PROGRESS IN CHEMISTRY 化学进展

DOI:10.7536/PC190814

人参皂苷类化合物样品前处理及分析检测*

宋志花[1**] 李盛红[3] 杨刚强[1] 周 娜[2] 陈令新[2**]

(1.烟台大学药学院 分子药理和药物评价教育部重点实验室 新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心 烟台 264005; 2.中国科学院烟台海岸带研究所 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室 山东省海岸带环境过程重点实验室 烟台 264003; 3.中国科学院大连化学物理研究所 中国科学院分离分析化学重点实验室 大连 116023)

摘 要 人参皂苷类化合物是参属类植物中的一类重要活性成分,主要包括原人参二醇、原人参三醇、齐墩果酸型、奥克梯隆型四类。最近,已发现的人参皂苷类化合物化学结构多达620余种,它们具有相似的化学结构,但药理活性具有明显差异。该类化合物所在基质复杂多样,选择简便高效的样品前处理方法及检测技术对于有效检测样品中人参皂苷含量至关重要。本文综述了测定各类样品中多种人参皂苷含量的样品前处理技术(溶剂提取、固相萃取等)及常用检测方法(高效液相色谱法、超高效液相色谱法、薄层色谱法、气相色谱法等),对各种方法的灵敏度及回收率等参数进行了总结,并评述了每种方法的优缺点及研究进展。

关键词 人参皂苷 样品前处理 分析方法

中图分类号:O652 **文献标识码**:A **文章编号**:1005-281X(2020)2/3-0239-10

Sample Pretreatment, Analysis and Detection of Ginsenosides*

Zhihua Song[1**], *Shenghong Li*[3], *Gangqiang Yang*[1], *Na Zhou*[2], *Lingxin Chen*[2**]

(1. Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. CAS Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research (YIC), Chinese Academy of Sciences (CAS), Shandong Provincial Key Laboratory of Coastal Environmental Processes, Yantai 264003, China; 3.CAS Key Laboratory of Separation Sciences for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract Ginsenosides are an important kind of active ingredients in Panax genus and can be classified into four main types: the protopanaxadiols (PPD), protopanaxatriols (PPT), oleanolic acids (OA) and ocotillol type (OT). Recently, more than 620 kinds of these compounds have been isolated. Their chemical structures are similar but have quite different medicinal functions. It is of vital importance to develop simple and facile sample pretreatment methods and detection techniques to detect the content of ginsenosides in complex matrix. This review includes many kinds of sample pretreatment methods (such as liquid phase extraction, and solid phase extraction) and detection methods (such as high performance liquid chromatography, ultra-performance liquid chromatography, thin layer chromatography, and gas chromatography), etc., summarizes the sensitivity and

收稿:2019年8月13日,收修改稿:2019年9月13日,网络出版:2019年12月19日

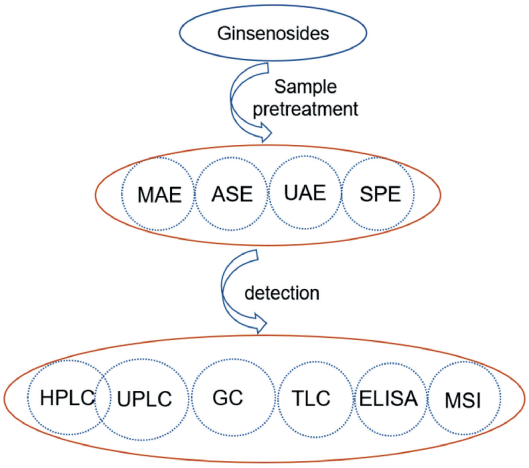
* 烟台市重点研发计划(No. 2018ZHGY085)和药学国家级实验教学示范中心(烟台大学)资助

The work was supported by the Key Research Project of Yantai City (No. 2018ZHGY085) and the National Demonstration Center for Experimental Pharmacy Education (Yantai University).

** Corresponding author e-mail: zhihuasong08@yeah.net (Zhihua Song); lxchen@yic.ac.cn (Lingxin Chen)

recovery of various methods, and reviews the advantages and disadvantages of each method and its research progress.

Key words ginsenosides; sample pretreatment; analysis methods



Contents

1 Introduction
2 Sample pretreatment technologies
2.1 Solvent extraction methods
2.2 Solid phase extraction(SPE)
3 Detection methods
3.1 High performance liquid chromatography (HPLC)
3.2 Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC)
3.3 Other detection methods
4 Conclusion and outlook

1 引言

人参皂苷(ginsenoside)主要存在于人参属植物的根、茎、叶、花等器官中[1],属于固醇类三萜化合物,是人参属中药材的主要活性成分[2],一般不超过人参属药用植物干重的2%~5%[3]。该类化合物具有抗癌[4~6]、增强机体免疫力[7]、消肿抗炎[8]、抗菌[4]、抗心肌缺血再灌注损伤[9]、抗氧化[10]、增强记忆力[10]等良好的药理活性,成为近期科研工作者研究的热点[2, 11]。

目前,人们从人参属植物中分离出的人参皂苷类化合物多达620余种[12],其化学结构主要分为:原人参二醇(protopanaxadiol(PPD),包括Rb1、Rb2、Rb3、Rd、Rg3、Rh2等)、原人参三醇(protopanaxatriol(PPT),包括Re、Rf、Rg1、Rg2、Rh1等)、齐墩果酸型(oleanolic acid(OA),包括Ro等)、奥克梯隆型(Octillol(OT))四大类[12~16](如表1[13])。人参皂苷类化合物不同的化学结构决定了其具有不同的药理活性[17, 18],为了进一步研究其作用机理,对该类化合物进行分析检测将会促进中药事业的发展。人参皂苷类化合物通常存在于复杂的植物样品基质中,其代谢过程及作用机理非常复杂,因此,分析检测各种人参皂苷的单体成分面临巨大的挑战。本文对最近五年来人参皂苷类化合物的样品预处理技术及检测方法进行文献综述,以期为解决该难题提供一定的理论参考。

2 样品前处理技术

2.1 溶剂提取法

人参皂苷类化合物的提取非常关键,溶剂提取法是最为常用的提取方法,该方法主要依据溶剂对人参皂苷类化合物相似相溶的原理,通过选取不同极性的溶剂实现目标成分的有效提取,尽量去除杂质。传统的溶剂提取方法主要包括:煎煮[19]、浸渍[20]、索氏提取等方法。传统技术所需仪器简单、操作方便,Xiong等[21]以60%的乙醇水溶液作为提取溶剂,加热至80 ℃回流萃取三次,每次1.51 h,对三七中三七皂苷R1,人参皂苷Rg1、Re、Rb1及Rd的萃取收率分别可达1.12~5.63、10.52~23.35、1.13~3.43、14.09~18.85及5.15~6.76 $mg\cdot g^{-1}$。

但传统提取技术仍存在一些不足之处,如操作温度过高易破坏热稳定低的活性成分、提取效率低、有机溶剂消耗量大造成环境污染(萃取1 g干燥样品需要几十毫升有机溶剂)、提取时间长、萃取效率低、能耗高等[22, 23]。为了克服以上不足,一些新兴的快速提取方法应运而生,主要包括:微波辅助提取法、超声辅助提取法、加速溶剂萃取、加压溶剂提取、亚/超临界流体萃取和酶解法等(如表2[24~29]所示)。

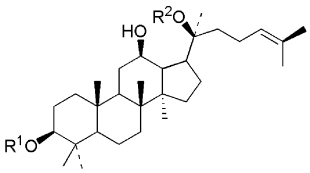
(1)微波辅助提取法(MAE)

MAE借助于微波能(频率介于300 MHz~300 GHz)加速提取速率,最早于1986年被应用于天然产物中有效成分的提取[30]。在提取过程中,微波可有效破坏药材细胞壁,使待提取成分有效析出,是一种操作简便、快速、节能高效的提取方法[24, 25],易于实现在线联用。

表 1 四类常见人参皂苷化合物:(a)20(s)-原人参二醇、(b)20(s)-原人参三醇、(c)齐墩果酸型、(d)24(*R*)-奥克梯隆型[13]

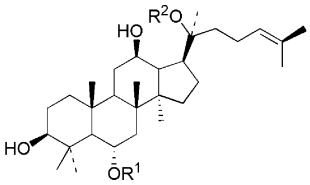
Table 1 Four types of common ginsenosides:(a) 20(s)-PPD,(b) 20(s)-PPT,(c) OA,(d) 24(*R*)-OT[13]. Copyright 2000 American Chemical Society

(a)



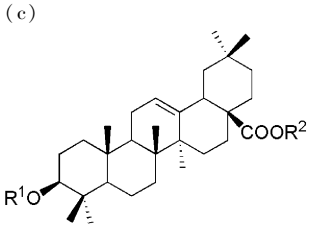
ginsenoside	R^1	R^2	formula	M.W.
Rb1	-glc[2→1]glc	-glc[6→1]glc	$C_{54}H_{92}O_{23}$	1108
Rb2	-glc[2→1]glc	-glc[6→1]ara(p)	$C_{53}H_{90}O_{22}$	1078
Rc	-glc[2→1]glc	-glc[6→1]ara(f)	$C_{53}H_{90}O_{22}$	1078
Rd	-glc[2→1]glc	-glc	$C_{48}H_{82}O_{18}$	946

(b)



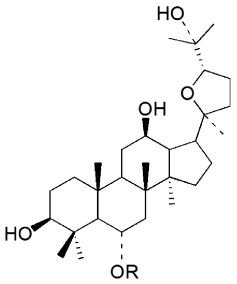
ginsenoside	R^1	R^2	formula	M.W.
Rg1	-glc	-glc	$C_{42}H_{72}O_{14}$	800
Re	-glc[2→1]rha	-glc	$C_{48}H_{82}O_{18}$	946
Rf	-glc[2→1]glc	-H	$C_{42}H_{72}O_{14}$	800

(c)



ginsenoside	R^1	R^2	formula	M.W.
Ro	-glcUA[2→1]glc	-glc	$C_{48}H_{76}O_{19}$	956

(d)



pseudoginsenoside	R	formula	M.W.
F11	-glc[2→1]rha	$C_{42}H_{72}O_{14}$	800

Sugar units: glc: β-D-glucose; ara(p): α-L-arabinofuranose; rha: α-L-rhamnose; glcUA: β-D-glucuronide.

Jin 等[31]以水作为萃取溶剂,在 145 ℃条件下,采用 1600 W 微波对西洋参中的人参皂苷类化合物提取 15 min,该方法对 9 种人参皂苷类化合物的总提取收率分别是加热回流提取法及加压升温提取法的 1.67 倍和 2.57 倍。为了避免持续高温引起人参皂苷类化合物降解,Zhang 等[23]发展了动态微波辅助提取法提取人参根须中的人参总皂苷,相比于普通微波辅助提取法,其产率提升了 15%。MAE 虽然有效提高了萃取效率,但极易破坏某些热敏性活性化合物。

(2)超声辅助提取法(UAE)

超声波的声波频率范围是 20~50 MHz,其工作过程主要涉及到三种作用机制:① 空化效应:植物细胞在超声波的作用下,细胞内产生的气泡声压达到最大耐受值而瞬间破裂,使得细胞被破坏,待测物质被有效释放;② 机械效应与热效应:超声波使得体系吸收机械能,内能增加,分子运动速度有效增加,加速了物质溶出速度。在三种机制的作用下,植物细胞被破坏,活性成分有效扩散到提取溶剂中,从而有效提高了回收率[26, 32]。

Mathur 等[33]系统考察了超声辅助提取过程中萃取剂种类及温度对中药材中各类人参皂苷类化合物提取效率的影响,结果发现 100%甲醇利于西洋参中 Rb(0.189 $mg\cdot g^{-1}$)和 Rg(3.163 $mg\cdot g^{-1}$)的提取;70%甲醇利于 Rg1(1.812 $mg\cdot g^{-1}$)的提取。Liu 等[34]以 70%甲醇水溶液为萃取剂,对人参根粉末在室温(25 ℃)超声萃取 30 min,将所得溶液在 40 ℃减压蒸馏后转移至容量瓶中,采用甲醇定容,经 HPLC 检测出新鲜人参中 11 种人参皂苷类化合物,其中,Rg1、Re、Rb1 及 Rd 含量分别为 2.96、2.58、

2.38、0.70 mg·g^{-1}。Fu 等[35]发展了水溶液中添加表面活性剂的方式,采用超声辅助有效提取了三七根中三七皂苷 R1,人参皂苷 Rg1、Re、Rb1 及 Rd,样品收率分别可达 28.66、46.52、12.91、29.31 及 9.26 mg·g^{-1};相比于传统溶剂提取过程,该过程无须使用有机溶剂,更加绿色环保。

表 2 人参皂苷类化合物的样品前处理方法

Table 2 Sample pretreatment methods for ginsenosides

Sample pretreatment methods		Principles	Advantages	Disadvantages
Solvent extraction method	Microwave assisted extraction (MAE)	Cell walls of the Chinese traditional medicine are disrupted by the microwave with energy of 300 MHz~300 GHz, and then the extracting rate is increased.	Convenient operation, short extraction time, high extraction yield, less solvent consumption, and low cost[24, 25].	Some heat-sensitive compounds are easy to be destroyed.
	Ultrasonic assisted extraction (UAE)	The disruption of cell walls, reduction of particle-size and enhancing mass transfer of the cell contents are caused by cavitation bubble collapse, mechanical and thermal effects.	Highly efficient, low consumption of solvent, fast (tens minutes), mild conditions(20~30 ℃), simple and low cost[26].	Low degree of automation and difficult to be used on-line.
	Accelerated solvent extraction(ASE)	ASE is carried out in closed container with a high pressure and a temperature above the boiling point of organic solvent. The extraction rate increases with the increase of pressure and temperature.	Fast(a few minutes to ten minutes), save solvent, realize automation easily.	Some heat-sensitive compounds are easy to be destroyed; the instruments are expensive; and operation skills are hard to master.
	Sub-and supercritical fluid extraction	The extraction process proceeds by using sub- and supercritical fluids near the critical point of temperature and pressure with the good properties of high-density, low-viscosity, and high-permeability.	Non-toxic and safe, no organic solvent residual, environment friendly, low energy cost[27].	The instrument is expensive due to high pressure resistant.
	Enzymatic dissociation method	Active ingredients can beextracted from plant tissues by using suitable enzymes (cellulase, amylase, etc.) under mild conditions[28]. Furthermore, the fragmentation of cell walls will be accelerated with the increase of the pressure(100~600 MPa)[29].	Efficient and has great potential in extraction of active ingredients from traditional Chinese medicine.	Susceptible to external conditions.
Solid phase extraction (SPE)		The ginsenoside compounds and impurities are separated by adsorbents according to the difference in adsorption.	Simple, low cost and wide range ofapplication.	Large amount of organic reagents consumption, only suitable for pretreatment of small batches of samples.

总之,在人参皂苷类化合物提取过程中,超声辅助提取法的优点主要包括[26]:提取效率高,可以做到短时间内(几十分钟)提取活性成分;操作条件温和(20~30 ℃),有效避免了高温对活性成分的破坏;过程简单、易操作,设备运行成本低。目前,该方法已被广泛应用于中药材中有效成分提取、环境分析、化学化工等多个领域的样品前处理过程中。

(3)加速溶剂萃取(ASE)

ASE 是一种在密闭容器内,借助高温(100~200 ℃)、高压(6~20 MPa)条件提取固体基质中化合物的技术。其主要原理是:随着体系压力升高,溶剂的沸点逐渐升高,从而有效增加待提取物的溶解度;待提取物扩散速度随温度升高而加快,从而加速提取过程。在人参皂苷类化合物的提取过程中,ASE 的优势主要是:快速(几分钟至十几分钟)、节约溶剂、借助于仪器易实现自动化。

Yu 等[36]采用 ASE 联用离心分配色谱(CPC)及 UPLC 技术对西洋参叶中 20 种弱极性人参皂苷类化合物进行了在线提取检测,最佳提取条件为:时间 5 min,温度 130 ℃。相比于离线分离检测,该联用技术将过滤、浓缩、离心、降解等步骤进行合并,节省人力,改善实验结果的重现性。该技术的不足之处在于热敏性活性成分易被破坏,仪器价格昂贵,要求操作者掌握仪器操作技能等。

(4)亚/超临界流体萃取

亚/超临界流体萃取是采用温度和压力处于临界点附近的流体对目标物进行提取的技术。最常用的流体为二氧化碳和水,相比于以上几种提取方式,

该技术具有低毒、无溶剂残留、环境友好、低能耗等优点[27],适用于人参皂苷等一系列具有生物活性化合物的提取[22]。Han 等[37]在 30 kPa、50 ℃条件下,采用超临界 CO_2 提取了理冲生髓饮药物中的抗卵巢癌活性成分,经 HPLC 测出人参皂苷 Rd、Rc 等 19 种活性成分。

亚临界水的压力介于 20~150 bar,温度介于 100~374 ℃,具有无毒性、安全、环境友好等优点[22, 27]。Chung 等[27]发现,亚临界水对红参中人参皂苷 Rg3 的萃取效率((1.59 ± 0.05) $mg\cdot g^{-1}$)是热水、甲醇、乙醇萃取效率的 3.6~6.9 倍。亚/超临界流体萃取技术的弊端在于实验条件要求高,需要专用设备。

(5)酶解法

人们选取合适的酶(纤维素酶、淀粉酶等),在一定压力(100~600 MPa)及温度条件下分解植物组织,加速人参属植物中人参皂苷类化合物等有效成分的释放,即酶解法[28, 29]。加压酶解法,即酶解过程中,增加体系压力(100~600 MPa)可以加快细胞壁的破碎,增加酶的活性,利于提高萃取效率,在中药活性成分提取中显现出较大潜力[37]。

近年来,酶解法在中药活性成分提取中显现出较大潜力[28]。Sunwoo 等[38]采用加压酶解法从新鲜人参根中提取了人参皂苷类化合物,在同等条件下(100 MPa,50 ℃),纤维素酶酶解法提取总皂苷产量为 40.2 $mg\cdot mL^{-1}$,明显高于 β-淀粉酶酶解法提取收率(36.1 $mg\cdot mL^{-1}$)。另外,酶解法还可以将某些含量丰富的人参皂苷类化合物成分转变为某些含量低并且药用价值高的稀缺种类[28, 39]。Wan 等[40]采用酶解法结合加压溶剂萃取技术在 140 ℃、6.89×10^3 kPa 条件下,取 22 mL 甲醇提取三七叶中的人参皂苷,静态萃取时间 15 min,经 UPLC/Q-TOF MS 共检测出 57 种皂苷类化合物。

2.2 固相萃取(SPE)

SPE 通过改变萃取材料种类实现人参皂苷等样品的富集纯化,是一种较为成熟的样品前处理技术。大孔树脂是分离纯化天然产物中人参皂苷类化合物常用的材料,其具有价格低廉,萃取效果较好等优势。近年来,一批新型的商品化 SPE 材料发展迅猛。Waters Oasis HLB SPE 小柱(1 mL,30 mg)对人参皂苷类化合物具有很好的富集能力,Qi 等[41]将其用于人血浆、尿液、粪便中西洋参代谢产物的富集,经 LC-Q-TOF-MS 分别测出 42 种、44 种、45 种人参皂苷类化合物。Ju 等[42]对患有慢性心力衰竭的小鼠静脉注射益气复脉制剂,采用 Waters Oasis HLB SPE 小柱吸附该小鼠的血浆,经超快速液相色谱质谱联用技术(UFLC-MS/MS)测出 10 种人参皂苷类化合物。为了进一步提高人参皂苷类化合物的富集效率,科研工作者不断尝试发展新型的 SPE 材料,如分子印迹材料、碳纳米材料、金属氧化物纳米材料等。

(1)分子印迹聚合物(MIPs)

分子印迹技术(MIT)是制备空间结构结合位点与模板分子完全匹配的聚合物基质的合成技术[43],是人工模拟抗原-抗体、生物素-抗生素及酶-底物等之间的特异性作用[44],并以此为基础发展起来的一种制备特异性分离富集材料的技术[45~48]。最近,张伟等[49]制备了人参皂苷 Re 印迹整体柱,该整体柱对 Re 具有特异性吸附作用,吸附容量达 0.247 $mg\cdot g^{-1}$。

Hou 等[50]以 Rb1、Rg1 和 R1 为模板分子,丙烯酰胺(AM)为单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为交联剂,发展了多模板印迹 SBA-15 材料,将其填充 SPE 空柱管后用于雄鼠血浆中 Rb1、Rg1 及 R1 的富集,最大吸附容量可达 123.11 $\mu mol\cdot g^{-1}$。Yin 等[51]研究发现,表面分子印迹技术制备的 Rg1 印迹材料对于 Rg1 的吸附容量(46.80 $mg\cdot g^{-1}$)高于沉淀聚合技术所得 Rg1 印迹聚合物(27.74 $mg\cdot g^{-1}$)。Zhou 等[52]发展了 Rb1 印迹硅胶包覆 Fe_3O_4 材料(Rb1-MMIPs),该材料对小鼠粪便中的 58 种人参皂苷类化合物具有较好的富集效果,Rb1-MMIPs 材料对 Rb1、Rg1、R1 的萃取收率分别是非印迹材料(MNIPs)的 5.66、5.58、4.75 倍。此外,该材料对人参皂苷类化合物的富集能力优于有机溶剂(34 种)和商品化 Waters Oasis HLB SPE 小柱(30 种)。

总之,分子印迹材料对人参皂苷类化合物具有较高的富集效率,可有效减少有机溶剂消耗量,成本低廉,环境友好。但是,该材料的制备过程重现性并不理想。因此,寻找制备分子印迹材料的新方法及新型的富集材料仍然是亟待解决的关键科学问题。

(2)其他材料

多壁碳纳米管(MWCNTs)由石墨片层构成,是一类多孔碳纳米材料,具有独特的物理化学性质(如比表面积高达 2600 $m^2\cdot g^{-1}$ 等)[53],被广泛应用于样品前处理[54]。修洋等[55]发现 MWCNTs 对人参皂苷类化合物具有特异性吸附作用,对人参提取物中人参皂苷的吸附回收率在 3 min 内可达 100%,而大孔树脂在 10 min 内对人参皂苷的吸附回收率不足 45%,MWCNTs 材料在中药材中有效成分的提取

中具有潜在的应用价值。

Wei 等[56]将氧化铝纳米颗粒涂覆的聚醚砜纤维中空膜材料用于口服液中人参皂苷类化合物的萃取,回收率可达 88.61%~94.29%。

3 检测方法

3.1 高效液相色谱法(HPLC)

在人参皂苷类化合物的分离分析中,HPLC 是最为常用的分析检测技术(如表3[12, 24, 40, 42, 55, 57~62]所示),其具有分析速度快(几到几十分钟)、分离效果好(柱效可达几万到几十万理论塔板数每米)、灵敏度高(取决于检测器)、重现性好等优点[63]。在该类化合物的分析中,与 HPLC 联用的检测器包括:紫外检测器(UV)、二极管阵列检测器(DAD)、蒸发光散射检测器(ELSD)、质谱检测器(MS)等。

表 3 液相色谱法检测人参皂苷类化合物

Table 3 The application of liquid chromatography for analysis of active compounds in Chinese herbs

Analyte	Matrix	Sample pretreatment	Column and temperature	Mobile phases and detection	Recovery(%)	LOD	Ref
Re, Rh1, Rg2, Rg1, Rf	White ginseng, red ginseng, American ginseng, and ginseng.	Extracted by methanol	Shiseido UG 80 Capcell Pak NH_2 column (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm), 25 ℃	0~3 min, 89% A; 3~25 min, 89%→84% A; 25~30 min, 84%→82% A; 30~35 min, 82%→76% A; 35~40 min, 89% A. A: acetonitrile; B water. UV: 203 nm	95.31% ~103.85%	0.0047 ~ 0.225 (mg·L^{-1})	12
20(*S*)-Rh1, 20(*R*)-Rh1, Rg6, F4, Rk3, 20(*S*)-Rg3, 20(*R*)-Rg3, Rk1, Rg5	Roots of P. quinquefolius L.	Reflux extraction by water and methanol	Acchrom Technologies ODS-C18 type column (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm), 30 ℃.	0~10 min, 33% B; 10~15 min, 33%→40% B; 15~40 min, 40%→60% B; 40~70 min, 60% B. A: water; B: acetonitrile. HPLC-UV: 203 nm. HPLC-ESI-MS	97.97% ~103.24%	0.18~ 0.45 (μg·mL^{-1})	24
ginsenosides Rb1, Rc, Rb2, Rb3; notoginsenosides Fc, Fe, Fd	Panax notoginseng leaves	Rxtracted by methanol	Agilent Zorbax ODS C8 column (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm), 35 ℃	0~5 min, 15%→30% B; 5~15 min, 30%→32% B; 15~35 min, 32%→32% B; 35~45 min, 32%→45% B; 45~60 min, 45%→50% B. A: water; B: acetonitrile. HPLC-UV: 203 nm	98.7%~106.1%	98 (ng)	40
Ginsenoside Rg1, Ginsenoside Rb1, Ginsenoside Rc, Ginsenoside Rd, Ginsenoside Re, Ginsenoside Rf, Ginsenoside Rg3, Ginsenoside Rh1, Ginsenoside Rb2, Ginsenoside Rb3	Ginsenosides in chronic heart failure (CHF) rats	Solid-phase extraction (SPE)	ACQUITY UPLC® HSS T3 column (100 × 2.1 mm i.d., 1.8 μm), 40 ℃	0~1 min, 30%→35% B; 1.0~5.0 min, 35%→38% B; 5.0~5.5 min, 38%→45% B; 5.5~6.0 min, 45%→80% B; 6.0~7.0 min, 80%→90% B; 7.0~7.5 min, 90%→30% B; 7.5~8.0 min, 30%→30% B. A: water with 0.1% formic acid; B: acetonitrile. UFLC-MS/MS	60%~105%	–	42
Ginsenoside Rg1, Ginsenoside Re, Ginsenoside Rb1	Panax quinquefolii Radix	Reflux extraction by water-saturated *n*-butanol	Venusil XBP C18 column (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm), 30 ℃.	0.01~25 min, 19%→20% A; 25.01~60 min, 20%→40% A; 60.01~80 min, 40.1%→100% A. A: acetonitrile; B: 0.1% phosphoric acid solution. UV: 203 nm	88.61%~94.29%	0.066~ 0.400 (μg·mL^{-1})	55
notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, ginsenoside Rb1, astragaloside Ⅳ, ginsenoside Rd	Qishen Yiqi Dripping Pills (QYDP)	liquid-liquid Extraction using water-saturated *n*-butanol	Acquity UPLC HSS T3 column (100 × 2.1 mm i.d., 5 μm), 30 ℃	0~1 min, 83% A; 1~14 min, 83%→56%; 14~15 min, 56% A. A: water containing 0.1% formic acid; B: acetonitrile. UPLC-ELSD	96.87%~99.97%	2.36~ 7.68 (μg·mL^{-1})	57

续表 3

Analyte	Matrix	Sample pretreatment	Column and temperature	Mobile phases and detection	Recovery(%)	LOD	Ref
G-Ra1, G-Ra2, G-Rb1, G-Rb2, G-Rb3, G-Rc, G-Rd, G-Re, G-Re4, G-Rf, G-Rg1, G-Rg2, G-Ro, G-Rs2, G-RoMe, 20-Glc-G-Rf, Ma-G-Rb2, NG-R1, NG-R2	Roots and rhizomes of Panax ginseng samples.	Extracted by 70% aqueous MeOH solutions	Diamonsil ODS C18 column (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm), room temperature	0~20 min, 10%→20% A; 20~30 min, 20%→22% A; 30~40 min, 22%→31%A; 40~75 min, 31%→33% A; 75~80 min, 33%→40% A; 80~90 min, 40%→50% A; 90~100 min, 50%→60% A; 100~110 min, 60%→70% A. Flow rate: 0~32 min, 0.8 mL/min; 32.1~110 min, 0.5 mL/min. A: MeCN; B: MeCN: H_2O: 0.1% formic acid aqueous solution (5:90:8; v/v/v) HPLC-ESI-MS	94.87% ~102.45%	0.159~9.052 (ng)	58
N-R1, G-Rg1, G-Re, G-Rf, G-F3, G-Rg2, G-Rh1, G-Rb1, G-Ro, G-Rc, G-Rb2, G-Rb3, CS-IV, CS-Iva, G-Rd, G-Rg3	*Panax japonicas* (PJ), *Panax japonicus* var. major (PM), and *Panax zingiberensis* (PZ)	Extracted by 60% aqueous methanol solutions	Waters C18 column (150 × 3.9 mm i.d., 4.6 μm), room temperature	0~3 min, 20%→23% A; 3~8 min, 30%→35% A; 8~15 min, 35% A; 15~20 min, 35%→60% A; 20~22 min, 60%→80% A; 22~24 min, 80%→95% A; 24~25 min, 95%→20% A. A: acetonitrile; B: 0.05% formic acid aqueous solution. HPLC-ESI-MS/MS	99.25% ~104.10%	0.13~2.22 ($ng \cdot mL^{-1}$)	59
ginsenosides Rg1, 20(S)-Rg2, Re, 20(S)-Rh, Rb1, Rb2, Rd	Tissue extracts from the root and rhizome of Panax ginseng C.A. Mey.	Extracted by methanol	Waters C18 column(100 mm ×2.1 mm i.d., 1.7 μm), room temperature ~20 ℃.	0~3 min, 10%→20% B; 3~25 min, 20%→38% B; 25~30 min, 38%→85% B; 30~30.1 min, 85%→100% B; 30.1~32 min, 100% B; 32~32.1 min 100%→10% B. A: formic acid aqueous solution; B: acetonitrile containing 0.1% formic acid. UPLC-QTOF-MS	–	6.08~108.72 ($ng \cdot mL^{-1}$)	60
Rg1 and its metabolites	Sprague-Dawley rat bile, urine, and feces	Extracted by methanol	Shim-Pack XR-ODS Ⅱ (75 × 2 mm, 2.3 μm) column, 40 ℃.	0~7 min, 22%→80% B; 7~7.01 min, 80%→22%; 7.01~10 min, 22%→22% B. A: 0.05% formic acid aqueous solution; B: 0.05% formic acid in acetonitrile. HPLC-MS/MS	Rg1, ginsenoside Rh1 (Rh1), and protopanaxatriol (Ppt) in bile, urine, and feces ≥ 70%. The fecal excretion recoveries of Rg1, Rh1, and Ppt, 22.19% ~40.11%. Rg1 in bile, 6.88%; Rh1 and Rg1in Urinary excretion 0.04% ~0.09%.	–	61
Rg1, Re, Rf, Rg2, Rb1, Rc, Rb2, Rd	Kang'ai injection	Aqueous two-phase system based Deep eutectic solvent and K_2HPO_4 solution	Agilent Zorbax SB-C18 column (250×4.6 mm i.d., 5 μm), 30 ℃	0~34 min, 19.2% A; 34~35 min, 19.2%→28.0% A; 35~48 min, 28.0% A; 48~56 min, 28.5% A; 56~72 min, 36.0% A. A: acetonitrile; B: 0.1% phosphoric acid aqueous solution. HPLC-DAD: 203 nm	92.7%~110.8%	0.3~1.5 ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	62

由于 UV 价格低廉、操作简便、检测灵敏度较高,通常被应用于简单基质中样品的检测,是测定人参皂苷类化合物的主力检测器[64]。Xu 等[65]采用 HPLC 在 203 nm 波长条件下对人参主根的周皮、表皮及中柱中 8 种人参皂苷进行分离检测,发现周皮中人参皂苷含量(≥ 25 $mg \cdot g^{-1}$)分别为表皮及中柱中含量的 4.6 及 74 倍。在人参皂苷的检测中,UV 的不足之处在于,由于待测化合物的分子结构中缺少共轭双键等生色团,检测波长通常介于 200~205 nm,检测结果受溶剂干扰严重。

ELSD 属于通用型检测器,适用于紫外吸收很弱的人参皂苷类化合物的检测。Kwon 等[66]采用 HPLC-ELSD 测定越南野生人参中紫外响应较弱的 OT 类化合物,共检出 17 种以 OT 为主的人参皂苷类化合物。Park 等[67]采用 HPLC-ELSD 对 9 种人参皂苷类化合物进行有效分离检测,并考察了流动相组成、洗脱条件等因素对 ELSD 检测器的影响。Yu 等[68]以 $FeCl_3$ 作为催化剂,促进高含量低活性的 Rb1 转化为低含量高活性的珍贵人参皂苷类化合物;并采用 HPLC-ELSD 对产物进行分离检测,除 Rb1 外,共测得 6 种 Rk1 等人参皂苷类化合物;证实催化反应成功完成,为低含量珍贵人参皂苷类化合物的合成提供了有力指导,但是,其不足之处在于检测灵敏度低,检测时间较长。

相比于上述两种检测器,MS 或 MS/MS 具有更高的检测灵敏度(ng 以下)[69, 70]、高通量、高分辨率、强选择性等优势[69],可鉴定人参的分子结构,在近期的中药分析应用中日趋广泛[15, 71, 72]。Popovich 等[14]采用 LC-QTOF-MS/MS 在 40 min 内实现了 102 种人参皂苷类化合物的分离检测;并测出人参主根、根须、根茎、茎、叶部位的人参皂苷种类数量分别是 76、69、74、44、57,发现生长 13 年的人参根部人参皂苷含量最丰富,生长 14 年的人参茎叶中人参皂苷含量最丰富。

3.2 超高效液相色谱法(UPLC)

随着液相色谱泵耐压性能的改善,UPLC 的应用得到推广,相比于 HPLC,UPLC 的分析速度更快[20]。最近,Yang 等[58]采用超高效液相色谱串联二极管阵列检测器及飞行时间质谱检测器(UPLC-DAD-QTOF-MS/MS)在 10 min 内实现了 131 种人参皂苷类化合物有效分离检测。串联质谱(MS)分析复杂中药优点主要是:分析速度快,分辨率高,灵敏度高[5]。

Kuang 等[20]采用超高效液相色谱-电喷雾二级质谱联用技术(UPLC-ESI-FT-MS),首次检测出红毛七粉末中 23 种丙二酰三萜烯皂苷类化合物。Yu 等[57]采用 UPLC-ELSD 在 15 min 内实现芪参益气滴丸中 5 种人参皂苷类化合物的分离检测。

3.3 气相色谱法(GC)

GC 适用于分离检测挥发性和半挥发性的小分子化合物[73],Tang 等[74]采用 GC-MS 对人参及西洋参根、茎、叶组织的初级代谢产物进行分离分析,最终检测出 149 种化合物,主要包括 14 种糖类、39 种酸类、14 种醇类、29 种氨基酸和 48 种未知及未分类化合物。Wang 等[75]采用 GC-MS 从人参中测出 91 种以挥发性萜烯类和醇类芳香类化合物为主的物质,并发现人参芳香类化合物含量与其生长年限相关。Qi 等[76]采用 GC-MS 对比研究了高丽参和西洋参的代谢产物。Tang 等[77]采用 GC-MS 对人参的叶、茎、叶柄、侧根、主根的代谢产物进行检测,测出代谢产物种类数目分别是 30、16、20、36、31。

在人参皂苷类化合物的分离检测中,GC 对待测样品具有一定挥发性的要求并且要求检测前衍生化反应[78, 79],GC 多应用于人参皂苷类化合物代谢产物的检测。

3.4 其他检测方法

(1)薄层色谱法(TLC)

TLC 是一种非常简便快捷的分离及定性检测方式,该技术对人参皂苷类化合物的分析始于 80 年代初期。Paik 等[80]以 $V_{CHCl_3}:V_{CH_3OH}:V_{H_2O}=65:35:10$ 的混合溶液为展开剂,将 Rb1 酶解液中 Rb1、Rd、Rg3、Rh2 等化合物在 $60F_{254}$ 硅胶薄层色谱板上展开,以 10% 硫酸溶液为显色剂,通过颜色变化定性描述酶解反应程度。在人参皂苷类化合物的检测中,TLC 的不足之处:(1)难以实现成分复杂的样品(十几至几十种组分)的分离;(2)难以实现精确定量。

(2)酶联免疫分析法(ELISA)

ELISA 基于抗原-抗体特异性识别作用,将人参皂苷类化合物与对应抗体进行结合,从而测定该类化合物含量,Qu 等[81]制备了人参皂苷 Rh1 的单克隆抗体,并将其应用于中药中人参皂苷 Rh1 和 Rg2 的测定。相比于上述几种分析方法,ELISA 的优势在于样品前处理过程简单、易操作、特异性强、环保、样品用量少(几微升)、适用于大批量痕量样品的快速检测。该方法的弊端在于复杂样品多种成分之间相互干扰,易出现假阳性结果。

(3)质谱成像技术(MSI)

在人参皂苷类化合物的分析测定中,传统的检测方法通常需要复杂的样品预处理过程,该过程占据分析过程用时的 60% 以上,因此,寻求简单快速的分析方法引发科研工作者的广泛关注。质谱成像技术无需复杂的样品预处理步骤,有利于研究物质在复杂基质中的空间分布。

最近,Liu 等[82]采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱成像技术(MALDI-TOF-MSI)对不同生长年限的人参根切片进行分析,检出人参皂苷类化合物总计 31 种,PPD、PPT、OA 及其他种类人参皂苷类化合物的数量分别是 20、7、1、3 种,可有效鉴定不同生长年限的人参根。质谱成像技术具有一系列

优点[83]:快速(几十秒)、空间分辨率高(微米级)、灵敏度高(与 MS 相当)、节省样品(切片厚度几十微米)等。因此,质谱成像技术在珍贵中药材检测中展现出巨大的开发潜力。

综上所述,在人参皂苷类化合物的分析检测中,HPLC 及 UPLC 联用各类检测器是最为常用的方式。虽然 TLC 难以实现准确定量,但具有操作过程简单、成本低廉的优势,目前仍被广泛使用。GC 检测灵敏度高,但该技术对分析对象有一定挥发性的要求限制了其在人参皂苷类化合物分析检测中的应用,多应用于人参皂苷类化合物代谢产物的分析检测。ELISA 适合微量样品的快速检测,但检测结果易受结构类似化合物干扰。质谱成像技术具有较高的时空分辨率,作为一种新兴技术吸引着人们不断探索。

4 结论与展望

人参皂苷类化合物具有繁多的化学分子结构,结构差异导致其药理活性差异明显。近年来,科研工作者发展了多种样品前处理及检测方法,该类方法对实现人参皂苷类化合物的定性定量分析具有重要意义。

虽然现有的样品前处理技术及分析方法在人参皂苷类化合物的分析测定方面取得了很好的结果,但仍然存在一些问题,如溶剂提取过程所用试剂污染环境、提取不充分,检测过程耗时等。因此,在未来我们应当向以下几个方向不断努力:(1)在样品前处理方面,发展切实可行的处理方法,尽量减少样品前处理过程引入新的杂质;(2)发展集成化、易操作的样品前处理-分析测试在线联用技术,节省能源及人力;(3)寻求绿色环保无毒的溶剂,提升食用安全性及减少环境污染。

参 考 文 献

[1] Gurung B, Bhardwaj P K, Rai A K, Sahoo D. Nat. Prod. Res., 2018, 32: 234.

[2] Gao Y L, Wang T, Wang G F, Li G S, Sun C F, Jiang Z M, Yang J R, Li Y S, You Y L, Wu X R, Sun L Q, Wang H B, Li C M, Tian J W, Zhu J, Wang K Z. Cho S. Food Chem. Toxicol., 2019, 131: 110578.

[3] Wang W Y, Ni Y Y, Wang L, Che X, Liu W H, Meng Q G. Xenobiotica, 2015, 45: 385.

[4] Ren Q W, Yang G Q, Guo M Q, Guo J W, Li Y, Lu J, Yang Q, Tang H H, Li Y, Fang X J, Sun Y X, Qi J G, Tian J W, Wang H B. Eur. J. Med. Chem., 2019, 161: 118.

[5] Xu X F, Gao Y, Xu S Y, Liu H, Xue X, Zhang Y, Zhang H, Liu M N, Xiong H, Lin R C, Li X R. J. Ginseng Res., 2018, 42: 277.

[6] Liu Z Y, Zhang H Y, Bi Y, Liu X X, Lu J, Zhang X C, Xu J Y, Wang C Z, Yuan C S. Nat. Prod. Res., 2017, 31: 1523.

[7] Liu F, Ma N, Xia F B, Li P, He C W, Wu Z Q, Wan J B. J. Ginseng Res., 2019, 43: 105.

[8] Song Y Q, Zhao F, Zhang L M, Du Y, Wang T, Fu F H. Fitoterapia, 2013, 91: 173.

[9] 杨刚强(Yang G Q), 李阳(Li Y), 杨青(Yang Q), 岳馨(Yue X), 姚雷(Yao L), 姜永涛(Jiang Y T). 有机化学(Chinese Journal of Organic Chemistry), 2017, 37: 1530.

[10] An K S, Choi Y O, Lee S M, Ryu H Y, Kang S J, Yeon Y, Kim Y R, Lee J G, Kim C J, Lee Y J, Kang B J, Choi J E, Song K S. Nutrients, 2019, 11: 1120.

[11] Zhang J Q, Zhang Q, Xu Y R, Li H X, Zhao F L, Wang C M, Liu Z, Liu P, Liu Y N, Meng Q G, Zhao F. Planta Med., 2019, 85: 292.

[12] Zhang L N, Wang S Y, Qu B Q, Chi H J, Quan Y L, Wu X H. J. Pharmaceut. Biomed., 2019, 170: 48.

[13] Chan T W D, But P P H, Cheng S W, Kwok M Y I, Lau F W, Xu H X. Anal. Chem., 2000, 72: 1281.

[14] Chen W, Balan P, Popovich D. G., J. Ginseng Res., 2019, DOI:10.1016/j.jgr.2019.04.007.

[15] Huang X, Liu Y, Zhang Y, Li S P, Yue H, Chen C B, Liu S Y. J. Ginseng Res., 2019, 43: 27.

[16] Liu J, Xu Y R, Yang J J, Wang W Z, Zhang J Q, Zhang R M, Meng Q G. J. Ginseng Res., 2017, 41: 373.

[17] Bi Y, Ma C, Zhou Z W, Zhang T T, Zhang H Y, Zhang X C, Lu J, Meng Q G, Lewis P J, Xu J Y. Rec. Nat. Prod., 2015, 9: 356.

[18] Bi Y, Yang J, Ma C, Liu Z Y, Zhang T T, Zhang X C, Lu J, Meng Q G. Pharmazie, 2015, 70: 213.

[19] Kim S J, Shin J Y, Ko S K. J. Ginseng Res., 2016, 40: 86.

[20] Xia Y G, Liang J, Li G Y, Yang B Y, Kuang H X. J. Mass Spectrom., 2016, 51: 947.

[21] Hu Y P, Cui X M, Zhang Z J, Chen L J, Zhang Y M, Wang C X, Yang X Y, Qu Y, Xiong Y. Molecules, 2018, 23: 1206.

[22] Munir M T, Kheirkhah H, Baroutian S, Quek S Y, Young B R. J. Clean. Prod., 2018, 183: 487.

[23] Zhang Y, Li Y, Liu Z, Zhong L, Chi R, Yu J. Wuhan University Journal of Natural Sciences, 2015, 20: 247.

[24] Zhong Z X, Li G K, Luo Z B, Zhu B H. Talanta, 2019, 194: 46.

[25] Choi P, Park J Y, Kim T, Park S. H, Kim H. K, Kang K S, Ham J. J. Funct. Foods, 2015, 14: 613.

[26] Wu W, Sun L, Zhang Z, Guo Y, Liu S. J. Pharmaceut. Biomed., 2015, 107: 141.

[27] Lee J H, Ko M J, Chung M S. J. Supercrit. Fluids, 2018, 133: 177.

[28] Wan H D, Li D. RSC Adv., 2015, 5: 78874.

[29] Palaniyandi S A, Damodharan K, Lee K W, Yang S H, Suh J W. Biotechnol. Bioprocess Eng., 2015, 20: 608.

[30] Ganzler K, Salgo A, Valko K. J. Chromatogr., 1986, 371: 299.

[31] Yao H, Li X, Liu Y, Wu Q, Jin Y. J. Ginseng Res., 2016, 40: 415.

[32] Yoon S H, Nam Y M, Hong J T, Kim S J, Ko S K. J. Ginseng Res., 2016, 40: 300.

[33] Biswas T, Ajayakumar P V, Mathur A K, Mathur A Nat. Prod. Res., 2015, 29: 1256.

[34] Liu Z, Xia J, Wang C Z, Zhang J Q, Ruan C C, Sun G Z, Yuan C S. J. Agr. Food Chem., 2016, 64: 5389.
[35] Cui Q, Liu J, Xu W, Kang Y F, Wang X, Li Y, Fu Y J. Clean. Prod., 2019, 210: 1507.
[36] Zhang Y C, Zhang J X, Liu C M, Yu M, Li S N. J. Chromatogr. A, 2017, 1483: 20.
[37] Wang Y H, Li Y, Zhang Y, Feng G, Yang Z X, Guan Q X, Wang R, Han F J. Molecules, 2017, 22: 17.
[38] Sunwoo H H, Gujral N, Huebl A C, Kim C T. Food Bioprocess Tech., 2014, 7: 1246.
[39] Zhong F L, Ma R, Jiang M L, Dong W W, Jiang J, Wu S Q, Li D H, Quan L H. J. Microbiol. Biotechnol., 2016, 26: 1661.
[40] Liu F, Ma N, He C W, Hu Y J, Li P, Chen M W, Su H X, Wan J B. J. Ginseng Res., 2018, 42: 149.
[41] Wan J Y, Wang C Z, Liu Z, Zhang Q H, Musch M W, Bissonnette M, Chang E B, Li P, Qi L W, Yuan C S. J. Chromatogr. B, 2016, 1015: 62.
[42] Zheng H R, Chu Y, Zhou D Z, Ju A C, Li W, Li X, Xia Y, Polachi N, Li D K, Zhou S P, Sun H, Liu C X. J. Chromatogr. B, 2018, 1072: 282.
[43] Yang Q, Li J H, Wang X Y, Xiong H, Chen L X. Anal. Chem., 2019, 91: 6561.
[44] 明魏娜(Ming W N), 王晓艳(Wang X Y), 明永飞(Ming Y F), 李金花(Li J H), 陈令新(Chen L X). 化学进展(Progress in Chemistry), 2016, 28: 552.
[45] Wang L Y, Li J H, Wang J N, Guo X T, Wang X Y, Choo J, Chen L X. J. Colloid Interf. Sci., 2019, 541: 376.
[46] Xing R R, Wen Y R, Dong Y R, Wang Y J, Zhang Q, Liu Z. Anal. Chem., 2019, 91: 9993.
[47] BelBruno J J. Chem. Rev., 2019, 119: 94.
[48] Culver H R, Peppas N A. Chem. Mat., 2017, 29: 5753.
[49] 张 伟(Zhang W), 孙成贺(Sun C H), 王绍艳(Wang S Y), 李芊(Li Q)1,王英平(Wang Y). 精细化工(Fine Chemicals), 2015, 32: 1102.
[50] Sun C H, Wang J H, Huang J J, Yao D D, Wang C Z, Zhang L, Hou S Y, Chen L N, Yuan C S. Polymers, 2017, 9: 18.
[51] Liu Q S, He J, Zhou W B, Gu Y L, Huang H Q, Li K Q, Yin X Y. J. Sep. Sci., 2017, 40: 744.
[52] Cai Q Z, Yang Z Y, Chen N, Zhou X M, Hong J L. J. Chromatogr. A, 2016, 1455: 65.
[53] 李健(Li J), 官亦标(Guan Y B), 傅凯(Fu K), 苏岳锋(Su Y F), 包丽颖(Bao L Y), 吴锋(Wu F). 化学进展(Progress in Chemistry),2014, 26: 1233.
[54] 韩强(Han Q), 王宗花(Wang Z), 张晓琼(Zhang X), 丁明玉(Ding M). 化学进展(Progress in Chemistry), 2014, 26: 820.
[55] 苗 瑞(Miao R), 吴冬雪(Wu D X), 王秋颖(Wang Q Y), 赵幻希(Zhao H X), 李 雪(Li X), 修 洋(Xiu Y), 刘淑莹(Liu S Y). 高等学校化学学报(Chemical Journal of Chinese Universities), 2018, 39: 2178.
[56] He Y D, Wei Y Q, Sun X J, Zhou G W, Zheng J. Anal. Methods, 2018, 10: 2464.
[57] Peng J J, Li D X, Huang J Y, Tong L, Yu B Y. Chin. Herb. Med., 2017, 9: 267.
[58] Wang H P, Zhang Y B, Yang X W, Zhao D Q, Wang Y P. J. Ginseng Res., 2016, 40: 382.
[59] Du Z X, Li J H, Zhang X, Pei J, Huang L F. Molecules, 2018, 23: 20.
[60] Liang Z T, Chen Y J, Xu L, Qin M J, Yi T, Chen H B, Zhao Z Z. J. Pharmaceut. Biomed., 2015, 105: 121.
[61] He C Y, Feng R, Sun Y P, Chu S F, Chen J, Ma C, Fu J, Zhao Z X, Huang M, Shou J W, Li X Y, Wang Y Z, Hu J F, Wang Y, Zhang J T. Acta Pharm. Sin. B, 2016, 6: 593.
[62] Li P, Zhao P Y, Liu W J, Jiang Y F, Wang W J, Bao L Y, Jin Y R, Li X W. Microchem. J., 2018, 137: 302.
[63] Wang Y L, Sha C J, Liu W H, Gai Y Y, Zhang H Y, Qu H L, Wang W S. J. Pharmaceut. Biomed., 2012, 62: 87.
[64] Biswas T, Kalra A, Mathur A K, Lal R K, Singh M, Mathur A. Appl. Microbiol. Biot., 2016, 100: 4909.
[65] Zhang J J, Su H, Zhang L, Liao B S, Xiao S M, Dong L L, Hu Z G, Wang P, Li X W, Huang Z H, Gao Z M, Zhang L J, Shen L, Cheng R Y, Xu J, Chen S L. Molecules, 2017, 22: 13.
[66] Yunusova N, Kim J Y, Lee G J, Hong J Y, Shin B K, Cai S Q, Piao X L, Park J H, Kwon S W. Int. J. Food Sci. Tech., 2015, 50: 1607.
[67] Lee G J, Shin B K, Yu Y H, Ahn J, Kwon S W, Park J H. J. Pharmaceut. Biomed., 2016, 128: 158.
[68] Yu H S, Wang Y, Liu C Y, Yang J M, Xu L Q, Li G H, Song J G, Jin F X. Chem. Pharm. Bull., 2018, 66: 901.
[69] Guo C, Li D M, Liu C M, Guo Z P, Chen Y. Anal. Bioanal. Chem., 2018, 410: 4293.
[70] 张俊杰(Zhang J J), 贾金萍(Jia J P), 秦雪梅(Qin X M). 分析测试学报(Journal of Instrumental Analysis), 2017, 36: 579.
[71] Cheng C S, Wu W R, Huang B M, Liu L, Luo P, Zhou H. Phytochem. Lett., 2016, 17: 194.
[72] Wu W, Jiao C X, Li H, Ma Y, Jiao L L, Liu S Y. Phytochem. Anal., 2018, 29: 331.
[73] Wang Y P, Choi H K, Brinckmann J A, Jiang X, Huang L F. J. Chromatogr. A, 2015, 1426: 1.
[74] Liu J, Liu Y, Wang Y, Abozeid A, Zu Y G, Tang Z H. J. Pharmaceut. Biomed., 2017, 135: 176.
[75] Cui S Q, Wang J, Yang L C, Wu J F, Wang X L. J. Pharmaceut. Biomed., 2015, 102: 64.
[76] Yang L, Yu Q T, Ge Y Z, Zhang W S, Fan Y, Ma C W, Liu Q, Qi L W. Sci. Rep., 2016, 6: 11.
[77] Liu J, Liu Y, Wang Y, Abozeid A, Zu Y G, Zhang X N, Tang Z H. Molecules, 2017, 22: 14.
[78] Park S E, Seo S H, Lee K I, Na C S and Son H S J. Ginseng Res., 2018, 42: 57.
[79] Sun Y F, Chen S Q, Wei R M, Xie X, Wang C C, Fan S H, Zhang X, Su J, Liu J, Jia W, Wang X Y. Food Funct., 2018, 9: 3547.
[80] Chang K H, Jo M N, Kim K T, Paik H D. J. Ginseng Res., 2014, 38: 47.
[81] Yan X, Zhao Y, Zhang Y, Qu H H. Molecules, 2017, 22: 29.
[82] Bai H R, Wang S J, Liu J J, Gao D, Jiang Y Y, Liu H X, Cai Z W. J. Chromatogr. B, 2016, 1026: 263.
[83] Buchberger A R, DeLaney K, Johnson J, Li L J. Anal. Chem., 2018, 90: 240.