

道路绿化灯台叶质量评价

杨妮娜¹, 徐安顺², 杨春勇², 赵应红¹, 王元忠^{3*}

- (1. 西双版纳傣族自治州傣医医院, 云南 景洪 666100;
2. 中国医学科学院 药用植物研究所 云南分所, 云南 景洪 666100;
3. 云南省农业科学院 药用植物研究所, 昆明 650200)

[摘要] 目的:建立道路绿化用灯台叶中11种重金属含量测定方法,HPLC指纹图谱,熊果酸及齐墩果酸含量测定方法,拟探讨灯台叶中重金属含量、有效成分含量和整体质量的变化关系,为灯台叶药材的采收提供依据。方法:22批灯台叶样品中S1~S12来自不同种植园,S13~S22采自不同街道绿化带中。采用ICP-MS测定灯台叶中重金属含量,HPLC指纹图谱结合相似度和主成分分析评价两组样品整体质量变化。结果:部分样品中Se和Hg未检出,其他元素在样品中均有检出,其中Fe、Mn含量较高,As、Se、Pb含量较低。道路绿化样品中Hg元素均被检出,平均值为 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,而种植园样品中Hg元素均低于检测线。种植园样品中As和Se含量变异最大RSD>120%,Cr和Ni含量RSD>60%。道路绿化样品中Cr、Mn、Fe、Ni、As、Se含量变化RSD>70%,但与种植园样品相比变化较大,Cu、Se、Pb在两组样品中变化水平相当。根据《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》(WM/T2-2004)中相关规定计算,22个样品中Pb、Cd、Hg、Cu、As均未超标,但道路绿化样品中上述有毒重金属元素呈现升高趋势。种植园样品指纹图谱共标记16个共有峰,道路绿化样品仅13个共有峰,且两组样品在色谱峰数量和吸光度上均有较大差异。种植园样品之间相似度较高,除S1、S4、S11外其他均>0.95,绿化样品相似度较小,仅S18相似度>0.9,其余在0.557~0.895离散分布。两组样品有12个共有峰,种植园样品共有峰面积均大于道路绿化样品,且峰面积RSD均小于道路绿化样品,将两组样品原始色谱数据进行主成分分析,两组样品被截然分开。结论:道路绿化灯台叶中有毒重金属含量与种植园样品相比有升高趋势,化学信息少且有效成分含量较低、变化大。为确保药材安全性和临床疗效,建议城市道路绿化灯台树不作为傣族药材灯台叶的来源。

[关键词] 傣组药; 灯台叶; 重金属; 指纹图谱; 质量评价

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)15-0076-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017150076

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1406.074.html>

[网络出版时间] 2017-04-27 14:06

Quality Evaluation of *Alstonia scholaris* Leaves Growing in Street Greening

YANG Ni-na¹, XU An-shun², YANG Chun-yong², ZHAO Ying-hong¹, WANG Yuan-zhong^{3*}

- (1. Dai Hospital of Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture, Jinghong 666100, China;
2. Yunnan Branch Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Jinghong 666100, China;
3. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the content determination method of 11 heavy metals in *Alstonia scholaris* leaves, oleanolic, ursolic acid content determination methods and HPLC fingerprint, and explore the heavy metals content and overall quality of the *A. scholaris* leaves in order to provide the reference for the harvest of medicinal material. **Method:** All the samples were divided into two groups: S1-S12 were from different

[收稿日期] 20161217(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260608)

[第一作者] 杨妮娜, 硕士, 药师, 从事傣药资源开发, 质量控制与评价工作, Tel: 15887615937, E-mail: yangnina-2008@163.com

[通讯作者] *王元忠, 博士, 副研究员, 从事中药资源开发与应用工作, Tel: 13888829994, E-mail: boletus@126.com

plantations, and S13-S22 were collected from different streets greening. ICP-MS was used to determinate the content of heavy metals, and HPLC fingerprint combined with similarity evaluation and principal component analysis was used to evaluate overall quality variation of two groups of samples. **Result:** Except Se and Hg in few samples, all the other metals were detected in which the content of Fe and Mn was higher and the content of As, Se, Pb was lower. Hg element was detected in street green samples with the average of $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ but lower than the limit of detection in plantation samples. The content RSD of As and Se in plantation samples was more than 120%, and Cr and Ni content RSD was higher than 60%. Contents RSD of Cr, Mn, Fe, Ni, As and Se in road greening samples was higher than 70%, and such variation was bigger than that in the plantation samples. RSD of Cu, Se and Pb was equivalent in two groups. The contents of Pb, Cd, Hg, Cu and As in 22 samples were not beyond the standard according to the requirements in *Foreign Trade and Economic Standards of Medicinal Plants and Preparations* (WM/T2-2004). However, these toxic heavy metals in the road greening samples showed an increasing trend. 16 common peaks were marked in plantation samples and the fingerprint of street greening samples had marked 13 common peaks. Two groups of samples had significant differences in chromatographic peak number and absorbance. The similarity was higher in plantation samples, > 0.95 except for S1, S4 and S11; the similarity was lower in greening samples, only S18 > 0.9 , with discrete distribution between 0.557-0.895 for the remaining samples. 12 common peaks were marked in two groups, and the common peaks areas of plantation samples were larger, with RSD of common peaks areas less than that in greening ones. The results of PCA revealed that two group samples were separated in two parts. **Conclusion:** The results indicated that heavy metals contents and the content variation in the samples from street greening were increased as compared with the samples from plantations, and at the same time, their chemical compositions and contents were relatively lower. In order to ensure drugs safety and clinical efficacy, it is suggested that the *A. scholaris* leaves from road greening shall not be used as a source of Dai medicine.

[Key words] Dai medicine; *Alstonia scholaris* leaves; heavy metals; fingerprint; quality evaluation

傣族医药是我国传统医药中的瑰宝,也是中华民族传统的优秀民族文化。经过萌芽、成长积累、总结成形 3 个阶段,同时巧妙地吸收和借鉴了小乘佛教、古印度医学、中原汉族医学等相关知识,形成了极具民族性、地域性、原创性的傣族医药文化,是傣族人民长期探索世界、顺应自然的生存经验及医疗实践,如同一颗珍宝散落在浩如烟海的贝叶经里,几千年来为边疆少数民族健康事业做出了卓越贡献^[1]。灯台叶性寒,味苦而微涩,具有清热解毒、消肿止痛、止咳化痰之功效,傣族医临床常用于治疗拢达儿(腮腺肿大),拢答儿(颌下淋巴结肿大),乃多皇卖唉列习特来(肺热咳嗽、痰多),习火(哮喘)等呼吸系统疾病和拢匹勒(月子病),农杆农暖(乳腺炎),拢匹把母(癫痫病),拢梅接路多火档(风湿肢体关节疼痛)等诸多疑难杂症^[2-3]。现代研究发现灯台叶富含生物碱、黄酮和萜类成分,具有止咳平喘、抗炎镇痛、抗肿瘤、调节免疫和血糖血脂等药理活性^[4-9]。灯台叶主产于我国云南南部、广东、广西、海南、福建、台湾和东南亚国家,绝大多数用做城市道路和园林绿化。研究表明尾气污染会导致道路

绿化植物体内发生一系列生理生化反应进而影响次生代谢产物合成与代谢,该现象是植物在环境胁迫下的一种应答反应^[10-11]。植物暴露于污染环境中,光合作用和水分蒸腾作用下降,气体交换通道关闭气孔导度下降,细胞膜结构受损渗透性增强代谢紊乱,酶系统被毁植物生化反应无序,最终植物形态和物质积累改变^[12-13]。因此,建立道路绿化灯台叶质量评价方法是亟待解决的问题。

汽车尾气污染是道路绿化植物的主要污染方式,而重金属则是尾气中主要的有毒物质。近年来重金属含量超标成为了影响药材安全性的主要因素,也是药材出口及全球化面临的重要问题^[14]。重金属可通过食物链累积,对消化系统、内分泌系统、心血管系统、中枢神经系统、皮肤、骨骼等产生不可逆损伤^[15-17]。如长期暴露在高浓度 Pb 中,会影响肾小管重吸收,损伤肾小管和肾小球,甚至引发 Pb 中毒而导致肾源性高血压;过久暴露于高浓度 Hg 中可以影响人们的认知、感觉、运动神经功能或引发癌变,例如日本的水俣病;长期摄入重金属超标物质还可能引起恶心、呕吐、腹痛、腹泻等一系列消化

系统症状,以上毒性(分子毒性、基因毒性、细胞毒性和致癌性)均与重金属浓度和价态相关^[18-28]。因此,建立道路绿化灯台叶中重金属元素含量测定方法对临床用药的安全性有积极意义。

除安全性之外,有效性也是衡量药材品质的主要指标。含量测定和指纹图谱是目前评价药材有效性的重要手段。由于傣族药质量标准较低,现代研究相对滞后且缺乏相应对照品,因此基于整体观念的指纹图谱技术优势突显。HPLC 指纹图谱技术结合多元统计分析以其灵敏度高、分离效果好、分析快速、数据挖掘处理方便等特点在药材质量控制中应用广泛^[29-31]。本研究采用 ICP-MS 和高效液相色谱联用的方法,旨在建立灯台叶中重金属的含量测定方法和 HPLC 指纹图谱,探讨道路绿化样品中重金属富集规律和整体质量变化,为灯台叶药材采收、临床用药的安全性和有效性提供科学依据。

1 材料

22 批灯台叶样品均采自云南西双版纳, S1 ~ S12 为 2014 至 2015 年间采于不同的种植园, S13 ~ S22 于 2015 年采自不同街道绿化带中。所有样品经西双版纳傣族自治州傣医医院赵应红主任药师鉴定为夹竹桃科植物糖胶树 *Alstonia scholaris* 的干燥叶。样品采集后晒干,粉碎,过 2 号筛,密封,阴凉干燥处保存。

NexION300 型 ICP-MS(美国 PE 公司), MARS6 型微波消解仪(美国 CEM 公司), AR1140 型分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器公司), 1260 型高效液相色谱仪和 ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(美国 Agilent 公司), 超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司), FW-100 型高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。

65% 硝酸、过氧化氢(分析纯,西陇化工股份有限公司),标准物质菠菜叶、灌木枝叶(国家标准物质中心,批号 GBW10015GSB-6, GBW07603GSB-6), 甲醇、甲酸、三氯甲烷、盐酸、氨水(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司), 乙腈、甲醇(色谱级,美国 Fisher 公司), Millipore 纯水系统(美国 Millipore 公司),熊果酸(上海源叶生物科技有限公司,批号 YA0505YA14,纯度 98%),齐墩果酸(上海源叶生物科技有限公司,批号 B20954,纯度 98%)。

2 方法与结果

2.1 重金属含量测定

2.1.1 ICP-MS 仪器参数 射频功率 1.6 kW, 氩气流量 15 L·min⁻¹, 氮气流量 5 mL·min⁻¹, 采样锥孔

径 1.1 mm, 分离锥孔径 1.0 mm, 重复次数 3, 采样深度 6.5 mm, 进样速率 0.1 mL·min⁻¹, 截取锥孔径 0.88 mm。

2.1.2 重金属含量测定供试品制备 精密称取灯台叶样品粉末 0.2 g 于聚四氟乙烯消解罐中,先后加入浓硝酸 5 mL 和过氧化氢 2 mL,一式 3 份,消解,冷却,取出消解罐,将消解液转移至比色皿管中,用少许超纯水洗涤消解罐与盖子 2~3 次,合并洗涤液于比色管中,定容至 25 mL,混匀,至澄清后取上清液测定。同法制成空白溶液和菠菜叶、灌木枝叶标准物质溶液,与样品同时消解后测定。消解程序:第一阶段压力 4.5 MPa,功率 1.8 kW,0~10 min 温度由 20 °C 升至 120 °C 并保持 10 min;第二阶段温度由 120 °C 升至 150 °C,其他条件不变;第三阶段温度由 150 °C 升至 200 °C 维持 40 min,其他条件同第一阶段。

2.1.3 数据处理 将 ICP-MS 原始数据导入 Microsoft Excel 2007 进行整理并计算含量。

2.1.4 重金属含量测定方法学考察 将标准物质菠菜叶和灌木枝叶中各元素的测量值与标准值进行比较,验证该方法的准确度,结果表明标准物质测量值基本在推荐值范围内,见表 1。同一样品消解液重复测定 6 次,所测各元素含量的 RSD 在 0.9%~2.2%,表明该方法能够满足试验要求。

表 1 菠菜叶和灌木枝叶 11 中元素测定值与推荐值(n=6)
Table 1 Measured and recommended value of 11 elements in spinach leaves and bush branches and leaves (n=6) μg·g⁻¹

元素	菠菜叶		灌木枝叶	
	测定值	真实值($\bar{x} \pm s$)	测定值	真实值($\bar{x} \pm s$)
Ni	0.87	0.92 ± 0.12	1.9	1.7 ± 0.3
Se	0.094	0.092 ± 0.024	0.16	0.12 ± 0.02
Cd	0.18	0.15 ± 0.02	-	-
Hg	18	20 ± 3	-	-
Cr	1.7	1.4 ± 0.2	2.49	2.6 ± 0.2
Mn	40	41 ± 3	63	61 ± 5
Fe	564	540 ± 20	1 129	1 070 ± 57
Cu	9.2	8.9 ± 0.4	5.9	6.6 ± 0.8
Zn	33.9	35.3 ± 1.5	19.6	20.6 ± 2.2
As	0.25	0.23 ± 0.03	1.17	1.25 ± 0.15
Pb	10.8	11.1 ± 0.9	51	47 ± 3

注:“-”表示该值低于检测线。

2.1.5 不同批次灯台叶样品中 11 种重金属元素含量测定 不同批次灯台叶样品中有毒重金属元素

含量见表 2, 两组样品中 11 种重金属含量差异见表 3, 4。表 2 中可以看出, 除少量样品中无 Se 和 Hg, 其他元素均被检测出, 其中 Fe 和 Mn 含量较高, As, Se, Pb 含量较低。12 批种植园样品中 Hg 元素浓度低于检测线均未被检测到, 而 10 批道路绿化样品中 Hg 元素均被检出, 表明 Hg 元素可能来源于汽车尾气, 同时该元素在长期暴露于尾气污染的灯台叶中更容易累积, 该现象在药材采购过程中应引起重视。表 3, 4 中可以看出, 11 种重金属在所有样品中均具有较大的变异系数, 说明这些元素在不同样品中的含量差异较大, 导致这种现象的原因可能与样品在污染环境中的暴露时间(生长年限), 采样点尾气

污染程度、采样点土壤本底水平等因素相关。表 4 中 Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Cd, Hg 等 7 种元素的含量差异均大于表 3 相应元素的变异系数, 说明道路绿化样品中这 7 种重金属含量差异大于种植园样品, 该现象可能与植物在污染空气中暴露水平、车流量、尾气排量等因素相关。表 3, 4 中 Cu, Se, Pb 3 个元素的变异系数无明显差异, 说明在两组样品中这 3 个元素的含量变异程度相当, 表明污染空气对该 3 种重金属元素的累积影响较小。在两组样品中 As 和 Se 含量变异均为最大, 但绿化样品中 As 含量变异没有升高反而降低, 表明不同重金属之间的累积相互影响。

表 2 不同批次灯台叶样品中重金属质量分数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Heavy metals contents in different branches *Alstonia scholaris* leaves ($\bar{x} \pm s, n=6$)

No	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Hg
S1	1.88 ± 0.22	102.83 ± 4.22	436.08 ± 10.05	0.83 ± 0.21	5.18 ± 0.51	11.04 ± 0.44	0.55 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.06 ± 0.01	1.98 ± 0.39	-
S2	7.11 ± 0.79	86.49 ± 2.31	550.87 ± 33.70	1.04 ± 0.11	9.06 ± 0.46	20.12 ± 0.69	1.00 ± 0.26	0.17 ± 0.02	0.08 ± 0.00	2.05 ± 0.62	-
S3	2.15 ± 0.43	168.31 ± 17.8	237.68 ± 10.70	3.11 ± 0.13	7.06 ± 0.27	12.17 ± 0.12	0.19 ± 0.07	0.51 ± 0.03	0.15 ± 0.02	2.33 ± 0.38	-
S4	2.13 ± 0.14	77.57 ± 3.60	504.69 ± 50.85	0.99 ± 0.13	8.64 ± 0.15	13.18 ± 1.80	0.96 ± 0.04	0.15 ± 0.01	0.07 ± 0.00	1.49 ± 0.06	-
S5	5.55 ± 0.81	101.22 ± 6.05	432.88 ± 31.90	1.29 ± 0.26	7.52 ± 0.28	17.38 ± 1.21	0.60 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.07 ± 0.01	1.56 ± 0.24	-
S6	2.29 ± 0.13	75.74 ± 2.76	280.60 ± 9.21	0.75 ± 0.04	7.00 ± 0.47	14.45 ± 2.32	0.27 ± 0.08	0.10 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.62 ± 0.06	-
S7	1.21 ± 0.37	64.11 ± 1.23	182.42 ± 14.34	0.62 ± 0.08	5.12 ± 0.11	10.96 ± 1.15	0.17 ± 0.06	-	0.09 ± 0.01	0.49 ± 0.09	-
S8	3.20 ± 0.30	90.30 ± 2.32	286.86 ± 28.56	0.98 ± 0.14	7.41 ± 0.19	13.90 ± 1.73	0.24 ± 0.02	-	0.10 ± 0.02	0.72 ± 0.19	-
S9	0.75 ± 0.01	95.06 ± 1.38	206.41 ± 17.30	0.60 ± 0.05	4.96 ± 0.11	11.49 ± 1.07	0.22 ± 0.03	-	0.07 ± 0.00	0.68 ± 0.06	-
S10	1.77 ± 0.28	99.29 ± 0.91	305.05 ± 24.80	0.73 ± 0.03	5.48 ± 0.12	11.77 ± 0.32	0.46 ± 0.09	0.04 ± 0.00	0.08 ± 0.00	1.16 ± 0.06	-
S11	4.64 ± 0.47	93.62 ± 2.46	454.85 ± 24.70	0.82 ± 0.01	6.37 ± 1.43	13.39 ± 2.28	0.89 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.07 ± 0.02	1.49 ± 0.04	-
S12	3.43 ± 0.14	92.13 ± 5.30	491.54 ± 57.30	0.89 ± 0.05	6.34 ± 0.99	13.60 ± 3.53	0.65 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	1.57 ± 0.14	-
S13	7.79 ± 0.31	96.62 ± 8.00	178.57 ± 18.36	2.50 ± 0.14	7.76 ± 1.18	18.12 ± 4.18	1.47 ± 0.17	0.74 ± 0.26	0.05 ± 0.01	2.35 ± 0.26	0.12 ± 0.03
S14	4.75 ± 0.56	123.42 ± 23.90	541.11 ± 38.98	3.11 ± 0.20	5.85 ± 0.73	13.11 ± 1.85	0.68 ± 0.17	1.33 ± 0.29	0.04 ± 0.01	1.52 ± 0.76	0.11 ± 0.01
S15	6.24 ± 1.32	76.82 ± 2.04	649.82 ± 47.17	1.82 ± 0.09	6.38 ± 0.42	13.45 ± 3.34	0.74 ± 0.07	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.02	1.51 ± 0.14	0.11 ± 0.02
S16	0.03 ± 0.00	211.05 ± 25.54	234.31 ± 42.43	2.69 ± 0.10	5.57 ± 0.43	8.08 ± 0.83	0.22 ± 0.04	1.25 ± 0.12	0.10 ± 0.02	1.06 ± 0.10	0.11 ± 0.01
S17	4.33 ± 0.53	60.60 ± 12.57	649.45 ± 31.71	1.25 ± 0.11	6.05 ± 0.36	17.49 ± 2.04	0.97 ± 0.05	0.16 ± 0.02	0.04 ± 0.01	1.86 ± 0.20	0.10 ± 0.04
S18	3.08 ± 0.96	52.67 ± 5.79	407.13 ± 91.26	1.02 ± 0.35	6.50 ± 0.56	12.73 ± 1.37	0.37 ± 0.12	-	0.03 ± 0.01	1.03 ± 0.67	0.10 ± 0.02
S19	0.82 ± 0.05	140.65 ± 10.45	304.02 ± 29.57	0.73 ± 0.07	5.31 ± 0.81	7.43 ± 0.55	0.50 ± 0.18	0.18 ± 0.08	0.08 ± 0.03	0.77 ± 0.10	0.11 ± 0.04
S20	0.81 ± 0.18	77.12 ± 7.58	149.56 ± 6.64	0.41 ± 0.13	4.16 ± 0.75	9.11 ± 1.12	0.11 ± 0.06	0.36 ± 0.05	0.05 ± 0.02	0.81 ± 0.11	0.10 ± 0.01
S21	2.98 ± 0.42	369.84 ± 63.22	365.23 ± 71.13	4.77 ± 0.37	6.74 ± 0.50	13.04 ± 5.68	0.27 ± 0.08	1.78 ± 0.22	0.04 ± 0.00	0.62 ± 0.07	0.10 ± 0.02
S22	0.55 ± 0.13	68.45 ± 7.29	117.58 ± 8.62	0.41 ± 0.14	3.58 ± 0.10	10.34 ± 1.35	0.08 ± 0.02	-	0.13 ± 0.07	0.69 ± 0.10	0.11 ± 0.04

注:“-”表示该元素未被检测到。

《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》(WM/T2-2004)中规定 Pb, Cd, Hg, Cu, As 等重金属含量限

分别为 5.0, 0.3, 0.2, 20.0, 2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。2015 年由 中国中医科学院中药资源中心主持制定《中医药-

中药材重金属限量》国际标准正式发布,该标准中药材 Cu, Pb, As, Cd, Hg 超标率分别由 21.0%, 12.0%, 9.7%, 28.5%, 6.9% 下降至 1.476%, 3.967%, 4.819%, 1.872%, 1.08%^[32]。据此标准计算,22 个样品中 Pb, Cd, Hg, Cu, As 超标率为零,均未超标。

表 3 不同种植园灯台叶中重金属含量变异性(n=12)

Table 3 Deviancy of 11 heavy metals contents in different plantation samples(n=12)

重金属	质量分数/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	变异系数/%
Cr	3.01	63
Mn	95.56	27
Fe	364.16	35
Ni	1.05	64
Cu	6.68	20
Zn	13.62	20
As	0.85	156
Se	0.14	121
Cd	0.08	25
Pb	1.35	45
Hg	-	-

表 4 不同街道灯台叶样品中重金属含量变异性(n=10)

Table 4 Deviancy of 11 heavy metals contents in different streets greening samples(n=10)

重金属	平均质量分数/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	变异系数/%
Cr	3.14	84
Mn	127.72	76
Fe	459.68	69
Ni	1.87	75
Cu	5.79	21
Zn	12.29	30
As	0.54	82
Se	0.57	118
Cd	0.06	50
Pb	1.22	47
Hg	0.11	9

2.2 指纹图谱

2.2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱(0~5 min, 5% B; 5~35 min, 5%~26% B; 35~40 min, 26%~56% B), 进样量 7 μL , 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,

检测波长 287 nm。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别取不同批次灯台叶粉末 0.5 g, 精密称定, 置洁净具塞试管中, 精密加入纯净水 10 mL, 超声提取(53 Hz) 40 min, 取出, 过滤, 滤液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得为供试品溶液。

2.2.3 数据处理 不同批次样品色谱图原始数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”进行相似度评价同时采用 SIMCA-P⁺ 11.5 软件对原始色谱数据进行主成分分析。

2.2.4 指纹图谱方法学考察 取 S1 样品, 按照 2.2.2 项下方法制得供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 考察各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果同一共有峰相对保留时间 RSD < 0.8%, 相对峰面积 RSD < 1.9%, 表明仪器精密密度良好。平行称取 S1 样品 6 份, 采用 2.2.2 项中的方法制得供试品溶液, 各取 7 μL , 依次进样, 考察各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果同一共有峰相对保留时间 RSD < 1.1%, 相对峰面积 RSD < 2.3%, 表明方法重复性良好。取 S1 样品, 按 2.2.2 项下方法制得供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样记录色谱图, 考察各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果同一共有峰相对保留时间 RSD < 0.4%, 相对峰面积 RSD < 2.1%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 HPLC 指纹图谱相似度评价及主成分分析

按 2.2.1 和 2.2.2 中方法建立不同生长环境中灯台叶 HPLC 指纹图谱, 分别将原始数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”和 SIMCA-P⁺ 11.5 软件进行相似度评价及主成分分析, 结果见图 1, 2 和表 5。图 1 可以看出种植园样品共标记 16 个共有峰, 而道路绿化样品仅 13 个共有峰, 且两组样品在色谱峰数量和吸光度上均有较明显差异, 表明不同生长环境下同一物种中化学成分及含量的累积不尽相同。表 5 可以看出种植园样品之间相似度较高, 多数高于 0.95 (S11 除外); 绿化样品相似度较小, 在 0.5~0.9 离散分布, 提示种植园样品整体质量较为稳定, 道路绿化样品质量差异性较大。两组样品共有峰面积和 RSD 见表 6, 表中可以看出两组样品有 12 个共有峰, 在相同的保留时间下, 种植园样品峰面积均大于道路绿化样品, 且 12 个共有峰面积 RSD 均小于于城市道路绿化样品, 表明种植园样品化学成分多且含量高, 差异小, 该结果与相似度评价结果一致。将两组样品原始色谱

数据进行主成分分析,结果见图 2。图中两组样品被截然被分成 2 个部分,种植园样品,道路绿化样品。种植园样品分布较为集中,说明组内差异较小,质量较为相近且稳定,绿化样品组内分布较为零散差异较大,质量差异明显,再次印证了以上结果。

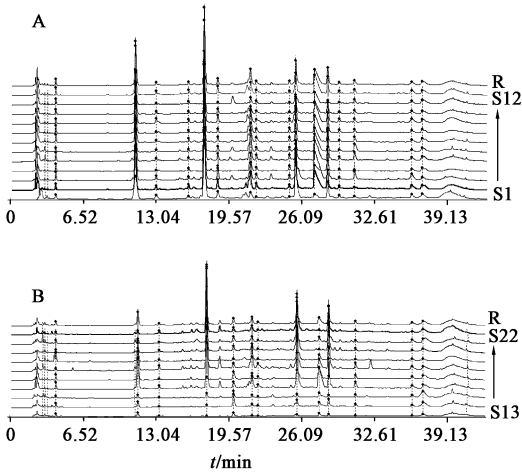
2.3 熊果酸和齐墩果酸含量测定

2.3.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 甲酸水(12:88), 进样量 10 μL, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 210 nm。

表 5 不同样品相似度评价

Table 5 Similarity evaluation of different samples

No.	相似度	No.	相似度
S1	0.884	S12	0.986
S2	0.977	S13	0.588
S3	0.968	S14	0.608
S4	0.888	S15	0.557
S5	0.978	S16	0.895
S6	0.927	S17	0.615
S7	0.962	S18	0.923
S8	0.965	S19	0.721
S9	0.949	S20	0.864
S10	0.981	S21	0.829
S11	0.691	S22	0.876



A. 种植园样品; B. 道路绿化样品

图 1 灯台叶样品 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint in leaves of *Alstonia scholaris*

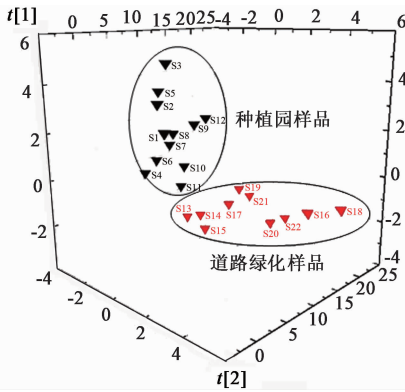


图 2 22 批样品主成分得分

Fig. 2 Principal component analysis scores of 22 branches samples

表 6 两组样品共有峰面积和 RSD

Table 6 Common peak areas and RSD of two group samples

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	94.73	1 138.02	178.43	2 860.20	311.23	45.05	1 416.57	241.75	521.37	93.75	177.37	285.82
S2	117.54	1 457.97	103.92	3 334.89	694.40	179.70	1 181.62	1 292.59	547.32	52.73	193.91	159.71
S3	155.86	1 734.95	121.78	3 097.89	600.21	179.31	926.84	2 726.21	844.41	261.01	336.24	123.88
S4	127.99	698.00	24.24	819.08	610.86	102.27	593.20	215.63	280.37	26.21	88.46	135.27
S5	150.35	1 234.68	54.59	2 890.94	1 015.11	139.78	788.39	1 530.67	831.17	260.03	135.82	140.73
S6	81.31	633.70	50.92	1 128.94	645.19	120.20	288.02	1 250.01	320.03	358.47	88.98	269.38
S7	146.11	1 230.13	58.52	1 067.19	546.80	159.21	576.99	884.62	354.71	142.73	99.72	148.83
S8	139.86	1 125.95	37.02	1 159.85	682.02	136.71	717.98	1 207.03	512.70	105.55	119.92	126.62
S9	85.64	1 567.71	132.48	1 490.73	340.91	159.06	662.34	1 415.60	612.30	88.87	26.28	91.82

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取各批次灯台叶粉末样品 0.1 g 于洁净试管中, 精密移取甲醇 2 mL 保鲜膜密封, 轻轻摇匀, 称定质量, 超声提取(53 Hz) 30 min, 取出静置, 补足减失质量, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 续滤液为供试品溶液。

2.3.3 线性和方法学考察 齐墩果酸: 线性方程 $Y = 4 031.55X - 62.08$, $r = 0.999 6$, 线性范围 0.033 6 ~ 1.200 0 g·L⁻¹, 检测限 0.009 7 g·L⁻¹, 定量限 0.026 6 g·L⁻¹, 精密密度 RSD 0.5%, 重复性 RSD 1.2%, 稳定性 RSD 1.3%。熊果酸: 线性方程 $Y = 10 622.36X - 4.81$, 线性范围 0.01 ~ 1.0 g·L⁻¹, $r = 0.999 8$, 检测限 0.002 1 g·L⁻¹, 定量限 0.006 16 g·L⁻¹,

续表 6

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S10	87.84	827.64	48.81	1 387.55	180.90	93.73	494.88	652.61	303.75	90.84	125.27	202.08
S11	96.40	652.48	21.88	61.90	161.02	74.95	376.68	586.21	79.29	104.63	121.99	323.94
S12	132.71	1 481.97	91.81	2 285.27	320.86	129.54	656.51	1 371.00	473.92	139.37	203.99	103.31
S13	46.79	101.95	10.46	12.02	17.97	8.93	49.45	104.44	41.62	18.17	17.82	130.78
S14	83.72	156.70	10.45	45.86	65.23	24.94	182.14	103.97	206.20	70.74	58.36	346.33
S15	42.08	84.95	9.79	119.77	58.62	17.46	70.51	150.74	44.46	63.53	102.52	552.04
S16	137.50	1 087.06	62.84	3 211.90	350.70	85.12	1 083.83	1 658.12	856.56	199.01	155.68	154.69
S17	96.40	652.48	21.88	61.90	161.02	74.95	376.68	586.21	79.29	104.63	121.99	323.94
S18	52.93	848.78	92.18	2 770.16	717.52	212.86	1 356.77	425.80	1 739.36	175.61	175.09	281.01
S19	167.80	521.68	31.49	654.42	64.35	41.02	665.54	231.79	377.39	28.80	62.24	101.84
S20	60.33	124.06	44.59	1 075.23	184.72	17.42	1 738.96	22.45	603.43	74.25	49.72	221.08
S21	73.05	133.15	37.63	445.86	171.67	50.89	429.23	166.59	445.52	58.90	136.87	109.38
S22	60.66	119.93	97.74	1 762.46	200.71	50.71	1 264.51	39.87	521.76	54.23	41.30	325.89

精密度 RSD 0.8%, 重复性 RSD 0.9%, 稳定性 RSD 1.9%。加样回收结果见表 7。

表 7 灯台叶中齐墩果酸和熊果酸的加样回收率试验 (n=3)

Table 7 Added sample recovery test of oleanolic and ursolic acid (n=3)

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
齐墩果酸	1.666	1.42	3.116 2	101.81	0.4
		1.63	3.301 2	100.31	1.5
		1.96	3.704 0	98.56	1.2
熊果酸	1.930	1.57	3.528 3	101.46	1.3
		1.91	3.778 9	96.83	0.8
		2.26	4.136 6	97.23	0.7

2.3.4 熊果酸和齐墩果酸含量测定结果 熊果酸和齐墩果酸含量测定结果见表 8。两组样品中熊果酸最高分别为 11.50, 10.28 mg·g⁻¹, 齐墩果酸最高分别为 9.96, 11.03 mg·g⁻¹。种植园样品中齐墩果酸和熊果酸平均质量分数为 8.32, 9.11 mg·g⁻¹, 道路绿化样品中二者平均质量分数分别为 7.49, 8.32 mg·g⁻¹, 表明绿化样品中三萜类成分含量较低。两组样品中熊果酸含量 RSD 分别为 15.9%, 20.3%, 表明该成分在绿化样品中含量变异较大。以上结果表明道路绿化灯台叶样品可能受到了汽车尾气的污染而导致其化学成分的合成与累积受阻。

两组样品中重金属总量的平均值、共有峰面积均值和萜类成分均值见图 3。图中可看出, 道路

表 8 灯台叶中熊果酸和齐墩果酸含量测定

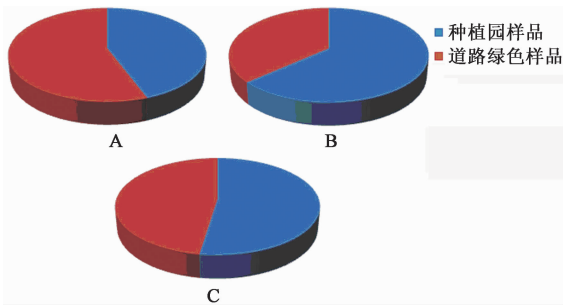
Table 8 Contents determination of oleanolic and ursolic acid in leaves of *Alstonia scholaris*

No.	齐墩果酸	熊果酸	No.	齐墩果酸	熊果酸
S1	7.91	8.20	S12	8.23	8.77
S2	8.25	9.34	S13	7.96	8.64
S3	4.84	5.95	S14	8.02	9.15
S4	9.96	11.50	S15	11.03	10.28
S5	9.17	10.66	S16	5.28	6.07
S6	8.33	9.65	S17	7.31	8.76
S7	7.68	8.58	S18	7.92	9.32
S8	8.30	9.16	S19	7.50	7.46
S9	8.07	7.81	S20	6.24	7.54
S10	9.12	9.32	S21	7.06	8.35
S11	9.91	10.33	S22	6.52	7.72

绿化样品中重金属总量均值高于种植园样品, 共有峰面积及熊果酸齐墩果酸含量均低于种植园样品。综上结果表明长期暴露于汽车尾气污染的环境中导致植物体内重金属总量不断积累, 抑制植物次生代谢产物的合成与累积, 该现象可能与车流量、尾气排放量及其他生态因素有关。

3 结论

道路绿化灯台叶样品中有毒重金属含量与种植园样品相比有升高趋势, 且变异较大, 化学信息总量少且有效成分含量相对较低。为确保药材安全性和



A. 重金属总量; B. 总共有峰面积; C. 熊果酸和齐墩果酸比

图 3 重金属总量、总共有峰面积和萜类成分含量关系

Fig. 3 Pie charts of common peak areas and contents of heavy metals, oleanolic and ursolic acid

临床疗效, 建议道路绿化灯台树不作为傣族药材灯台叶的来源。

【参考文献】

[1] 朱成兰, 赵应红, 马伟光. 傣药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 35-45.

[2] 中科院植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 90.

[3] 康朗腊. 档哈雅龙[M]. 昆明: 云南民族出版社, 2003: 20-29.

[4] Kandhare A D, Patil M V, Bodhankar S L. Ameliorative effect of alkaloidal fraction of leaves of *Alstonia scholaris* against acetic acid induced colitis via modulation of oxido-nitrosative and pro-inflammatory cytokines [J]. *Pharmacologia*, 2016, 7(4): 170-181.

[5] 惠婷婷, 孙赟, 朱丽萍, 等. 云南傣族药物灯台叶中黄酮类成分 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(9): 1111-1113.

[6] QIN X J, ZHAO Y L, SONG C W, et al. Monoterpenoid indole alkaloids from inadequately dried leaves of *Alstonia scholaris* [J]. *Nat Prod Bioprospecting*, 2015, 5(4): 185-193.

[7] Arulmozhi S, Mazumder P M, Lohidasan S, et al. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of leaves of *Alstonia scholaris* Linn. R. Br [J]. *Europ J I Med*, 2010, 2(1): 23-32.

[8] WANG C M, CHEN H T, WU Z Y, et al. Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris* [J]. *Molecules*, 2016, 21(2): 139.

[9] FENG L, CHEN Y, YUAN L, et al. A combination of alkaloids and triterpenes of *Alstonia scholaris* (Linn.) R. Br. leaves enhances immunomodulatory activity in C57BL/6 mice and induces apoptosis in the A549 cell line [J]. *Molecules*, 2013, 18(11): 13920-13939.

[10] 崔胜辉, 于裕贤, 宋晓东, 等. 大气污染对城市植被的生态胁迫效应综述 [J]. *生态科学*, 2009, 28(6):

562-567.

[11] 张雅静, 石辉, 刘雄飞, 等. 植物次生代谢酚类物质含量与空气污染关系研究 [J]. *农业现代化研究*, 2014, 35(4): 472-476.

[12] 薛泽辉. 从树木生理学角度分析大气污染对植物的影响及植物的生态适应 [J]. *河南林业科技*, 2007, 27(1): 40-42.

[13] 马艳丽, 王鹏. 植物对大气污染的响应机制 [J]. *山西农业科学*, 2013, 41(4): 394-396.

[14] 赵静, 刘勇, 张艾华, 等. 不同产地三七中重金属元素的含量测定及分析 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(20): 4001-4006.

[15] MIAO W, ZHU B, XIAO X, et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles on lead bioconcentration and toxicity on thyroid endocrine system and neuronal development in zebrafish larvae [J]. *Aquat Toxicol*, 2015, 161: 117-126.

[16] Pamphlett R, Kum J S. Different populations of human locus ceruleus neurons contain heavy metals or hyperphosphorylated tau: implications for amyloid- β and tau pathology in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 45(2): 437-447.

[17] Mathew B, Krishnamurthy N B. Health effects caused by metal contaminated ground water [J]. *Int J Adv Sci Res*, 2015, 1(2): 60-64.

[18] HE B, YUN Z, SHI J, et al. Research progress of heavy metal pollution in China: sources, analytical methods, status, and toxicity [J]. *Chin Sci Bull*, 2013, 58(2): 134-140.

[19] Davis L E, Kornfeld M, Mooney H S, et al. Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family [J]. *Ann Neurol*, 1994, 35(6): 680-688.

[20] WANG Y, CHEN A, Dietrich K N, et al. Postnatal exposure to methyl mercury and neuropsychological development in 7-year-old urban inner-city children exposed to lead in the United States [J]. *Chd Neuropsych*, 2014, 20(5): 527-538.

[21] Strain J J, Davidson P W, Thurston S W, et al. Maternal PUFA status but not prenatal methylmercury exposure is associated with children's language functions at age five years in the Seychelles [J]. *J Nutr*, 2012, 142(11): 1943-1949.

[22] Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress [J]. *Polish J Environ Stud*, 2006, 15(4): 523-530.

[23] Vatamaniuk O K, Mari S, LU Y P, et al. Mechanism

- of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (40): 31451-31459.
- [24] Kinjo Y, Akiba S, Yamguchi N, et al. Cancer mortality in minamata disease patients exposed to methylmercury through fish diet [J]. *J Epidemiol*, 1996, 6(3): 134-138.
- [25] WANG X, Sato T, XING B, et al. Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish [J]. *Sci Total Environ*, 2005, 350(1): 28-37.
- [26] FU R, YANG Y, XU Z, et al. The removal of chromium (VI) and lead (II) from groundwater using sepiolite-supported nanoscale zero-valent iron (S-NZVI) [J]. *Chemosphere*, 2015, 138: 726-734.
- [27] HUANG Z, KUANG X, CHEN Z, et al. Comparative studies of tri- and hexavalent chromium cytotoxicity and their effects on oxidative state of *Saccharomyces cerevisiae* cells [J]. *Curr Microbiol*, 2014, 68(4): 448-456.
- [28] Wise Jr J P, Wise J T, Wise C F, et al. Concentrations of the genotoxic metals, chromium and nickel, in whales, tar balls, oil slicks, and released oil from the Gulf of Mexico in the immediate aftermath of the deepwater horizon oil crisis; is genotoxic metal exposure part of the deepwater horizon legacy? [J]. *Environ Sci Technol*, 2014, 48(5): 2997-3006.
- [29] Viapiana A, Struck-Lewicka W, Konieczynski P, et al. An approach based on HPLC-fingerprint and chemometrics to quality consistency evaluation of *Matricaria chamomilla* L. commercial samples [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7(1561): 1-11.
- [30] XU N, ZHOU G, LI X, et al. Geographical classification of *Epimedium* based on HPLC fingerprint analysis combined with multi-ingredients quantitative analysis [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, doi: 10.1002/bmc.3871.
- [31] 李丽, 鄂秀辉, 何毅, 等. 多成分定量结合指纹图谱分析用于不同产地香加皮的质量评价 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(8): 1529-1534.
- [32] 张晓东. 中药材重金属限量国际标准发布 [N]. *北京: 中国中医药报*, 2015-08-12 (001).

[责任编辑 顾雪竹]