

基于七叶一枝花中高含量皂苷类成分的氮、磷、钾配施方案研究

威则日沙^{1,3,4}, 刘哲^{1,3,4}, 兰建龙^{1,3,4}, 赵雪莲^{1,3,4}, 海来约布^{1,3,4}, 张绍山^{2,3,4}, 杨正明^{2,3,4*}, 刘圆^{3,4,5*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041
2. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川 成都 610041
3. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225
4. 青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室, 四川 成都 610225
5. 西南民族大学民族医药研究院, 四川 成都 610041

摘要: 目的 研究氮、磷、钾肥配施对七叶一枝花 *Paris polyphylla* var. *chinensis* 中皂苷类成分含量的影响, 以优化七叶一枝花最佳氮、磷、钾配施方案, 为其合理施肥提供科学依据。方法 以 3 因素 5 水平二次回归通用旋转组合设计安排田间试验, 采用 UPLC-ELSD 法测定七叶一枝花中 7 种皂苷含量, 通过方差分析建立回归方程 (经 F 检验), 利用模型分析氮、磷、钾配施对各皂苷含量的影响, 使用统计频数法筛选最优施肥方案。结果 贡献率分析表明, 氮肥对重楼皂苷 II、V 的贡献率最大, 磷肥对重楼皂苷 H、纤细薯蓣皂苷的贡献率最大, 钾肥对重楼皂苷 I、VI、VII 的贡献率最大。单因素分析表明, 氮、磷、钾对重楼皂苷 VII、VI 含量有极显著影响 ($P < 0.01$); 互作效应分析表明, 不同浓度的氮肥、磷肥和钾肥的协同作用显著提高重楼皂苷 VI 的含量; 根据回归模型分析最佳施肥范围, 取交集得氮、磷、钾肥最优施肥范围分别为 516.39~557.19、2771.70~2848.20、461.61~502.65 kg/hm²。结论 建立了重楼皂苷与氮、磷、钾肥配施的相关性回归方程模型, 有利于七叶一枝花中皂苷类成分含量的提高, 为合理施肥提供科学性依据。

关键词: 七叶一枝花; 氮; 磷; 钾; 重楼皂苷 VII; 重楼皂苷 VI; 重楼皂苷 H; 重楼皂苷 II; 纤细薯蓣皂苷; 重楼皂苷 I; 重楼皂苷 V; 最优施肥量

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)10-3089-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.027

Research on NPK application scheme of *Paris polyphylla* var. *chinensis* on high contents of saponins

WEIZE Ri-sha^{1, 3, 4}, LIU Zhe^{1, 3, 4}, LAN Jian-long^{1, 3, 4}, ZHAO Xue-lian^{1, 3, 4}, HAILAI Yue-bu^{1, 3, 4}, ZHANG Shao-shan^{2, 3, 4}, YANG Zheng-ming^{2, 3, 4}, LIU Yuan^{3, 4, 5}

1. School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China
2. Institute of Qinghai-tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China
3. Sichuan Laboratory of Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology Engineering, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China
4. Key Laboratory of Tibetan Plateau Ethnic Medicinal Resources Protection and Utilization of National Ethnic Affairs Commission of the People's Republic of China, Chengdu 610225, China
5. Ethnic Medicine Institute, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To investigate the effect of NPK application on the contents of saponins in *Paris polyphylla* var. *chinensis*, so as to optimize the best NPK application for *P. polyphylla* var. *chinensis*, which provided some scientific basis for its rational fertilization. **Methods** A field experiment was carried out with three factors and five levels second order regression current rotation

收稿日期: 2020-11-09

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1708005); 四川省科技计划项重点研发项目 (2021YFS0043); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资助 (2021PTJS35)

作者简介: 威则日沙 (1991—), 男, 硕士研究生, 主要从事少数民族药物研究。E-mail: 1579980078@qq.com

*通信作者 杨正明 (1990—), 男, 助理研究员, 主要从事民族药资源品质评价及其生理生态与栽培研究。E-mail: 790721918@qq.com
刘圆 (1968—), 教授, 博士生导师, 从事少数民族药物研究和教学。Tel: (028)85528812 E-mail: 499769896@qq.com

design, and the contents of seven kinds of saponins were determined by UPLC-ELSD. The regression equation was built via variance analysis with *F*-test, the effect of NPK application on the content of saponins was analyzed by model analysis, and the optimum NPK application was selected by frequency statistic method. **Results** Results of contribution rate analysis showed that N fertilizer made the highest contribution to polyphyllin II and V, P fertilizer made the highest contribution to polyphyllin H and gracillin, and K fertilizer made the highest contribution to polyphyllin I, VI and VII. Single factor analysis showed that NPK application had a very significant impact on the content of polyphyllin VII and VI ($P < 0.01$). The interaction effect analysis showed that the synergistic effect of NPK application could significantly increase the content of polyphyllin VII. The optimum NPK application areas were 516.39—557.19 kg/hm², 2771.70—2848.20 kg/hm² and 461.61—502.65 kg/hm², respectively. **Conclusion** The regression equation model was established between the contents of polyphyllins in *P. polyphylla* var. *chinensis* and NPK application, which could be beneficial to increase the contents of saponins in *P. polyphylla* var. *chinensis*, and provide a scientific basis for rational fertilization.

Key words: *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara.; N; P; K; polyphyllin VII; polyphyllin VI; polyphyllin H; polyphyllin II; gracillin; polyphyllin I; polyphyllin V; optimal fertilizer application rate

七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara. 为百合科重楼属植物, 是历版《中国药典》收录的 2 种基原药材“重楼”的来源之一, 以重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 和重楼皂苷 VII 总含量为其质量评价指标^[1]。重楼甾体皂苷是重楼中含有的主要活性成分, 具有抗肿瘤、消炎、止血、抗菌、镇痛、镇静、抗氧化、免疫调节、抑制血管生成、保护肝脏与肾脏作用^[2-3]。重楼是珍稀濒危名贵传统药材, 过度采挖已使其野生资源濒临灭绝, 人工栽培是解决滇重楼资源危机的必然途径。

近十多年来, 重楼种植已成规模, 种植面积不断扩大, 肥料施用不均衡会导致重楼根茎品质下降^[4], 探讨氮、磷、钾肥配施对七叶一枝花的质量的影响, 可以为七叶一枝花的生态种植提供科学依据。目前, 关于氮、磷、钾配施对重楼活性成分影响的研究主要以滇重楼为主, 相关研究^[5-9]结果表明, 合理施用氮、磷、钾肥可提高滇重楼的产量和品质, 土壤肥力是影响滇重楼质量的重要因素。不同植物对氮、钾、磷的需求比例不同, 单一微肥量过高或过低对药材植物生长发育、药效成分的积累及药材质控标准均有影响, 并且元素量单一化容易使土壤恶化^[4,6,10], 因此适宜的氮、磷、钾肥配施是药用植物高产优质的重要基础。本实验采用 3 因素 5 水平二次回归通用旋转组合设计方法, 采用 UPLC-ELSD 法测定 20 个小区的七叶一枝花中重楼皂苷 I 等 7 种甾体皂苷含量, 探讨氮、磷、钾配施对七叶一枝花中皂苷类成分含量的影响, 以期规范化七叶一枝花的生态栽培提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Waters Acquity UPLC®超高效液相色谱仪(美

国 Waters 公司); BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司); METTLER AE240 电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ-5200E 型超声波清洗器(40 kHz、250 W, 昆山超声仪器有限公司); ProElut C₁₈ 反相硅胶键合固相萃取柱(200 μg, 北京迪科马科技有限公司)。

重楼皂苷 I(批号 MUST-19053105)、重楼皂苷 II(批号 MUST-18103104)、重楼皂苷 V(批号 MUST-19052102)、重楼皂苷 VI(批号 MUST-180717002)、重楼皂苷 VII(批号 MUST-18062201)、重楼皂苷 H(批号 MUST-19040101)、纤细薯蓣皂苷(批号 MUST-15081110)均购自成都曼斯特生物有限公司, 质量分数大于 98%。乙腈为色谱纯(美国 Sigma 公司); 水为屈臣氏蒸馏水; 其余试剂为分析纯。

1.2 材料

以四川省汶川县水磨镇白石村西南民族大学重楼仿野生繁育试验基地人工栽种七叶一枝花为试验材料, 经西南民族大学刘圆教授鉴定为百合科(Liliaceae)重楼属 *Paris* L. 植物七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara., 洗净, 50 °C 烘干, 粉碎, 过筛(3 号筛), 备用。

供施肥料为尿素(总氮 ≥ 46.4%, 四川宏泰生化有限公司公司)、过磷酸钙(P₂O₅ ≥ 12%, 四川省成都市青白江区磷肥厂)、硫酸钾(K₂O ≥ 60%, 国投新疆罗布泊钾盐有限责任公司)。

2 方法与结果

2.1 田间试验设计

田间试验设计见课题组前期报道^[11], 试验地位于四川省汶川县水磨镇白石村西南民族大学重楼仿野生繁育试验基地。试验地土壤肥力状况:

pH 值为 7.50; 有机质为 32.36 mg/kg; 碱解氮为 158.67 mg/kg; 速效磷为 51.67 mg/kg; 速效钾为 236.71 mg/kg。试验因素为氮肥 (X₁)、磷肥 (X₂)、钾肥 (X₃), 采用 3 因素 5 水平二次通用

旋转组合设计方法, 共 20 个处理, 20 个小区随机安排于试验地中 (试验小区面积为 16 m²)。试验因素和水平编码见表 1。二次通用旋转组合设计与试验方案见表 2。

表 1 因素水平编码

Table 1 Code of factor levels

水平	因素			施肥量/(kg·hm ⁻²)		
	氮	磷	钾	氮肥 (尿素)	磷肥 (过磷酸钙)	钾肥 (硫酸钾)
-1.681 8	0	0	0	0	0	0
-1	92.10	122.70	92.10	200.10	1 022.70	180.45
0	227.10	302.70	227.10	493.50	2 522.70	445.20
1	362.10	482.70	362.10	787.05	4 022.70	709.95
1.681 8	454.20	605.40	454.20	987.15	5 045.40	890.40
变幅	135.00	180.00	135.00	293.50	1 500.00	264.75

表 2 试验设计与实施方案

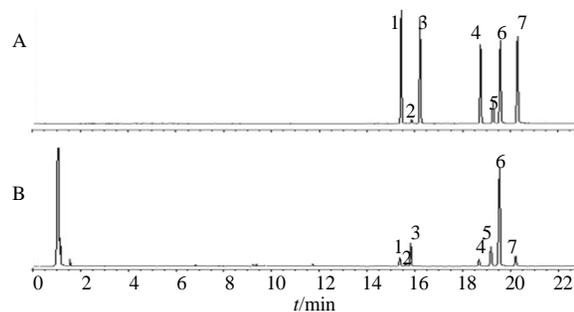
Table 2 Experimental design and implementation of programs

小区编号	码值方案			实施方案/[g·(16 m ²) ⁻¹]		
	氮 (X ₁)	磷 (X ₂)	钾 (X ₃)	氮肥 (尿素)	磷肥 (过磷酸钙)	钾肥 (硫酸钾)
1	1	1	1	1 258.65	6 433.1	1 135.25
2	1	1	-1	1 258.65	6 433.1	288.62
3	1	-1	-1	1 258.65	1 635.5	1 135.25
4	1	-1	-1	1 258.65	1 635.5	288.62
5	-1	1	-1	319.99	6 433.1	1 135.25
6	-1	1	-1	319.99	6 433.1	288.62
7	-1	-1	-1	319.99	1 635.5	1 135.25
8	-1	-1	-1	319.99	1 635.5	288.62
9	-1.681 8	0	-1	0	4 034.3	711.94
10	1.681 8	0	0	1 578.64	4 034.3	711.94
11	0	-1.681 8	0	789.32	0	711.94
12	0	1.681 8	0	789.32	8 068.6	711.94
13	0	0	-1.681 8	789.32	4 034.3	0
14	0	0	1.681 8	789.32	4 034.3	1 423.87
15	0	0	0	789.32	4 034.3	711.94
16	0	0	0	789.32	4 034.3	711.94
17	0	0	0	789.32	4 034.3	711.94
18	0	0	0	789.32	4 034.3	711.94
19	0	0	0	789.32	4 034.3	711.94
20	0	0	0	789.32	4 034.3	711.94

2.2 七叶一枝花中 7 种皂苷含量测定

2.2.1 色谱条件 参照张绍山等^[12]、刘哲等^[13]重楼皂苷含量测定方法, 已优化分离条件。ACQUITY UPLC[®] HSS C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 分析时间 23 min; 进样量 2 μL; ELSD 检测器: 增益 500, 冷却模式, 漂移管温度 55 °C, 氮气压力 276 kPa; 柱温 40 °C; 体积流量 0.2 mL/min; 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱程序: 0~23 min, 10%~80%A。混合对照品和供试品溶液色谱图见图 1。

2.2.2 对照品溶液制备 取重楼皂苷 VII、重楼皂苷 H、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 II、重楼皂苷 V、纤细薯蓣皂苷、重楼皂苷 I, 精密称定, 色谱甲醇



1-重楼皂苷 VII 2-重楼皂苷 VI 3-重楼皂苷 H 4-重楼皂苷 II
5-纤细薯蓣皂苷 6-重楼皂苷 I 7-重楼皂苷 V
1-polyphyllin VII 2-polyphyllin VI 3-polyphyllin H 4-polyphyllin II
5-gracillin 6-polyphyllin I 7-polyphyllin V

图 1 混合对照品 (A) 和供试品溶液 (B) 溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixed reference (A) and sample (B)

定容到 10 mL 量瓶中, 分别得 0.522 0、0.320 0、0.526 0、0.442 0、0.460 0、0.163 0、0.476 0 mg/mL 对照品溶液, 用时以 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液备用。

2.2.3 供试品溶液制备 参考张绍山等^[12]、刘哲等^[13]的研究, 取 0.5 g 七叶一枝花样品粉末, 精密称定, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 50 mL 甲醇, 摇匀, 静置 4 h, 再超声 30 min, 滤过, 重复上述操作 1 次。合并 2 次滤液, 45 °C 减压旋蒸回收溶剂, 残渣加甲醇溶解, 定容至 5 mL, 以

0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液备用。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液适量, 稀释到 5 mL, 配制成不同稀释倍数的混合对照品溶液, 进样 2 μL, 按“2.2.1”项下色谱条件测定。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制外标法标准曲线, 结果见表 3。

2.2.5 样品测定 取七叶一枝花样品粉末, 按“2.2.3”项下制备供试品溶液, 以“2.2.1”项下色谱条件进样, 测定峰面积, 外标法计算含量。20 个小区七叶一枝花样品的 7 个甾体皂苷含量见表 4。

表 3 对照品的线性回归方程

Table 3 Linear regression equation of reference

成分	线性回归方程	R ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
重楼皂苷 VIII	Y=990 746 X-12 920	0.999 1	0.010 4~0.313 2
重楼皂苷 H	Y=3×10 ⁶ X-8 588.6	0.999 1	0.003 2~0.097 8
重楼皂苷 II	Y=775 109 X-3 548.4	0.999 3	0.009 5~0.285 6
纤细薯蓣皂苷	Y=242 905 X-6 399.9	0.999 9	0.009 2~0.276 0
重楼皂苷 I	Y=1×10 ⁷ X-9 588.4	0.999 1	0.000 6~0.019 2
重楼皂苷 V	Y=1×10 ⁶ X-12 009	0.999 1	0.008 8~0.265 2
重楼皂苷 VI	Y=1×10 ⁶ X-17 682	0.999 0	0.009 5~0.283 8

表 4 样品中 7 种皂苷含量

Table 4 Contents of seven saponins

小区	质量分数/%								
编号	重楼皂苷 VII	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 H	重楼皂苷 II	纤细薯蓣皂苷	重楼皂苷 I	重楼皂苷 V	重楼皂苷 VII、II、I 总和	
1	0.459±0.009	0.304±0.005	0.017±0.004	0.224±0.005	0.022±0.004	0.817±0.001	0.202±0.017	0.500	2.045
2	0.248±0.004	0.128±0.000	0.017±0.001	0.185±0.000	0.046±0.001	0.584±0.011	0.029±0.013	0.339	1.237
3	0.288±0.039	0.139±0.011	0.010±0.000	0.235±0.011	0.017±0.001	0.843±0.001	0.107±0.086	0.455	1.639
4	0.147±0.005	0.059±0.009	0.011±0.001	0.196±0.009	0.013±0.001	0.673±0.016	0.143±0.001	0.339	1.243
5	0.282±0.005	0.069±0.007	未检测出	0.107±0.007	0.086±0.006	0.511±0.011	0.027±0.006	0.300	1.081
6	0.129±0.004	0.077±0.004	0.007±0.000	未检测出	0.001±0.000	0.016±0.011	未检测出	0.073	0.23
7	0.155±0.001	0.051±0.001	0.283±0.009	0.166±0.001	0.006±0.001	0.351±0.009	1.349±0.011	0.224	2.362
8	0.049±0.011	0.03±0.001	0.205±0.007	0.042±0.001	0.007±0.000	0.090±0.007	0.344±0.001	0.060	0.768
9	0.095±0.001	0.011±0.001	未检测出	0.609±0.001	0.012±0.000	0.500±0.004	0.279±0.011	0.401	1.506
10	0.337±0.011	0.115±0.016	未检测出	未检测出	未检测出	0.015±0.001	未检测出	0.176	0.467
11	0.118±0.001	0.04±0.003	0.009±0.001	0.106±0.003	0.102±0.001	0.521±0.009	0.024±0.006	0.248	0.921
12	0.258±0.106	0.190±0.005	0.007±0.001	未检测出	0.001±0.000	未检测出	未检测出	0.258	0.456
13	0.075±0.011	0.063±0.000	未检测出	未检测出	未检测出	未检测出	未检测出	0.075	0.138
14	0.388±0.001	0.220±0.011	0.012±0.003	0.052±0.001	0.013±0.004	0.407±0.017	0.338±0.009	0.282	1.429
15	0.171±0.001	0.085±0.009	0.024±0.005	0.077±0.001	0.020±0.000	0.944±0.013	1.224±0.007	0.397	2.545
16	0.157±0.001	0.078±0.004	0.013±0.000	0.070±0.001	0.045±0.001	1.003±0.017	1.095±0.007	0.410	2.461
17	0.11±0.016	0.047±0.039	0.025±0.001	0.033±0.016	0.024±0.005	1.077±0.001	1.166±0.001	0.407	2.482
18	0.164±0.003	0.066±0.005	0.063±0.000	0.040±0.003	0.013±0.000	1.025±0.001	1.280±0.007	0.410	2.651
19	0.128±0.005	0.056±0.005	0.008±0.007	0.049±0.004	0.008±0.003	1.027±0.001	1.456±0.011	0.401	2.732
20	0.192±0.000	0.031±0.004	0.056±0.011	0.100±0.001	0.002±0.005	1.067±0.006	1.077±0.001	0.453	2.525

2.3 氮、磷、钾配施对七叶一枝花的皂苷类成分的影响

2.3.1 数学模型建立 根据表 4 试验结果, 利用 DPS 7.05 数据处理系统对数据进行回归模型分析, 结合矩阵模型, 建立氮肥 (X₁)、磷肥 (X₂)、钾肥 (X₃) 与重楼皂苷 VII 含量的回归数学模型 Y₁、重楼皂苷 VI 含量的回归数学模型 Y₂、重楼皂

苷 H 含量的回归数学模型 Y₃、重楼皂苷 II 含量的回归数学模型 Y₄、纤细薯蓣皂苷含量的回归数学模型 Y₅、重楼皂苷 I 含量的回归数学模型 Y₆、重楼皂苷 V 含量的回归数学模型 Y₇。用 F 检验法分别检验方程各项回归系数、方程总回归系数和失拟度, 得到方差分析结果见表 5。

表 5 氮、磷、钾肥与皂苷的方差分析

Table 5 Analysis of variance of NPK fertilizer and saponins

变异来源	F 值						
	重楼皂苷 VII	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 H	重楼皂苷 II	纤细薯蓣皂苷	重楼皂苷 I	重楼皂苷 V
X ₁	94.973 2**	40.968 9**	3.679 8	0.877 1	0.038 6	1.087 6	3.486 3
X ₂	55.572 2**	37.279 2**	4.223 1	0.319 4	0.263 0	0.693 8	3.556 7
X ₃	140.844 6**	34.854 7**	0.154 6	0.553 2	0.579 1	2.877 6	3.606 7
X ₁ ²	11.273 8**	0.004 4	0.027 9	5.432 1*	0.222 2	7.292 3*	25.763 0**
X ₂ ²	3.642 6	8.543 8*	0.115 6	0.000 1	2.337 0	7.218 5*	33.258 0**
X ₃ ²	17.304 1**	19.173 5*	0.088 0	0.068 0	0.202 0	8.684 1*	24.165 0**
X ₁ X ₂	0.785 2	5.981 0*	7.918 2*	0.037 5	0.173 8	0.058 4	5.532 6*
X ₁ X ₃	1.607 5	12.365 5**	0.168 2	0.140 6	1.450 3	0.180 1	1.633 8
X ₂ X ₃	2.544 2	0.940 0	0.228 9	0.001 7	0.451 1	0.127 5	1.206 1

X₁-氮 X₂-磷 X₃-钾 **P≤0.01; *P≤0.05

X₁-N X₂-P X₃-K **P≤0.01; *P≤0.05

$$Y_1=0.153 53+0.068 39 X_1+0.052 31 X_2+0.083 28 X_3+0.022 94 X_1^2+0.013 04 X_2^2+0.028 42 X_3^2+0.008 12 X_1X_2+0.011 62 X_1X_3+0.014 62 X_2X_3 \quad (1)$$

$$Y_2=0.060 57+0.042 32 X_1+0.040 37 X_2+0.039 03 X_3+0.000 43 X_1^2+0.018 81 X_2^2+0.028 18 X_3^2+0.021 12 X_1X_2+0.030 37 X_1X_3+0.008 37 X_2X_3 \quad (2)$$

$$Y_3=0.029 38-0.032 22 X_1-0.034 51 X_2+0.006 60 X_3+0.002 73 X_1^2+0.005 56 X_2^2+0.004 85 X_3^2+0.061 75 X_1X_2-0.009 00 X_1X_3-0.010 50 X_2X_3 \quad (3)$$

$$Y_4=0.061 10-0.036 55X_1-0.022 06 X_2+0.029 03 X_3+0.088 56 X_1^2-0.000 36 X_2^2-0.009 91 X_3^2+0.009 87 X_1X_2-0.019 12 X_1X_3-0.002 12 X_2X_3 \quad (4)$$

$$Y_5=0.018 56-0.001 62 X_1-0.004 24 X_2+0.006 29 X_3-0.003 79 X_1^2+0.012 30 X_2^2-0.003 61 X_3^2-0.004 50 X_1X_2-0.013 00 X_1X_3+0.007 25 X_2X_3 \quad (5)$$

$$Y_6=1.014 38+0.082 99 X_1-0.066 28 X_2+0.134 99 X_3-0.209 19 X_1^2-0.208 12 X_2^2-0.228 28 X_3^2-0.025 12 X_1X_2-0.044 12 X_1X_3+0.037 12 X_2X_3 \quad (6)$$

$$Y_7=1.208 73-0.125 08 X_1-0.126 34 X_2+0.127 22 X_3-0.331 00 X_1^2-0.376 08 X_2^2-0.320 57 X_3^2+0.205 87 X_1X_2-0.111 87 X_1X_3-0.096 12 X_2X_3 \quad (7)$$

通过方差分析所得方程经 F 检验, F_{1R} = 35.991 93, F_{1Lf} = 0.510 26, 即 F_R 显著, F_{Lf} 不显著, 说明二次回归方程拟合得较好, 其可靠程度较高。其中一次项 X₁、X₂、X₃ 均达到显著, 二次项 X₁²、X₂²、X₃² 达到显著水平, 交互项均未达到显

著; F_{2R} = 17.574 89, F_{2Lf} = 1.970 45, 即 F_R 显著, F_{Lf} 不显著, 说明二次回归方程拟合得较好, 其可靠程度较高。其中一次项 X₁、X₂、X₃ 均达到显著, 二次项 X₂²、X₃² 达到显著水平, 交互项中 X₁X₂ 达到显著; 其余所得方程经 F 检验, F_R 不显著, F_{Lf} 显著, 说明二次回归方程拟合不好, 不能说明氮肥、磷肥、钾肥对其他皂苷有影响。经上述检验, 在 α=0.05 显著水平剔除不显著项后, 得到简化后的回归方程:

$$Y_1=0.153 53+0.068 39 X_1+0.052 31 X_2+0.083 28 X_3+0.022 94 X_1^2+0.028 42 X_3^2 \quad (8)$$

$$Y_2=0.060 57+0.042 32 X_1+0.040 37 X_2+0.039 03 X_3+0.018 81 X_2^2+0.028 18 X_3^2+0.021 12 X_1X_2+0.030 37 X_1X_3 \quad (9)$$

2.3.2 因子主效应分析 根据表 5 中各项回归系数的 F 值计算各因素对因变量的贡献率^[14], 可得各因素对试验结果的影响效果, 得到各因素对 7 种重楼皂苷的贡献率见表 6。氮、磷、钾对 7 种重楼皂苷的贡献率影响不同 (表 6)。按贡献率从大到小排列得到各因素对重楼皂苷 VII 的影响为钾>氮>磷, 对重楼皂苷 VI 的影响为钾>磷>氮, 对重楼皂苷 H 的影响为磷>氮, 对重楼皂苷 II 的影响氮>磷、钾, 对纤细薯蓣皂苷的影响为磷>氮、钾, 对重楼皂苷 I 的影响为钾>氮>磷, 对重楼皂苷 V 的影响为氮>磷>钾。以上可以看出, 氮、磷、钾对不同重楼皂苷含量的影响效果不同, 说明氮、磷、钾配施可能对重楼皂苷的合成有影响。

表 6 单因素贡献率

Table 6 Single factor contribution rate

肥料	贡献率/%						
	重楼皂苷 VII	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 H	重楼皂苷 II	纤细薯蓣皂苷	重楼皂苷 I	重楼皂苷 V
氮	2.089 7	1.851 6	0.728 2	0.815 9	0.155 2	0.943 4	2.277 9
磷	2.011 0	2.272 5	1.200 1	0	0.572 1	0.861 5	2.183 8
钾	2.427 5	2.378 7	0	0	0.155 2	1.537 3	1.960 8

2.3.3 单因素效应分析 通过降维处理, 将磷、钾肥 2 个因素固定在 0 水平, 可得出单因素氮肥与 (1) 方程中重楼皂苷 VII 的影响方程:

$$Y_1=0.153\ 53+0.068\ 39 X_1+0.022\ 94 X_1^2 \quad (10)$$

同理可得磷肥、钾肥与重楼皂苷 VII 之间的影响方程:

$$Y_1=0.153\ 53+0.052\ 31 X_2 \quad (11)$$

$$Y_1=0.153\ 53+0.083\ 28 X_3+0.028\ 42 X_3^2 \quad (12)$$

同上方法, 将 (2) 方程进行降维处理可得出单因素对重楼皂苷 VI 的影响方程:

$$Y_2=0.06\ 057+0.042\ 32 X_1 \quad (13)$$

$$Y_2=0.060\ 57+0.040\ 37 X_2+0.018\ 81 X_2^2 \quad (14)$$

$$Y_2=0.060\ 57+0.039\ 03 X_3+0.028\ 18 X_3^2 \quad (15)$$

根据方程 10~12 得出 Y_1 (重楼皂苷 VII) 单因素回归方程效应影响图, 见图 2。

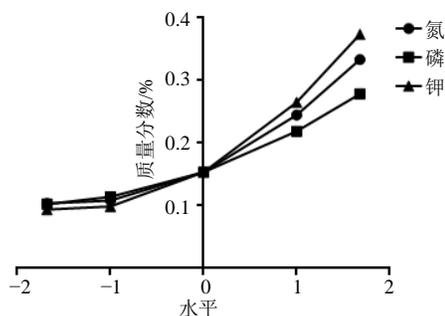


图 2 重楼皂苷 VII 单因素效应分析

Fig. 2 Polyphyllin VII single factor analysis

图 2 可以看出, 氮肥、磷肥、钾肥对重楼皂苷 VII 影响整体呈上升的趋势。在 -1.681 8~0 水平, 各因素对重楼皂苷 VII 的影响顺序为磷肥>氮肥>钾肥; 0~1.681 8 水平, 各因素对重楼皂苷 VII 的影响顺序为钾肥>氮肥>磷肥。在 -1.681 8~1.681 8 水平, 氮肥、磷肥、钾肥呈上升状态, 表明随着肥力水平的增加重楼皂苷 VII 随之增加。在设计 5 个水平中过低、过高都会影响重楼皂苷 VII 的增加, 氮肥、磷肥、钾肥在 1.681 8 水平的氮、磷、钾配施能显著提高重楼皂苷 VII。

根据公式方程 13~15 得出 Y_2 (重楼皂苷 VI) 回归方程效应影响图, 见图 3。

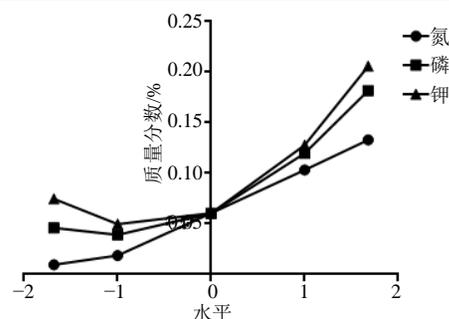


图 3 重楼皂苷 VI 单因素效应分析

Fig. 3 Polyphyllin VI single factor analysis

由图 3 可见, 氮肥、磷肥、钾肥对重楼皂苷 VI 影响整体呈上升的趋势, 各因素对重楼皂苷 VI 的影响顺序为钾肥>磷肥>氮肥。在 -1.681 8~-1 水平之间, 磷肥、钾肥呈下降状态, 表明随着肥力水平的增加重楼皂苷 VI 随之减小。在 -1~1.681 8 水平之间, 氮肥、磷肥、钾肥呈上升状态, 表明随着肥力水平的增加重楼皂苷 VI 随之增加。在设计 5 个水平中过低、过高都会影响重楼皂苷 VI 的增加, 氮肥、磷肥、钾肥在 1.681 8 水平的氮、磷、钾配施能显著提高重楼皂苷 VI。

2.3.4 交互效应分析 试验各因素之间不仅单独对试验结果产生影响, 还存在交互效应。 X_1X_2 对重楼皂苷 VI 影响显著, X_1X_3 对重楼皂苷 VI 影响极显著。因此, 有必要进一步探讨氮-磷交互对重楼皂苷 VI 的影响。氮-磷交互效应和氮-钾交互效应重楼皂苷 VI 的方程分别见 (16)、(17)。

$$Y_2=0.060\ 57+0.042\ 32 X_1+0.040\ 37 X_2+0.018\ 81 X_2^2+0.021\ 12 X_1X_2 \quad (16)$$

$$Y_2=0.060\ 57+0.042\ 32 X_1+0.039\ 03 X_3+0.028\ 18 X_3^2+0.030\ 37 X_1X_3 \quad (17)$$

由图 4 和图 5 可以看出不同浓度的氮肥、磷肥和钾肥都影响着重楼皂苷 VI 的提高, 氮肥和磷肥的交互效应、氮肥和钾肥的交互效应利于重楼皂苷 VI 的提高。氮肥和磷肥的交互效应在 1 水平到 1.681 8 水平施肥有利于重楼皂苷 VI 的提高, 是理想的交互区间; 氮肥和钾肥的交互效应在 1 水平到 1.681 8 水平施肥有利于重楼皂苷 VI 的提高。

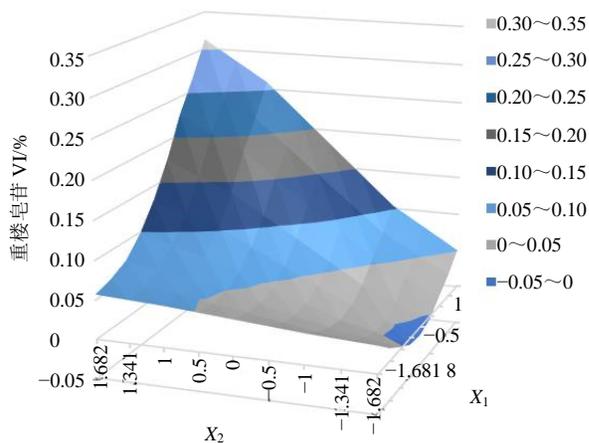


图4 X₁X₂ 交互效应含量变化

Fig. 4 X₁X₂ interaction effect on content changes

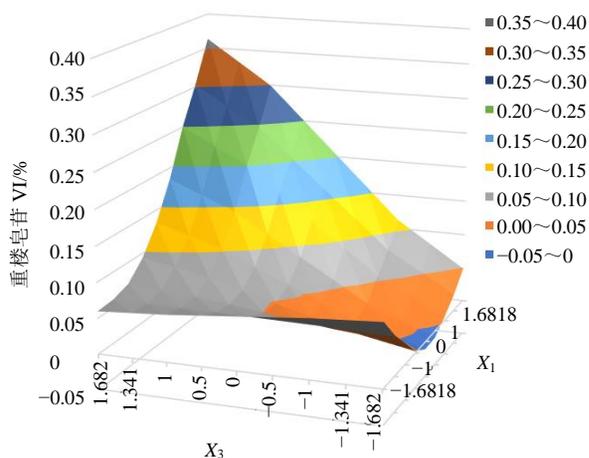


图5 X₁X₃ 交互效应含量变化

Fig. 5 X₁X₃ interaction effect on content changes

2.3.5 施肥方案的优选 通过建立的产量回归模型就能算出各重楼皂苷最高含量下氮、磷、钾各最佳施用配方的理论值，因为考虑到实际生产过程温度、湿度和光照等环境因素的影响，通过因子频率计算得到一个合适的范围，见表7。

各重楼皂苷最佳施肥范围不同，但基本集中于0水平左右，取各重楼皂苷成分最佳施肥量范围交集的结果，确定最优施肥范围为氮肥 516.39~557.19 kg/hm²、磷肥 2 771.70~2 848.20 kg/hm²、钾肥 461.61~502.65 kg/hm²。

3 讨论

施肥是达到药用植物高产优质的重要措施，合理的肥料配施不但能促进植物生长发育，提高药材产量，还可以改善药材品质，对中药材品质保障及土壤环境保护有重要意义^[15-16]。

科学合理的氮、磷、钾肥配施对重楼药材浸出物、总皂苷等含量积累均具有一定影响^[11, 17-18]。在本课题组实际研究中发现七叶一枝花中含有重楼皂苷 VII、重楼皂苷 H、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 II、纤细薯蓣皂苷、重楼皂苷 I、重楼皂苷 V，与前人^[19-22]研究相符；本实验结果表明，氮、磷、钾肥料配施对七叶一枝花的重楼皂苷 VII、重楼皂苷 VI 含量有显著影响；不同施肥处理下，除 6、8、10、12 和 13 号小区未能达到药典规定重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 和重楼皂苷 VII 总量不得少于 0.6% 的要求，其余小区样品均能满足药典规定。在试验因素范围内氮、磷和钾有利于七叶一枝花重楼皂苷 VII 含量的提高。

表7 各皂苷成分含量最优施肥量

Table 7 Optimum NPK application for high contents of saponins

成分	含量临界值/%	95%置信区间			最优施肥范围/(kg·hm ⁻²)		
		氮	磷	钾	氮	磷	钾
重楼皂苷 VII	0.10	-0.020~0.463	-0.001~0.477	0.040~0.510	487.63~629.39	2 521.20~3 238.20	455.79~580.22
重楼皂苷 VI	0.09	0.078~0.613	0.166~0.751	0.062~0.677	516.39~673.42	2 771.70~3 649.20	461.61~624.44
重楼皂苷 H	0.04	-0.429~0.429	-0.429~0.429	-0.384~0.384	367.59~619.41	1 879.20~3 166.20	343.54~546.86
重楼皂苷 II	0.11	-0.271~0.271	-0.243~0.243	-0.243~0.243	413.96~573.04	2 158.20~2 887.20	380.87~509.53
纤细薯蓣皂苷	0.01	-0.217~0.217	-0.217~0.217	-0.217~0.217	429.81~557.19	2 197.20~2 848.20	387.75~502.65
重楼皂苷 I	0.57	-0.326~0.326	-0.326~0.326	-0.326~0.326	397.82~589.18	2 033.70~3 011.70	358.89~531.51
重楼皂苷 V	0.51	-0.326~0.326	-0.326~0.326	-0.365~0.365	397.82~589.18	2 033.70~3 011.70	348.57~541.83
重楼皂苷 VII、II、I	0.60	-0.217~0.217	-0.217~0.217	-0.217~0.217	429.81~557.19	2 197.20~2 848.20	387.75~502.65
交集范围	无	0.078~0.217	0.166~0.217	0.062~0.217	516.39~557.19	2 771.70~2 848.20	461.61~502.65

重楼皂苷 VII、重楼皂苷 VI 产量与氮、磷、钾肥的配施的相关性均达显著水平，当施用氮肥 555.15~713.10 kg/hm²、磷肥 2 542.20~3 376.20

kg/hm²、钾肥 523.05~660.90 kg/hm²时，重楼皂苷 VII 含量大于 0.20 %；当施用氮肥 516.45~673.50 kg/hm²、磷肥 2771.85~3649.20 kg/hm²、钾肥

461.55~624.45 kg/hm² 时, 重楼皂苷 VI 含量大于 0.09%。结合重楼皂苷 V、IV、III、II 和 I 最高含量与氮、磷、钾肥配施相关性的理论值, 取交集得最佳氮、磷、钾施肥范围为氮肥 516.39~557.19 kg/hm²、磷肥 2 771.70~2 848.20 kg/hm² 和钾肥 461.61~502.65 kg/hm²。

本研究结果得出方案可为七叶一枝花的高质量的栽培提供理论依据, 也为实际生产中提高七叶一枝花的品质, 对指导七叶一枝花野生资源人工移植驯化提供一定的参考, 为七叶一枝花专用配方肥的进一步研制提供理论依据。并且说明在一定条件下, 土壤因子的养分含量适当, 重楼皂苷的含量越高, 七叶一枝花的质量越好。

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: 271.
- [2] 李焘. 滇重楼与七叶一枝花化学成分及生物活性的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2011.
- [3] 文飞燕. 重楼珍稀濒危植物资源与品质评价 [D]. 成都: 四川大学, 2015.
- [4] 杨永红, 戴丽君, 何昆鸿, 等. 土壤营养与人工栽培滇重楼品质相关性评价 [J]. 中药材, 2012, 35(10): 1557-1561.
- [5] 李金龙, 熊俊芬, 张海涛, 等. 氮、磷、钾对滇重楼产量及皂苷含量的影响 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学, 2016, 31(5): 895-901.
- [6] 陈翠, 康平德, 杨丽云, 等. 云南重楼高产栽培施肥研究 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(5): 97-100.
- [7] 段艳涛, 何忠俊, 梁社往, 等. 滇重楼总皂苷含量和菌根侵染率与土壤因子的关系 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(22): 3091-3095.
- [8] 王印, 何忠俊, 段艳涛, 等. 滇重楼根茎有效成分与土壤钾状况的关系研究 [J]. 西南农业学报, 2012, 25(3): 950-953.
- [9] 毛玉东, 梁社往, 何忠俊, 等. 土壤 pH 对滇重楼生长、养分含量和总皂甙含量的影响 [J]. 西南农业学报, 2011, 24(3): 985-989.
- [10] 阮召群. 华重楼种植基地土壤肥力综合评价 [J]. 福建农业科技, 2016(Z1): 1-4.
- [11] 刘哲, 钟海蓉, 威则日沙, 等. 氮、磷、钾配施对华重楼根茎的产量和有效成分含量的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6103-6113.
- [12] 张绍山, 刘璇, 王景富, 等. UPLC 法测定云南省不同地区云南重楼及多芽品系中 7 种甙体皂苷量及其指纹图谱建立 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4257-4263.
- [13] 刘哲, 余孟杰, 向海燕, 等. 七叶一枝花中 6 种甙体皂苷与土壤肥力的相关性探究 [J]. 中成药, 2020, 42(11): 3079-3084.
- [14] 张亚琴, 雷飞益, 陈雨, 等. 锌硼钼配施对川白芷药材农艺性状与产量的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2018, 24(3): 769-778.
- [15] 邵镭钎, 李丹, 蒋攀, 等. 氮、磷、钾配施对川明参产量和品质的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3926-3932.
- [16] 丁丹丹, 李西文, 陈士林, 等. 优质中药材栽培合理施肥探讨 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2018, 20(7): 1114-1122.
- [17] 刘莉, 简应权, 姚厂发, 等. 苗药血人参规范化种植肥效试验研究 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1169-1173.
- [18] 高普珠, 晋小军, 张喜民, 等. 施用磷酸二铵对延胡索产量品质的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3687-3691.
- [19] 刘琴, 樊小莉, 杨莉, 等. 四川盆周山地重楼属植物药用资源的筛选及评价 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 526-534.
- [20] 尹显梅, 张开元, 蒋桂华, 等. 华重楼皂苷类成分的动态分布规律对药材质量的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1199-1204.
- [21] 牟杨, 马明东, 程昕, 等. 镧对华重楼生长及皂苷含量的影响 [J]. 植物科学学报, 2017, 35(1): 115-121.
- [22] 杨亚利, 刘佳, 张鹏, 等. 4 种重楼不同部位薯蓣皂苷及皂苷元含量的分析 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1035-1038.

[责任编辑 时圣明]