

高效液相色谱法同时测定灵芝中10种灵芝三萜的含量

林志香, 郑莹媛

(厦门市食品药品质量检验研究院, 福建 厦门 361012)

摘要:本研究旨在建立一种同时测定灵芝中10种灵芝三萜成分的高效液相色谱法(HPLC)。采用乙醇回流提取样品,经Phenomenex C₁₈色谱柱分离,以乙腈-0.075%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱(流速0.3 mL/min,检测波长257 nm)。方法验证显示:10种目标成分在0.01~0.10 mg/mL浓度范围内线性关系良好,精密度RSD≤1.67%,定量限为0.1~0.5 mg/kg;加热回流提取的回收率(97.2%~102%)显著优于超声提取。应用该方法成功测定了24批灵芝样品中灵芝三萜含量,证实其稳定性与可靠性。本方法实现了10种灵芝三萜成分的同步分析,为完善灵芝药食产品质量标准提供了技术支持。

关键词:高效液相色谱法;灵芝酸类;多组分同步分析;质量控制

中图分类号:O657.72 文献标识码:A 文章编号:1009-8143(2026)03-0037-06

Doi:10.3969/j.issn.1009-8143.2026.03.08

Simultaneous Determination of the Content of 10 Types of Triterpenoids in *Ganoderma lucidum* by High-Performance Liquid Chromatography

Lin Zhi-xiang, Zheng Ying-yuan

(Xiamen Institute for Food and Drug Control, Ximen, Fujian 361012, China)

Abstract: This study aims to establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of 10 triterpenoid components in *Ganoderma lucidum*. Samples were extracted via ethanol reflux, separated on a Phenomenex C₁₈ column, and subjected to gradient elution using acetonitrile-0.075% phosphoric acid solution as the mobile phase (flow rate: 0.3 mL/min; detection wavelength: 257 nm). Method validation demonstrated good linearity for all ten target components within the concentration range of 0.01-0.10 mg/mL, with precision RSD≤1.67% and quantification limits of 0.1 - 0.5 mg/kg. The recovery rate of heat reflux extraction (97.2%-102%) was significantly superior to ultrasonic extraction. This method has been successfully applied to determine the content of triterpenoids in 24 batches of *Ganoderma lucidum* samples, confirming its stability and reliability. This method achieves simultaneous analysis of 10 triterpenoid components in *Ganoderma lucidum*, providing technical support for improving the quality standards of *Ganoderma lucidum* medicinal and edible products.

Key words: HPLC; *Ganoderma* triterpenoids; simultaneous multi-component analysis; quality control

引言

灵芝三萜作为灵芝中一类具有高度结构多样性的四环三萜类化合物,是国际公认的灵芝标志性活性成分,其结构特征与抗炎、抗氧化、调节代谢及靶向调控细胞信号通路等生物活性密切相关,直接承载着灵芝“药食同源”的核心功效^[1-3]。灵芝三萜

含量与组成不仅直接关联灵芝的药效强度,更被视为评价灵芝药材及相关产品质量的核心指标,因此建立可靠的灵芝三萜测定方法,是构建灵芝药材及其制品质量控制标准的基础,可有效解决当前产业中因成分含量不明导致的质量参差不齐、药效评价缺乏量化依据等问题^[4-5]。目前对灵芝三萜的测定方法主要有以下四种:紫外分光光度法、高效液相

收稿日期:2025-12-04

第一作者简介:林志香(1994—),女,硕士,主要研究方向为食品安全检测。E-mail:1534565233@qq.com

色谱法^[6-7]、超高效液相色谱-串联质谱法、高效液相色谱-电喷雾-质谱(HPLC-ESI-MS)法^[8]。

因灵芝三萜标准物质较贵不易获得,现有研究中用高效液相色谱法测定 10 种灵芝三萜的含量的方法多依赖单一成分(如灵芝酸 A)的定量且检测时间较长(1.5 h 左右)^[9-11]。本研究通过改变灵芝样品的前处理方法、流动相的组成及柱温条件,建立了一种高效液相色谱法同时测定灵芝中 10 种灵芝三萜的含量,该方法能够在 1 h 内测定 10 种有效成分,缩短了样品的检测时间,且具有良好的分离效果,准确度及精密性好,为测定灵芝中的有效功能成分提供参考依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪:配有紫外检测器, Waters ARC 型,美国 Waters 公司。

电子分析天平:XRS204 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

全自动平行浓缩仪:AutoEVA-20PLUS 型,睿科集团(厦门)股份有限公司。

甲醇、乙腈、无水乙醇:HPLC 级,德国 Merck。

磷酸:AR,沪试。

10 种灵芝三萜的分子式、CAS 号和标准品信息于表 1 所示:

表 1 10 种灵芝三萜的分子式、CAS 号和标准品信息

灵芝三萜种类	英文名称	分子式	CAS 号	纯度	生产商
灵芝烯酸 C	Ganoderenic acid C	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	100665-42-7	98.0%	ANPEL
灵芝酸 C ₂	Ganoderic acid C ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	98296-48-1	98.0%	ChromaDex
灵芝酸 G	Ganoderic Acid G	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	98665-22-6	96.8%	BePure
灵芝烯酸 B	Ganoderenic acid B	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	100665-41-6	98.0%	ANPEL
灵芝酸 B	Ganoderic acid B	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	81907-61-1	98.0%	源叶生物
灵芝酸 A	Ganoderic Acid A	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	81907-62-2	98.0%	ANPEL
灵芝酸 H	Ganoderic acid H	C ₃₂ H ₄₄ O ₉	98665-19-1	97.0%	源叶生物
灵芝烯酸 D	Ganoderenic acid D	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	100665-43-8	98.0%	源叶生物
灵芝酸 D	Ganoderic acid D	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	108340-60-9	98.0%	ANPEL
灵芝酸 F	Ganoderic acid F	C ₃₂ H ₄₂ O ₉	98665-15-7	98.0%	ANPEL

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

取灵芝样品,用研磨机粉碎后混匀,过 20 目筛,密封,冷冻保存。称取粉碎混匀后的试样 1.0 g(精确至 0.01 g)于 150 mL 锥形瓶中,加入 80 mL 乙醇,80℃加热回流提取 45 min,过滤,合并滤液,平行浓缩仪 30℃减压干燥,浓缩至约 5 mL,转移至刻度试管,氮气吹干,加入 1.00 mL 甲醇溶解,涡旋混匀,过微孔滤膜(0.22 μm),供液相色谱分析(必要时,试样测定液用甲醇进行适当稀释,使灵芝三萜的质量浓度在 0.01~0.10 mg/mL 范围内)。

1.2.2 标准溶液的配制

(1)标准储备液:准确称取按其纯度折算为 100% 质量的灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 C₂、灵芝酸 D、灵芝酸 F、灵芝酸 G、灵芝酸 H 和灵芝烯酸 B、灵芝

烯酸 C、灵芝烯酸 D 各 10 mg(精确至 0.1 mg),分别加甲醇溶解并转移至 10 mL 容量瓶中,定容至刻度,混匀,得到浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液。2℃~8℃避光保存,有效期为 3 个月。

(2)标准系列工作液:分别移取 0.05、0.10、0.20、0.40、0.50 mL 的各灵芝三萜标准溶液于 5 mL 容量瓶中,用甲醇稀释并定容,混匀,配制成 0.01、0.02、0.04、0.08、0.10 mg/mL 混合标准系列工作溶液,临用时配制。

1.2.3 测定色谱条件

色谱柱 Phenomenex Kinetex C₁₈(150 mm×3.0 mm, 粒径 2.6 μm),流速 0.3 mL/min,柱温 30℃,检测器为紫外检测器或二极管阵列检测器,检测波长 257 nm,进样量 10 μL,参考洗脱梯度为流动相 A(0.075% 磷酸溶液),流动相 B(乙腈),梯度洗脱条件见表 2。

表2 流动相梯度洗脱条件

时间/min	A/%	B/%
0.0	80	20
3.0	73.5	26.5
34.0	73.5	26.5
52.0	61.5	38.5
53.0	80	20
70.0	80	20

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

实验比较了 Phenomenex Kinetex C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 2.6 μm)、Agilent T3 (150 mm×3.0 mm, 2.6 μm) 两种不同色谱柱对 10 种灵芝三萜峰型和出峰情况的影响, Phenomenex Kinetex C₁₈ 可将 10 种灵芝三萜有效分离, 使用 Agilent T3 柱子时灵芝酸 A 和灵芝酸 H 没有分开, 且灵芝酸 F 未出峰, 综上选用 Phenomenex Kinetex C₁₈ 柱子。考察柱温 30℃、35℃ 下 10 种灵芝三萜的响应值及峰型的尖锐度, 柱温 35℃ 时只有 8 个峰, 且各峰的响应相对于柱温 30℃ 较差, 最终采取 30℃ 的柱温进行测定, 分析谱图如图 1 所示。实验还考察乙腈-0.075% 磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水三种不同流动相, 使用乙腈-水时峰型较宽, 其他两种溶剂峰型差不多, 本实验采用乙腈-0.075% 磷酸溶液的流动相对样品进行梯度洗脱, 并分别按照 1.2.3 中的色谱条件对混合标准溶液和灵芝样品溶液进行测定, 通过图 2 可知 10 种灵芝三萜的分离效果较好, 出峰时间稳定, 可用于实际样品的测定。

2.2 线性关系验证

按照 1.2.2 中标准系列工作液的配制方法配制 0.01、0.02、0.04、0.08、0.10 mg/mL 的 10 种灵芝三萜混合标准系列工作液。按照 1.2.3 中的色谱条件进行测定, 测算并记录各灵芝三萜的峰面积, 以峰面积为纵坐标(Y), 各灵芝三萜的浓度为横坐标(X)绘制标准曲线, 计算线性回归方程。结果见表 3, 可知 10 种灵芝三萜在 0.01~0.10 mg/mL 浓度范围内线性关系良好。

2.3 精密度试验

准确吸取 0.10 mg/mL 的 10 种灵芝三萜混合标准溶液, 按 1.2.3 中的色谱条件重复进样 6 次, 记录

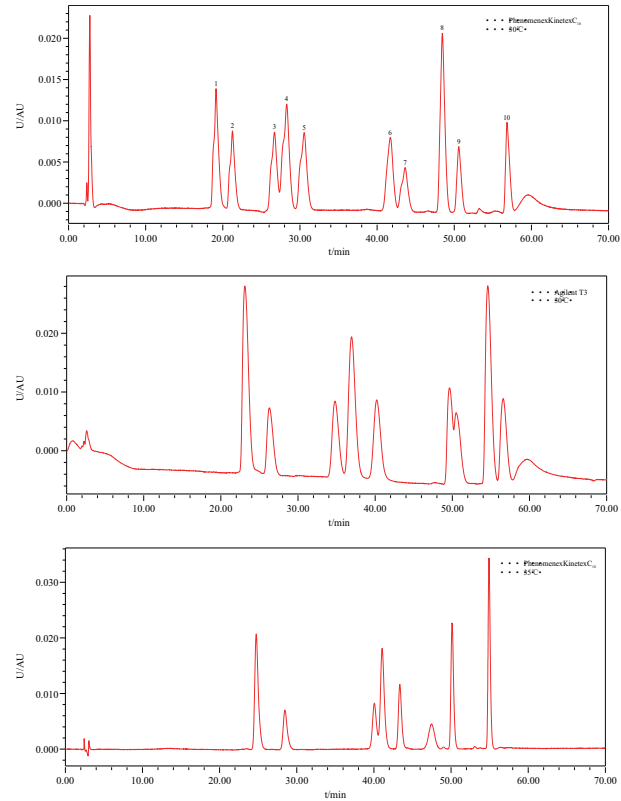


图1 不同色谱柱和不同柱温下10种灵芝三萜的分析情况图

注: 1-灵芝烯酸C; 2-灵芝酸C₂; 3-灵芝酸G; 4-灵芝烯酸B; 5-灵芝酸B; 6-灵芝酸A; 7-灵芝酸H; 8-灵芝烯酸D; 9-灵芝酸D; 10-灵芝酸F。

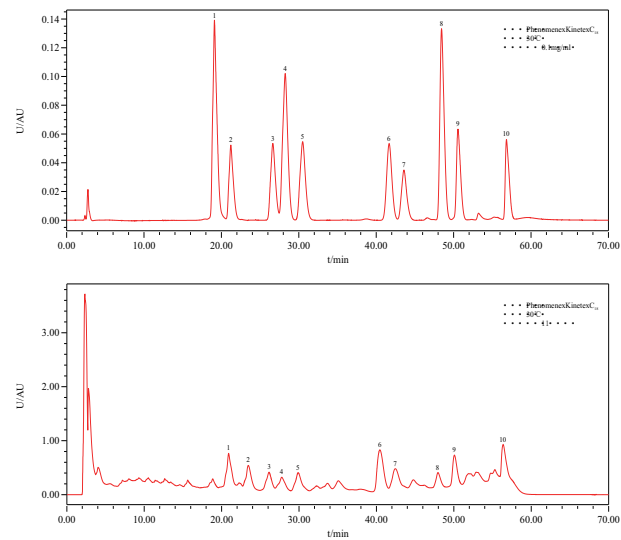


图2 标准溶液(0.1 mg/mL)和样品(编号11)中10种灵芝三萜的分析情况图

注: 1-灵芝烯酸C; 2-灵芝酸C₂; 3-灵芝酸G; 4-灵芝烯酸B; 5-灵芝酸B; 6-灵芝酸A; 7-灵芝酸H; 8-灵芝烯酸D; 9-灵芝酸D; 10-灵芝酸F。

表3 10种灵芝三萜线性关系验证

灵芝三萜种类	回归方程	R^2
灵芝烯酸C	$Y=5.56\times10^7X-2.02\times10^5$	0.999 5
灵芝酸C ₂	$Y=2.05\times10^7X+3.29\times10^3$	0.999 9
灵芝酸G	$Y=2.32\times10^7X+2.82\times10^4$	0.997 5
灵芝烯酸B	$Y=2.69\times10^7X+1.12\times10^4$	0.999 8
灵芝酸B	$Y=4.97\times10^7X-3.28\times10^4$	0.999 4
灵芝酸A	$Y=2.59\times10^7X+5.06\times10^3$	0.998 8
灵芝酸H	$Y=1.71\times10^7X-1.24\times10^4$	0.999 2
灵芝烯酸D	$Y=5.25\times10^7X-4.25\times10^4$	0.997 9
灵芝酸D	$Y=2.44\times10^7X-9.88\times10^4$	0.997 8
灵芝酸F	$Y=1.87\times10^7X-1.06\times10^4$	0.997 5

各灵芝三萜的峰面积和保留时间,并计算RSD值。结果见表4,可见该方法精密度良好。

2.4 定量限试验

称取灵芝样品(编号CZ-11),按照1.2.1中的前处理方式进行处理,1.2.3中的色谱条件上机测定,计算10种灵芝三萜的定量限。当灵芝样品取样量为1 g,定容体积为1 mL时,灵芝烯酸C、灵芝烯酸D的定量限为0.1 mg/kg;灵芝酸A、灵芝酸B、灵芝酸C₂、灵芝酸D、灵芝酸F、灵芝酸G和灵芝烯酸B定量限为0.3 mg/kg;灵芝酸H的定量限为0.5 mg/kg。

2.5 回收率试验

本试验比较了加入80 mL乙醇后,通过80℃加热回流提取45 min以及超声提取45 min对灵芝中10种灵芝三萜回收率的影响。以样品编号CZ-1为

表4 10种灵芝三萜峰面积和保留时间的RSD值
(n=6)

灵芝三萜种类	峰面积的RSD(%)	保留时间的RSD(%)
灵芝烯酸C	1.25	0.10
灵芝酸C ₂	1.08	0.20
灵芝酸G	1.61	0.20
灵芝烯酸B	1.58	0.20
灵芝酸B	0.97	0.20
灵芝酸A	0.88	0.10
灵芝酸H	1.63	0.10
灵芝烯酸D	1.36	0.10
灵芝酸D	1.67	0.10
灵芝酸F	1.11	0.10

加标样品,分别加入0.04 mg/g 10种灵芝三萜混合标准品溶液,回收率结果见表5,可知加热回流45 min回收率较好,满足实验要求。

2.6 样品测定

选取24种不同产地灵芝样品(厂家提供),按照1.2.1中的方法前处理,1.2.3中的色谱条件进行测定。结果如表6所示,表明该方法可用于实际样品的检测。

3 结论

本研究成功建立了同时测定灵芝中10种三萜类成分(灵芝烯酸C、灵芝酸C₂、灵芝酸G、灵芝烯酸B、灵芝酸B、灵芝酸A、灵芝酸H、灵芝烯酸D、灵芝

表5 两种前处理方式下10种灵芝三萜回收率情况

灵芝三萜	本底值(mg/g)	超声提取45 min		加热回流45 min	
		测定值(mg/g)	回收率(%)	测定值(mg/g)	回收率(%)
灵芝烯酸C	0.005	0.031	65.0	0.044	97.8
灵芝酸C ₂	0.040	0.065	62.5	0.079	98.0
灵芝酸G	0.148	0.176	70.0	0.188	99.0
灵芝烯酸B	0.017	0.044	67.5	0.056	98.5
灵芝酸B	0.013	0.042	72.5	0.052	97.2
灵芝酸A	0.105	0.131	65.0	0.144	98.8
灵芝酸H	0.130	0.154	60.0	0.169	99.8
灵芝烯酸D	0.071	0.099	70.0	0.112	102
灵芝酸D	0.176	0.201	62.5	0.216	100
灵芝酸F	0.394	0.424	75.0	0.435	102

表 6 24 种不同产地灵芝中 10 种灵芝三萜的含量

(单位: mg/g)

编号	灵芝烯酸 C	灵芝酸 C ₂	灵芝酸 G	灵芝烯酸 B	灵芝酸 B	灵芝酸 A	灵芝酸 H	灵芝烯酸 D	灵芝酸 D	灵芝酸 F
CZ-1	0.005	0.040	0.148	0.017	0.013	0.105	0.130	0.071	0.176	0.394
CZ-2	0.026	0.104	0.409	0.396	0.361	1.327	0.300	0.371	0.781	0.782
CZ-3	0.007	0.025	0.221	0.043	0.100	0.499	0.581	0.164	0.414	0.959
CZ-4	0.020	0.761	0.282	0.074	0.464	1.134	1.290	0.051	0.797	1.502
CZ-5	0.016	0.042	0.377	0.062	0.094	0.888	0.232	0.211	0.681	1.128
CZ-6	0.011	0.046	0.356	0.060	0.074	0.100	0.364	0.063	0.117	0.706
CZ-7	0.005	0.020	0.139	0.025	0.088	0.168	0.177	0.067	0.194	0.804
CZ-8	0.018	0.144	0.187	0.026	0.079	0.173	0.472	0.075	0.156	0.902
CZ-9	0.027	0.343	0.237	0.132	0.202	0.920	0.813	0.194	0.494	0.869
CZ-10	0.034	0.099	0.304	0.215	0.181	0.849	0.271	0.265	0.595	0.845
CZ-11	0.132	1.515	0.720	0.284	0.702	1.438	1.179	0.212	0.922	1.312
CZ-12	0.018	0.689	0.379	0.082	0.456	0.965	1.752	0.054	0.681	1.561
CZ-13	0.071	0.380	0.448	0.371	0.496	2.459	0.432	0.569	1.488	1.513
CZ-14	0.071	0.039	0.165	0.245	0.169	0.987	0.638	0.307	0.514	0.998
CZ-15	0.006	0.022	0.178	0.061	0.131	0.275	0.717	0.085	0.209	1.283
CZ-16	0.021	0.057	0.265	0.012	0.361	0.429	0.414	0.049	0.559	1.353
CZ-17	0.083	0.095	0.273	0.029	0.031	0.204	0.121	0.096	0.212	0.886
CZ-18	0.021	0.420	0.322	0.162	0.495	1.514	0.864	0.115	1.100	1.579
CZ-19	0.008	0.013	0.191	0.047	0.101	0.636	0.487	0.201	0.487	0.758
CZ-20	0.011	0.086	0.419	0.089	0.056	0.795	0.504	0.083	0.627	0.926
CZ-21	0.008	0.015	0.234	0.037	0.114	0.455	0.557	0.114	0.374	0.611
CZ-22	0.026	0.230	0.246	0.061	0.146	0.680	0.976	0.161	0.497	0.734
CZ-23	0.005	0.047	0.186	0.018	0.057	0.279	0.430	0.090	0.261	0.667
CZ-24	0.015	0.099	0.390	0.116	0.299	0.660	0.397	0.238	0.646	0.855

酸 D、灵芝酸 F) 的高效液相色谱分析方法。通过优化前处理流程(80℃乙醇回流提取 45 min)和色谱条件(乙腈-0.075% 磷酸梯度洗脱, 柱温 30℃), 在 1 h 内实现了 10 种灵芝三萜的有效分离。方法学验证表明: 在 0.01~0.10 mg/mL 范围内线性良好($R^2 \geq 0.9975$), 精密度 $RSD \leq 1.67\%$, 加标回收率达 97.2%~102%。该方法显著提高了检测效率, 解决了传统单一成分质控的局限性, 为灵芝药材及其制品的“多指标成分”质量评价体系提供了技术支持。

参考文献

[1] 吴长辉. 灵芝超微粉高效液相色谱特征指纹图谱研究[J]. 中国药业, 2022, 31(18): 79-82.

[2] 温舒然, 马占山, 詹冬玲. 灵芝三萜提取工艺的优化[J]. 吉林大学学报(理学版), 2024, 62(02): 452-463.

[3] 汪丽娜, 蒋昆霞, 关梦瑶, 等. 灵芝 HPLC 指纹图谱研究及其在产地追溯中的应用[J]. 北方药学, 2022, 19(05): 1-5.

[4] 谢昊臻, 胡婷婷, 王佳慧, 等. 基于高分辨质谱技术的植物源性药食同源特色农产品中 10 种农药残留的测定和快速筛查[J]. 化学试剂, 2022, 44(02): 266-272.

[5] 梁锐, 冯娜, 张劲松, 等. HPLC 测定灵芝子实体水提取物及相关产品中三萜的含量[J]. 菌物学报, 2022, 41(02): 309-317.

[6] 梁涵, 张诚贤, 孙梦莹, 等. 离子液体萃取-高效液相色谱法同时测定破壁灵芝孢子粉中 10 种三萜化合物[J]. 分析试验室, 2024, 43(06): 876-880.

[7] 贾红岩, 王亚涛, 张芝华, 等. 高效液相色谱法测定不同产地及品种灵芝三萜类成分的含量[J]. 微生物学通报, 2024, 51(05): 1055-1062.

- 2017, 44(1):238-244.
- [8] 孙立宏. 灵芝成分测定方法研究进展[J]. 天津药学, 2017, 29(4):57-61.
- [9] 黄强燕, 薛平, 李莉. 一测多评法测定灵杞益肝口服液中的4种灵芝酸类成分[J]. 中南药学, 2019, 17(10):1706-1710.
- [10] 罗舒, 宋怡, 罗霞, 等. 灵芝中10种灵芝酸类成分含量一测多评法的建立[J]. 中国药房, 2023, 34(14):1703-1706.
- [11] 李晔. 灵芝提取物中多种三萜的质量控制研究[J]. 海峡药学, 2020, 32(06):31-34.

文后参考文献表排写格式

(参见 GB/T 7714-2015 信息与文献 参考文献著录规则)

<http://www.scal.edu.cn/dxtsgxb/201906120155>

参考文献按在正文中出现的先后次序列表于文后, 表上以“参考文献”居中排作为标识; 参考文献的序号左顶格, 并用数字加方括号表示, 如[1], [2], …, 以与正文中的指示序号格式一致。每一参考文献条目的最后均以“.”结束。各类参考文献条目的编排格式及示例如下。

a. 连续出版物

[序号] 主要责任者. 文献题名[J]. 刊名, 出版年份, 卷号(期号): 起止页码.

示例:

- [1] 袁庆龙, 候文义. Ni-P合金镀层组织形貌及显微硬度研究[J]. 太原理工大学学报, 2001, 32(1):51-53.
- [2] 罗华武, 徐兴烟, 陈丹, 等. 气相色谱法测定粗生物柴油中甲醇含量[J]. 福建分析测试, 2024, 33(03):23-25+31.
- [3] TENOPIR C. Online databases: qualitycontrol[J]. Libraryjournal, 1987, 113(3):124-125.

注: 作者不超过3位应全列出, 姓名之间用逗号“,”隔开; 4位以上作者应写出前3位作者, 再加逗号及“等”或“et al”。英文文献中的作者姓名写法为, 完整姓氏在前, 名字采用缩写字母在后。

b. 专著

[序号] 主要责任者. 文献题名[M]. 出版地: 出版者, 出版年: 起止页码.

示例:

- [1] 刘国钧, 王连成. 图书馆史研究[M]. 北京: 高等教育出版社, 1979: 15-18, 31.
- [2] 陈小华, 等. 固相萃取技术与应用[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2019: 10-13.

c. 论文集

[序号] 主要责任者. 文献题名[C]. 出版地: 出版者, 出版年.

示例: [1] 雷光春. 综合湿地管理: 综合湿地管理国际研讨会论文集[C]. 北京: 海洋出版社, 2012.

d. 学位论文

[序号] 主要责任者. 文献题名[D]. 保存地: 保存单位, 年份.

示例: [1] 张和生. 地质力学系统理论[D]. 太原: 太原理工大学, 1998.

e. 报告

[序号] 主要责任者. 题名: 其他题名: 报告编号[R/OL]. (更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径.

示例: [1] 汤万金, 杨跃翔, 刘文, 等. 人体安全重要技术标准研制最终报告: 7178999X-2006BAK04A10/10.2013 [R/OL]. (2013-09-30) [2014-06-24]. <http://www.nstrs.org.cn/xiangxiBG.aspx?id=41707>.

f. 专利文献

[序号] 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利号[P]. 公告日期或公开日期.

示例: [1] 邓一刚. 全智能节电器: 200610171314.3[P]. 2006-12-13.

g. 国际、国家、行业标准

[序号] 主要责任者. 标准名: 标准编号[S]. 出版地: 出版者, 出版年: 引文页码.

示例:

- [1] 全国信息与文献标准化技术委员会. 信息与文献 都柏林核心元数据元素集: GB/T 25100—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 2-3.

备注: 标准类文献, 于文中首次引用时, 以“标准编号《标准名称》”形式展示, 后续再次引用时可只说明标准编号; 标准类文献正文如果已经列出, 则参考文献列表不再列出。