

基于 UPLC-Q-TOF-MS 的广佛手化学成分快速鉴定研究

钟艳梅¹, 冯毅凡¹, 郭 姣^{2*}

¹广东药学院中心实验室; ²广东药学院中医药研究院 国家中医药管理局高脂血症“调肝降脂”重点研究室, 国家中医药管理局“脂代谢”三级实验室 广东省代谢性疾病中医药防治重点实验室, 广州 510006

摘要:本研究应用超高效液相色谱仪联用四级杆串联飞行时间质谱仪 UPLC-Q-TOF-MS 在正负离子模式下分离分析广佛手药材成分, 采用 Masslynx4.1 软件及网络数据库 Scifinder 及 Chemspider 检索其一级、二级质谱数据, 快速鉴定了广佛手药材的化学成分, 共鉴定化学成分 45 种, 其中首次从广佛手中鉴定了 23 种化合物。

关键词:佛手; 化学成分; UPLC-Q-TOF-MS

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

Rapid Identification of Components from *Fructus citri Sarcodactylis* Based on Ultra-high Performance Liquid Chromatography Time-of-flight Mass Spectrometry

ZHONG Yan-mei¹, FENG Yi-fan¹, GUO Jiao^{2*}

¹Guangdong Pharmaceutical University, Central laboratory; ²Key Unit of Modulating Liver to Treat Hyperlipemia SATCM, Level 3 Laboratory of Lipid Metabolism SATCM, Guangdong TCM key laboratory for metabolic diseases, Guangzhou 510006, China

Abstract: In this study, the chemical components of *Fructus citri Sarcodactylis* were rapidly identified using ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) in positive and negative ion mode. The MS, MS/MS data were analyzed by Masslynx4.1 software, and retrieved in database of Scifinder and Chemspider for the rapid identification. As a result, 45 components were analyzed and identified from *Fructus citri Sarcodactylis*, 23 of them were firstly identified.

Key words: *Fructus citri Sarcodactylis*; chemical component; UPLC/Q-TOF-MS

广佛手是芸香科柑橘属植物 *Citrus medica* L. Var. *sarcodactylis* Swingle 成熟果实, 其性味辛、苦、酸、温, 具有舒肝理气, 和胃止痛之功, 用于治疗胸腹胀满、消化不良等症^[1], 与金佛手、川佛手、建佛手等为常用我国传统中药佛手道地药材。广佛手主产于广东化州、德庆等地, 为“十大广药”之一, 是药食同源的名贵中药^[2,3]。广佛手是我校郭姣教授在“调肝启枢化浊”法指导下研制的方药调肝降脂新药复方贞术调脂胶囊^[4]的主要药物之一, 深入研究其佛手中的化学成分对揭示该方的药效物质基础具有现实意义。目前关于广佛手化学成分研究并不多见, 主要有挥发油, 香豆素、黄酮、内酯等成分得到分离鉴定^[5-12], 因此随着广佛手药材药理作用的深入

研究, 其化学成分的全面快速鉴定成分一个首要任务亟待解决。液质联用技术为近几十年发展起来的新兴技术, 是中药物质基础研究的有力手段, 超高效液相联用四级杆串联飞行时间质谱仪 (UPLC/Q-TOF-MS) 具有高分辨率, 高灵敏度, 高选择性, 用时短, 扫描范围广等特点, 是一种在定性分析中具有独特优势的液质联用仪, 本研究采用 UPLC/Q-TOF-MS 快速分析鉴定了广佛手药材成分, 取得了较好的结果, 同时也提出了药材成分分离鉴定工作的新思路。

1 材料与仪器

1.1 材料

广佛手药材 *Fructus citri Sarcodactylis*: 芸香科柑橘属植物 *C. medica* 成熟果实佛手果切片后晒干而成, 药材购自致信药业有限公司 (批号为 120501, 产地: 广东), 药材样品经广东药学院中药学院刘基柱副教授鉴定为真品, 标本保存于广东药学院中心实

实验室。

1.2 试剂

95%乙醇(分析纯),75%乙醇(分析纯),超纯水(自制),蒸馏水,色谱乙腈(Merck),甲酸,色谱甲醇(Merck),6,7-二甲氧基香豆素标准品购自中国食品药品检定研究院(批号111740-200501,纯度>95%)。

1.3 仪器

ACQUITY 超高效液相色谱分析系统、Q-ToF micro 高分辨四级杆与飞行时间串联质谱仪配有 lock-spray 接口(美国 Waters 公司)。Masslynx4.1 数据处理系统(美国 Waters 公司),ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ 色谱柱(2.1×50 mm,1.7μm)(美国 Waters 公司),DL-360A 超声波清洗器(上海之信仪器有限公司),超低有机物型 Arium 611 UV 超纯水器(德国 Sartorius 公司)。

2 实验方法

2.1 样品制备

称取佛手药材提取物 20.0 g,剪碎,20 mL 70% 甲醇浸泡过夜,超声提取 1 h,过滤,滤液过 0.22 μm 微孔滤膜待分析。

2.2 标准品制备

精密称取标准品 6,7-二甲氧基香豆素 1 mg 于 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,静置,配成浓度为 0.1 mg/mL 的溶液,精密吸取 50 μL 该溶液甲醇稀释至 1 mL,摇匀,静置,待分析。

2.3 UPLC/Q-TOF-MS 分析条件

2.3.1 液相条件

二元梯度洗脱,流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)和乙腈(B)。梯度洗脱条件为 0~3.6 min,98~75% A;3.6~4.6 min,75~68% A;4.6~6.0 min,68% A;6.6~7.6 min,65~50% A;7.6~8 min,50~45% A;8~9.6 min,45% A;9.6~12 min,45~30% A;12~14.6 min,30~0% A;14.6~30 min,0~98%

A,流速 0.4 mL/min,进样量 5 μL,柱温:30 °C。

2.3.2 质谱条件

毛细管电压(capillary):3000 V;锥孔电压(sample cone):30 V;源温(source temp):120 °C;脱溶剂温度(desolvation temp):350 °C;碎裂能量(CE):10 V。脱溶剂氮气流速 600 L/h,锥孔反吹氮气,流速 60 L/h;碰撞气体为氩气。实验中采用 Lockmass 通路对实验数据采集进行实时校正,Lockmass 标准品溶液为脑腓肽(10 μg/mL),校正切换频率为 10 次/秒。扫描范围为 50~1500 Da,ESI 正负离子模式下采集数据。

2.4 UPLC/Q-TOF-MS 方法学考察:

2.4.1 精密度的实验

精密吸取同一供试品溶液,连续进样 6 次,每次进样 5 μL,各主要色谱峰的保留时间 RSD 值均小于 0.3%,相对峰面积的 RSD 值均小于 3%,表明仪器的精密性良好。

2.4.2 稳定性的实验

取同一供试品溶液,分别与 0、1、2、4、12、24 h 进样检测,每次进样 5 μL,各主要色谱峰的保留时间 RSD 值均小于 0.3%,相对峰面积的 RSD 值均小于 3%,表明供试品溶液在 24h 内稳定。

2.4.3 重现性的实验

按 2.1 项下,分别制备供试品 6 份进样检测,每次进样 5 μL,对比各主要峰的保留时间 RSD 值均小于 0.3%,相对峰面积的 RSD 值均小于 3%,表明实验方法重复性良好。

3 实验结果

如图 1 所示,实验中对佛手药材成分进行了正负离子一级全扫描(m/z 50~1500 Da)及二级质谱扫描,检测时间 25 min。从图 1 可见,正负离子扫描图有差别,负离子模式的峰信息较为丰富。总离子流图中检测出的各个色谱峰经 masslynx4.1 软件进行了检索。

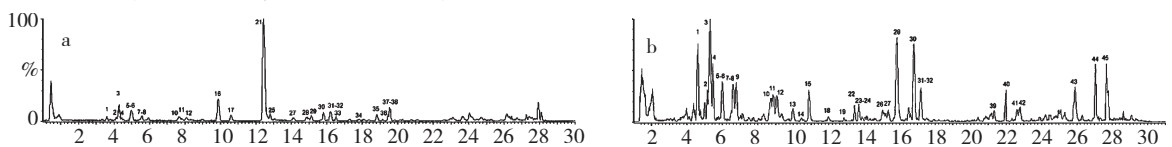


图 1 广佛手药材在正(A)负(B)离子模式下的总离子流图

Fig.1 Positive(A)and negative(B)total ion chromatogram of Fructus citri Sarcodactylis sample by UPLC/Q-TOF-MS

注:正负离子总离子流图中峰号相同的为同一物质

Note:The same peak No. for the same component in the chromatogram

在一级质谱图中,可获得各个峰物质的高分辨一级质谱数据(精确至小数点后第4位),同时能够获得误差范围 $\leq 5\text{ppm}$ 的分子式。在二级质谱中, masslynx4.1 工作站能够给出特定保留时间范围的指定分子量离子的二级质谱碎裂信息,这些信息可用于推测每个峰物质的结构。

实验中对于图1中色谱峰进行了匹配检索,发现在正负离子模式下的检测物质类别有所不同,正离子模式下,主要检测到香豆素类、生物碱类成分,检测离子以 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 多见,而在负离子模式,黄酮及黄酮苷类成分、有机酸、酯类成分为主要的检测类别,检测离子主要为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。在总离子流图的前端,主要为极性较大的糖苷类物质及黄酮苷类物质,则在正负离子两种模式下均能被检测。

图1总离子流图中的45种成分的鉴别结果如表1所示,根据Masslynx4.1工作站给出的高分辨一级质谱数据、分子式及二级质谱碎片数据,应用网络资源Scifinder及Chemspider数据库检索数据,从佛手药材中共分离鉴定成分45种,包括糖苷类成分共9种,香豆素类成分13种,黄酮及黄酮苷类成分10种,有机酸类成分6种,其他类7种;其中23种成分首次从广佛手中被发现,包括糖苷类8种(峰号1、4、5、7、12、15、18和19),黄酮及其苷类物质4种(峰号6、20、24和30),有机酸类5种(峰号9、41~44)等。广佛手药材化学成分的分析鉴定的过程结合了一级质谱信息与二级质谱信息,以下以峰21为例进行说明其鉴定过程。

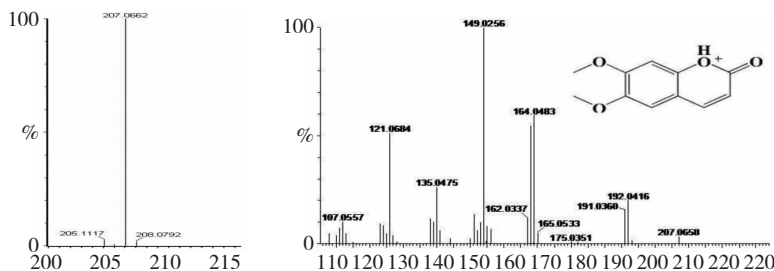


图2 峰21的一级质谱图(A)与二级质谱图(B)

Fig. 2 MS(A) and MS/MS(B) spectra of peak 21

峰21的一级质谱高分辨数据为207.0662, masslynx4.1 工作站给出的元素组成为 $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_4$, 根据氮率可知检测离子为 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰,分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$, 检索Scifinder、Chemspider数据库, Chemspider数据库中,与6,7-二甲氧基香豆素或5,7-二甲氧基香豆素数据相吻合^[10-12],同时其二级质谱显示主要产生了207 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、192 $[\text{M} + \text{H}-\text{CH}_3]^+$ 、164

$[\text{M} + \text{H}-\text{CH}_3-\text{CO}]^+$ 、163 $[\text{M} + \text{H}-\text{CH}_3-\text{OCH}_2]^+$ 、149 $[\text{M} + \text{H}-2\text{CH}_3-\text{CO}]^+$ 、135 $[\text{M} + \text{H}-\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2]^+$ 、121 $[\text{M} + \text{H}-\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_2]^+$ 等特征离子,根据标准品比对最终鉴定峰21为6,7-二甲氧基香豆素,其质谱裂解途径如下图3所示。

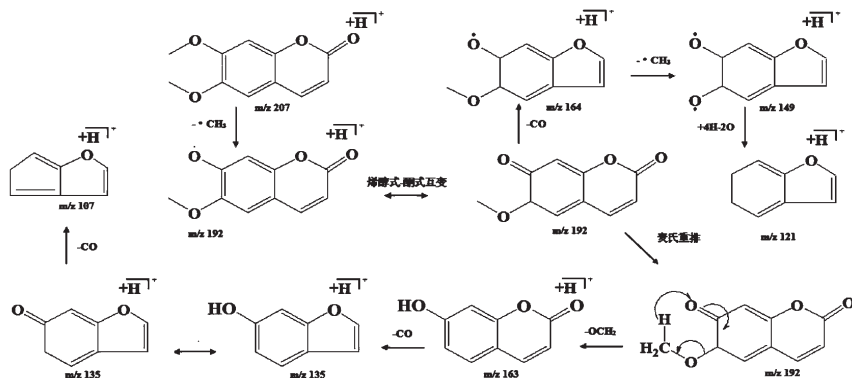


图3 正离子模式下峰21的二级质谱裂解途径

Fig. 3 The cleavage pathways of peak 21 in positive ion mode

表1 广佛手药材化学成分的UPLC-Q/TOF-MS鉴定结果^[5-12]Table 1 Identification result of components from *C. medica* by UPLC-Q/TOF-MS^[5-12]

峰号 No.	保留时间 TR	鉴定结果 Identification results	分子式 Molecular formula	检测离子 Parent ion	测量 MW Detected MW	误差 (ppm) Error	MS ² 质谱特征碎片 MS ² ions
1*	3.61	1-O-(3-丁烯基)-6-O- α -L-阿拉伯糖基- β -D-吡喃葡萄糖苷	C ₁₅ H ₂₆ O ₁₀	M + Na	389.1458	2.5	389, 371, 352, 327, 287, 245, 185, 161, 147
				M-H	365.1451	0.8	365, 303, 263, 221, 173, 161, 143, 125, 101
2	4.18	香叶木素-6,8-二-C- β -D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	M + H	625.1787	2.9	625, 571, 572, 511, 467, 469, 457, 439, 409, 385, 367, 355, 325
				M-H	623.1625	2.1	623, 533, 413, 503, 383, 312, 221
3*	4.31	3-甲氧基-4-O- β -D-葡萄糖基苯甲酸乙酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	M + Na	381.1169	1.8	381, 376, 261, 197, 179, 151, 145, 137
				M-H	357.1181	-1.4	357, 284, 195, 151
4*	4.51	Dasycarpuside B	C ₁₇ H ₂₈ O ₁₀	M + Na	415.1580	3.4	415, 347, 345, 283, 219, 177
				M-H	391.1606	0.5	391, 357, 329, 289, 247, 195, 161, 143, 125
5*	5.02	3-epi-Swertiajaposide C	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	M + H	389.1467	4.9	390, 275, 233, 227, 209, 167
				M-H	387.1296	1.3	387, 225, 181
6*	5.10	己糖基戊糖-黄酮氧苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	M-H	593.1497	-1.5	595, 463, 449, 397, 343, 313, 287, 249, 147
7*	5.60	Cnidioside B	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₀	M + H	399.1280	-2.8	399, 383, 327, 303, 219, 191, 177, 147, 121
				M-H	397.1141	1.5	397, 235, 191
8	5.63	7-(2-羟基乙氧基)-6-甲氧基-香豆素	C ₁₂ H ₁₂ O ₅	M + H	237.0762	-0.4	237, 219, 191, 177, 147, 134, 119
				M-H	235.0612	2.6	235, 219, 191, 177, 147, 134, 119
9*	5.80	3-羟基-2-甲氧基-5,6-二甲基-苯甲酸	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	M-H	195.0652	-2.0	195, 177, 151, 136
10	7.74	香叶木苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	M + H	609.1842	3.8	609, 463, 301, 263, 129
				M-H	607.1683	3.3	609, 463, 325, 299, 284
11	7.81	橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	M-H	609.1835	2.6	609, 301
12*	8.08	1-O-苄基-3,4,6-三-(3',4',5'-三羟基苯甲酸)-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₈	M + H	727.1606	5.0	727, 708, 685, 667, 649, 521, 463, 375, 323, 229
				M-H	725.1383	-4.1	725, 561, 537, 373, 329, 191, 169, 163
13	8.98	羟基甲氧基香豆素	C ₁₀ H ₈ O ₄	M-H	193.0502	0.5	193, 178, 149, 134, 117
14*	9.45	三甲氧基香豆素	C ₁₂ H ₁₂ O ₅	M-H	235.0620	6.0	235, 219, 191, 177, 147, 134, 119
15*	9.88	白花丹素-5-O-葡萄糖	C ₁₇ H ₁₈ O ₈	M-H	349.0938	4.3	349, 201, 180, 119
16	9.89	水合羟基前胡素	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	M + H	305.1040	4.9	305, 203, 175, 159, 147, 131, 119, 103

17	10.65	白当归脑 1-O-乙酰基-3-O-[-1-氧代-3-(4- 羟基-3-甲氧基苯基)-2-丙烯]- β-D-呋喃果糖基-2,3,6-三乙酸 酯-α-D-吡喃葡萄糖苷	$C_{17}H_{16}O_6$	M + H	317.1031	1.9	317, 285, 245, 203, 178, 167, 153
18*	10.98		$C_{30}H_{38}O_{18}$	M + H	687.2183	-1.7	689, 627, 409, 383, 347, 327, 285, 243, 145, 127
				M-H	685.2013	-3.8	685, 583, 541, 439, 397, 235, 195
19*	10.98	聚羧酸三己糖苷	$C_{23}H_{38}O_{22}$	M-H	665.1774	-0.3	695, 521, 503, 475, 359, 234, 125
20*	11.85	二氢黄柏兹德	$C_{32}H_{42}O_{17}$	M-H	697.2327	-2.4	697, 535, 357, 339, 195
21	12.49	6,7-二甲氧基香豆素	$C_{11}H_{10}O_4$	M + H	207.0662	2.4	207, 192, 164, 149, 135, 121
22*	12.45	芳基四氢萘木质素	$C_{34}H_{42}O_{18}$	M-H	737.2311	2.4	737, 692, 575, 397, 235, 191
23	12.69	3',5,7-三羟基-4'-甲氧基黄酮	$C_{16}H_{12}O_6$	M-H	299.0560	1.3	299, 284, 256, 211
24*	12.69	三羟基-二氢黄酮	$C_{16}H_{14}O_6$	M-H	301.0717	1.7	301, 286, 258, 242, 164, 150
25	12.82	佛手内酯	$C_{12}H_8O_4$	M + H	217.0509	3.7	217, 202, 174, 161, 156, 146, 131, 118, 115, 105
26	14.03	3,5,6-三羟基-4',7-二甲氧基黄 酮	$C_{18}H_{34}O_5$	M-H	329.2344	4.9	329, 229, 211, 171, 139
27	14.36	3,5,6-三羟基-3',4',7-三甲氧基 黄酮	$C_{18}H_{16}O_8$	M-H	359.0777	2.8	359, 344, 329, 301, 286, 246, 206, 165
28*	14.90	柠檬苦素	$C_{26}H_{30}O_8$	M + H	471.2025	1.3	470, 425, 305, 213, 161
				M-H	469.1867	1.1	469, 381, 229
29	15.17	氧化前胡素	$C_{16}H_{14}O_5$	M + H	287.0932	4.5	287, 203, 174, 159, 147, 131
30*	15.82	己糖基-黄酮氧苷	$C_{28}H_{36}O_{10}$	M + H	533.2397	1.9	532, 469, 377, 369, 307, 215, 205, 175, 161
				M-H	531.2219	-2.1	532, 489, 471, 427, 325, 307, 245, 125
31	16.24	3,5,6-三羟基-4',7-二甲氧基黄 酮	$C_{17}H_{14}O_7$	M + H	331.0840	6.6	331, 316, 257, 242, 187, 183, 169, 148, 135, 121, 118
				M-H	329.0670	2.7	329, 314, 299, 271, 255, 201
32	16.30	诺米林	$C_{28}H_{34}O_9$	M + H	515.2299	3.5	514, 469, 377, 307, 289, 279, 215, 205, 175, 161
				M-H	513.2131	1.2	513, 469, 453, 435, 391, 311, 161
33	16.51	6,6',7,7'-四甲氧基-3,3'双香豆 素	$C_{22}H_{18}O_8$	M + 3H	413.1242	1.5	413, 385, 357, 353, 325, 294, 259, 207, 179, 167, 125
34*	17.93	二萜类生物碱	$C_{30}H_{40}N_2O_8$	M	556.2758	-12.0	556, 522, 400, 315, 152, 135
35	18.82	5-甲氧基-8-羟基补骨脂素	$C_{12}H_8O_5$	M + H	233.0461	4.7	233, 218, 200, 190, 173, 162, 144, 134, 115, 106
36	19.45	佛手酚	$C_{11}H_6O_4$	M + H	203.0349	2.5	203, 158, 155, 147, 131, 119, 105, 103
37	19.55	羟基甲氧基香豆素	$C_{10}H_8O_4$	M + H	193.0510	4.7	193, 178, 165, 149, 134
38	19.55	5-异戊烯氧基-7-甲氧基香豆素	$C_{15}H_{16}O_4$	M + H	261.1139	4.6	261, 205, 193, 178, 165, 149, 137, 121, 109
39*	20.30	葡萄糖内酯	$C_{19}H_{22}O_3$	M-H	297.1480	-3.7	297, 228, 174

40*	21.02	-	$C_{28}H_{37}O_9N_5$	M-H	554.2589	13.2	555,437,279,152,131
41*	21.64	甲氧基-十七烷酸	$C_{18}H_{32}O_3$	M-H	295.2286	4.4	295,278,241
42*	21.78	甲氧基-十七烷酸	$C_{18}H_{32}O_3$	M-H	295.2287	4.7	295,278,241
43*	24.90	甲氧基-十五烷酸	$C_{16}H_{32}O_3$	M-H	271.2272	-0.4	271,253,225,223,197
44*	26.05	十八烷酸	$C_{18}H_{32}O_2$	M-H	279.2328	1.4	279,262,235,222,203,181,158
45	26.65	棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	M-H	255.2334	3.9	255,237,222,179,151

注：“*”为首次从佛手中鉴定出，“-”表示暂未鉴定出。

Note: “*” indicated that compound was firstly identified from *C. medica* and “-” indicated that compound was not identified.

实验中发现每一类物质的质谱裂解行为有其特点,同类物质的二级质谱具有相似性,如香豆素类物质因其结构中有内酯结构及苯环,主要会产生 $[M + H - CO]^+$ 、 $[M + H - 2CO]^+$ 、 $[M + H - CO_2]^+$ 及苯环特征离子。而苷类物质主要由于糖基的存在,主要产生 $[M + H - 162]^+$ (脱己糖)、 $[M + H - 150]^+$ (脱戊糖)及糖环开裂产生的 $[M + H - 120]^+$ 、 $[M + H - 90]^+$ 等离子。实验结果表明,45个峰信息中,首次从广佛手中发现的化学成分共23种,其中峰40暂未鉴定出。

4 结论

本次实验通过采用超高效液相串联四级杆飞行时间质谱仪(UPLC/Q-TOF-MS)比较全面地分析鉴定了佛手药材中存在的化学成分或其次生代谢产物,分离鉴定了正负离子模式下佛手药材化学成分,共鉴定了43种化学成分,其中首次从佛手中发现的化学成分共23种,包括糖苷类成分共8种,有机酸类成分5种,黄酮及黄酮苷类成分4种,其他类成分共6种。

广佛手具有抗炎,抗氧化,抗肿瘤等功效^[10,11],其药材中存在的香豆素、黄酮类成分可能为其主要药效活性成分,最新研究表明佛手的抗氧化抗肿瘤作用与其多糖类及糖苷类成分相关^[8];此次研究采用了ESI离子源,发现了广佛手中存在的较多较大极性的糖苷类成分,这为进一步深入研究广佛手药材的药理作用,寻找其药效活性成分,进而开发应用提供了强有力的依据和前期研究基础,同时也提出一种基于新型仪器分析技术-液质联用的天然产物化学成分的分离鉴定方法,此方法的应用将有效缩短天然产物鉴定工作的研究周期,减少研究开发成本,为天然产物成分分析鉴定工作提出了新的思路。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典), Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 124.
- 2 Lin LW(林乐维), Jiang L(蒋林), Hao DQ(郝大庆), et al. HPLC fingerprint of *Fructus citri Sarcodactylis* from Guangdong province. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2009, 31:1805-1808.
- 3 Zhang RF(张瑞芳), Gao YH(高幼衡), Cui HH(崔红花), et al. Fingerprints of *Fructus citri Sarcodactylis* from Guangdong by HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2007, 38:1075-1077.
- 4 Guo J(郭姣), Bei WJ(贝伟剑), Hu YM(胡因铭), et al. A new TCM formula FTZ lowers serum cholesterol by regulating HMG-CoA reductase and CYP7A1 in hyperlipidemic rats. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135:299-307.
- 5 Qiu ZW(丘振文), He JX(何建雄), Tang HM(唐洪梅), et al. The study for chemical composition characteristics of bergamot essential oil. *Prog Mod Biomed*(现代生物医学进展), 2010, 10:4363-4365.
- 6 Gao YH(高幼衡), Xu HH(徐鸿华), Diao YM(刁远明), et al. Study on chemical components of *Citri medica* L. sarcodactylis swingle. *Traditional Chin Drug Res Clin Pharm*(中药新药与临床药理), 2002, 13:315-316.
- 7 Gao YH(高幼衡), Huang HH(黄海波), Xu HH(徐鸿华), et al. Study on chemical components of *Citri medica* var. *sarcodactylis*. *Chin Med Mat*(中药材), 2002, 25:639-640.
- 8 Li WJ(李文娟). Extraction and separation of effective components from bergamot and their biological activities study *in vitro*. Chongqing: Chongqing University, MSc. 2013.