

刘鹏, 付艺萱, 张旭超, 王晓玲. 5种采集条件下银杏落叶中莽草酸的含量[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28 (1): 104-110

Liu P, Fu YX, Zhang XC, Wang XL. Content of shikimic acid in fallen leaves of *Ginkgo biloba* L. under five conditions [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2022, 28 (1): 104-110

5种采集条件下银杏落叶中莽草酸的含量

刘鹏 付艺萱 张旭超 王晓玲✉

西南民族大学药学院 成都 610041

摘要 为优选出高含量的莽草酸银杏落叶资源,建立了一种HPLC方法测定银杏落叶中莽草酸的含量.比较树上绿叶与落叶、不同胸径、雌株与雄株、不同采集时间、不同地区等5个条件下莽草酸的含量差异.结果表明莽草酸浓度在0.04-0.15 mg/mL范围内线性关系良好($r > 0.999$);平均加样回收率为99.21% ($N = 6$, $RSD = 1.35\%$).不同采集条件下银杏落叶中莽草酸的含量规律如下:银杏落叶中莽草酸的含量平均值大于树上绿叶;落叶中莽草酸的含量随着胸径的增加而增加,线性相关系数 R^2 为0.673;雌株银杏落叶中莽草酸平均含量大于雄株;与不同采集时间以及不同地区之间未呈现出相关性.本研究建立的莽草酸HPLC测定方法快速、简便,专属性强,准确度高;银杏落叶中莽草酸含量变化有一定规律;结果可为莽草酸资源开发利用提供科学依据. (图7 表12 参26)

关键词 银杏; 银杏落叶; 莽草酸; 高效液相色谱; 含量测定

Content of shikimic acid in fallen leaves of *Ginkgo biloba* L. under five conditions

LIU Peng, FU Yixuan, ZHANG Xuchao & WANG Xiaoling✉

College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract To optimize the high content of shikimic acid in fallen leaves of *Ginkgo biloba* L., a high performance liquid chromatography (HPLC) method was established. The content of shikimic acid in green leaves and fallen leaves, leaves with different diameter at breast height, female and male trees, leaves obtained in different collection times, and leaves obtained from different areas were compared. The results showed that the concentration of shikimic acid had a good linear relationship in the range 0.04-0.15 mg/mL ($r > 0.999$), and the average recovery was 99.21%. The content of shikimic acid in *G. biloba* leaves under different collection conditions was as follows: the average content of shikimic acid in fallen leaves was higher than that in green leaves on trees. The content of shikimic acid in fallen leaves increased with the increase in DBH levels, and the linear regression R^2 was 0.673; The average content of shikimic acid in female leaves was higher than that in male trees, and the content of shikimic acid in fallen leaves had no relationship with the collection time or region. Therefore, the HPLC determination method of shikimic acid established in this experiment is rapid, simple, specific, and accurate. The content of shikimic acid in the fallen leaves of *G. biloba* are regular, which provides a scientific basis for the development and utilization of shikimic acid resources.

Keywords *Ginkgo biloba* L.; *Ginkgo biloba* fallen leaf; shikimic acid; HPLC; content determination

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科银杏属大型落叶乔木,广泛分布于中国、日本、朝鲜、韩国、加拿大、新西兰、澳大利亚、美国、法国、俄罗斯等^[1].银杏叶中含有黄酮、萜内酯、酚酸、聚异戊烯醇等化学成分^[2];具有活血、抗炎、止痛、抗氧化、抗病毒、降血脂、抗抑郁等作用^[3-6];对高血压、脑功能障碍、动脉粥样硬化、扩张脑血管和其他血管疾病具有显著疗效^[7-11].目前的研究与开发主要集中于银杏叶中具有很强药理活性的黄酮类和内酯类成分.

经本课题组前期研究和查阅文献发现,在银杏落叶中有着丰富的莽草酸资源,适合工业化开发^[12-13].莽草酸是抗亚洲禽流感病毒药物“达菲”的重要成分,具有抗菌、抗肿瘤作用、防止血栓形成、抗禽流感作用,市场的需求量较大^[14-17].目前对银杏落叶中莽草酸资源的关注度不够,研究内容较少,造成了莽草酸资源的浪费.在此背景下,本研究用高效液相色谱法测定5个条件下银杏落叶中莽草酸的含量,找出银杏落叶中莽草酸的含量规律,以期为莽草酸资源的合理利用提供参考.

收稿日期 Received: 2021-06-07 接受日期 Accepted: 2021-08-04

西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(2020NYB33)和西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2020SZ80)资助 Supported by the Special Fund for Basic Scientific Research Operations in Central Universities of Southwest Minzu University (2020NYB33) and the Innovative Scientific Research Project for Postgraduates of Southwest Minzu University (CX2020SZ80)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: wxl3232@sina.com)

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695/2996高效液相色谱仪、KQ-250B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、SHB-III循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)、电子天平(龙腾电子)、HH-S6数显恒温水浴锅(江苏金怡仪器科技有限公司)、回流冷凝管、圆底烧瓶、胶头滴管、烧杯、容量瓶、移液枪(100-1 000 μL)、2 mL无菌注射器(上海康德莱企业发展集团股份有限公司)。

1.2 试验试剂与材料

莽草酸对照品(成都普思生物科技有限公司)、石油醚(分析纯,天津市致远化学试剂有限公司)、无水乙醇(分析纯,成都金山化学试剂有限公司),67批次银杏叶样品(四川成都样品采集时间为2020年11-12月,其余地区样品采集时间均为2020年11月下旬)分布详情见表1。

表1 样品来源

Table 1 Samples of each region

序号 Number	地区 Area	经纬度 Longitude and latitude	批次 Batch number
1	内蒙古呼和浩特 Hohhot, Inner Mongolia	40°49'N, 111°42'E	3
2	北京昌平 Changping, Beijing	40°13'N, 116°14'E	3
3	北京西城 Xicheng, Beijing	39°55'N, 116°22'E	3
4	宁夏银川 Yinchuan, Ningxia	38°28'N, 106°16'E	3
5	山东济南 Jinan, Shandong	36°39'N, 117°2'E	3
6	陕西西安 Xi'an, Shanxi	34°10'N, 108°34'E	3
7	江苏苏州 Suzhou, Jiangsu	31°18'N, 120°35'E	3
8	江苏常熟 Changshu, Jiangsu	31°39'N, 120°45'E	3
9	四川阿坝 Aba, Sichuan	30°55'N, 103°25'E	3
10	四川成都 Chengdu, Sichuan	30°38'N, 103°3'E	22
11	浙江宁波 Ningbo, Zhejiang	29°53'N, 121°33'E	3
12	湖南湘潭 Xiangtan, Hunan	27°50'N, 112°56'E	3
13	贵州贵阳 Guiyang, Guizhou	26°23'N, 106°38'E	3
14	云南昆明 Kunming, Yunnan	25°3'N, 102°42'E	3
15	广西柳州 Liuzhou, Guangxi	24°20'N, 109°25'E	3
16	广西玉林 Yulin, Guangxi	22°38'N, 110°9'E	3

四川成都样品除雌雄对照外,其余批次均为雌株。

The samples from Chengdu were all female except the male and female control.

2 试验方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取莽草酸对照品适量,置于50 mL容量瓶中,加入0.4%磷酸水溶液制成每1 mL含0.2 mg的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

供试品均在45 °C恒温条件下烘干,打粉,过五号筛,精密称取样品粉末1 g,置于50 mL圆底烧瓶中,加入15 mL 70 %乙醇,称重,回流提取2 h,放冷,称定质量,70%乙醇补重,石油醚等体积萃取,过滤,取续滤液1 mL,定容至25 mL容量瓶,微孔滤膜过滤,备用。

2.3 色谱条件

Diamonsil(钻石)C18色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-0.4%磷酸水溶液(B),梯度洗脱:0-10 min, 0%-2% A; 10-15 min, 2%-90% A; 15-18 min, 90% A; 18-20 min, 90%-0% A; 20-25 min, 0% A。流速为0.8 mL/min;柱温为35 °C;进样量为10 μL;检测波长为220 nm。

3 方法学考察

3.1 专属性试验

按2.3项下色谱条件进行检测,以莽草酸峰计算理论塔板数大于6 000,分离度大于1.5。对照品及样品的色谱图见图1、2。

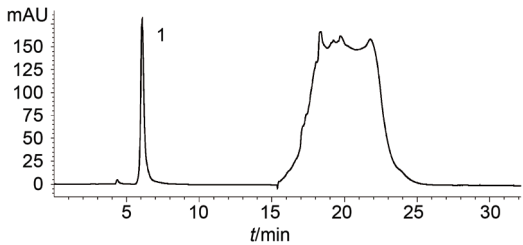


图1 对照品HPLC图。
Fig. 1 HPLC diagram of the reference substance.

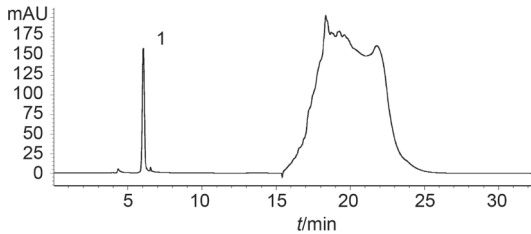


图2 供试品溶液HPLC图。
Fig. 2 HPLC diagram of the sample.

3.2 线性关系考察

精密吸取2.1项下的对照品溶液2、3、4、5、6、7.5 mL,分别于10 mL量瓶中,以甲醇定容。各取10 μL注入液相色谱仪,测定,以对照品浓度(x, mg/L)为横坐标,峰面积y为纵坐标(y),绘制标准曲线,并拟合线性回归方程,结果见表2,表明各化合物在相应线性范围内线性关系良好。

表2 对照品线性回归方程及线性范围

Table 2 Linear regression equation and linear range of reference

成分 Component	回归方程 Regressive equation	r	线性范围 Linear range (μg/mL)
莽草酸 Shikimic acid	$y = 3267.8x + 217.28$	0.9995	0.04-0.15

3.3 仪器精密度试验

取适量2.1项下对照品溶液按液相色谱条件连续进样6次。莽草酸的峰面积RSD(N=6)分别为1.54%,结果说明仪器精密度良好。

3.4 供试品溶液稳定性试验

随机抽取一份供试品,按2.2项下供试品溶液的方法制备,分别在0、4、8、12、16、20、24、36 h进样,记录峰面积,结果莽草酸峰面积的RSD(N=8)为1.27%,表明供试品溶液在36 h内稳定。

3.5 重复性试验

按2.2项下供试品溶液的方法,平行制备样品溶液6份,按上述方法测定,记录样品峰面积,莽草酸含量的RSD(N=6)为1.58%。结果表明本试验重复性很好。

3.6 加样回收率试验

精密称取同一样品6份,每份0.5 g,置50 mL中,分别精密加入对照品8.06 mg,按2.2项下方法制备供试品溶液,并按

表3 加样回收结果 ($N = 6$)Table 3 Recovery results of added samples ($N = 6$)

成分 Component	取样量 Mass of sample (m/g)	原有量 Content (m/mg)	加入量 Added (m/mg)	测得量 Found (m/mg)	回收率 Recovery (r/%)	平均回收率 Average recovery (r/%)	RSD (r/%)
莽草酸 Shikimic acid	0.5004	8.0100	8.06	15.8433	97.19	99.24	1.35
	0.5008	8.0111	8.06	15.9617	98.64		
	0.5011	8.0110	8.06	15.9990	99.10		
	0.5013	8.0101	8.06	16.0083	99.23		
	0.5014	8.0115	8.06	16.0886	100.21		
	0.5043	8.0106	8.06	16.1580	101.08		

2.2项下色谱条件测定,记录峰面积,进样量10 μL ,计算回收率和RSD,结果见表3中所示。

3.7 样品测定

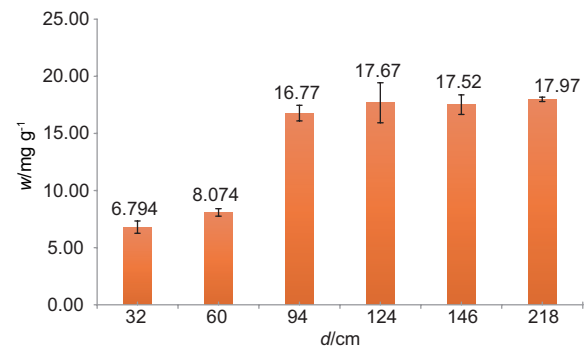
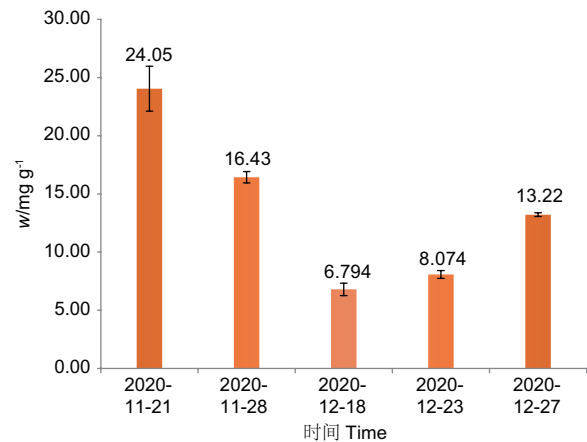
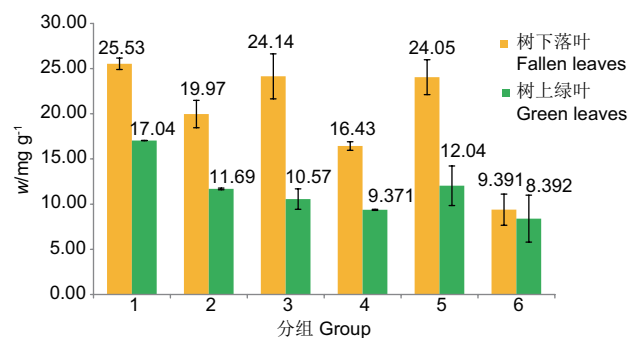
精密称取银杏叶样品1.0 g,按2.2项下样品溶液的制备方法进行制备,按2.3项下色谱条件进行测定,记录色谱图,计算含量,试验数据以3个重复的“平均值 $\pm$ 标准差”表示。不同分类条件的含量测定结果见表4、图3、图4、图5、图6(不同树木胸径、不同采集时间、树上绿叶与树下落叶、雄株与雌株等条件选取的样本均固定在四川成都地区)。

3.8 产地系统聚类分析

采用IBM SPSS Statistics 26统计软件以37批来自16个不同地区的样品中莽草酸的含量为变量,采用离差平方和瓦尔德(ward)法选取欧式距离平方和作为样本的测度,对37批

样品进行系统聚类分析,结果见图7。

分析发现,当欧式距离为5时,37批样品被分成了三大类:第一类包括6, 29, 3, 27, 24, 34, 21, 25, 36, 1, 9, 28, 32, 13, 15, 共计15个批次,这15批次的样品分别来自陕西西安,

图3 不同树木胸径银杏落叶中莽草酸的含量分析结果 ($N = 3$)。Fig. 3 Results of shikimic acid content analysis of different tree perimeter of *Ginkgo biloba* fallen leaves ($N = 3$).图4 不同采集时间含量测定结果 ($N = 3$)。Fig. 4 Results of content determination under different collection times ($N = 3$).图5 树上绿叶与树下落叶的含量测定结果 ($N = 3$)。Fig. 5 Determination of the contents of green leaves and fallen leaves in trees ($N = 3$).表4 不同地区银杏落叶中莽草酸的含量分析结果 ($N = 3$)Table 4 Content of shikimic acid of *Ginkgo biloba* fallen leaves from different areas ($N = 3$)

序号 Number	纬度 Latitude	采集地点 Area	含量 Content (w/mg g ⁻¹)
1	40°49'N	内蒙古呼和浩特 Hohhot, Inner Mongolia	4.28 $\pm$ 0.16
2	40°13'N	北京昌平 Changping, Beijing	12.01 $\pm$ 1.04
3	39°55'N	北京西城 Xicheng, Beijing	8.42 $\pm$ 0.97
4	38°28'N	宁夏银川 Yinchuan, Ningxia	12.58 $\pm$ 1.42
5	36°39'N	山东济南 Jinan, Shandong	16.13 $\pm$ 0.14
6	34°10'N	陕西西安 Xi'an, Shanxi	8.07 $\pm$ 0.98
7	31°18'N	江苏苏州 Suzhou, Jiangsu	12.71 $\pm$ 1.11
8	31°39'N	江苏常熟 Changshu, Jiangsu	17.97 $\pm$ 0.19
9	30°55'N	四川阿坝 Aba, Sichuan	3.49 $\pm$ 0.17
10	30°38'N	四川成都 Chengdu, Sichuan	14.13 $\pm$ 0.51
11	29°53'N	浙江宁波 Ningbo, Zhejiang	12.35 $\pm$ 0.21
12	27°50'N	湖南湘潭 Xiangtan, Hunan	14.15 $\pm$ 0.48
13	26°23'N	贵州贵阳 Guiyang, Guizhou	11.46 $\pm$ 1.67
14	25°3'N	云南昆明 Kunming, Yunnan	6.02 $\pm$ 0.07
15	24°20'N	广西柳州 Liuzhou, Guangxi	11.39 $\pm$ 0.56
16	22°38'N	广西玉林 Yulin, Guangxi	5.45 $\pm$ 0.27

序号 Number	经度 Longitude	采集地点 Area	含量 Content (w/mg g ⁻¹)
1	121°33'E	浙江宁波 Ningbo, Zhejiang	12.35 $\pm$ 0.21
2	120°45'E	江苏常熟 Changshu, Jiangsu	17.97 $\pm$ 0.19
3	120°35'E	江苏苏州 Suzhou, Jiangsu	12.71 $\pm$ 1.11
4	117°2'E	山东济南 Jinan, Shandong	16.13 $\pm$ 0.14
5	116°22'E	北京西城 Xicheng, Beijing	8.42 $\pm$ 0.97
6	116°14'E	北京昌平 Changping, Beijing	12.01 $\pm$ 1.04
7	112°56'E	湖南湘潭 Xiangtan, Hunan	14.15 $\pm$ 0.48
8	111°42'E	内蒙古呼和浩特 Hohhot, Inner Mongolia	4.28 $\pm$ 0.16
9	110°9'E	广西玉林 Yulin, Guangxi	5.45 $\pm$ 0.27
10	109°25'E	广西柳州 Liuzhou, Guangxi	11.39 $\pm$ 0.56
11	108°34'E	陕西西安 Xi'an, Shanxi	8.07 $\pm$ 0.98
12	106°38'E	贵州贵阳 Guiyang, Guizhou	11.46 $\pm$ 1.67
13	106°16'E	宁夏银川 Yinchuan, Ningxia	12.58 $\pm$ 1.42
14	104°3'E	四川成都 Chengdu, Sichuan	14.13 $\pm$ 0.51
15	103°25'E	四川阿坝 Aba, Sichuan	3.49 $\pm$ 0.17
16	102°42'E	云南昆明 Kunming, Yunnan	6.02 $\pm$ 0.07

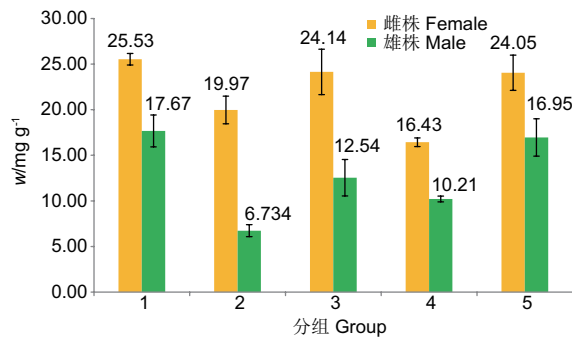


图6 雄株与雌株的含量测定结果 (N = 3).
Fig. 6 Results of content determination of male and female trees (N = 3).

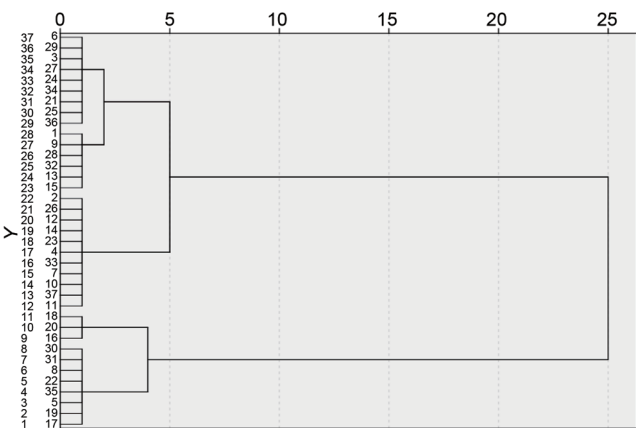


图7 37个批次银杏叶聚类分析图。
Fig. 7 Cluster analysis diagram of 37 batches of *Ginkgo biloba* leaves.

四川成都, 北京西城, 内蒙古呼和浩特, 四川阿坝, 云南昆明, 广西玉林; 第二大类包括2, 26, 12, 14, 23, 4, 33, 7, 10, 37, 11, 这11个批次样品分别来自北京昌平, 四川成都, 贵州贵阳, 广西柳州, 宁夏银川, 江苏苏州, 浙江宁波, 湖南湘潭; 第三大类包括18, 20, 16, 30, 31, 8, 22, 35, 5, 19, 17, 共计11个批次, 这11个批次分别来自四川成都, 江苏常熟, 山东济南; 当欧式距离为10时, 37批样品被分成了两大类: 第一类包括6, 29, 3, 27, 24, 34, 21, 25, 36, 1, 9, 28, 32, 13, 15, 2, 26, 12, 14, 23, 4, 33, 7, 10, 37, 11, 共计26批次, 它们分别来自陕西西安, 四川成都, 北京西城, 内蒙古呼和浩特, 四川阿坝, 云南昆明, 广西玉林, 北京昌平, 贵州贵阳, 广西柳州, 宁夏银川, 江苏苏州, 浙江宁波, 湖南湘潭; 第二大类包括18, 20, 16, 30, 31, 8, 22, 35, 5, 19, 17, 共计11个批次, 分别来自四川成都, 江苏常熟, 山东济南。

由以上结果可以看出, 聚类分析方法并没有将相同地区银杏叶中莽草酸的含量分为一类, 并且同一类地区中莽草酸的含量在地理位置上不存在特征性规律。因此, 可以认为, 银杏叶中莽草酸的含量并没有呈现出地区性差异。

3.9 相关性分析

相关分析用于研究定量数据之间的关系情况, 是否有关系, 关系紧密程度情况等, 本研究利用SPSS AU V21.0数据科学分析平台, 采用相关性分析方法, 以莽草酸含量为变量, 将雄株落叶与雌株落叶、不同银杏树胸径、银杏落叶与银杏绿叶、银杏落叶采集时间这4个条件进行相关分析, 得到结果见表5、6、7、8。

3.9.1 银杏树雌株、雄株中莽草酸含量的相关性分析 由表5可以看出, 银杏落叶与绿叶和银杏叶莽草酸含量之间的相

关系数值为0.688, 并且呈现出0.05水平的显著性, 因而说明银杏雌株与雄株和含量之间有着显著的负相关关系。

表5 银杏树雌株、雄株中莽草酸含量Pearson相关性分析
Table 5 Pearson correlation analysis of shikimic acid content in male and female ginkgo trees

项目 Item	平均值 Average	标准差 Standard deviation	含量 Content	雌株与雄株 Male and female
含量 Content	16.367	6.242	1	
雌株与雄株 Male and female	0.583	0.515	-0.800**	1

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3.9.2 不同银杏树木胸径中莽草酸含量的相关性分析 由表6可以看出, 银杏树木胸径和含量之间的相关系数值为0.820, 并且呈现出0.05水平的显著性, 因而说明树木胸径和含量之间有着显著的正相关关系。

表6 不同银杏树木胸径中莽草酸含量Pearson相关性分析
Table 6 Pearson correlation analysis of shikimic acid content in DBH of different ginkgo trees

项目 Item	平均值 Average	标准差 Standard deviation	树木胸径 DBH	含量 Content
树木胸径 DBH	112.333	66.277	1	
含量 Content	14.132	5.222	0.820*	1

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3.9.3 银杏落叶、银杏绿叶中莽草酸含量的相关性分析 由表7可以看出, 银杏落叶与绿叶和含量之间的相关系数值为0.688, 并且呈现出0.05水平的显著性, 因而说明银杏落叶与绿叶和含量之间有着显著的正相关关系。

表7 银杏落叶、银杏绿叶中莽草酸含量Pearson相关性分析
Table 7 Pearson correlation analysis of shikimic acid content in *Ginkgo biloba* leaves

项目 Item	平均值 Average	标准差 Standard deviation	银杏落叶与绿叶 Fallen leaves and green leaves	含量 Content
银杏落叶与绿叶 Fallen leaves and green leaves	0.500	0.522	1	
含量 Content	15.717	6.376	0.688*	1

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3.9.4 银杏落叶采集时间的相关性分析 由表8可以看出, 编号和含量之间的相关系数值为-0.681, 接近于0, 并且 P 值为 $0.205 > 0.05$, 因而说明采集时间和含量之间没有相关关系。

3.10 线性回归分析

回归分析是确定两种或两种以上变量间相互依赖的定量关系的一种统计分析方法, 它的实质就是研究 X (自变量, 通常为量数据)对 Y (因变量, 定量数据)的影响关系情况, 有相关关系不一定有回归影响关系。本研究利用SPSSAU V21.0数据科学分析平台, 采用线性回归分析法, 以莽草酸含量为变量, 将雄株落叶与雌株落叶、不同银杏树胸径、银杏落叶与银杏绿叶、银杏落叶采集时间这4个条件进行回归分析, 得到结果如表9、10、11、12。由于雄株落叶与雌株落叶、银杏落叶与银杏绿叶这两个条件中的数据存在模型共线性问题, 对以上两个条件进行逐步回归分析。

3.10.1 银杏树雌株、雄株中莽草酸含量的逐步回归分析 如图9所示, 将银杏树雄株、雌株作为自变量, 而将莽草

表8 不同采集时间下莽草酸含量Pearson相关性分析

Table 8 Pearson correlation analysis of shikimic acid content at different picking times

项目 Item	平均值 Average	标准差 Standard deviation	采集时间 Collection time	含量 Content
采集时间 Collection time	3.000	1.581	1	
含量 Content	13.712	6.969	-0.681	1

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

酸含量作为因变量进行逐步回归分析,经过模型自动识别,最终余下银杏树雌株一共1项在模型中,模型公式为莽草酸含量 = $12.326 + 9.698 \times$ 银杏树雌株, R 方值为0.640,意味着银杏树雌株可以解释莽草酸含量的64.0%变化原因。而且模型通过 F 检验 ($F = 17.780$, $P = 0.002 < 0.05$),说明模型有效。银杏树雌株的回归系数值为9.698 ($t = 4.217$, $P = 0.002 < 0.01$),意味着银杏树雌株会对莽草酸含量产生显著的正向影响关系。

3.10.2 银杏落叶、银杏绿叶中莽草酸含量的逐步回归分析 如图10所示,将银杏落叶、银杏绿叶作为自变量,而将莽草酸含量作为因变量进行逐步回归分析,经过模型自动识别,最终余下银杏绿叶一共1项在模型中,模型公式为莽草酸含量 = $19.918 - 8.402 \times$ 银杏绿叶, R 方值为0.473,意味着银杏绿叶可以解释莽草酸含量的47.3%变化原因。而且模型通过 F 检验 ($F = 8.992$, $P = 0.013 < 0.05$),说明模型有效。银杏绿叶的回归系数值为-8.402 ($t = -2.999$, $P = 0.013 < 0.05$),意

味着银杏绿叶会对莽草酸含量产生显著的负向影响关系。

3.10.3 不同银杏树木胸径中莽草酸含量的线性回归分析 从表11可知,将银杏树木胸径作为自变量,而将莽草酸含量作为因变量进行线性回归分析,从上表可以看出,模型公式为莽草酸含量 = $6.871 + 0.065 \times$ 树木胸径,模型 R 方值为0.673,意味着银杏树木胸径可以解释莽草酸含量的67.3%变化原因。对模型进行 F 检验时发现模型通过 F 检验 ($F = 8.232$, $P = 0.046 < 0.05$),也即说明银杏树木胸径一定会对莽草酸含量产生影响关系,最终具体分析可知:树木胸径的回归系数值为0.065 ($t = 2.869$, $P = 0.046 < 0.05$),意味着银杏树木胸径会对莽草酸含量产生显著的正向影响关系。

3.10.4 银杏落叶采集时间的线性回归分析 从表12可知,将采集时间作为自变量,而将莽草酸含量作为因变量进行线性回归分析,可以看出,模型公式为莽草酸含量 = $22.718 - 3.002 \times$ 采集时间,模型 R 方值为0.464,意味着采集时间可以解释莽草酸含量的46.4%变化原因。对模型进行 F 检验时发现模型并没有通过 F 检验 ($F = 2.596$, $P = 0.205 > 0.05$),也即说明采集时间并不会对莽草酸含量产生影响关系,因而不能具体分析自变量对因变量的影响关系。

4 讨论

4.1 提取溶剂的选择

经查阅文献[18-20],考察了甲醇、水、70%乙醇3种提取

表9 银杏树雌株、雄株中莽草酸含量逐步回归分析 ($N = 12$)Table 9 Parameter estimate analysis of shikimic acid content in male and female ginkgo trees ($N = 12$)

项目 Item	非标准化系数		标准化系数		<i>t</i>	<i>P</i>	VIF	<i>R</i> ²	调整 <i>R</i> ² adj <i>R</i> ²	<i>F</i>
	Unstandardized coefficient		Standardized coefficient							
	<i>B</i>	标准误 Std. error	Beta							
常数 Constant	12.326	1.485	-		8.302	0.000**	-	0.640	0.604	<i>F</i> (1, 10) = 17.780, <i>P</i> = 0.002
雌株 Male	9.698	2.300	0.800		4.217	0.002**	1.000			

D-W = 2.974; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

表10 银杏落叶、银杏绿叶中莽草酸含量逐步回归分析

Table 10 Parameter estimate analysis of shikimic acid content in *Ginkgo biloba* leaves

项目Item	非标准化系数		标准化系数		<i>t</i>	<i>P</i>	VIF	<i>R</i> ²	调整 <i>R</i> ² adj <i>R</i> ²	<i>F</i>
	Unstandardized coefficient	Std. error	Beta							
常数 Constant	19.918	1.981	-		10.054	0.000**	-	0.473	0.421	<i>F</i> (1, 10) = 8.992, <i>P</i> = 0.013
银杏绿叶 Green leaves	-8.402	2.802	-0.688		-2.999	0.013*	1.000			

D-W = 2.931; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

表11 不同银杏树木胸径中莽草酸含量线性回归分析

Table 11 Parameter estimate analysis of shikimic acid content in different ginkgo trees with DBH

项目 Item	非标准化系数 Unstandardized coefficient		标准化系数 Standardized coefficient		<i>t</i>	<i>P</i>	VIF	<i>R</i> ²	调整 <i>R</i> ² adj <i>R</i> ²	<i>F</i>
	<i>B</i>	标准误 Std. error	Beta							
常数 Constant	6.871	2.874	-		2.391	0.075	-	0.673	0.591	<i>F</i> (1, 4) = 8.232, <i>P</i> = 0.046
树木胸径 DBH	0.065	0.023	0.820		2.869	0.046*	1.000			

D-W = 1.431; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

表12 不同采集时间下莽草酸含量Pearson相关性分析

Table 12 Parameter estimate analysis of shikimic acid content at different picking times

项目 Item	非标准化系数		标准化系数		<i>t</i>	<i>P</i>	VIF	<i>R</i> ²	调整 <i>R</i> ² adj <i>R</i> ²	<i>F</i>
	Unstandardized coefficient		Standardized coefficient							
	<i>B</i>	标准误 Std. error	<i>Beta</i>							
常数 Constant	22.718	6.179	-		3.677	0.035*	-			
采集时间 Collection time	-3.002	1.863	-0.681		-1.611	0.205	1.000	0.464	0.285	<i>F</i> (1, 3) = 2.596, <i>P</i> = 0.205

D-W = 1.442; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

溶剂, 由于莽草酸极性较大, 甲醇提取率较低, 以水和70%乙醇为提取溶剂时, 提取率相当。但水提液色谱峰背景较为复杂, 不利于含量测定, 70%乙醇提取莽草酸分离度高, 重复性和回收率满足要求。因此, 选用70%乙醇作为提取溶剂。

4.2 检测波长的确定

文献报道测定莽草酸的吸收波长有210 nm、213 nm、215 nm^[19-22]。本试验发现在220 nm波长下莽草酸出峰明显且干扰峰最少, 分离度较高, 故选择220 nm作为检测波长。

4.3 流动相及流速的选择

本研究对甲醇-0.4%磷酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-水3种不同溶剂系统进行考察。从峰分离情况、保留时间以及峰对称性等考虑, 最终选择用甲醇-0.4%磷酸水溶液作为流动相。本研究发现流速为1 mL/min时, 色谱峰出现时间在5 min左右, 会受到溶剂峰的干扰, 故将其流速调整至0.8 mL/min。

4.4 银杏落叶中莽草酸的含量规律

根据试验结果, 归纳出以下规律: 第一、银杏(雌株)落叶中莽草酸含量与胸径有着显著的正相关关系, 随着银杏树木胸径的增加, 莽草酸含量呈增长趋势。建议在选取莽草酸资源时, 可以选择胸径较大的树木落叶进行开发, 其莽草酸含量较为丰富; 第二、随着秋冬季节时间的推移, 落叶(雌株)中莽草酸含量虽然呈下降趋势, 但统计学分析结果表明两者并不存在相关性; 第三、雌性银杏落叶中莽草酸的含量大于树

上绿叶中莽草酸的含量。银杏叶中莽草酸的含量与其中3-脱氧-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸合成酶、脱氢奎尼酸合成酶、莽草酸脱氢酶有关, 从树上脱落, 切断了莽草酸的下游生化反应, 阻止了莽草酸进一步合成芳香族氨基酸^[23-24]; 第四、莽草酸含量和雌株之间有着显著的负相关关系, 银杏雌株中莽草酸平均含量低于雌株中莽草酸平均含量。有文献报道雌株中总黄酮的含量高于雄株, 而黄酮类化合物正是由莽草酸途径和多酮化途径生物合成的产物^[25-26]; 随着经度或纬度的降低, 不同地区银杏落叶中莽草酸的含量并没有呈现出递减或者递增的趋势, 未发现明显规律, 也许是由于在进行采集时, 没有严格控制采集时间、树木胸径、雌雄株等变量造成的, 有待进一步研究。

5 结论

本论文建立了一种银杏落叶中莽草酸含量测定的方法, 并用于测定树上绿叶与落叶、不同胸径、雌株与雄株、不同采集时间、不同地区等5个条件下莽草酸的含量, 最后采用多种统计分析方法对银杏落叶中莽草酸的含量进行统计分析。由统计分析结果可知, 树上绿叶与落叶、不同胸径大小、雌株与雄株3个条件下银杏落叶中莽草酸含量具有一定规律。在收集不同产地样本时, 个别样本的收集条件变量没有做到完全一致, 无法得出规律性的结论, 应当在后续的研究中严格控制胸径、雌株、收集时间等变量再行比较研究。

参考文献 [References]

- 1 李月娣. 银杏价值及其产业现状分析[J]. 长春大学学报, 2017, 27 (2): 32-37 [Li YD. Analysis on value of *Ginkgo biloba* and its industry status [J]. *J Changchun Univ*, 2017, 27 (2): 32-37]
- 2 夏晓晖, 张宇, 郝砚彬, 王国华, 杨丽钦, 薛孔芳. 银杏叶化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (9): 100-104 [Xia XH, Zhang Y, Xi YB, Wang GH, Yang LQ, Xue KF. Advances in studies on chemical constituents and bioactivities actions of *Ginkgo biloba* L. [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2009, 15 (9): 100-104]
- 3 郭月萍, 李红叶. 银杏叶提取物注射液治疗血管源性中枢性眩晕疗效及对凝血功能的影响[J]. 血栓与止血学, 2020, 26 (6): 965-966 [Guo YP, Li HY. Effect of *Ginkgo biloba* extract injection on central vertigo and coagulation [J]. *Chin J Throm Hemo*, 2020, 26 (6): 965-966]
- 4 庞欣欣, 张雅歌, 石秀杰, 韩佳瑞. 银杏叶提取物对糖尿病肾病的治疗进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20 (4): 372-374 [Pang XX, Zhang YG, Shi XJ, Han JR. Progress in the treatment of diabetic nephropathy with *Ginkgo biloba* extract [J]. *Chin J Integra Trad W Nephrol*, 2019, 20 (4): 372-374]
- 5 莫晓宁, 潘海燕, 李艾, 黄泽强, 蔡锦源, 周业生. 银杏叶提取物的抑菌活性研究[J]. 粮食科技与经济, 2019, 44 (4): 97-99+105 [Mo XN, Pan HY, Li A, Huang ZQ, Cai JY, Zhou YS. Study on the antibacterial activity of *Ginkgo biloba* leaf extract [J]. *Grain Sci Technol Ecol*, 2019, 44 (4): 97-99+105]
- 6 Banin RM, Machado MMF, Andrade ISD, Carvalho LOT, Hirata BKS, Andrade HM, Júlio VDS, Ribeiro Jéssica DSFB, Cerutti SM, Oyama LM, Ribeiro EB, Telles MM. *Ginkgo biloba* extract (GbE) attenuates obesity and anxious/depressive-like behaviours induced by ovariectomy [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 44
- 7 汪素娟, 康安, 狄留庆, 张圣洁, 田乐, 周伟, 恽菲, 单进军, 赵晓莉, 毕肖林. 银杏叶提取物主要活性成分药动学研究进展[J]. 中草药, 2013, 44 (5): 626-631 [Wang SJ, Kang A, Di LQ, Zhang SJ, Tian L, Zhou W, Yun F, Shan JJ, Zhao XL, Bi XL. Progress in pharmacokinetic study on main active ingredients of *Ginkgo biloba* leaf extract [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2013, 44 (5): 626-631]
- 8 魏学立, 曲玮, 梁敬钰. 银杏的研究进展[J]. 海峡药学, 2013 (2): 1-8 [Wei XL, Qu W, Liang JY. Progresses of *Ginkgo biloba* L. [J]. *Strait Pharm J*, 2013 (2): 1-8]
- 9 张鹏飞, 廖丽君, 邓祯, 谭玉萍. 银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44 (2): 426-429 [Zhang PF, Liao LJ, Deng Z. Research progress of pharmacological effects and clinical application of *Ginkgo biloba* extract [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2017, 44 (2): 426-429]
- 10 李思佳, 耿剑亮, 张悦, 杨娜, 周芳, 阿基业, 王广基. 银杏药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2017, 40 (6): 731-741 [Li SJ, Geng JL, Zhang Y, Yang N, Zhou F, A JY, Wang GJ. Advances in pharmacological research of *Ginkgo biloba* [J]. *Drug Evalua Res*, 2017, 40 (6): 731-741]
- 11 王淑静, 袁天宇, 张家宁. 银杏叶提取物及其活性成分改善认知功能作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30 (10): 1819-1824 [Wang SJ, Yuan TY, Zhang JN. Research advanced of *Ginkgo biloba* extract and its active components in improving cognitive function [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2018, 30 (10): 1819-1824]
- 12 姚鑫, 周桂生, 唐于平, 郭盛, 金春, 秦勇, 钱大玮, 段金殿. 银杏落叶化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24 (10): 1377-1381 [Yao X, Zhou GS, Tang YP, Guo S, Jin C, Qin Y, Qian DW, Duan JA. Studies on chemical constituents of fallen leaves of

- Ginkgo biloba* [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2012, **24** (10): 1377-1381]
- 13 王晓玲, 常颜, 唐晓莹, 陈炼红. 一种从银杏落叶中分离提纯莽草酸的方法, CN106316830B [P]. 2018 [Wang XL, Chang Y, Tang XY, Chen LH. A method for separating and purifying shikimic acid from *Ginkgo biloba* leaves, CN106316830B [P]. 2018]
- 14 孙海, 林英杰, 吴毓林, 伍贻康. 抗流感药达菲(Tamiflu)合成纵览[J]. 有机化学, 2009, **29** (12): 1869-1889 [Sun H, Lin YJ, Wu YL, Wu YK. A survey of synthetic approaches to anti-influenza drug Tamiflu [J]. *Chin J Org Chem*, 2009, **29** (12): 1869-1889]
- 15 何邵平, 禹琪芳, 段杰林, 肖定福, 贺建华. 莽草酸的制备及其生物学功能研究进展[J]. 饲料博览, 2014 (10): 32-36 [He SP, Yu QF, Duan JL, Xiao DF, He JH. Advance on preparation and biological function of shikimic acid [J]. *Feed Rev*, 2014 (10): 32-36]
- 16 马怡, 孙建宁, 徐秋萍, 郭亚建. 莽草酸对血小板聚集和凝血的抑制作用[J]. 药学报, 2000 (1): 1-3 [Ma Y, Sun JN, Xu QP, Guo YJ. Inhibitory effect of shikimic acid on platelet aggregation and blood coagulation [J]. *Acta Pharm Sin*, 2000 (1): 1-3]
- 17 林洁, 兰琪欣, 韦应芳, 廖兰艳, 韦国锋. 八角茴香药用成分的提取及其镇痛作用的实验研究[J]. 右江民族医学院学报, 2008 (2): 195-196 [Lin J, Lan QX, Wei YF, Liao LY, Wei GF. An experimental study of the extraction procedure of medicinal components from star anise and its analgesic function [J]. *J Youjiang Med Univ Nat*, 2008 (2): 195-196]
- 18 曹春月, 陈前祎, 王黔阳, 何珺. 正交设计优化银杏叶中4种活性成分综合提取工艺[J]. 化学与粘合, 2020, **42** (2): 84-87 [Cao CY, Chen QW, Wang QY, He J. Optimization of comprehensive extraction process of four active Ingredients in ginkgo leaves by orthogonal design [J]. *Chem Adhes*, 2020, **42** (2): 84-87]
- 19 彭善贵, 许莉, 曾桢, 周世玉. HPLC法测定八角茴香中莽草酸和反式茴香脑含量[J]. 中国药师, 2018, **21** (9): 1665-1666+1674 [Peng SG, Xu L, Zeng Z, Zhou SY. Determination of shikimic acid and trans-anethole in *Illicium verum* by HPLC [J]. *Chin Pharm*, 2018, **21** (9): 1665-1666+1674]
- 20 张敏, 米佳宁, 杨晓岚, 王月荣, 章弘扬, 胡坪. 八角茴香水溶性成分HPLC指纹图谱及莽草酸的定量研究[J]. 上海中医药杂志, 2011 (12): 91-95 [Zhang M, Mi JN, Yang XL, Wang YR, Zhang HY, Hu P. HPLC fingerprint of water-soluble constituents of *Illicium verum* Hook. f. and quantitative analysis of shikimic acid [J]. *Shanghai J Trad Chin Med*, 2011 (12): 91-95]
- 21 谢济运, 陈小鹏, 李志荣, 陈芳, 栗本超. 湿地松松针中莽草酸的提取及含量测定[J]. 安徽农业科学, 2010, **38** (9): 4571-4574 [Xie JY, Chen XP, Li ZR, Chen F, li BC. Extraction and content determination of shikimic acid in *Pinus elliotti* Engelm [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2010, **38** (9): 4571-4574]
- 22 张志琴, 刘光明, 杨永寿, 肖培云. 云南松松针中莽草酸的含量测定[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2012, **21** (1): 10-12 [Zhang ZQ, Liu GM, Yang YS, Xiao PY. Determination of shikimic acid in pine needles of *Pinus yunnanensis* Franch [J]. *J Yunnan Minzu Univ*, 2012, **21** (1): 10-12]
- 23 寇玉辉, 雷叶. 莽草酸的合成研究现状[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2011, **29** (3): 53-59 [Kou YH, Lei Y. Synthesis of shikimic acid [J]. *J Shanxi Univ Sci Technol (Nat Sci Ed)*, 2011, **29** (3): 53-59]
- 24 汪华, 崔志峰. 莽草酸生物合成途径的调控[J]. 生物技术通报, 2009 (3): 50-53 [Wang H, Cui ZF. Regulation of shikimic acid biosynthesis pathway [J]. *Biol Bull*, 2009 (3): 50-53]
- 25 王金艳. 银杏黄酮类化合物含量的时空分布研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2015 [Wang JY. The temporal and spatial distribution of flavonoids in *Ginkgo biloba* L. [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015]
- 26 余丽娟, 陈全斌, 李俊, 苏小建, 何伟平. 银杏雌雄植株青叶及其落地黄叶的黄酮含量比较[J]. 广西轻工业, 1995 (4): 37-38 [Yu LJ, Chen QB. Comparison of flavonoid content in green leaves of male and female *Ginkgo biloba* plants and their native yellow leaves [J]. *Light Ind Sci Technol*, 1995 (4): 37-38]