



## · 资源与鉴定 ·

## 夏枯草内在品质及生长特性对铅、铜、镉胁迫的响应

武征, 郭巧生, 王庆亚\*, 周黎君, 张志远, 张利霞, 黄涛

(南京农业大学 中药材研究所, 江苏 南京 210095)

**[摘要]** **目的:**研究不同浓度处理水平的铅(Pb)、铜(Cu)、镉(Cd) 3种重金属单一胁迫对夏枯草内在品质及生长特性的影响。**方法:**以《中药材生产质量管理规范, GAP(试行)》和土壤环境质量标准为主要指导原则, 设定不同浓度水平处理夏枯草植株, 测定相关指标, 结合统计方法进行分析比较。**结果:**接近土壤环境质量二级标准上限值时, 夏枯草生长正常, 减产幅度在正常范围内, 果穗重金属含量也在《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》限值内, 同时能一定程度上增加熊果酸的积累; 栽培夏枯草土壤中的重金属 Pb, Cu, Cd 临界值分别可以确定为 400, 100, 1.0 mg · kg<sup>-1</sup>。**结论:**低浓度胁迫对夏枯草毒害作用较低, 同时能一定程度上增加熊果酸的积累, 高浓度水平对夏枯草的毒害作用明显, 3种重金属胁迫使植株各部位相应重金属含量增加的趋势大致相同。

**[关键词]** 夏枯草; 重金属; 单一胁迫; 生长状态; 重金属富集; 次生代谢

夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 为唇形科多年生草本植物, 以其干燥果穗入药, 因“夏至后即枯”得名, 是常用的传统中药之一, 历版药典均有收载<sup>[1]</sup>。夏枯草有降压、降糖、抗菌、抗炎、抗过敏及抗病毒等功效<sup>[1]</sup>。近年来, 国内外对夏枯草的需求越来越大, 夏枯草人工规范化栽培已成发展趋势, 而中药材栽培中重金属污染已成为当前中药材生产中亟待解决的重要问题<sup>[2]</sup>。但近年来, 国内外的研究多集中在中药材重金属含量方面, 关于重金属污染对中药材生理和生长方面的影响少见报道, 夏枯草在此方面的研究更未见报道。本试验以我国颁布的《中药材生产质量管理规范, GAP(试行)》和《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》为主要指导原则, 对几种重金属单一胁迫中药材夏枯草内在品质和生长指标进行研究分析, 以合理确定夏枯草产地环境质量土壤重金属元素的安全标准, 从而更好的指导夏枯草实际生产, 并为制定产地环境质量评价提供理论指导依据。

## 1 材料

实验用夏枯草种子由南京农业大学中药材研究

所提供, 经郭巧生教授鉴定为唇形科夏枯草 *P. vulgaris* 小坚果。试验地设在南京农业大学牌楼生命科学学院农业试验基地, 共 3 个小区。CdCl<sub>2</sub> · 2.5H<sub>2</sub>O, PbSO<sub>4</sub>, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O 均为国产分析纯试剂。供试土壤采自南京农业大学试验基地, 为红壤性水稻土, pH 6.0, 有机质 27.12 g · kg<sup>-1</sup>, 铅(Pb), 铜(Cu), 镉(Cd)的质量分数分别为 34.90, 37.40, 0.01 mg · kg<sup>-1</sup>。

## 2 方法

### 2.1 实验设计

本试验采用盆栽土培方式进行。待土壤自然风干后, 过 2 mm 筛, 将土壤装入塑料盆(盆口径 35 cm, 盆高 30 cm), 每盆钵装风干土重 8 kg, 并按预先设置浓度, 见表 1。在每盆中添加外源重金属。喷施清水充分混匀后平衡 2 周, 作为模拟不同浓度的重金属污染土壤。待夏枯草长至 6 片叶子时, 于 2008 年 3 月 10 日, 分别向每盆中移栽夏枯草 5 株, 重复 3 次。试验期间定期浇水, 保持 70% 左右的田间持水量。在夏枯草盛花期取植株相同部位叶, 用蒸馏水洗净、揩干, 用于测定各项生理生化指标。

### 2.2 测定方法

**2.2.1 株高测定** 从 2008 年 5 月 1 日至 2008 年 5 月 25 日每 5 d 测定 1 次各处理夏枯草的株高, 重复 5 次。

**2.2.2 地上、下部分测定** 于 2008 年 7 月 20 日,

**[收稿日期]** 2009-05-13

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30772730); 国家科技基础条件平台项目(2005DK21004)

**[通信作者]** \* 王庆亚, Tel: (025) 84396484, E-mail: qingyawang@yahoo.com

表1 盆栽试验处理元素种类和处理水平

处理元素	处理水平				土壤环境质量标准 (GB15618-95)	
	1	2	3	4	二级	三级
对照	-	-	-	-	-	-
Pb	300	400	500	600	≤300	≤500
Cu	100	250	400	550	≤100	≤400
Cd	0.3	1.0	10	20	≤0.3	≤1.0

表2 Pb,Cu,Cd 标准曲线溶液浓度设置  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

元素	标准溶液质量浓度				
Cu	0	0.5	1.0	2.5	5.0
Cd	0	0.5	1.0	2.5	5.0
Pb	0	0.05	0.5	1.0	2.5

沿土表剪取地上部,测量果穗数和果穗总重,同时洗出根系。在 105 ℃ 下杀青半小时,70 ℃ 烘干,分别称量地上部和地下部干重。整个生长期为 294 d,胁迫处理期为 132 d。

**2.2.3 重金属残留量的测定** 重金属元素按 GB156185.1.5.2 和《中国药典》2005 年版一部附录 IX B 的规定执行。Cu,Pb,Cd 采用 ICP 法测定。为保证测试数据的准确性与代表性,每样品均进行 3 次重复检测,最后取 3 组数据均值。并取  $\alpha = 0.05$  水平进行差异显著性分析。

**标准曲线绘制:** 分别吸取适量的标准使用液(上海标样中心,批号 GSB-04-1767-2004),用去离子水稀释成系列标准溶液,采用原子吸收光谱仪制作校准曲线,见表 2。

**夏枯草药材安全性评价:** 夏枯草药材安全限量标准参照《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》(简称《标准》)。

**2.2.4 熊果酸的提取及含量的测定** 熊果酸的提

取按照《中国药典》2005 年版中有关熊果酸提取的方法执行。然后分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,测定。室内温度 24 ℃,进样时间 1 h。

**标准曲线绘制:** 精密称取在 105 ℃ 干燥至恒重的熊果酸对照品适量,加无水乙醇分别制成每 1 mL 含 0.02,0.04,0.06,0.08,0.10,0.12 mg 的溶液,摇匀。按以上方法进样。所得回归方程为  $Y = 102.530X - 716.72 (r = 0.9978)$ 。根据回归方程及夏枯草各熊果酸成分的峰面积,计算熊果酸成分的含量。

**2.3 数据处理与统计方法** 采用 DPS 3.01 中文数据统计软件进行方差分析和多重比较。

### 3 结果与分析

#### 3.1 单一重金属胁迫对夏枯草生长的影响

**3.1.1 对果穗数和果穗总重的影响** Pb,Cu,Cd 单一重金属胁迫下在低浓度处理水平上夏枯草果穗数和果穗总重比对照略有增加,随胁迫浓度增加果穗数和果穗总重都迅速下降,其中 Cu 胁迫下降最为明显,果穗数和果穗总重分别比对照下降 95.3%,96.9%,几乎绝收,见表 3。

表3 单一重金属胁迫对夏枯草各生长指标的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

处理元素	处理水平	果穗个数 /个/盆	果穗总重 /g/盆	株高 /cm	地上干重 /g/盆	地下干重 /g/盆
CK	对照	150.0 ± 4.24b	15.00 ± 0.14d	23.32 ± 2.81a	63.37 ± 2.82a	13.34 ± 0.70a
Pb	1	250.0 ± 24.04a	21.67 ± 1.78ab	20.83 ± 3.58ab	62.37 ± 3.58a	11.36 ± 1.17bcd
	2	170.0 ± 4.24b	13.30 ± 0.85d	19.42 ± 1.96abc	54.30 ± 1.31b	11.07 ± 0.91bcde
	3	101.5 ± 6.36c	9.23 ± 0.19ef	19.45 ± 1.56abc	55.28 ± 2.86b	10.33 ± 0.60cdef
	4	86.5 ± 9.19cd	7.76 ± 0.48fg	19.28 ± 2.80abc	55.06 ± 3.04b	9.64 ± 0.25efg
Cu	1	162.5 ± 23.3b	14.77 ± 0.36d	20.90 ± 3.07ab	56.71 ± 4.34a	8.57 ± 0.54g
	2	61.0 ± 15.5d	2.29 ± 0.38h	14.77 ± 3.26de	20.01 ± 2.77b	5.82 ± 0.10h
	3	24.0 ± 4.48e	1.81 ± 0.42hi	11.78 ± 4.33e	12.64 ± 1.14c	5.13 ± 1.16h
	4	7.0 ± 1.65e	0.56 ± 0.14i	4.95 ± 1.73f	8.81 ± 0.84c	2.55 ± 0.04i
Cd	1	251.5 ± 28.9a	22.97 ± 0.10a	21.78 ± 3.26ab	57.35 ± 1.08a	11.88 ± 0.60abc
	2	231.5 ± 33.2a	20.83 ± 1.52b	22.43 ± 1.94ab	55.46 ± 5.73ab	11.14 ± 0.18bcde
	3	138.5 ± 47.3b	19.24 ± 1.73c	19.22 ± 8.22abc	51.21 ± 3.09b	9.35 ± 0.48fg
	4	91.5 ± 4.94cd	9.94 ± 0.47e	18.27 ± 3.50bcd	42.03 ± 0.62c	8.35 ± 0.76g

注:置信区间置信度为 95%,其中小写字母为新复极差比较  $P < 0.05$  差异显著性(表 4,5 同)。



**3.1.2 对株高的影响** 由表 3 可以看出,在单一重金属胁迫下,与对照比较,夏枯草株高均减小。Cu 单一处理时,以处理 2,3,4 与对照比较表现为差异显著。特别是 Cu 胁迫处理 3 和处理 4 分别比对照下降 52.2%,78.8%。说明 Cu 单一重金属胁迫对株高影响较其他 2 种明显,Cu 胁迫对株高影响尤为明显,Cu 胁迫处理 4 的株高仅为 4.95 cm。

**3.1.3 对地上干重影响** 由表 3 可知,Pb,Cu,Cd 单一重金属胁迫对地上干重影响总体趋势表现为,随处理浓度增加而降低,Pb,Cu 胁迫较 Cd 胁迫下降更为迅速,特别是 Cu 胁迫在高浓度处理与对照比较表现为显著差异。通过比较各种处理水平对夏枯草的株高和地上部干重的影响可知,对株高和地上部干重的影响趋势一致。

**3.1.4 对地下干重影响** Pb,Cu,Cd 单一重金属胁迫对地下干重影响表现为,随处理浓度增加而降低,与地上干重表现一致。各处理与对照比较都表现为显著差异。说明 Pb,Cu,Cd 单一重金属胁迫对夏枯草根系的影响明显。

由此可见,夏枯草对重金属单一胁迫具有一定的忍耐作用。在土壤环境质量二级标准上限值时,

与对照相比夏枯草没有明显的毒害,生物量也没有显著的变化,生长基本正常。这对于夏枯草人工栽培具有指导意义。

**3.2 单一重金属胁迫对夏枯草各部位相应重金属含量的影响**

不同浓度的重金属处理植物体各部分相应的重金属含量差异显著,见表 4。Pb,Cu,Cd 单一重金属胁迫都促进夏枯草根、茎、叶、果穗对相应胁迫重金属的吸收,并且随处理浓度增大各部位重金属含量都总体相应增大。Pb,Cu,Cd 处理浓度最大时,根、茎、叶、果穗中相应重金属含量达到最大值。Pb 处理浓度最大时,根、茎、叶、果穗中 Pb 分别为对照的 13.92,1.52,0.98,0.96 倍;Cu 处理浓度最大时茎、叶、果穗中 Cu 含量分别是对照的 0.22,1.1,0.45 倍,其中根 Cu 含量最大值出现在处理 3,为对照的 5.3 倍;Cd 在处理浓度最大时,根、茎、叶、果穗中 Cd 含量分别是对照的 7.00,2.89,3.00,3.37 倍。由此可见夏枯草根对重金属的富集能力最大,茎、叶、果穗的富集能力相对较小,这与根细胞壁中存在大量交换位点,能将重金属离子固定在这些位点上,从而阻止重金属离子进一步向地上部分转移<sup>[3-5]</sup>的研究结论相一致。

表 4 单一重金属胁迫对夏枯草各部位相应重金属质量分数的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

mg · kg<sup>-1</sup>

处理元素	处理水平	根	茎	叶	果穗
Pb	对照	3.47 ± 0.581e	2.35 ± 0.218d	2.59 ± 1.404d	2.80 ± 0.382c
	1	12.67 ± 1.701d	2.47 ± 1.053d	2.97 ± 1.074c	3.51 ± 0.368bc
	2	27.88 ± 1.106c	3.73 ± 0.692c	3.93 ± 3.007b	4.01 ± 0.254b
	3	42.36 ± 1.325b	4.34 ± 0.841b	4.76 ± 0.352c	4.36 ± 0.578a
	4	55.80 ± 4.354a	5.92 ± 0.742a	5.12 ± 2.467a	5.49 ± 0.34a
Cu	对照	26.94 ± 0.417e	12.08 ± 0.599c	9.64 ± 0.389d	9.40 ± 0.114c
	1	62.1 ± 3.411d	13.03 ± 0.452b	11.62 ± 0.478d	10.73 ± 0.359bc
	2	89.66 ± 3.326c	13.16 ± 0.449b	14.58 ± 0.203c	11.85 ± 1.867abc
	3	169.76 ± 4.722a	13.86 ± 0.359b	17.72 ± 0.989b	12.66 ± 1.079a
	4	153.8 ± 6.771b	14.77 ± 1.168a	20.23 ± 1.409a	13.63 ± 0.262ab
Cd	对照	0.11 ± 0.009d	0.09 ± 0.002e	0.08 ± 0.001e	0.08 ± 0.002d
	1	0.13 ± 0.008d	0.17 ± 0.007d	0.18 ± 0.004d	0.18 ± 0.001c
	2	0.24 ± 0.004c	0.29 ± 0.003c	0.24 ± 0.004c	0.29 ± 0.004bc
	3	0.56 ± 0.002b	0.34 ± 0.007ab	0.29 ± 0.008b	0.33 ± 0.007ab
	4	0.88 ± 0.001a	0.35 ± 0.002a	0.32 ± 0.003a	0.35 ± 0.002a

《标准》规定了药用植物及制剂的绿色品质标准,包括药用植物原料、饮片、提取物及其制剂等的质量标准及检验方法。该标准适用于药用植物原料及制剂的外经贸品质检验。《标准》是中华人民共和国对外经济贸易活动中药用植物及其制剂外经贸

的重要质量标准之一,其中的重金属限量标准为:铅(Pb) ≤ 5.0 mg · kg<sup>-1</sup>、镉(Cd) ≤ 0.3 mg · kg<sup>-1</sup>、汞(Hg) ≤ 0.2 mg · kg<sup>-1</sup>、铜(Cu) ≤ 20.0 mg · kg<sup>-1</sup>、砷(As) ≤ 2.0 mg · kg<sup>-1</sup>、总量 ≤ 20.0 mg · kg<sup>-1</sup>。

由表 4 分析可以看出,Pb,Cd 分别在处理 4 和



处理 3 时果穗中相应重金属含量超出《标准》中限量标准; Cu 在几个处理浓度都未超出《标准》中的限量标准。这对于确定栽培夏枯草土壤中重金属临界值具有指导意义。

### 3.3 单一重金属胁迫对夏枯草果穗熊果酸含量的影响

《中国药典》2005 年版中以熊果酸作为夏枯草活性成分来进行评价, 并且按干燥品来计算, 含熊果酸不得少于 0.12%。Pb, Cu, Cd 单一胁迫随处理浓度的增大, 夏枯草果穗熊果酸含量总体上都有所升高, 后随处理浓度的进一步增大, 熊

表 5 单一重金属胁迫对夏枯草果穗熊果酸质量分数的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

$g \cdot L^{-1}$

处理元素	CK	水平 1	水平 2	水平 3	水平 4
Pb	0.229 ± 0.011a	0.253 ± 0.011a	0.261 ± 0.006a	0.271 ± 0.013a	0.276 ± 0.021a
Cu	0.229 ± 0.011b	0.253 ± 0.008ab	0.264 ± 0.015ab	0.282 ± 0.01a	0.288 ± 0.024a
Cd	0.229 ± 0.011a	0.257 ± 0.009a	0.258 ± 0.008a	0.264 ± 0.025a	0.265 ± 0.009a

如表 5 所示, 在所有处理浓度, 果穗熊果酸含量都不低于《中国药典》2005 年版中所规定的最低标准。根据 Pb, Cu, Cd 胁迫对果穗熊果酸含量影响, 同时结合对生长特性和果穗重金属含量, 可以看出, Pb, Cu, Cd 胁迫分别在处理水平 2、处理水平 1、处理水平 2 时夏枯草产量与质量可以兼顾。所以栽培夏枯草土壤中重金属 Pb, Cu, Cd 临界值分别可以确定为 400, 100, 1.0  $mg \cdot kg^{-1}$ 。

## 4 结果与讨论

综合上述分析得出 Pb, Cd 2 种重金属在处理水平 1 和处理水平 2 时生长总体较好, Cu 处理在处理水平 1 时生长较其他处理好, 并且此水平处夏枯草果穗重金属含量在《标准》限值内, 同时果穗的熊果酸含量比对照略有提高, 因此根据生态环境效应法, 可以将种植夏枯草的土壤中 Pb, Cu, Cd 3 种重金属临界值分别设定为 400, 100, 1.0  $mg \cdot kg^{-1}$ 。为夏枯草规范化种植基地土壤 Pb, Cu, Cd 含量标准提供依据。

大量的研究报道, 重金属进入植物体后绝大部分累积在根部, 本文的试验支持这一看法。其原因是多数重金属在根系主要以沉淀形式存在, 植物汁液中虽然也有离子态和络合态存在, 但由于吸持、钝化或沉淀作用, 使植物根系吸收的重金属难以向地上部运输<sup>[8]</sup>。试验结果表明, 在设计浓度范围内, 夏枯草吸收重金属的量随土壤

果酸含量上升趋势减缓。Pb, Cu, Cd 都在处理水平 4 时, 熊果酸含量达到最大值, 分别比对照增大 20.52%, 25.76%, 15.72%, 差异显著, 见表 5。可以看出 Pb, Cu, Cd 单一胁迫对夏枯草熊果酸含量的影响总体趋势大致相同, 重金属胁迫刺激了熊果酸的合成和积累, 并且低浓度胁迫时熊果酸增加幅度较大, 随胁迫浓度进一步增大, 熊果酸含量增加趋势减缓。这与苏文华等<sup>[6]</sup>关于植物药次生代谢产物积累与环境关系的研究结论相一致, 也与张檀等<sup>[7]</sup>研究的几种矿质元素对杜仲叶次生代谢物的影响相关结论一致。

重金属浓度升高相应增加, 但吸收比率趋于下降。这主要是由于土壤重金属浓度增高使植物吸收机能逐渐受到阻碍的原因。有关研究表明, 重金属元素在作物体内吸收和转运的机制与各元素在植物体内的吸收机制及生物化学过程密切相关。此外, 植物体对重金属元素的吸收还受土壤氧化还原电位 (Eh), pH, 土壤有机质含量以及重金属存在形态等诸多因素影响。

苏文华等<sup>[6]</sup>指出, 对大多数植物而言, 次生代谢产物的合成与积累往往受制于所处环境的变化。各方面的研究都认同, 有利于初生代谢的环境条件不利于次生代谢, 不利于初生代谢的条件反而增加次生代谢, 也就是相对于生长的胁迫环境可一定程度提高次生代谢。初生生长与次生代谢存在一定的平衡关系, 生物量过高时单位质量植物体中的次生产物的量下降; 单位质量植物体中的次生产物的量升高, 生物量下降。

总体来说, 夏枯草对重金属胁迫是比较敏感的。一旦土壤被重金属污染并超过一定剂量, 就会对夏枯草的正常生长产生影响, 进而影响其产量和品质。所以有必要对夏枯草种植基地土壤环境质量标准加以限定。另外该实验结果可为今后继续研究重金属胁迫夏枯草生长、重金属富集以及有效成分合成的因素提供有益参考, 同时可以很好地指导人工种植夏枯草的规范化生产。



[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005:197.
- [2] 宗良纲, 李嫦玲, 郭巧生. 中药材中重金属污染及其研究综述[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(3): 495.
- [3] Allan D L, Jarrel W M. Proton and copper absorption by maize and soybean root cell walls[J]. Plant Physiol, 1989, 89:823.
- [4] Cristian B, Dennis H B, Fernando C. The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence[J]. Environ Exper Botany, 1997, 38: 165.
- [5] Eva Lehoczky, Hona Loth, Zsanett Kiss. Cadmium and lead uptake by white mustard (*Sinapis alba* L.) grown in different soils [J]. Comm Soil Sci Plant Anal, 2002, 33(15/18):3167.
- [6] 苏文华, 张光飞, 李秀华, 等. 植物药材次生代谢产物的积累与环境的关系[J]. 中草药, 2005, 36(9):1415.
- [7] 张檀, 白明生, 刘丽, 等. 几种矿质元素对杜仲叶次生代谢物的影响初探[J]. 西北农林科技大学学报, 2002, 1(2):119.
- [8] 夏汉平, 孔国辉, 敖惠修, 等. 4种草本植物对油页岩矿渣土中铅镉的吸收特性比较试验研究[J]. 农村生态环境, 2000, 16(4):28.

## Effects of lead, copper and cadmium stresses on growth and inherent quality of *Prunella vulgaris*

WU Zheng, GUO Qiaosheng, WANG Qingya\*, ZHOU Lijun, ZHANG Zhiyuan, ZHANG Lixia, HUANG Tao  
(Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

[Abstract] **Objective:** *Prunella vulgaris* was used as the experimental material to study the effects of lead (Pb), copper (Cu) and cadmium (Cd) on the related physiological and growth indexes of the plant. **Method:** By referencing the GAP and the soil environmental quality standard, the growth and inherent quality of the plant were observed under different concentrations of the heavy metals stresses. The data were statistically processed. **Result:** The results showed that the plant grew normally when the heavy metal concentrations in soil were close to up limits of the soil environmental quality standard II. The content of heavy metal in spica met the requirement of the standard, and under the circumstances the content of ursolic acid was increased in a certain range. The critical values of Pb, Cu, Cd in the *P. vulgaris* grown soil were set at 450, 100, 1.0 mg · kg<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion:** The harmful influence of the heavy metal stress at a lower concentration is lighter than at a higher concentration, and it could increase the content of ursolic acid. The stress of Pb, Cu and Cd is more obvious than that of Zn.

[Key words] *Prunella vulgaris*; heavy metal; single stress; growth state; heavy metal accumulation; secondary metabolism

doi: 10.4268/cjcm20100301

[责任编辑 吕冬梅]