫, 等. 不同醋制方法对白芍 6 种活性成分影响的定量质控 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(9): 175-179.
- [15] 高明旭. 白芍总苷对类风湿关节炎的治疗作用研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2022.
- [16] 卫博文, 刘维, 张淑敏, 等. 白芍总苷治疗原发性干燥综合征的疗效及安全性 Meta 分析 [J]. 天津中医药, 2024, 41(4): 458-466.
- [17] 李丽, 范晓旭, 华姑安, 等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 通路探讨白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠的保护作用及机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(3): 341-351.
- [18] Jiang H J, Li J, Wang L, *et al.* Total glucosides of paeony: A review of its phytochemistry, role in autoimmune diseases, and mechanisms of action [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 258: 112913.
- [19] 王秋艳, 王世新, 隋方宇, 等. 白芍活性成分、药理作用及成分变化的影响因素研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(5): 1817-1829.
- [20] 徐佳新. 白芍药性物质基础及质量标准研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2022.
- [21] 梅茜, 夏金鑫, 郭爽, 等. 基于指纹图谱及网络药理学的白芍质量标志物 (Q-marker) 预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2627-2633.
- [22] 马福家, 仓婕, 孔铭, 等. 不同生长年限白芍中主要成分含量的比较研究 [J]. 上海医药, 2016, 37(15): 75-79.
- [23] 褚雪梅. 不同生长年限白芍中没食子酸、芍药苷含量比较 [J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(7): 13-14.
- [24] 王巧. 芍药质量控制方法与白芍总苷药物动力学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [25] Dolezal J, Jandova V, Macek M, *et al.* Contrasting biomass allocation responses across ontogeny and stress gradients reveal plant adaptations to drought and cold [J]. *Funct Ecol*, 2021, 35(1): 32-42.
- [26] Lundgren M R, Des Marais D L. Life history variation as a model for understanding trade-offs in plant-environment interactions [J]. *Curr Biol*, 2020, 30(4): R180-R189.
- [27] Shipley B, Meziane D. The balanced-growth hypothesis and the allometry of leaf and root biomass allocation [J]. *Funct Ecol*, 2002, 16(3): 326-331.
- [28] Gonzáles W L, Suárez L H, Molina-Montenegro M A, *et al.* Water availability limits tolerance of apical damage in the Chilean tarweed *Madia sativa* [J]. *Acta Oecol*, 2008, 34(1): 104-110.
- [29] 张家亮. 繁殖模式和环境胁迫对入侵植物繁殖投入的影响 [D]. 武汉: 中国科学院大学(中国科学院武汉植物园), 2019.

[责任编辑 时圣明]