

glucoside attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by activating JAK2/STAT3 signaling pathway *via* the regulation of IL-10 secretion in mice[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 463(1-2): 175-187.

[19] 谢 静, 龚易昕悦, 丁立生, 等. 黄芪及其活性成分对脓毒症临床和药理作用的研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(8): 2502-2510.

[20] Han L L, Song J Q, Yan C Q, *et al*. Inhibitory activity and mechanism of calycosin and calycosin-7-*O*- β -D-glucoside on α -glucosidase: spectroscopic and molecular docking analyses[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 118(7): 227-235.

[21] Yan X L, Yu A M, Zheng H Z, *et al*. Calycosin-7-*O*- β -D-glucoside attenuates OGD/R-induced damage by preventing oxidative stress and neuronal apoptosis *via* the SIRT1/FOXO1/PGC-1 α pathway in HT22 cells[J]. *Neural Plast*, 2019, 2019(12): 8798069.

叶面施肥对红芪及其根际土壤无机元素累积的影响

魏小成, 李成义*, 周瑞娟, 张广袤, 贾妙婷, 罗旭东, 强正泽
(甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730101)

摘要: **目的** 探究叶面施加无机盐溶液对红芪及其根际土壤无机元素累积的影响。**方法** 在红芪不同生长期叶面施加不同剂量无机 Zn 盐 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 溶液 (0.8、0.4、0.1 $\mu\text{g/L}$), 采用火焰原子吸收光谱法测定不同生长期红芪根、茎、叶及土壤 0、20、40 cm 处 Mg、Ca、Cu、Zn、K、Fe、Co 含量; 结合相关性、主成分及正交偏最小二乘法判别分析等分析叶面施肥对红芪及其根际土壤无机元素累积的影响。**结果** 外源无机 Zn 盐溶液能够促进红芪及其根际土壤中无机元素的累积; 主成分分析发现可以依据无机元素含量将红芪根、茎、叶区分开; 相关性分析发现土壤中 Co、K 含量与红芪中 Ca、Mg、Fe 含量有显著相关性; 正交偏最小二乘法判别分析发现 Zn 盐溶液造成红芪不同部位差异的主要无机元素有 Ca、Fe、Mg 等。**结论** 无机 Zn 盐溶液能够促进生长期红芪不同部位的无机元素累积, 可在红芪生长期叶面施加一定剂量的无机 Zn 盐溶液, 以提高红芪质量。

关键词: 红芪; 叶面施肥; 根际土壤; 无机元素; 锌 (Zn)

中图分类号: R282 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)05-1722-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.05.060

无机元素与植物生长发育关系密切, 其中 Zn 是植物需求量大的微量元素, 通常限制作物产量, 影响其营养价值^[1]。研究发现 Zn 作为植物体内众多酶的组成成分, 在植物生理生化过程具有重要作用^[2]; 此外, Zn 参与相关基因的表达, 电子的接受、传递和叶绿素、碳水化合物及蛋白质的合成^[3]。生长发育过程中 Zn^{2+} 缺乏或过量都会对植物生长和品质形成造成不利影响; 缺少 Zn^{2+} 会造成植物根部伸展受阻、根尖生长缓慢、叶片变黄甚至枯萎^[4]; 过量 Zn^{2+} 会造成植物产量下降和生长迟缓, 影响 Fe、P、Mg、Mn 的累积^[5]。

红芪是甘肃道地药材, 以陇南“米仓红芪”为佳, 是豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根, 具有补气固表、消毒排脓等功效^[6]。常与黄芪通用, 因其皮色红润, 故称为红芪, 我国台湾、香港等地将红芪认为是黄芪的优良品种。现代药理研究表明, 红芪具

有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化—抗肺纤维等作用^[7-10]。目前, 大量研究发现无机元素与中药材生长关联性强, 影响中药质量及临床疗效^[11-14]。土壤无机元素不易被植物直接吸收或吸收较慢, 基于此, 课题组在红芪道地产区陇南武都区展开大田试验。在红芪生长期叶面喷施不同剂量锌盐溶液, 采用火焰原子吸收光谱 (AAS) 法测定采收期红芪根茎、叶及土壤无机元素含量, 探究锌盐溶液对不同生长期红芪根、茎、叶及其根际土壤无机元素累积的影响, 分析其含量变化特征及互相之间的影响, 以期为红芪种植提供相应参考。

1 材料

1.1 大田试验 试验田位于甘肃省陇南市武都区, 海拔 1 953 m, 北纬 33°32'13"、东经 105°3'48"。前茬没有种植农作物, 较为平整的荒地, 消除其他肥料影响。于当地采购一年生红芪幼苗进行种植, 采用单因素完全随机区组试

收稿日期: 2022-11-03

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (81860683, 82160730); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82104345); 甘肃省教育厅双一流重大科研项目 (GSSYLXM-05); 甘肃省重点研发计划项目 (21YF5FA133)

作者简介: 魏小成 (1997—), 男, 硕士生, 从事中药鉴定与品质评价研究。E-mail: 2550888492@qq.com

* **通信作者:** 李成义 (1964—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药品种与质量研究。E-mail: gslchengyi@163.com

验。设置处理组和空白组，每个处理组重复 3 个，小区面积为 30 m²（5 m×6 m）。行距 30 cm，株距 10 cm。处理组分别在红芪生长期 7 月、8 月、9 月中旬将不同剂量无机锌盐溶液叶面施肥于红芪地上部分，设为 Zn 低、中、高剂量组（0.1、0.4、0.8 μg/L），叶面喷施，空白组叶面喷施同体积纯净水。每月进行采样，至 10 月采收期收集红芪药材，同时收集 0、20、40 cm 处根际土壤，共得到 252 份样品。

1.2 仪器 SOLAAR S-2 型火焰原子吸收分光光度计（上海光电器件有限公司）；SB 450300 型电热板（湖北英山国营无限电元件厂）；101-2 型电热恒温鼓风干燥箱（上海跃进医疗器械有限公司）；VPH-1-5T 型超纯水制造系统（南京易普易达科技发展有限公司）；BS224 型分析天平（德国 Sartorius 公司）；OHAUS Corporation DV SERIES 型电子天平（十万分之一，美国奥豪斯公司）；AL 104 型电子天平（万分之一，瑞士梅特勒-托利多公司）；FW 200 型高速万能粉碎机（北京科伟永兴仪器有限公司）；KQ-250 TDB 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；C 型玻璃仪器气流烘干机（河南予华仪器有限公司）。玻璃器皿（实验过程中，所有玻璃器皿均用铬酸洗液浸泡 24 h，实验前用超纯水清洗干净，于烘箱 50 ℃干燥备用）。

1.3 试剂 Mg、Ca、Cu、Zn、K、Fe、Co 单元素标准溶液，质量浓度均为 1 000 μg/mL，购自国家有色金属及电子材料分析测试中心。氢氟酸（批号 20190103）、浓硝酸（批号 20200324）、高氯酸（批号 20200508），均为分析纯，

表 1 元素测定条件

元素	背景校正	灯电流/mA	波长/nm	通带/nm	火焰种类	燃气体积流量/(L·min ⁻¹)
K	无	4	766.5	0.5	Air-C ₂ H ₂	1.2
Ca	无	5	422.7	0.5	Air-C ₂ H ₂	1.4
Zn	四线氘灯	5	213.9	0.2	Air-C ₂ H ₂	1.2
Co	四线氘灯	6	240.7	0.2	Air-C ₂ H ₂	1.0
Mg	四线氘灯	4	285.2	0.5	Air-C ₂ H ₂	1.1
Cu	四线氘灯	4	324.8	0.5	Air-C ₂ H ₂	1.1
Fe	四线氘灯	8	248.3	0.2	Air-C ₂ H ₂	0.9

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品溶液适量，在“2.3”项条件下进样测定，以对照品溶液质量浓度为横坐标（X），吸光度为纵坐标（A）进行回归，结果见表 2，可知各元素在各自范围内线性关系良好。

表 2 各元素线性关系

元素	回归方程	r	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)
Mg	A=0.473 99X-0.000 9	0.999 0	0~0.4
Fe	A=0.013 40X-0.000 8	0.999 5	0~4.0
Zn	A=0.215 57X+0.017 1	0.997 5	0~0.8
Ca	A=0.028 44X-0.000 6	0.996 8	0~0.8
Co	A=0.997 3X-0.000 6	0.997 3	0~2.0
Cu	A=0.063 30X-0.000 5	0.999 0	0~0.8
K	A=0.083 01X-0.000 2	0.997 7	0~0.8

2.4.2 精密度试验 精密吸取“2.2”项下对照品溶液适量，分别制成 Mg、Fe、Zn、Ca、Co、Cu、K 质量浓度为

购自天津大茂化学试剂厂；纯净水（批号 20200807）购自杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法

2.1 供试品溶液制备

2.1.1 红芪根、茎、叶供试品溶液 取红芪用自来水冲洗掉泥土，再用超纯水清洗，于 60 ℃烘箱烘至恒重。粉碎机粉碎，过 100 目筛。取红芪粉末 1.0 g，精密称定，平行 2 次。放入 50 mL 烧杯中，加入 16 mL 浓硝酸、4 mL 高氯酸，静置 24 h。于电热板上消解至将酸赶净，将消解液用 1%硝酸定容至 50 mL，4 ℃备用。空白组溶液用超纯水同法处理。

2.1.2 土壤供试品溶液 取土壤样品用研钵研细，于 60 ℃烘箱烘干。精密称取 0.2 g，精密称定，平行 2 次。放入 50 mL 烧杯中，加入 6 mL 浓硝酸、5 mL 高氯酸、2 mL 氢氟酸，静置 24 h。于电热板上消解至将酸赶净，将消解液用 1%硝酸定容至 50 mL，4 ℃备用。空白组溶液用超纯水同法处理。

2.2 对照品溶液制备 分别取 Fe、Zn、Ca、Co、Cu、K 单元素标准溶液 1 mL，超纯水定容至 50 mL，4 ℃备用。取 Mg 标准溶液 1 mL，加入 5 mL 50 mg/mL 氯化锶（SrCl₂·6H₂O）溶液（消除其他元素干扰），超纯水定容至 50 mL，4 ℃备用。

2.3 原子吸收光谱色谱条件 采用空气-乙炔火焰原子吸收光谱法，各元素色谱条件见表 1。

2.0、4.0、1.5、7.0、0.5、1.0、5.0 μg/mL 的溶液，在“2.3”项条件下进样测定 6 次，测得 Mg、Fe、Zn、Ca、Co、Cu、K 吸光度 RSD 为 1.7%、1.1%、0.8%、3.0%、2.2%、1.0%、0.9%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一份红芪 6 份，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下进样测定，测得 Mg、Fe、Zn、Ca、Co、Cu、K 吸光度 RSD 为 3.58%、1.69%、2.65%、3.70%、2.54%、3.54%、0.23%，表明该方法重复性良好

2.4.4 稳定性试验 取同一份红芪，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，室温下于 0、8、16、24 h 在“2.3”项条件下进样测定，测得 Mg、Fe、Zn、Ca、Co、Cu、K 吸光度 RSD 为 2.0%、1.2%、1.1%、2.3%、1.1%、3.1%、1.0%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密量取各元素含量已知的供试品溶液，平行 6 份，分别加入一定剂量的对照品溶液，按

“2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下进样测定，计算回收率。结果 Mg、Fe、Zn、Ca、Co、Cu、K 平均加样回收率分别为 98.31%、95.34%、97.72%、101.46%、103.72%、99.70%，RSD 分别为 2.1%、3.4%、0.8%、1.6%、2.0%、1.9%、1.3%。

2.5 数据分析 通过 Excel 2010、SSPS 25.0、SIMCA

14.1、Origin 2019 软件进行处理，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 红芪根、茎、叶无机元素含量测定 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下进样测定，代入“2.4.1”项下方程计算含量，结果见表 3~5。

表 3 红芪根中无机元素含量 (μg/g, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	月份	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Co
空白组	7 月	9 608.96±38.89	2 315.27±519.23	7 633.05±354.02	469.45±29.19	9.75±1.38	12.07±0.38	2.51±0.25
	8 月	7 267.51±1 376.19	11 171.48±5 729.46	8 515.74±1 505.20	479.46±126.50	10.79±1.80	12.78±0.84	2.05±1.31
	9 月	7 390.83±1 691.94	7 057.78±1 695.95	6 920.08±935.37	422.01±82.51	13.69±6.80	11.83±1.51	2.49±1.11
	10 月	14 817.84±1 350.06	7 694.01±2 306.66	7 085.35±1 247.19	396.68±85.19	17.75±3.85	11.83±2.00	2.10±1.14
Zn 低剂量组	7 月	9 109.08±1 387.01	2 292.38±75.37	7 563.12±429.74	400.11±93.49	7.23±0.37	11.48±0.10	2.61±0.61
	8 月	9 247.03±180.95	9 365.07±175.13	9 957.32±842.95	417.27±4.89	6.21±0.06	10.47±0.97	2.06±0.14
	9 月	7 554.43±876.00	8 979.93±643.70	6 107.16±256.64	317.70±18.33	4.14±2.04	10.29±0.42	2.01±0.14
	10 月	14 441.86±870.63	6 867.85±538.02	6 441.58±384.98	241.77±15.35	19.92±2.53	11.46±0.83	2.28±0.11
Zn 中剂量组	7 月	9 109.08±1 387.01	2 292.38±75.37	7 563.12±429.74	400.11±93.49	7.23±0.37	11.48±0.10	2.61±0.61
	8 月	3 867.10±1 096.46	17 747.98±1 567.13	8 565.95±533.94	404.08±90.92	12.76±1.99	14.33±0.79	1.51±0.42
	9 月	5 191.82±731.29	8 559.75±788.80	8 272.33±450.53	517.19±77.09	16.11±1.16	14.54±0.68	1.24±0.48
	10 月	13 033.27±1 483.61	12 025.68±550.35	8 296.29±328.41	472.15±149.82	27.29±3.11	10.98±0.76	0.83±0.24
Zn 高剂量组	7 月	9 109.08±1 387.01	2 292.38±75.37	7 563.12±429.74	400.11±93.49	7.23±0.37	11.48±0.10	2.61±0.61
	8 月	7 027.26±954.61	4 907.67±257.33	6 301.50±456.53	651.06±39.68	21.52±2.19	11.78±1.93	4.23±0.26
	9 月	8 906.84±2 066.79	5 051.59±1 868.38	6 067.63±260.50	409.60±62.28	24.60±13.73	9.66±3.87	4.22±0.30
	10 月	15 759.36±1 359.96	5 512.31±208.50	6 243.34±678.32	347.93±4.77	43.87±13.25	10.20±2.19	3.96±0.23

表 4 红芪茎中无机元素含量 (μg/g, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	月份	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Co
空白组	7 月	7 618.75±156.37	2 643.75±123.35	1 990.00±64.81	854.63±2.07	21.80±1.31	8.52±0.64	—
	8 月	7 524.58±183.28	4 595.83±188.44	2 315.00±57.15	1 018.66±18.80	17.33±1.98	8.76±1.84	—
	9 月	11 733.33±188.90	7 805.83±64.41	2 295.00±102.25	432.02±22.75	16.88±3.29	7.17±1.59	—
	10 月	12 442.08±159.00	11 568.75±61.78	2 770.00±154.69	1 043.90±27.97	15.94±0.44	7.63±0.78	—
Zn 低剂量组	7 月	7 863.75±27.06	2 868.33±63.40	1 949.17±12.96	635.21±22.44	21.72±3.10	7.58±0.31	—
	8 月	6 531.67±266.54	3 295.83±266.83	2 299.17±107.75	601.65±19.64	27.82±1.78	9.25±2.65	—
	9 月	11 695.42±774.82	8 982.92±78.74	1 755.00±78.77	386.91±6.01	23.76±2.58	6.36±0.81	—
	10 月	13 659.58±217.80	10 465.83±305.58	2 187.50±199.82	525.68±17.67	36.10±1.41	7.45±1.28	—
Zn 中剂量组	7 月	7 863.75±27.06	2 868.33±63.40	1 949.17±12.96	635.21±22.44	21.72±3.10	7.58±0.31	—
	8 月	7 303.33±444.20	4 682.92±48.15	2 222.50±100.08	898.43±33.51	24.98±1.83	8.23±1.27	—
	9 月	9 593.33±103.88	8 135.42±87.76	1 795.00±89.65	558.48±31.91	12.92±1.93	8.38±0.91	—
	10 月	15 712.08±296.30	12 896.67±637.79	3 175.00±167.97	1 554.78±28.90	10.02±0.97	9.62±1.61	—
Zn 高剂量组	7 月	7 863.75±27.06	2 868.33±63.40	1 949.17±12.96	635.21±22.44	21.72±3.10	7.58±0.31	—
	8 月	8 695.00±28.75	4 780.00±7.50	2 451.67±169.33	776.26±3.76	7.22±0.66	8.44±0.18	—
	9 月	17 668.33±127.00	9 501.67±64.15	2 215.00±76.84	343.17±19.92	7.05±1.37	6.99±1.27	—
	10 月	14 749.17±223.23	13 772.92±435.46	2 502.50±20.72	643.38±32.18	9.22±0.50	7.25±1.88	—

注：“—”表示未检出。

3.1.1 红芪根中无机元素的动态累积变化分析 在低剂量 Zn 盐溶液干预下，8 月份红芪根中 K 含量升高，其他剂量干预对红芪根中 K 含量变化趋势无影响，与空白组变化趋势一致；在中剂量 Zn 盐溶液干预下红芪根中 Ca 含量变化趋势与空白组一致，高剂量 Zn 盐溶液促进红芪根中 Ca 的吸收；Zn 盐溶液干预对红芪根中 Mg 的吸收趋势影响不大；低剂量 Zn 盐干预红芪根中 Fe 的吸收趋势与空白组一致；Zn 盐溶液干

预下，红芪根中 Zn 含量升高，侧面反映叶面施肥的必要性；中剂量 Zn 盐溶液抑制红芪根 Co 的累积，见图 1。

3.1.2 红芪茎中无机元素的动态累积变化分析 高剂量 Zn 盐溶液在 9 月份后抑制红芪茎中 K 的累积；Zn 盐溶液干预不影响红芪茎中 Ca、Fe 的吸收趋势；中剂量 Zn 盐溶液促进红芪茎中 Mg 的累积；中剂量 Zn 盐溶液促进红芪茎中 Zn、Cu 的累积，见图 2。

表 5 红芪叶中无机元素含量 (μg/g, $\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	月份	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Co
空白组	7 月	12 313.33±693.06	25 338.33±619.43	2 399.17±213.56	1 995.63±100.69	26.41±1.07	11.48±1.02	—
	8 月	14 700.00±192.50	22 881.67±536.74	1 433.75±69.06	2 382.92±107.30	24.38±0.16	12.41±0.21	—
	9 月	12 871.25±370.50	30 004.58±1 297.11	3 395.83±175.57	2 311.25±26.62	16.65±1.43	11.28±1.44	—
	10 月	8 177.50±885.46	33 011.67±785.87	5 616.25±85.81	4 645.31±44.19	19.58±0.32	10.01±0.37	—
Zn 低剂量组	7 月	12 892.50±499.47	25 869.17±788.00	2 165.42±122.19	1 912.92±52.63	22.90±1.61	11.09±1.08	—
	8 月	12 787.08±1 505.63	24 670.00±579.50	1 647.50±102.02	2 575.38±179.10	25.70±1.59	11.36±0.77	—
	9 月	9 062.08±149.92	28 155.42±1 269.04	3 423.33±28.73	3 167.63±94.21	24.97±10.09	10.96±0.72	—
	10 月	10 486.67±687.39	43 955.63±395.63	7 467.08±326.82	6 614.58±214.45	48.49±17.16	11.98±1.23	—
Zn 中剂量组	7 月	12 892.50±499.47	25 869.17±788.00	2 165.42±122.19	1 912.92±52.63	22.90±1.61	11.09±1.08	—
	8 月	17 720.42±1 028.31	23 537.50±935.48	1 605.83±23.83	2 718.69±278.81	36.93±2.34	12.30±0.67	—
	9 月	11 659.58±367.15	26 280.00±924.70	3 554.58±125.57	1 587.63±913.82	53.57±2.75	9.62±1.04	—
	10 月	8 682.08±315.25	41 447.50±406.25	5 165.63±83.13	2 207.44±22.06	76.08±2.56	9.72±0.05	—
Zn 高剂量组	7 月	12 892.50±499.47	25 869.17±788.00	2 165.42±122.19	1 912.92±52.63	22.90±1.61	11.09±1.08	—
	8 月	14 965.63±24.38	22 686.25±142.50	1 933.13±5.63	2 305.88±119.18	48.49±4.13	12.00±0.49	—
	9 月	11 043.13±120.63	43 966.25±828.75	4 067.50±86.25	1 642.72±28.58	53.91±1.64	5.74±1.19	—
	10 月	8 469.58±179.49	33 906.25±1 211.69	4 478.33±198.64	2 828.00±149.75	117.33±11.82	7.95±0.84	—

注：“—”表示未检出。

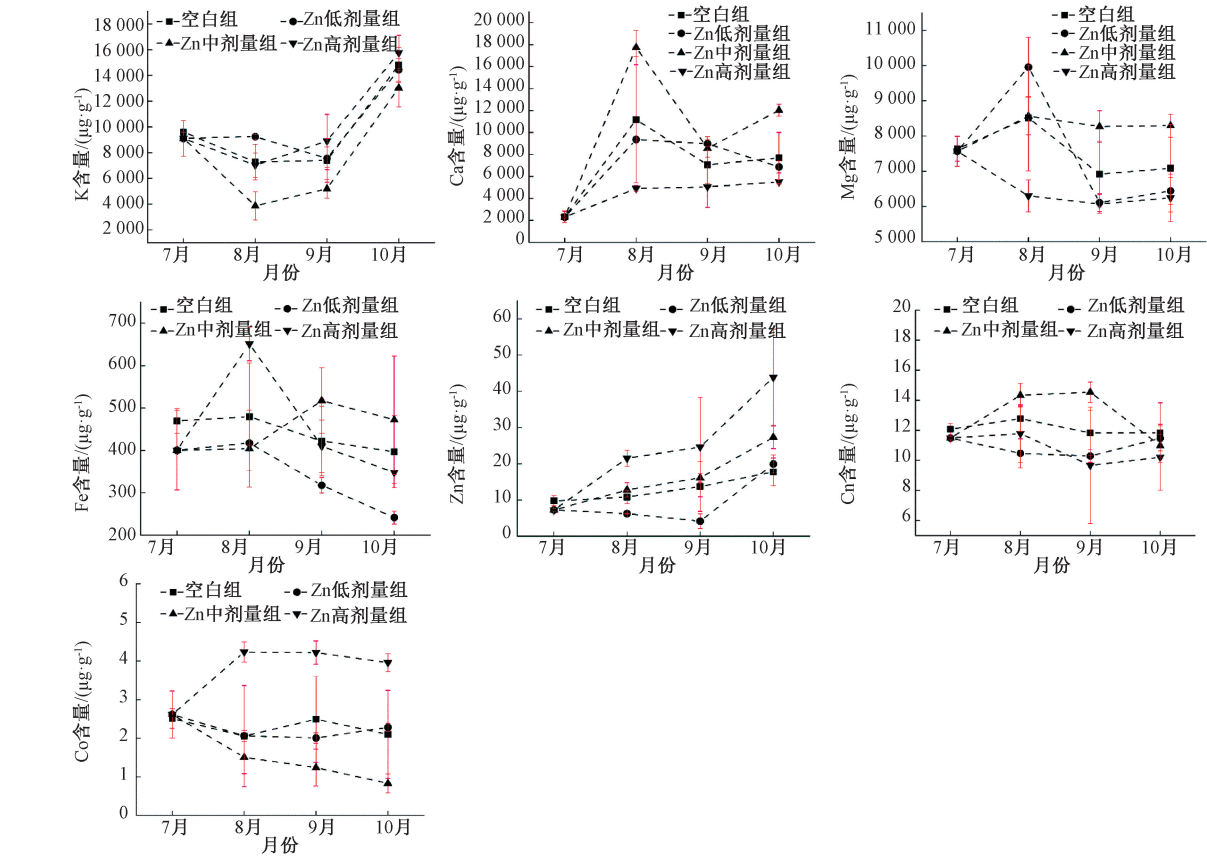


图 1 不同生长期红芪根中无机元素的动态变化趋势

3.1.3 红芪叶中无机元素的动态累积变化分析 低剂量 Zn 盐溶液在 9 月份后促进红芪叶 K 的累积；高剂量 Zn 盐溶液在 9 月份后抑制 Ca 的吸收；Zn 盐溶液不影响红芪叶中 Mg、Fe 的吸收趋势；Zn 盐溶液促进红芪叶中 Zn 的累积；高剂量 Zn 盐溶液抑制红芪叶中 Cu 的累积，见图 3。

3.2 根际土壤 0、20、40 cm 处无机元素含量测定 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下进

样测定，代入“2.4.1”项下方程计算含量，结果见表 6~8。

3.3 数据分析

3.3.1 Pearson 相关性分析 采用 SPSS 25.0 软件中 Pearson 相关性分析根际土壤和红芪元素含量相关性，结果见表 9。结果显示，土壤无机元素与红芪无机元素存在相关性，土壤中 Co 含量与红芪中 Ca、Mg、Cu 含量存在极显著

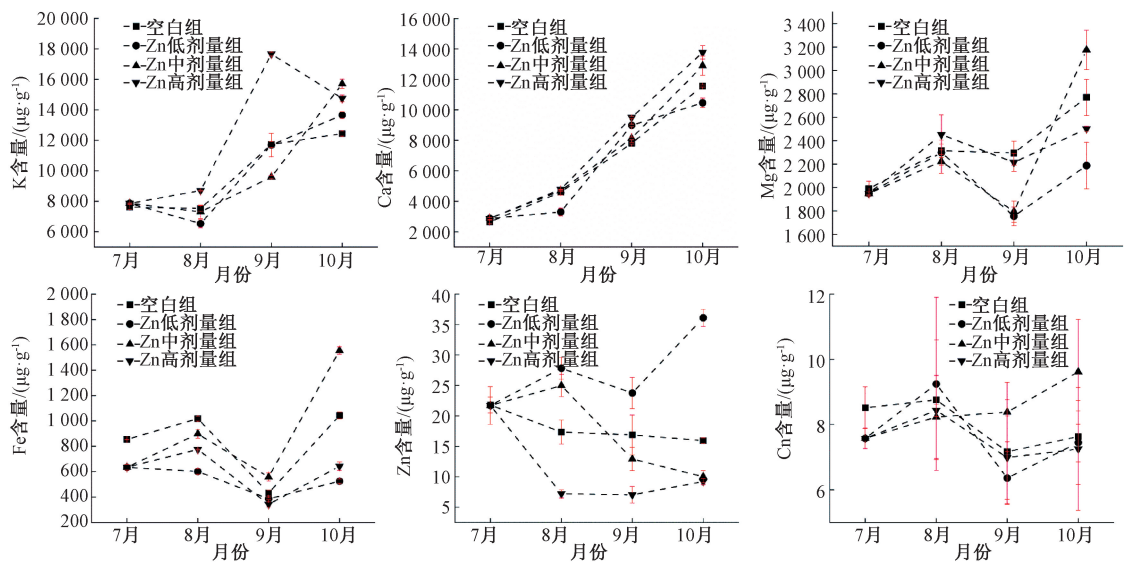


图 2 不同生长期红芪茎中无机元素的动态变化趋势

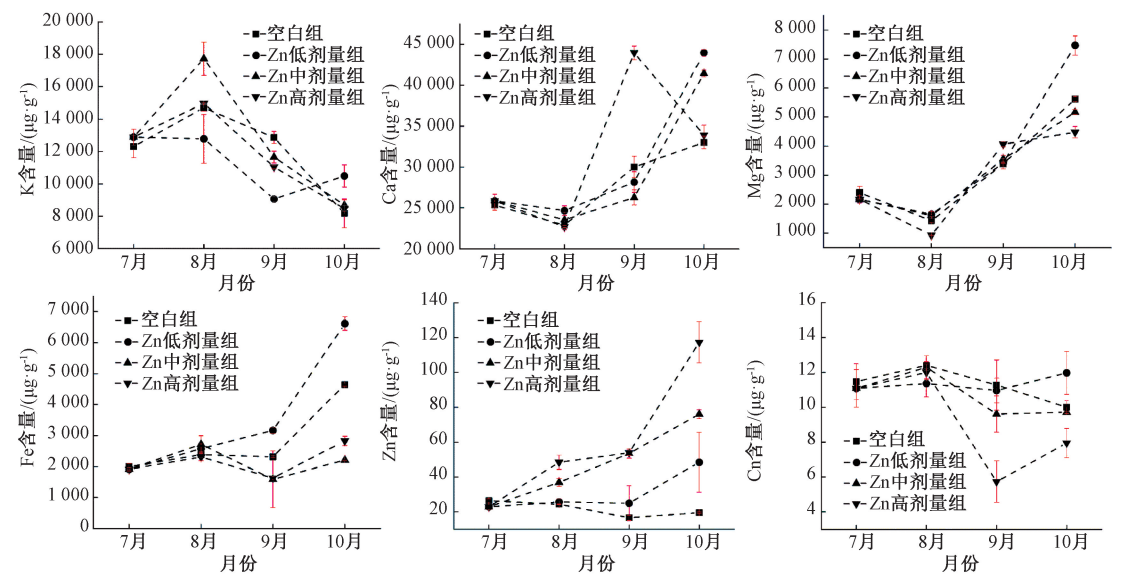


图 3 不同生长期红芪叶中无机元素的动态变化趋势

正相关，土壤中 K 含量与红芪中 Mg、Cu、Co 含量存在极显著正相关；土壤中 Co 含量与红芪中 Fe 含量、土壤中 Cu 含量与红芪中 Cu 含量、土壤中 Ca 含量与红芪中 Co 含量呈显著正相关；此外，土壤中 K、Zn 含量与红芪中 K、Zn 含量呈负相关。

3.3.2 红芪中无机元素图谱 按照所测元素顺序，取表 3~5 中红芪中 7 种无机元素含量的平均值做折线图。为方便观察，将 K、Ca、Mg 含量缩小 100 倍，Fe 含量缩小 10 倍，其他元素不变。建立红芪无机元素指纹图谱，见图 4。从整体看各元素分布有相似也有不同的分布态势，其共性可作为不同生长期红芪中无机元素相似性，差异性体现红芪生长期元素分布特征的变化。

3.3.3 主成分分析 采用 Origin 2019 软件对红芪根、茎、叶元素含量进行主成分分析，见图 5、表 10。前四种主成分贡献率大于 85%，可以代表样品中无机元素整体信息，

反映样品中无机元素含量动态变化特征。

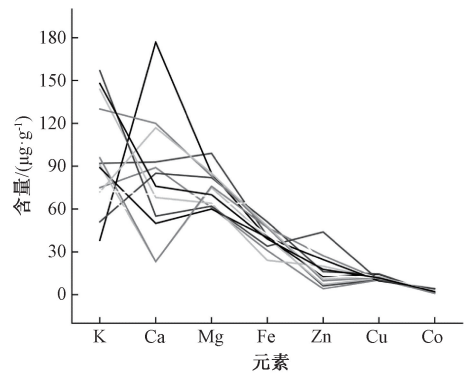


图 4 红芪无机元素图谱

3.3.4 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 为进一步筛选红芪根、茎、叶中的差异元素，采用 SIMCA14.1 软件分别对红芪无机元素含量进行 OPLS-DA 分析，得到变量

表 6 土壤 0 cm 处无机元素含量 (μg/g, $\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	月份	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Co
空白组	7 月	55 956.67±134.38	29 623.33±978.75	13 856.25±82.85	37 281.88±518.12	337.13±18.85	51.27±9.51	10.74±0.56
	8 月	30 518.16±309.69	19 158.54±64.69	10 730.56±405.66	28 752.26±569.69	314.55±8.88	39.35±1.66	23.85±5.88
	9 月	35 130.83±73.13	20 237.71±93.75	11 158.40±167.80	28 003.26±608.13	249.51±11.61	27.45±0.47	26.13±2.09
	10 月	38 449.38±226.88	21 470.35±134.69	11 622.85±549.19	29 319.51±180.94	389.47±15.07	29.31±2.37	25.03±4.21
Zn 低剂量组	7 月	43 294.38±93.13	33 089.06±364.06	13 962.50±636.25	37 311.88±425.00	319.23±3.82	65.26±7.06	12.34±1.36
	8 月	26 890.63±368.75	27 070.42±742.50	10 478.33±35.00	27 285.83±760.00	245.30±11.60	54.82±1.61	15.53±3.25
	9 月	29 019.17±830.00	27 158.33±836.88	11 264.79±235.37	26 881.46±847.21	176.32±5.53	30.67±1.10	26.60±4.23
	10 月	33 905.00±777.81	24 555.42±94.37	11 733.54±658.88	27 122.71±942.19	362.01±11.89	26.91±2.59	28.44±3.32
Zn 中剂量组	7 月	43 294.38±93.13	33 089.06±364.06	13 962.50±636.25	37 311.88±425.00	319.23±3.82	65.26±7.06	12.34±1.36
	8 月	27 825.63±143.75	25 324.79±951.88	11 357.92±373.05	29 108.33±715.71	373.52±15.26	24.41±3.49	19.54±3.09
	9 月	37 186.88±118.13	22 765.42±79.06	10 854.38±249.28	27 899.79±605.97	297.14±21.06	26.40±1.51	23.97±0.40
	10 月	35 137.08±25.00	21 945.83±202.81	11 267.71±547.45	28 381.67±675.08	442.52±14.10	25.73±0.14	26.93±1.72
Zn 高剂量组	7 月	43 294.38±93.13	33 089.06±364.06	13 962.50±636.25	37 311.88±425.00	319.23±3.82	65.26±7.06	12.34±1.36
	8 月	28 556.04±606.56	25 732.08±451.88	10 813.96±643.89	26 835.21±468.75	263.88±24.56	27.63±4.73	24.78±0.64
	9 月	38 592.71±126.88	27 377.81±942.19	11 351.56±334.06	27 855.83±474.17	230.95±11.60	23.96±0.31	27.41±1.09
	10 月	38 326.04±19.69	31 668.75±156.88	11 963.75±332.12	28 974.79±700.00	399.02±21.94	24.92±1.61	15.68±4.08

表 7 土壤 20 cm 处无机元素含量 (μg/g, $\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	月份	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Co
空白组	7 月	25 259.50±881.43	25 059.67±525.97	11 689.00±256.11	32 057.67±685.04	650.12±12.15	19.90±0.91	10.98±0.79
	8 月	27 461.94±779.17	21 031.39±750.83	14 206.39±749.12	35 066.94±749.12	610.46±12.15	31.15±0.95	12.43±0.95
	9 月	24 087.71±273.54	21 838.61±413.75	11 275.83±250.00	34 492.08±190.42	167.21±3.48	30.46±0.29	4.92±0.29
	10 月	24 826.67±340.83	17 037.22±614.38	5 188.61±131.67	28 059.17±236.66	301.12±10.54	27.99±1.14	10.10±1.14
Zn 低剂量组	7 月	24 854.17±508.75	26 033.33±968.75	11 390.00±105.00	31 384.17±561.89	553.19±27.69	23.74±2.14	9.65±0.90
	8 月	25 524.17±302.50	17 793.33±328.77	20 381.67±732.31	33 905.00±732.31	148.41±0.92	24.90±0.93	11.98±0.56
	9 月	23 461.25±118.75	21 553.75±971.25	6 977.50±55.33	32 227.50±955.00	126.66±1.99	27.15±0.73	4.65±0.43
	10 月	25 921.67±947.50	19 575.83±923.11	5 548.33±260.00	25 348.33±960.12	106.21±1.99	23.13±0.42	13.98±0.43
Zn 中剂量组	7 月	24 854.17±508.75	26 033.33±968.75	11 390.00±105.00	31 384.17±561.89	553.19±27.69	23.74±2.14	9.65±0.90
	8 月	25 187.50±770.00	20 248.33±207.50	11 275.00±152.50	33 990.00±458.75	273.69±0.13	18.35±1.35	10.74±0.18
	9 月	27 003.75±786.25	28 225.00±77.53	10 337.50±478.75	33 101.25±70.00	172.59±8.86	29.69±1.66	8.70±0.08
	10 月	22 756.67±830.57	18 623.33±195.00	4 877.50±195.00	26 865.00±358.75	118.27±6.41	26.38±1.04	14.69±1.58
Zn 高剂量组	7 月	24 854.17±508.75	26 033.33±968.75	11 390.00±105.00	31 384.17±561.89	553.19±27.69	23.74±2.14	9.65±0.90
	8 月	22 144.17±27.50	25 137.50±131.25	9 531.67±311.25	31 558.33±823.25	542.49±18.51	16.52±0.75	9.40±0.48
	9 月	22 852.50±755.00	20 450.00±352.52	16 985.00±412.50	34 743.33±83.12	158.93±7.69	22.95±1.35	12.42±0.41
	10 月	24 261.25±653.75	26 675.00±340.00	6 051.67±340.00	32 385.83±225.00	164.21±3.04	32.38±0.35	6.16±0.60

表 8 土壤 40 cm 处无机元素含量 (μg/g, $\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	月份	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Co
空白组	7 月	55 956.67±134.38	29 623.33±978.75	13 856.25±82.85	37 281.88±518.12	337.13±18.85	51.27±9.51	10.74±0.56
	8 月	30 518.16±309.69	19 158.54±64.69	10 730.56±405.66	28 752.26±569.69	314.55±8.88	39.35±1.66	23.85±5.88
	9 月	35 130.83±73.13	20 237.71±93.75	11 158.40±167.80	28 003.26±608.13	249.51±11.61	27.45±0.47	26.13±2.09
	10 月	38 449.38±226.88	21 470.35±134.69	11 622.85±549.19	29 319.51±180.94	389.47±15.07	29.31±2.37	25.03±4.21
Zn 低剂量组	7 月	35 949.06±72.19	29 321.25±48.75	11 042.50±476.88	32 809.06±37.81	260.65±19.45	85.26±5.81	15.39±2.36
	8 月	29 214.38±440.31	22 496.04±947.19	11 374.17±349.68	27 486.46±774.94	178.03±12.41	25.31±3.59	20.06±2.55
	9 月	30 688.13±749.69	25 357.29±407.50	11 204.79±301.74	26 330.83±572.95	177.75±20.04	26.87±0.90	27.46±1.41
	10 月	31 063.33±73.13	28 790.83±270.00	10 952.71±49.47	26 169.79±843.13	246.28±4.28	28.39±0.30	27.07±1.05
Zn 中剂量组	7 月	35 949.06±72.19	29 321.25±48.75	11 042.50±476.88	32 809.06±37.81	260.65±19.45	85.26±5.81	15.39±2.36
	8 月	26 321.04±315.31	23 384.38±391.20	9 412.71±554.69	27 398.33±61.25	234.42±19.21	22.13±1.91	21.30±1.65
	9 月	32 576.88±455.63	24 591.46±476.25	10 338.96±176.09	27 208.75±484.64	324.89±10.48	26.35±0.67	26.09±1.04
	10 月	33 946.88±352.46	23 807.50±840.31	10 777.08±253.73	26 648.75±650.26	302.74±26.70	25.89±0.45	19.47±0.39
Zn 高剂量组	7 月	35 949.06±72.19	29 321.25±48.75	11 042.50±476.88	32 809.06±37.81	260.65±19.45	85.26±5.81	15.39±2.36
	8 月	27 590.83±37.50	20 840.83±239.06	10 782.71±363.62	26 953.54±748.10	265.13±25.90	23.88±0.90	27.77±3.20
	9 月	31 498.75±106.25	24 752.92±983.44	10 657.50±136.85	25 606.25±135.76	413.91±9.76	23.39±0.37	26.20±3.61
	10 月	35 949.06±109.69	37 327.50±132.50	14 420.00±186.52	35 195.00±272.19	365.00±26.33	26.82±0.98	15.35±4.44

表 9 土壤无机元素与红芪无机元素间相关性分析

编号	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Co
T-K	-0.054	0.164	0.433 **	0.116	0.214	0.429 **	0.381 **
T-Ca	-0.144	0.043	0.268	0.045	0.217	0.104	0.327 *
T-Mg	-0.278	-0.123	0.157	-0.051	0.061	0.166	0.174
T-Fe	-0.028	-0.284	-0.147	-0.175	-0.155	-0.112	-0.048
T-Zn	-0.100	-0.168	-0.049	-0.169	-0.028	-0.183	-0.056
T-Cu	0.081	0.063	0.138	0.008	-0.221	0.313 *	0.136
T-Co	0.041	0.437 **	0.398 **	0.359 *	0.208	0.547 **	0.268

注：* $P<0.05$, ** $P<0.01$ ；“T”代表土壤。

表 10 主成分初始特征值和贡献率

主成分	特征值	累积方差贡献率/%	初始特征值方差贡献率/%
1	2.864 3	40.918 6	40.91
2	1.797 5	25.679 5	66.59
3	0.957 7	13.682 4	80.28
4	0.724 7	10.353 0	90.63
5	0.317 8	4.540 1	95.17
6	0.213 2	3.045 9	98.21
7	0.124 6	1.780 1	100.00

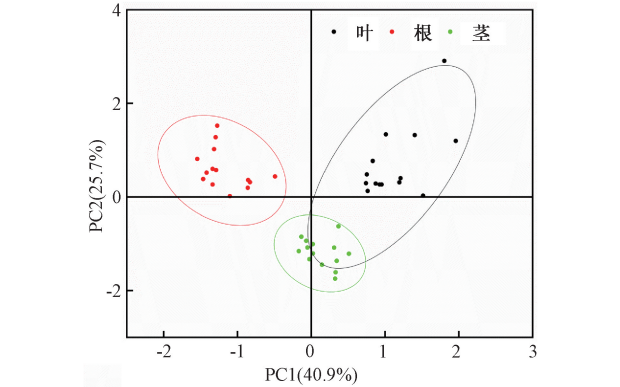


图 5 主成分分析图

重要性投影值图 (VIP), 见图 6。VIP 值越高, 对模型贡献率越大。基于此, 筛选 VIP>1 的无机元素, 结果显示, 差异贡献度由大到小依次为 Ca>Fe>Mg>Co>Cu, 推测以上元素可能是 Zn 盐溶液造成红芪不同部位差异的主要无机元素。

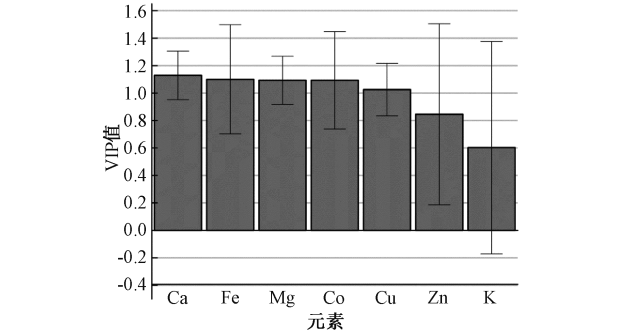


图 6 VIP 图

4 讨论

无机元素与中药质量密切相关, 已有研究证实无机肥通过调控前胡中香豆素类成分的含量, 以保证前胡质量^[15]; 增施钙肥和减施镁肥有利于提高朝鲜淫羊藿活性成

分的质量浓度^[16]。本试验初步研究了不同剂量 Zn 盐溶液干预下, 不同生长期红芪根、茎、叶及根际土壤 0、20、40 cm处无机元素的动态变化特征。研究发现, 中剂量 Zn 盐溶液促进红芪根中 Mg、Fe 累积, 高剂量 Zn 盐溶液促进红芪根中 Zn、Co 累积; 低剂量 Zn 盐溶液促进红芪茎 Zn 累积, 高剂量 Zn 盐溶液抑制红芪茎中 Zn 累积, 中剂量 Zn 盐促进红芪茎中 Cu 累积; 各剂量 Zn 盐溶液都能促进红芪叶 Zn 累积, 低剂量 Zn 盐溶液促进红芪叶中 Mg、Fe 累积; 相关性分析发现, 土壤 Co、K 与红芪中 Ca、Mg、Fe 有显著相关性。土壤是中药材发展的基础, 土壤中无机元素的动态变化趋势能反映出中药材生长发育所需的无机元素需求量, 而土壤无机元素不易被植物吸收。故本试验通过叶面施肥的方式, 调节红芪根、茎、叶中无机元素的含量, 增加红芪对无机元素的富集, 改变红芪的生长发育过程, 促进红芪营养物质累积。

目前, 化肥的大量使用虽然提高了作物产量, 同时也带来诸多生态环境问题。微量无机盐溶液能够促进植物生长, 改善土壤环境, 减少相应化肥的使用, 实现农业生态的可持续发展。研究结果表明, 外源无机 Zn 盐溶液能够促进红芪中有益无机元素的累积, 并且重金属 Cu 含量符合重金属行业标准。建议具体种植红芪过程中, 根据不同产地, 不同生长期红芪药材及根际土壤无机元素种类和含量的不同, 研制红芪适用的叶面喷施无机盐溶液, 以提高红芪质量, 为红芪发展提供新思路。

参考文献:

[1] 孟令博, 赵 曼, 亢 燕, 等. 不同浓度 Fe²⁺ 与 Zn²⁺ 对羊草幼苗生长和生理特性的影响[J]. 西北植物学报, 2021, 41(10): 1681-1690.

[2] White P J, Broadley M R. Physiological limits to zinc biofortification of edible crops[J]. *Front Plant Sci*, 2011, 17(2): 80.

[3] Hacisalihoglu G, Hart J J, Vallejos C E, *et al*. The role of shoot-localized processes in the mechanism of Zn efficiency in common bean[J]. *Planta*, 2004, 218(5): 704-711.

[4] Broadley M R, White P J, Hammond J P, *et al*. Zinc in plants[J]. *New Phytol*, 2007, 173(4): 677-702.

[5] 武维华. 植物生理学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 159.

[7] 张淑娟, 张育贵, 辛二旦, 等. 红芪研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 70-74.

[8] 牛江涛, 曹 瑞, 张泽国, 等. 红芪多糖的提取分离及药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(1): 130-133.

[9] 张 锐, 顾志荣, 吕 鑫, 等. 基于网络药理学探讨红芪的活性成分、作用靶点及潜在治疗价值[J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(6): 13-19.

[10] 冯慧敏, 李成义, 何军刚, 等. 红芪化学成分和药理作用研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2831-2842.

[11] 刘 岩, 李连泰, 计小清, 等. 土壤中无机元素对不同产地黄芩中无机元素和黄芩苷量的影响[J]. 中草药, 2017, 48(6): 1225-1228.

[12] 贾妙婷, 孙天雄, 汪 莉, 等. 外源钾对红芪药材性状及异黄酮类成分的影响[J]. 甘肃中医药大学学报, 2021, 38(2): 1-5.

[13] 宫福雨, 程 林, 韩 梅, 等. 黄芩药效成分积累的生态因子特征分析[J]. 中药材, 2020, 43(7): 1570-1576.

[14] 刘大会, 郭兰萍, 黄璐琦, 等. 矿质营养对药用植物黄酮类成分合成的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2367-2371.

[15] 梁卫青, 胡轶娟, 浦锦宝, 等. 前胡有效成分含量与土壤因子的相关性分析[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(11): 1302-1308.

[16] 刘振成, 张 硕, 代艾林, 等. 土壤因子对朝鲜淫羊藿有效成分的影响[J]. 东北林业大学学报, 2021, 49(5): 40-44.

金嗓清音丸中僵蚕成分的特异性引物扩增鉴定

郭晶晶^{1,2}, 唐玲玲³, 严小萍^{1,2}, 徐 超³, 胡建慧⁴, 李 娟³, 孙小祥⁴, 夏国华³, 林 玲³, 杨 欢^{3*}

(1. 南通大学附属如皋医院药剂科, 江苏 如皋 226500; 2. 如皋市人民医院药剂科, 江苏 如皋 226500; 3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 4. 镇江市中医院药剂科, 江苏 镇江 212003)

摘要: **目的** 建立特异性引物扩增鉴定金嗓清音丸中僵蚕成分。**方法** 根据家蚕、白僵菌、绿僵菌线粒体全基因序列差异设计特异性引物 PM2、PB2、PA2, 采用十六烷基三甲基溴化铵法、酚仿抽提法提取纯化总 DNA, 并以此为模板进行特异性引物扩增和方法学考察, 产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。**结果** 家蚕、白僵菌、绿僵菌 DNA 经 PCR 扩增后, 分别在 82、94、144 bp 处产生条带, 并且未观察到非特异性扩增条带。PM2、PB2、PA2 对相应 DNA 的检测灵敏度分别为 0.10、0.10、0.010 ng/μL。来自同一厂家的 6 批样品中同时检出家蚕、白僵菌 DNA, 但未检出绿僵菌 DNA, 而另外 2 批样品仅检出家蚕 DNA。**结论** 该方法方便可靠, 专属性强, 有助于更好地监控金嗓清音丸等含僵蚕中药成方制剂的质量, 可为其临床用药的安全性和有效性提供保障, 并与其他中成药中动物药的专属性鉴定提供参考。

关键词: 金嗓清音丸; 僵蚕; 成分鉴定; 特异性引物扩增

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)05-1729-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.05.061

中成药在保障大众健康方面发挥着重要作用, 其中抵当丸、大黄蛰虫丸等^[1-2] 含动物药的品种早在《伤寒杂病论》《金匱要略》中即有记载。僵蚕为蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染 (或人工接种) 白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant 而致死的干燥体, 性平, 味咸、辛, 具有息风止痉、祛风止痛、化痰散结等功效^[3], 但市面上常见绿僵蚕、黑死蚕等伪品^[4], 对临床用药安全性与有效性造成了不良影响。2020 年版《中国药典》一部收录了含僵蚕的成方制剂共 36 种, 其中金嗓清音

丸由麸炒僵蚕等 16 位中药组成, 具有养阴清肺、化痰利咽功效, 主治肺热阴虚所致的慢喉瘖、慢喉痹等, 目前该制剂的质量评价方法主要包括观察地黄、石斛、蝉蜕、甘草显微特征, TLC 法定性鉴别麦冬、玄参、芍药苷、丹皮酚、哈巴俄苷, HPLC 法测定黄芩、木蝴蝶中黄芩苷含量^[5], 但由于其组成复杂, 传统的显微、理化方法难以准确鉴定僵蚕成分, 故相关标准尚未涉及这一方面。

DNA 分子鉴定具有特异性高的优势, 近年来发展迅速, 是黄璐琦院士提出的“分子生药学”重要组成部

收稿日期: 2022-01-02

基金项目: 国家自然科学基金 (82173937); 南通市社会民生科技计划项目 (JCZ2022031)

作者简介: 郭晶晶 (1981—), 女, 主管中药师, 研究方向为中药学。Tel: (0513) 87512315—687, E-mail: 7318874@qq.com

* 通信作者: 杨 欢 (1980—), 男, 教授, 研究方向为中药学。Tel: (0511) 85038451, E-mail: yanghuan1980@ujs.edu.cn