

文章编号:1001-6880(2014)1-0069-08

# 独活水提部位化学成分的 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析

孙东东<sup>1</sup>,徐晓芳<sup>2</sup>,严世海<sup>3</sup>,宋小妹<sup>2</sup>,李祥<sup>1\*</sup><sup>1</sup>南京中医药大学药学院,南京 210046; <sup>2</sup>陕西中医学院药学院,咸阳 712046; <sup>3</sup>南京中医药大学附属医院,南京 210029

**摘要:**本文通过 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 技术对独活水提取部分中的化学成分进行定性分析,采用 LC-MS/MS, C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以甲醇-0.1% 甲酸溶液为流动相梯度洗脱,使用 ESI 离子源,正离子与负离子模式下采集数据。通过正、负离子质谱信息及元素组成,分析与相关文献数据对照,共鉴定出 12 个化合物,为阐明独活水提部分的药效物质基础提供有力的证据。

**关键词:**独活水提液;化学成分;HPLC-ESI-Q-TOF-MS

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

## Analysis on Chemical Components from Water Extract of *Angelicae pubescens* Radix by High Performance Liquid Chromatography-electrospray Ionization-quadrupole-time of Flight-mass Spectrometry

SUN Dong-dong<sup>1</sup>, XU Xiao-fang<sup>2</sup>, YAN Shi-hai<sup>3</sup>, SONG Xiao-mei<sup>2</sup>, LI Xiang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; <sup>2</sup>School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xian Yang 712046, China; <sup>3</sup>Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

**Abstract:** The manuscript make a qualitative analysis on chemical components in water extract of *Angelicae Pubescens Radix* by HPLC-ESI-Q-TOF-MS; LC-MS/MS, C<sub>18</sub> (4.6mm × 250 mm, 5μm) column was adopted, with methanol -0.1% formic acid as the mobile phase for gradient elution; ESI ion source was used for mass spectra, and data were collected in positive and negative mode. twelve compounds from water extract of *Angelicae Pubescens Radix* were identified by analyzing positive and negative ion mass spectra information and element composition and comparing controls with data from relevant literature, these provide powerful therapeutic material basis for water extract of *Angelicae Pubescens Radix*.

**Key words:** water extract of *Angelicae pubescens* Radix; chemical components; HPLC-ESI-Q-TOF-MS

独活为伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根。春初苗刚发芽或者秋末茎叶枯萎时采挖,除去须根和泥沙,烘至半干,堆置 2~3 d,发软后再烘至全干。性辛苦微温,归肾,膀胱经。具有祛风除湿,通痹止痛,用于风寒湿痹,腰膝疼痛,少阴伏风头痛,风寒挟湿头痛<sup>[1]</sup>。LC-MS/MS 联用技术在化学成分研究中的应用已显优势<sup>[2]</sup>。本文采用 LC-MS/MS 技术,对独活水提取部分中的主要化学成分进行鉴定,便于进一步阐明独活水提取部分的药效物质基础。

## 1 仪器与试药

AB SCIEX Triple Tof 5600 质谱仪(美国 AB 公司);岛津 LC-20A 快速液相(配有 DGU-20A3 在线脱气机,LC-20AD XR 泵,SIL-20A XR 自动进样器及 CTO-20AC 柱温箱,日本 Shimadzu 公司);分析软件: Analyst TF1. 6 software, Shortcut to peskview; FA1104N 1/1 万电子天平(上海精密科学仪器有限公司);EPED 超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司);色谱甲醇(HPLC,江苏汉邦科技有限);甲酸(分析纯,Merck 公司);超纯水(自制)。独活药材(批号:20120222)采于四川,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根,样品保存在南京中医药大学中药标本馆。

收稿日期:2012-12-31 接受日期:2013-07-19

基金项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目(2011ZYX6-014);江苏省 2012 年度普通高校研究生科研创新计划项目(CXZZ12-0626);江苏省中医药局科技项目(LZ13013)

\* 通讯作者 Tel:86-25-85811512;E-mail:lixiang\_8182@163.com

## 2 方法

### 2.1 LC 检测条件

Hanbon Lichrospher<sup>TM</sup> HPLC C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-0.1% 甲酸溶液(B); 梯度洗脱 0~5 min, 10% A; 5~10 min, 10%~30% A; 10~15 min, 30%~85% A; 15~20 min, 85%~100% A; 20~23 min, 100% A; 23~25 min, 100%~10% A; 24~30 min, 10%; 柱温 40 °C; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量 10 μL。

### 2.2 MS 检测条件

电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式, 多反应监测(MRM); 离子喷雾电压(Ion Spray voltage, IS) 分别为 5500.00V, -4500.00V; 去簇电压(declustering potential, DP) 分别为 80, -80; 碰撞电压(collision, CE) 分别为 45.0, -30.0; 雾化气/ion source gas 1) 55.00 psi; 辅助加热器/ion source gas 2) 55.

00psi。气帘气(CUR)为 40.00pis 去溶剂温度(TEM)为 500.00 °C; TOF MASSES(DA): Min = 100.0000, Max = 1200.0000; 碰撞活化扫描(collisional excitation scanning, CES)为 20.0。

### 2.3 样品溶液的制备

称取 80 g 独活药材, 加入 8 倍量水, 煎煮 3 次, 每次分别 1, 1, 0.5 h 过滤, 合并滤液, 合并后水提取液体积 1000 mL, 再加入 1100 mL 95% 酒精密封, 静置 48 h 后, 抽滤取上清液, 将上清液放在 80 °C 水浴锅上烘干。烘干恒重后, 称取 0.1000 g 用 50% 甲醇定容到 100 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

## 3 结果

### 3.1 LC-MS 成分鉴定

用 LC-MS / MS 对独活水提取部分中化学成分进行定性分析, (-)ESI-MS 和 (+)ESI-MS 的质谱总离子流图(TIC)见图 1。

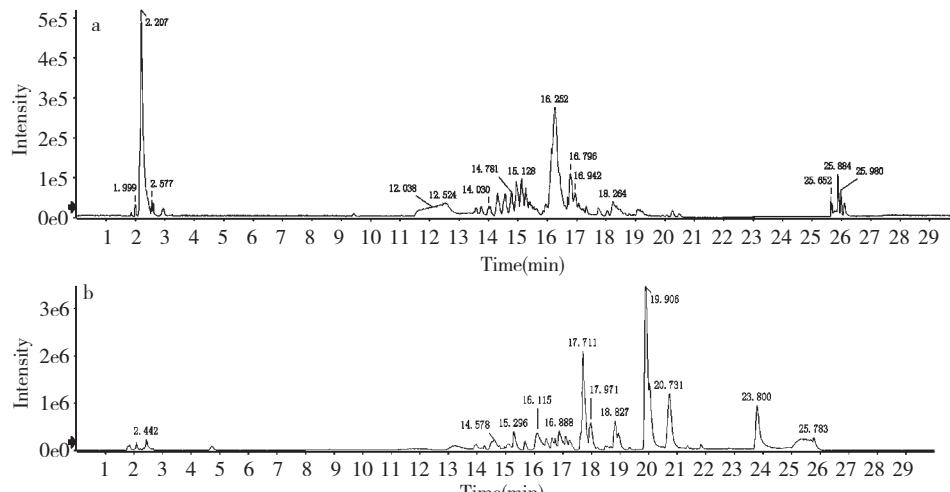


图 1 独活水提取部分中负离子(A)和正离子(B)模式的总离子流图

Fig. 1 The total ion current chromatogram in negative (A) and positive (B) ion mode for water extract of Angelica pubescens

### 3.2 独活水提取部分化学成分分析

通过 LC-MS 检测得到独活水提取部分中各化学成

分的保留时间和质谱信息, 并结合提取离子流图及与对照品、相关文献数据对比进行化学成分确认, 见表 1。

表 1 独活化学成分分析

Table 1 Analysis on chemical compositions of Angelica pubescens

| NO. | 保留时间<br>分 TR (min) | 正离子模式<br>Positive-ion mode                                      |                                                             | 负离子模式<br>Negative-ion mode                                     |                                                             | 分子式<br>Molecular formula                                     | 化合物<br>Compound |
|-----|--------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------|
|     |                    | 理理论相<br>对分子质量<br>Theoretical<br>relative<br>molecular<br>weight | 实测相对<br>分子质量<br>Measured<br>relative<br>molecular<br>weight | 理论相对<br>分子质量<br>Theoretical<br>relative<br>molecular<br>weight | 实测相对<br>分子质量<br>Measured<br>relative<br>molecular<br>weight |                                                              |                 |
| 1   | 2.86               | -                                                               | -                                                           | 243.0636                                                       | 243.0632                                                    | C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | 尿嘧啶核苷           |

|    |       |          |          |          |          |                                                               |             |
|----|-------|----------|----------|----------|----------|---------------------------------------------------------------|-------------|
| 2  | 16.61 | 217.0495 | 217.0508 | -        | -        | C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>                 | 异佛手柑内酯      |
| 3  | 16.63 | 163.0390 | 163.0411 | -        | -        | C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                  | 伞形花内酯       |
| 4  | 16.66 | 269.0784 | 269.0828 | -        | -        | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>                | 二氢欧山芹醇      |
| 5  | 16.79 | 187.0390 | 187.0412 | -        | -        | C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                 | 补骨脂素        |
| 6  | 16.82 | 217.0495 | 217.1084 | -        | -        | C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>                 | 花椒毒素        |
| 7  | 16.85 | 269.0819 | 269.0381 | -        | -        | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>                | 欧前胡素        |
| 8  | 17.18 | 195.0652 | 195.1017 | 193.0506 | 193.0527 | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>                | 阿魏酸         |
| 9  | 17.43 | 217.0495 | 217.0509 | -        | -        | C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>                 | 香柑内酯(佛手柑内酯) |
| 10 | 17.65 | 269.0819 | 269.0476 | -        | -        | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>                | 异欧前胡素       |
| 11 | 18.87 | 268.1040 | 268.1068 | -        | -        | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> | 腺嘌呤核苷       |
| 12 | 18.88 | 245.1172 | 245.1210 | -        | -        | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>                | 蛇床子素        |

### 3.3 根据质谱裂解特征鉴定的成分

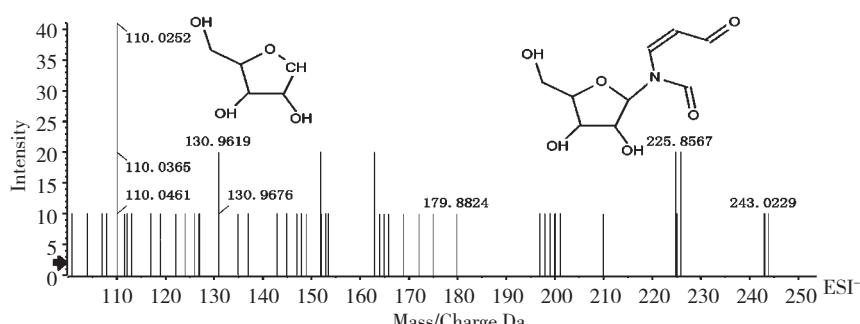


图 2  $T_R$  2.86 min 的  $MS^2$  图 (ESI<sup>-</sup>)

Fig. 2  $MS^2$  spectra (ESI<sup>-</sup>) of the peak at 2.86 min

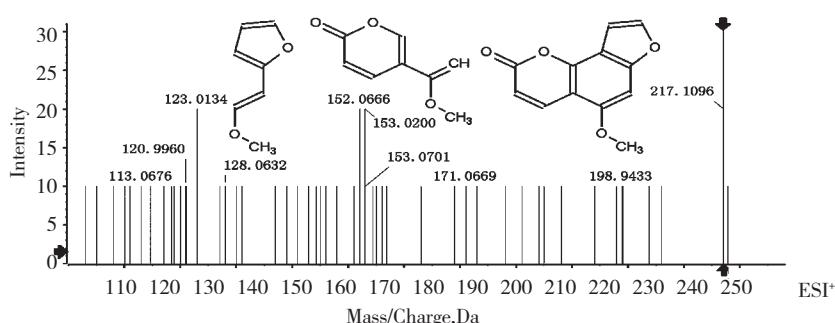
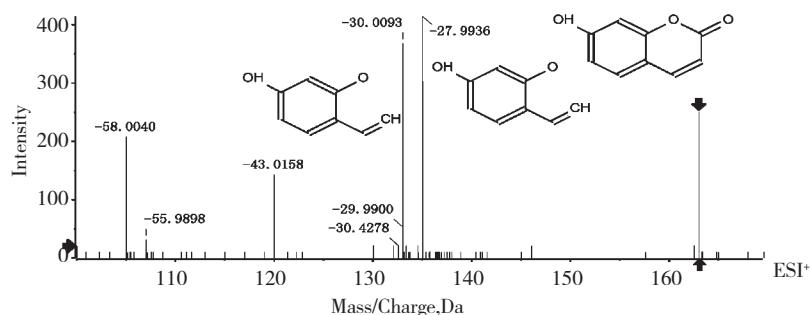


图 3  $T_R$  16.61 min 的  $MS^2$  图 (ESI<sup>+</sup>)

Fig. 3  $MS^2$  spectra (ESI<sup>+</sup>) of the peak at 16.61 min

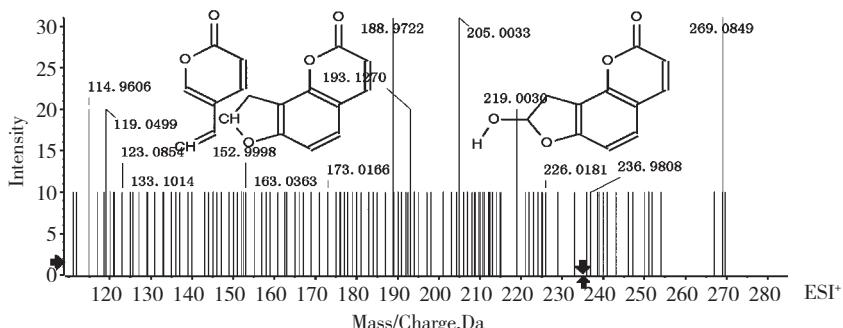
$t_R$  为 2.86 min 的峰在 ESI<sup>-</sup>模式下得到  $m/z$  为 243 的离子峰。文献<sup>[3]</sup>报道独活中存在的尿嘧啶核苷相对分子质量为 244, 推测  $m/z$  243 为其准分子离子峰, 对  $m/z$  243 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  130, 225 等碎片峰, 见图 2, 根据元素组成分析, 该化合物分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 相对分子质量理论值为 243.0636, 实测值为 243.0632 据此推测该化合物为尿嘧啶核苷。

$t_R$  为 16.61min 的峰在 ESI<sup>+</sup>模式下得到  $m/z$  为 217 的离子峰。文献<sup>[4]</sup>报道独活中存在的异佛手柑内酯相对分子质量为 216, 推测  $m/z$  217 为其准分子离子峰, 对  $m/z$  217 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  123, 153, 等碎片峰, 见图 3, 根据元素组成分析, 该化合物分子式为 C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>, 相对分子质量理论值为 217.0495, 实测值为 217.0508 据此推测该化合物为异佛手柑内酯。

图 4  $T_R$  16.63 min 的  $MS^2$  图 ( $ESI^+$ )Fig. 4  $MS^2$  spectra ( $ESI^+$ ) of the peak at 16.63 min

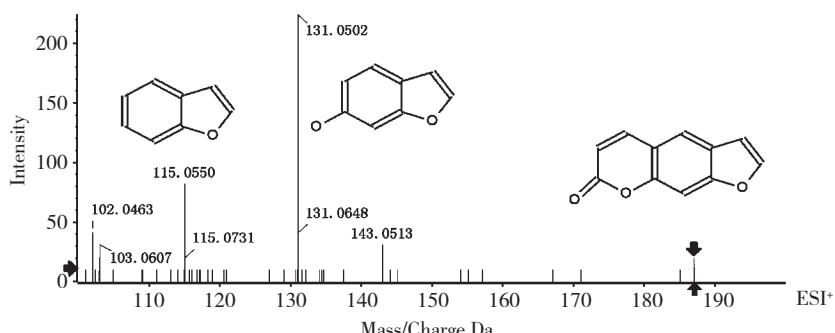
$t_R$  为 16.63min 的峰在  $ESI^+$  模式下得到  $m/z$  为 163 的离子峰。文献<sup>[5-6]</sup> 报道独活中存在的伞形花内酯相对分子质量为 162, 推测  $m/z$  163 为其准分子离子峰, 对  $m/z$  163 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  133,

135 等碎片峰, 见图 4, 根据元素组成分析, 该化合物分子式为  $C_9H_6O_3$ , 相对分子质量理论值为 163.0390, 实测值为 163.0411 据此推测该化合物为伞形花内酯。

图 5  $T_R$  16.66 min 的  $MS^2$  图 ( $ESI^+$ )Fig. 5  $MS^2$  spectra ( $ESI^+$ ) of the peak at 16.66 min

$t_R$  为 16.66min 的峰在  $ESI^+$  模式下得到  $m/z$  为 269 的离子峰。文献<sup>[7]</sup> 报道独活中存在的二氢欧山芹醇相对分子质量为 268, 推测  $m/z$  269 为其准分子离子峰, 对  $m/z$  269 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  188,

119 等碎片峰, 见图 5, 根据元素组成分析, 该化合物分子式为  $C_{14}H_{14}O_4$ , 相对分子质量理论值为 269.0784, 实测值为 269.0828 据此推测该化合物为二氢欧山芹醇。

图 6  $T_R$  16.79 min 的  $MS^2$  图 ( $ESI^+$ )Fig. 6  $MS^2$  spectra ( $ESI^+$ ) of the peak at 16.79 min

$t_R$  为 16.79min 的峰在  $ESI^+$  模式下得到  $m/z$  为

187 的离子峰。文献<sup>[5]</sup> 报道独活中存在的补骨脂素

相对分子质量为 186, 推测  $m/z$  187 其准分子离子峰, 对  $m/z$  187 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  131, 115 等碎片峰, 见图 6, 根据元素组成分析, 该化合物分

子式为  $C_{11}H_6O_3$ , 相对分子质量理论值为 187.0390, 实测值为 187.0412 据此推测该化合物为补骨脂素。

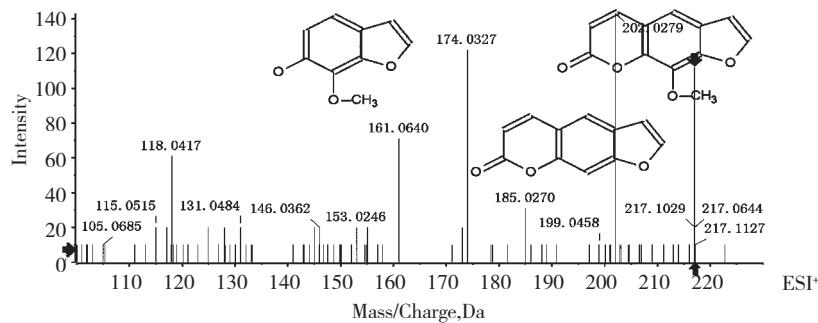


图 7  $T_R$  16.82 min 的  $MS^2$  图 ( $ESI^+$ )

Fig. 7  $MS^2$  spectra ( $ESI^+$ ) of the peak at 16.82 min

$t_R$  为 16.82 min 的峰在  $ESI^+$  模式下得到  $m/z$  为 217 的离子峰。文献<sup>[5]</sup> 报道独活中存在的花椒毒素相对分子质量为 216, 推测  $m/z$  217 其准分子离子峰, 对  $m/z$  217 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  185, 161

等碎片峰, 见图 7, 根据元素组成分析, 该化合物分子式为  $C_{12}H_8O_4$ , 相对分子质量理论值为 217.0495, 实测值为 217.1084 据此推测该化合物为花椒毒素。

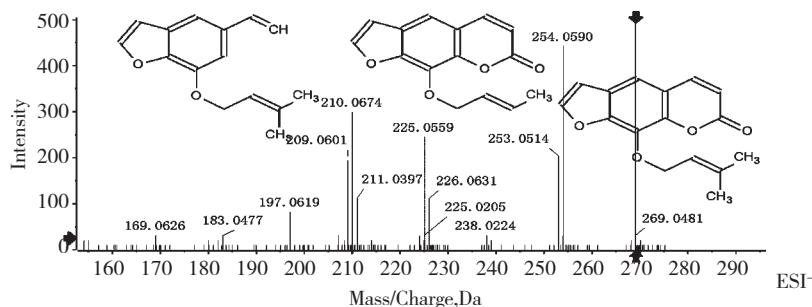
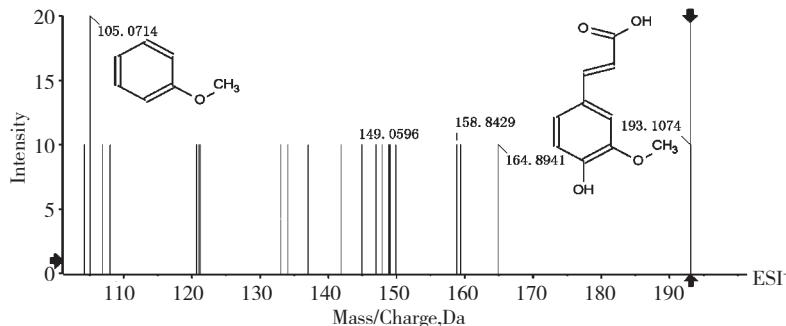


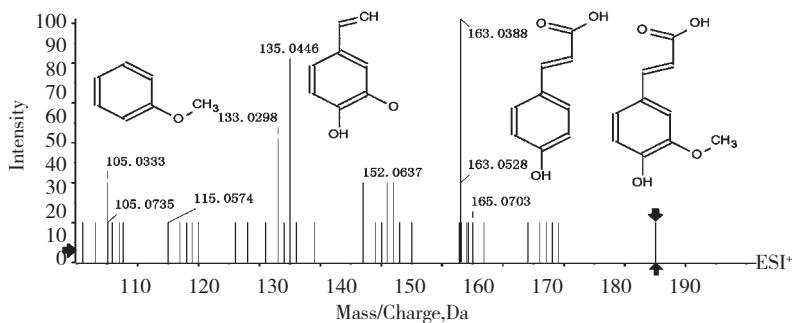
图 8  $T_R$  16.85 min 的  $MS^2$  图 ( $ESI^-$ )

Fig. 8  $MS^2$  spectra ( $ESI^-$ ) of the peak at 16.85 min

$t_R$  为 16.85 min 的峰在  $ESI^-$  模式下得到  $m/z$  为 269 的离子峰。文献<sup>[8]</sup> 报道独活中存在的欧前胡素相对分子质量为 270, 推测  $m/z$  269 其准分子离子峰, 对  $m/z$  269 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  253, 225

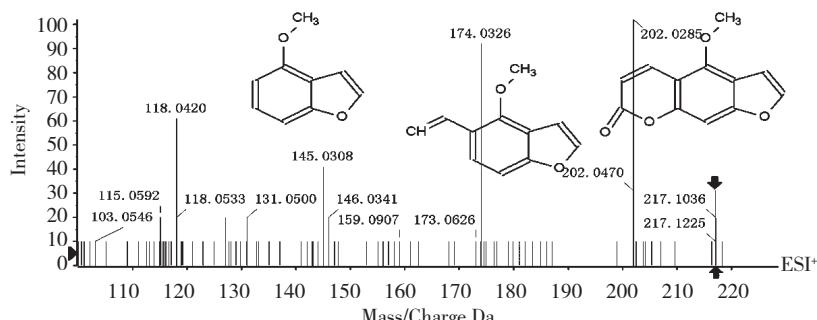
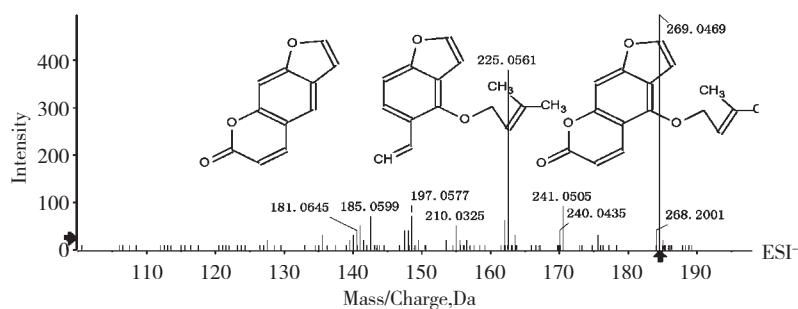
等碎片峰, 见图 8, 根据元素组成分析, 该化合物分子式为  $C_{16}H_{14}O_4$ , 相对分子质量理论值为 269.0819, 实测值为 269.0381 据此推测该化合物为欧前胡素。



图 9  $T_R$  17.18 min 的  $MS^2$  图 ( $ESI^+$ ,  $ESI^-$ )Fig. 9  $MS^2$  spectra ( $ESI^+$ ,  $ESI^-$ ) of the peak at 17.18 min

$t_R$  为 17.18 min 的峰在  $ESI^+$  模式下得到  $m/z$  为 195 的离子峰。文献<sup>[4]</sup>报道独活中存在的阿魏酸相对分子质量为 194, 推测  $m/z$  195 为其准分子离子峰, 对  $m/z$  195 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  105, 135, 163 等碎片峰, 见图 9, 根据元素组成分析, 该化合物分子式为  $C_{10}H_{10}O_4$ , 相对分子质量理论值为 195.

0652, 实测值为 195.1017; 此峰在  $ESI^-$  模式下得到  $m/z$  为 193 的离子峰, 见图 9, 对  $m/z$  193 进行  $MS^2$  分析, 得到  $m/z$  105 等碎片峰, 根据元素组成分析, 该化合物分子式  $C_{10}H_{10}O_4$ , 相对分子质量理论值为 193.0506, 实测值为 193.0527。据此推测该化合物为阿魏酸。

图 10  $T_R$  17.43 min 的  $MS^2$  图 ( $ESI^+$ )Fig. 10  $MS^2$  spectra ( $ESI^+$ ) of the peak at 17.43 min图 11  $T_R$  17.65 min 的  $MS^2$  图 ( $ESI^-$ )Fig. 11  $MS^2$  spectra ( $ESI^-$ ) of the peak at 17.65 min

$t_R$  为 17.43 min 的峰在  $ESI^+$  模式下得到  $m/z$  为 217 的离子峰。文献<sup>[3]</sup>报道独活中存在的香柑内酯(又名佛手柑内酯)相对分子质量为 216, 推测  $m/z$

217 其准分子离子峰, 对  $m/z$  217 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  145, 174 等碎片峰, 见图 10, 根据元素组成分析, 该化合物分子式为  $C_{12}H_8O_4$ , 相对分子质量理

论值为 217.0495, 实测值为 217.0509 据此推测该化合物为香柑内酯(又名佛手柑内酯)。

$t_R$  为 17.65 min 的峰在 ESI<sup>+</sup>模式下得到  $m/z$  为 269 的离子峰。文献<sup>[3,5]</sup>报道独活中存在的异欧前胡素相对分子质量为 270, 推测  $m/z$  269 其准分子离

子峰, 对  $m/z$  269 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  225, 185 等碎片峰, 见图 11, 根据元素组成分析, 该化合物分子式为  $C_{16}H_{14}O_4$ , 相对分子质量理论值为 269.0819, 实测值为 269.0476 据此推测该化合物为异欧前胡素。

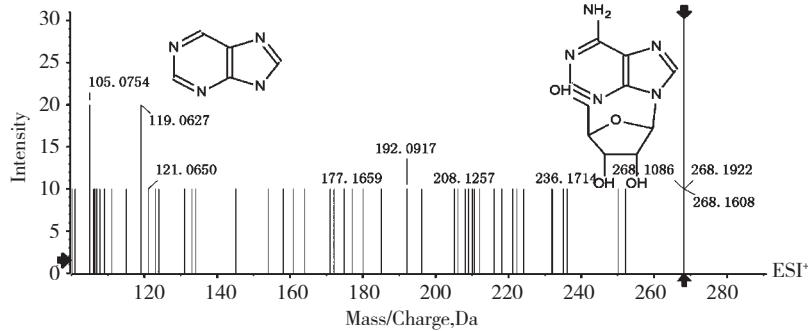


图 12  $T_R$  18.86 min 的  $MS^2$  图 ( $ESI^+$ )

Fig. 12  $MS^2$  spectra ( $ESI^+$ ) of the peak at 18.86 min

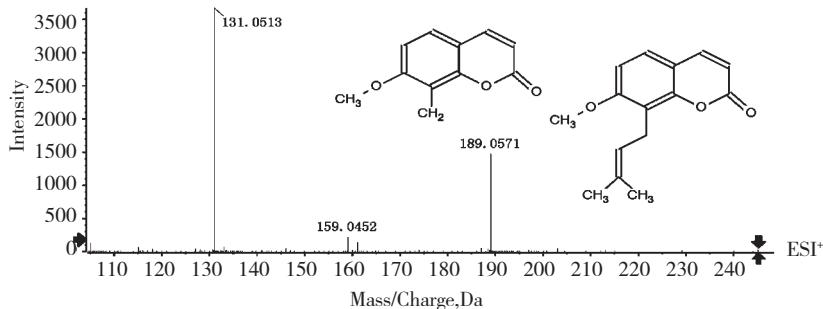


图 13  $T_R$  18.88 min 的  $MS^2$  图 ( $ESI^+$ )

Fig. 13  $MS^2$  spectra ( $ESI^+$ ) of the peak at 18.88 min

$t_R$  为 18.86 min 的峰在  $ESI^+$  模式下得到  $m/z$  为 268 的离子峰。文献<sup>[3]</sup>报道独活中存在的腺嘌呤核苷相对分子质量为 267, 推测  $m/z$  268 其准分子离子峰, 对  $m/z$  268 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  119 等碎片峰, 见图 12, 根据元素组成分析, 该化合物分子式为  $C_{10}H_{13}N_5O_4$ , 相对分子质量理论值为 268.1040, 实测值为 268.1068 据此推测该化合物为腺嘌呤核苷。

$t_R$  为 18.88 min 的峰在  $ESI^+$  模式下得到  $m/z$  为 245 的离子峰。文献<sup>[9]</sup>报道独活中存在的蛇床子素欧芹酚甲醚对分子质量为 244, 推测  $m/z$  245 其准分子离子峰, 对  $m/z$  245 进行  $MS^2$  分析, 分别为  $m/z$  189 等碎片峰, 见图 13, 根据元素组成分析, 该化合物分子式为  $C_{15}H_{16}O_3$ , 相对分子质量理论值为 268.10, 实测值为 268.1068 据此推测该化合物为蛇床子素

(又名欧芹酚甲醚)。

## 4 讨论

本实验的色谱峰没有完全分开但是由于采用 LC-MS/MS 联用技术, 利用质谱的最快, 最灵敏的高分辨率, 精确质量测定的定性能力的优点。通过获得色谱峰准分子离子, 对独活水提取部分进行了化学成分分析, 鉴定出独活水提取部分中可能含有的 22 种化学成分。其成分再通过二级质谱根据特征碎片离子峰加以确认。在正负离子模式检测的化学成分中, 由准确相对分子质量(误差  $< 5 \times 10^{-6}$ )及元素组成分析确定的化合物为 12 个。这 12 个化学成分中主要为香豆素类(异佛手柑内酯, 伞形花内酯, 补骨脂素, 花椒毒素, 香柑内酯, 蛇床子素等)。从独活总离子流图可以看出, 色谱峰主要集中在正离

子模式下,并且还有一些响应较好的色谱峰其质量数未能在已有数据库中找到,证明独活中还有一些未知成分,有待进一步研究。

本实验利用LC-MS/MS联用技术进行在线的分离、检测和鉴定技术,充分发挥了其快速对药材成分进行定性分析,弥补了在无对照品情况下对化合物的快速、准确鉴定的优势。提示此方法也同样适用于中药复方多成分分析,为中药复方成分分析提供了一种有效、可靠的分析模式。

## 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 :246.
- 2 Kong XX(孔兴欣), Shen WB(沈文斌), Wang LY(王丽云), et al. Identification of the related substances in cefmetazole sodium by LC-MS/MS. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2012, 43:170-176.
- 3 Zhou G(周刚), Ma BH(马宝花). The development on the study of Radix Angelicae Pubescens. *China Modern Medicine*(中国当代医药), 2012, 6(16):15-16.
- 4 Lin ZW(林中文), Gao L(高岚), Rao GX(饶高雄), et al. Coumarins of heracleum stenopterum. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究), 1993, 15:315-316.
- 5 Lin L(林黎), Qian XP(钱晓萍), Liu BR(刘宝瑞). Research progress on the chemical constituents and theantitumor activity of Angelica pubescens. *Modern Oncology*(现代肿瘤医学), 2011, 19:373-376.
- 6 Ding XF(丁希飞), Feng X(冯煦), Dong YF(董云发), et al. Studies on chemical constituents of the roots of Angelica pubescens. *J Chin Med Mater*(中药材), 2008, 31:516-518.
- 7 Zhu Y(朱艳), Li F(李繁), Liu QY(刘庆阳). 中药独活本草及药理学研究进展. *Journal of Liaoning Economic Management Cadre Institute, Journal of Liaoning economic Vocational Technological Institute*, 2010, 1:68-69.
- 8 Lin ZW(林中文), Gao L(高岚), Chen YP(陈一平), et al. Coumarins of Heracleum Candicans. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究), 1993, 15:313-15314.
- 9 Shi YH(石燕红), Zhao SM(赵森森), Wang R(王瑞), et al. Simultaneous determination of osthole and columbianadin of radix angelicae pubescens by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2010, 45:1270-1273.

(上接第130页)

- 5 Xuan HZ, Zhao J, Miao JY, et al. Effect of Brazilian propolis on human umbilical vein endothelial cell apoptosis. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49:78-85.
- 6 Wu X, Lu H. Correlation of calcium-independent phosphatidylcholine-specific phospholipase C with gamma-GT in hepatoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 1998, 30:104-106.
- 7 Su L, Zhao J, Zhao BX, et al. Safrole oxide induced human umbilical vein vascular endothelial cell differentiation into neuron-like cells by depressing the reactive oxygen species level at the low concentration. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763:247-253.

- 8 Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, et al. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. *J Nat Prod*, 2000, 63:1277-1279.
- 9 Pereira AD, de Andrade SF, de Oliveira Swerts MS, et al. First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46:2580-2584.
- 10 Munari CC, Alves JM, Bastos JK, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of Baccharis dracunculifolia extract on V79 cells by the comet assay. *J Appl Toxicol*, 2010, 30:22-28.