

基于 5 种生物碱定量分析的马钱子总碱提取工艺优化

潘自皓, 顾薇, 彭薇, 潘扬*

(南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 首先以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 柱温 35 ℃, 检测波长 260 nm, 建立同时测定 5 种马钱子生物碱(士的宁、马钱子碱、士的宁氮氧化物、马钱子碱氮氧化物与番木鳖次碱)含量的反相 HPLC 法; 然后以上述 5 种生物碱的总量为指标, 采用 $L_9(3^3)$ 正交实验法, 对马钱子总碱的回流提取工艺条件(溶剂用量、质量浓度和提取次数)进行优化。结果表明, 上述 5 种马钱子生物碱质量浓度线性范围依次为 14.64~468.48、11.625~372.0、0.555~17.76、0.891~28.512 $\mu\text{g/mL}$ 与 2.5~80.0 $\mu\text{g/mL}$, 回收率分别为 100.3%、101.7%、97.7%、98.8% 与 99.6%。优化后马钱子总碱的回流提取工艺条件为: 加入 20 倍量体积分数 70% 的酸性乙醇, 回流提取 4 次, 每次 1 h。在此提取条件下, 马钱子提取物中 5 种生物碱总质量分数达 3.633%。反相 HPLC 法同时测定 5 种马钱子生物碱含量的方法简便、准确; 以此作为马钱子总碱提取工艺优化的指标更为全面、可靠。

关键词: 马钱子; 生物碱; 反相 HPLC 法; 提取工艺; 正交实验法

中图分类号: R 931.71; R 944.6 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)06—0641—06

Extraction Process Optimization of Total Alkaloids Based on Simultaneous Determination of Five Alkaloids in *Strychnos nux-vomica* L.

PAN Zihao, GU Wei, PENG Wei, PAN Yang*

(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: The RP-HPLC analysis of was performed on a Merck C18 column (4.6×250 mm, 5 μm) for simultaneous determination of the contents of five alkaloids (strychnine, brucine, strychnine N-oxide, brucine N-oxide and vomicine) in *Strychnos nux-vomica* L.. The mobile phase was a mixture of acetonitrile (A) and aqueous (B), gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was at 260 nm, and the column temperature was at 35 ℃. The linear range of strychnine, brucine, strychnine N-oxide, brucine N-oxide and vomicine was 14.64~468.48 $\mu\text{g/mL}$, 11.625~372.0 $\mu\text{g/mL}$, 0.555~17.76 $\mu\text{g/mL}$, 0.891~28.512 $\mu\text{g/mL}$ and 2.5~80.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The average recovery of these five alkaloids was 100.3%, 101.7%, 97.7%, 98.8% and 99.6%,

收稿日期: 2013-10-24

基金项目: 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(ysxk-2010); 南京中医药大学中药学优势学科开放课题资助项目(2011ZYX5-001); 南京中医药大学青年自然科学基金资助项目(11XZR13)。

作者简介: 潘自皓(1981—), 男, 江苏南京人, 工学硕士, 助理研究员, 主要从事中药生物技术研究。E-mail: lance814@163.com

* 通信作者: 潘扬(1964—), 男, 江苏扬州人, 理学博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药化学与生物技术方面的研究。

E-mail: y.pan2006@163.com

respectively. With the total content of five alkaloids as the indexes, the extraction conditions of total alkaloids from *S. nux-vomica*, such as solvent amounts, concentration and extraction times, were optimized by $L_9(3^3)$ orthogonal experimental design. The optimal extraction process was heat reflux extraction with 20-fold, 70% acidic alcohol for 4 times, one hour for each time. Under this optimum condition, the total content of the five alkaloids of the extraction was 3.633%. The RP-HPLC method was simple, accurate and suitable for simultaneous determination of strychnine, brucine, strychnine N-oxide, brucine N-oxide and vomicine of *S. nux-vomica*. The optimization of the extraction process of the total alkaloids was more comprehensive and reliable because of the total content of the five alkaloids as the indicator.

Keywords: *Strychnos nux-vomica* L., alkaloid, RP-HPLC, extraction process, orthogonal experimental design

马钱子为马钱科植物马钱 (*Strychnos nux-vomica* L.) 的干燥成熟种子, 具有通络止痛、散结消肿之功效^[1], 临床用于治疗跌打损伤、风湿顽痹、痈疽肿痛等^[2]。现代药理研究表明, 马钱子还具有较强的抗肿瘤活性^[3], 可用于治疗皮肤癌、乳腺癌、脑肿瘤、食管癌和胃癌等多种恶性病症。

马钱子由于毒性较强, 临床多炮制后入药。作者对真菌发酵马钱子以及降毒保效也进行了较多的研究^[4-8]。无论炮制或发酵后的马钱子, 其主要活性成分均为生物碱类, 包括土的宁 (strychnine)、马钱子碱 (brucine)、土的宁氮氧化物 (strychnine N-oxide)、马钱子碱氮氧化物 (brucine N-oxide) 和番木鳖次碱 (vomicine) 等。

目前, 文献报道马钱子总生物碱的提取方法较多, 但大多仅以马钱子中含量较高的土的宁和马钱子碱作为优化指标。管庆霞等^[9]以土的宁和马钱子碱的含量为指标, 比较了冷浸提取、热浸提取、超声提取、渗漉提取和回流提取对马钱子总生物碱提取率的影响, 结果显示回流提取法的效率最高。祁艳等^[10]改进了已有的氨性氯仿浸渍提取工艺, 总生物碱得率明显提高。李彦超等^[11]比较了氨性氯仿、水、酸水与酸性乙醇作为溶剂, 回流提取马钱子总生物碱的提取率, 结果表明酸性乙醇的提取效率优于其它方法; 魏秀德等^[12]在对提取工艺的考察中也证实了酸性乙醇为马钱子生物碱提取的有效溶剂。

至于马钱子生物碱成分含量测定的方法, 国内已报道应用薄层扫描法 (TLCS)^[13]和高效液相色谱法 (HPLC)^[14-15]。TLCS 法分离能力明显不足, 且分析结果受多种因素的影响而稳定性较差。HPLC 法分

离效能高, 快速稳定, 已成为马钱子生物碱定量鉴定的最常用方法。

作者首先通过对色谱方法学的考察, 建立了同时测定 5 种马钱子生物碱 (土的宁、马钱子碱、土的宁氮氧化物、马钱子碱氮氧化物和番木鳖次碱) 的 RP-HPLC 法; 然后再以这 5 种马钱子生物碱的总量为指标, 采用 $L_9(3^3)$ 正交实验法, 对马钱子总碱的回流提取工艺条件 (溶剂用量、质量浓度和提取次数) 进行优化。

1 材料与方法

1.1 仪器

LC-10AT 高效液相色谱仪, 包括 LC-10AT 双泵、CBM-10A 系统控制器、7255i 手动进样阀、SPD-10A 紫外检测器和 CLASS-LC 10 化学色谱工作站, 日本 Shimadzu 公司制造; ERC-3415 型四通道在线脱气机, 日本 Shodex 公司制造; AT-530 型柱温箱, 天津 Autoscience 公司制造; 分析天平, 美国 Mettler Toledo 公司制造; UV 2401 型紫外分光光度计, 日本 Shimadzu 公司制造; HH2 型数显恒温水浴锅, 金坛市荣华仪器制造有限公司制造; KQ-500E 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司制造。

1.2 试剂

甲醇 (批号 12031910396, 分析纯), 无水乙醇 (批号 12040110503, 分析纯), 南京化学试剂有限公司产品; 盐酸 (批号 20101209, 分析纯), 上海中试化学工业总公司产品; 甲酸 (批号 20101128, 分析纯), 上海凌峰化学试剂有限公司产品; 氨水 (批号 F20110311, 分析纯), 国药集团化学试剂有限公司

产品;三乙胺(批号 F20110311,分析纯),国药集团化学试剂有限公司产品;乙腈(批号 101134,色谱纯),美国TEDIA 公司产品;实验用水,娃哈哈公司产纯净水。

1.3 标准品

土的宁(以下简称 S,批号 990317),日本和光(WAKO)纯药工业株式会社产品;马钱子碱(以下简称 B,批号 M9F5231),日本半井(NACALAI)药业株式会社产品;土的宁氮氧化物(以下简称 SNO),自制,由土的宁经半合成而成,经 UV、IR、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 MS 确定结构^[16];马钱子碱氮氧化物(以下简称 BNO),自制,由马钱子发酵品中提取、分离得到,经 UV、IR、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 MS 确定结构^[4];番木鳖次碱(以下简称 V),自制,从马钱子发酵品中提取、分离得到,经 UV、IR、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 MS 确定结构^[5]。上述 5 种对照品经 HPLC 面积归一化法分析,纯度均达 98%以上。

1.4 药材

制马钱子(产地云南,批号 709240226),经南京中医药大学潘扬教授鉴定为马钱科植物马钱(*Strychnos nux-vomica* L.)的干燥成熟种子。

2 方法与结果

2.1 5 种马钱子生物碱 RP-HPLC 测定的方法学

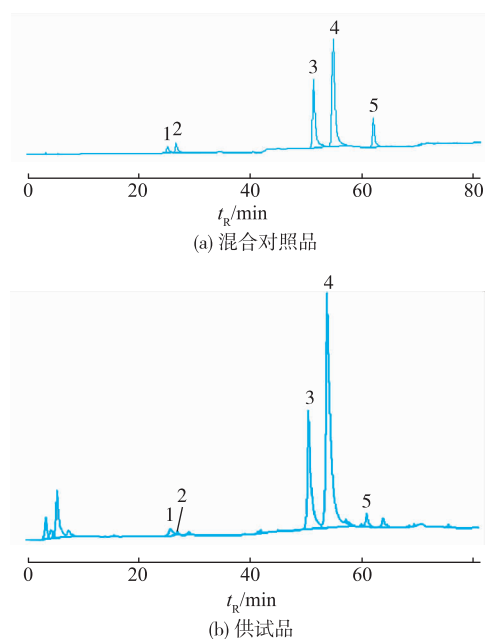
2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取 S、B、SNO、BNO 和 V 的对照品 4.88、4.65、5.55、5.94 mg 和 5.00 mg,分别置于 5 mL 的容量瓶中,用甲醇溶解并定容至 5 mL,制成对照品母液。

分别精密量取 S、B、SNO、BNO 和 V 的对照品母液 2.0、2.4、0.08、0.12 mL 与 0.4 mL,置于同一 5 mL 的容量瓶中,并用甲醇定容至 5 mL,即得到混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取马钱子药材粉碎,过 3 号筛,精密称取 1 g,加入 16 倍马钱子量的体积分数 70%乙醇-盐酸(体积比 100:1),加热回流提取 3 次,每次 1 h,合并 3 次所得的滤液,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解,并定容至 25 mL,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,取续滤液待测。

2.1.3 检测波长的选择 取混合对照品溶液的稀释液,在紫外分光光度计上进行全波长扫描(400~190 nm),其紫外光谱在波长约 260 nm 处具有最大吸收,故选择 260 nm 作为检测波长。

2.1.4 系统适应性实验 色谱条件:色谱柱为 Merck C18 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μm);流动相为乙腈(A)-水(B)(每 1 L 加甲酸 1 mL,氨水调节 pH 8.0)。梯度洗脱(体积分数):0 min:8%A-92%B;30 min:21%A-79%B;40 min:26%A-74%B;60 min:45%A-55%B;80 min:80%A-20%B;85 min:8%A-92%B。体积流量 1 mL/min,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 260 nm,进样量 10 μL 。在此条件下,各相邻色谱峰分别达到了较好的基线分离(即分离度大于 1.5),理论塔板数按土的宁峰计大于 5 000,结果如图 1 所示。



1. SNO; 2. BNO; 3. B; 4. S; 5. V

图 1 5 种马钱子生物碱的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC spectrum of the five *Strychnos* alkaloids

2.1.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液,用甲醇按 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 的体积比进行倍量稀释;向高效液相色谱仪中分别进样 10 μL ,分别以 S、B、SNO、BNO 和 V 的质量浓度(mg/mL)为横坐标(x),以色谱峰的积分面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,并计算回归方程与线性范围,结果见表 1。

2.1.6 精密度实验 取同一对照品溶液,向高效液相色谱仪中连续进样 6 次,每次进样量均为 10 μL ,考察 S、B、SNO、BNO 和 V 色谱峰的积分面积值,并分别计算 RSD。结果显示,土的宁、马钱子碱、土的宁氮氧化物、马钱子碱氮氧化物和番木鳖次碱对照品的 RSD 分别为 1.52%、1.48%、1.14%、1%与 1.21%。

表 1 线性关系考察结果

Table 1 Results of investigation of linear relationship

$n=6$

生物碱	线性方程	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g/mL}$)
S	$y=14\ 209\ 130x+78\ 142$	0.999 8	14.64~468.48
B	$y=11\ 263\ 979x+42\ 436$	0.999 9	11.625~372.0
SNO	$y=16\ 224\ 039x+3\ 435$	0.999 8	0.555~17.76
BNO	$y=15\ 176\ 726x+5\ 661$	0.999 9	0.891~28.512
V	$y=16\ 039\ 356x+13\ 425$	0.999 6	2.5~80.0

2.1.7 重复性实验 取同一供试品溶液,向高效液相色谱仪中连续进样 6 次,每次进样量均为 10 μL ,考察 S、B、SNO、BNO 和 V 色谱峰的积分面积值,并分别计算 RSD。结果表明,土的宁、马钱子碱、土的宁氮氧化物、马钱子碱氮氧化物和番木鳖次碱供试品的 RSD 分别为 1.76%、1.11%、0.74%、1.07% 与 1.30%。

2.1.8 稳定性实验 取同一供试品溶液,室温下放置,分别于 0、4、10、24 h 和 48 h 进样测定,每次进样量均为 10 μL ,考察 S、B、SNO、BNO 和 V 色谱峰的积分面积值,并分别计算 RSD。结果表明,供试品溶液中各生物碱的 RSD 分别 2.44%、1.27%、2.31%、2.8% 与 3.32%,这说明供试品溶液在 48 h 内较为稳定。

2.1.9 加样回收率实验 精密称取已知含量的马钱子药材 1 g,平行 6 份,分别加入一定量的混合对照品溶液,再制备得供试品溶液,进样高效液相色谱仪,测定 S、B、SNO、BNO 与 V 的平均加样回收率及其 RSD,结果见下表 2。

表 2 加样回收率实验结果

Table 2 Results of recovery rate test

$n=6$

生物碱	平均加样回收率/%	RSD/%
S	100.3	1.74
B	101.7	2.18
SNO	97.7	3.25
BNO	98.8	3.16
V	99.6	2.52

2.2 马钱子总生物碱提取工艺的优化

2.2.1 不同提取溶剂的考察 取马钱子药材粉碎,过 3 号筛,精密称取 1 g,分别加入 16 倍药材量的体积分数 70%乙醇-盐酸(体积比 100:1)、甲醇-盐酸(体积比 100:1)以及氯仿-乙醇-氨水(体积比

100:10:1),加热回流提取 3 次,每次 1 h,合并 3 次所得的滤液,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解,并定容至 25 mL,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,取续滤液分别测定提取液中 5 种生物碱的含量,考察不同溶剂对提取结果的影响,结果如表 3 所示。

表 3 不同提取溶剂的考察

Table 3 Results of different extract solvents

$n=3$

方法	质量分数/%					5 种生物碱总 质量分数/%
	S	B	SNO	BNO	V	
酸性乙醇法	1.467	1.054	0.013	0.014	0.087	2.634
酸性甲醇法	1.383	0.937	0.010	0.012	0.081	2.423
氨性氯仿法	1.368	0.872	0.018	0.006	0.053	2.317

由表 3 可知,酸性乙醇法提取所得的 5 种生物碱含量均高于酸性甲醇法,且除 SNO 以外,S、B、BNO 和 V 提取量均高于氨性氯仿法,故选择酸性乙醇法进行提取工艺的正交实验优化。

2.2.2 提取工艺的正交实验优化 为优化马钱子总生物碱的提取工艺,参照文献报道的工艺参数,在单因素实验的基础上,采用 $L_9(3^3)$ 正交实验法进行优化,考察 3 个关键因素,即溶剂量(A)、溶剂乙醇体积分数(B)与提取次数(C)对马钱子总生物碱提取的综合影响,因素水平见表 4。

表 4 因素水平表

Table 4 Levels of factors

水平	因素		
	溶剂量/倍 A	溶剂体积分数/% B	提取次数 C
1	12	50	2
2	16	70	3
3	20	90	4

$L_9(3^3)$ 正交实验中的各实验均按照“2.2.1”项下的方法,分别采用表 5 设计的溶剂量、溶剂体积分数和提取次数加热回流提取,HPLC 法测定其中 5 种生物碱的含量,并计算总量,结果见表 5 和表 6。

由表 5 的直观分析结果可知,影响马钱子中 5 种生物碱总提取效率的因素主次顺序是 $C>B>A$,即提取次数影响最大,溶剂体积分数次之,溶剂量最小;最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3$,即加入 20 倍马钱子量的体积分数 70%乙醇-盐酸(体积比 100:1),加热回流提取 4 次,每次 1 h。表 6 的方差分析结果显示,3 个因素的各水平之间并无显著性差异。

表5 正交实验表与实验结果
Table 5 Results of orthogonal test

实验号	因素			5种生物碱总质量分数/%
	溶剂量/倍 A	溶剂体积分数/% B	提取次数 C	
1	12	90%	2	2.360
2	16	90%	3	2.531
3	20	90%	4	3.420
4	12	70%	3	2.800
5	16	70%	4	3.597
6	20	70%	2	2.957
7	12	50%	4	3.065
8	16	50%	2	2.757
9	20	50%	3	3.451
均值1	2.742	2.770	2.691	
均值2	2.962	3.118	2.927	
均值3	3.276	3.091	3.361	
极差	0.534	0.348	0.670	

表6 方差分析表
Table 6 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F比	$F_{0.05}$ 临界值	显著性
A	0.224	2	1.836	19.000	无
B	0.432	2	3.549	19.000	无
C	0.691	2	5.664	19.000	无
误差	0.122	2	—		—

2.2.3 优化工艺的验证 按正交实验法确定的优化工艺,重复试验3次,分别测定5种生物碱的含量,并计算RSD(%)值,以验证优化结果的稳定性,结果如下表7所示。

表7 验证实验结果
Table 7 Results of verification test

实验号	5种生物碱总质量分数/%	平均质量分数/%	RSD/%
1	3.685	3.633	1.02
2	3.614		
3	3.619		

由表7可知,在优化的工艺条件下,马钱子中5

种生物碱的平均总质量分数为3.633%,高于正交实验中各实验结果,且3次验证实验的RSD值为1.02%。这充分说明了优化结果的重复性良好。

3 讨论

马钱子中的生物碱类成分种类很多,作者建立了同时测定其中5种重要生物碱含量的方法,采用C18色谱柱,以乙腈-水(每1 L加甲酸1 mL,氨水调节pH 8.0)为流动相,采用梯度洗脱,体积流量1 mL/min,柱温35℃,检测波长260 nm,进样量10 μ L。该方法能够更为全面地反映马钱子中生物碱成分的含量,从而为马钱子质量控制指标提供参考。同时,文献报道测定马钱子中生物碱含量的HPLC法,其流动相中通常加入磷酸二氢钾和十二烷基硫酸钠等离子对试剂,或者用乙酸和三乙胺调节流动相的pH值,这些成分均不适用于液质联用分析,不能将液相条件直接应用于液质,而在流动相中加入的甲酸和氨水均为液质分析中常用的试剂,该方法的建立也为后续实验对马钱子中生物碱类成分的结构鉴定奠定了基础。

目前,马钱子生物碱类成分常用的提取方法为氨性氯仿法,但在氯仿提取过程中,马钱子中的主要成分士的宁和马钱子碱在氯仿及其所含有的少量二氯甲烷的作用下会发生季铵化反应和氧化反应,从而导致马钱子中的生物碱类成分发生变化,因此有必要对提取溶剂作进一步的考察。

4 结语

作者以5种生物碱的总量为指标,先对马钱子生物碱的提取方法进行了考察,结果表明酸性乙醇法的提取效率最高。在此基础上,又进行了马钱子总生物碱提取工艺的正交实验优化,结果显示优化的提取工艺为加入20倍马钱子量体积分数70%乙醇-盐酸(体积比100:1),加热回流提取4次,每次1 h。随后进行的3次验证实验表明,优化结果是可靠的,且重复性好。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:卫生部,2010.
- [2] 黄喜茹,曹冬. 马钱子研究进展[J]. 上海中医药杂志,2005,39(1):62-65.
HUANG Xiru, CAO Dong. Research advancement of sem en strychni[J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2005,39(1):62-65.(in Chinese)

- [3] Deng X K, Yin W, Li W D, et al. The anti-tumor effects of alkaloids from the seeds of *Strychnos nux-vomica* on HepG2 cells and its possible mechanism[J]. **J Ethnopharmacol**, 2006, 106: 179–186.
- [4] 陈东军, 刘亮镜, 刘学湘, 等. 马钱子发酵物中马钱子碱氮氧化物的 NMR 数据解析[J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2009, 25(2): 125–128.
CHEN Dongjun, LIU Liangjing, LIU Xuexiang, et al. Analysis of NMR data of brucine N-oxide isolated from semen strychni fermented by *trametes cinnabarina*[J]. **Journal of Nanjing TCM University: Natural Science Edition**, 2009, 25(2): 125–128. (in Chinese)
- [5] 潘扬, 张弦, 刘亮镜, 等. 马钱子发酵品中生物碱化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(3): 452–457.
PAN Yang, ZHANG Xian, LIU Liangjing, et al. Alkaloids from fermentation product in *Strychni Semen* [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2012, 43(3): 452–457. (in Chinese)
- [6] 彭薇, 孙钰, 潘扬, 等. 不同发酵天数对“栓钱菌质”急性毒性及抗炎、镇痛作用的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(5): 541–545.
PENG Wei, SUN Yu, PAN Yang, et al. Effects of different fermentation days on acute toxicity and analgesic, Anti-Inflammatory activity of shuanqian junzhi[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(5): 541–545. (in Chinese)
- [7] 陈龙, 施旌, 曹亮, 等. 6 种真菌发酵对马钱子降毒保效作用的初步研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3): 476–480.
CHEN Long, SHI Zheng, CAO Liang, et al. Pilot study on effects of semen strychni fermented by six different fungi on toxicity, analgesia and anti inflammation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(3): 476–480. (in Chinese)
- [8] Yang G M, Pan Y, Liu L J, et al. Simultaneous determination of strychnine, brucine, strychnine N-oxide and brucine N-oxide in crude and fermented nux vomica by capillary zone electrophoresis with ephedrine hydrochloride as an internal standard[J]. **Chromatographia**, 2011, 73(11–12): 1223–1228.
- [9] 管庆霞, 王录娜, 李永吉, 等. 马钱子不同提取方法的比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(4): 815–816.
GUAN Qingxia, WANG Luna, LI Yongji, et al. The comparative study on semen strychni by different extraction methods[J]. **Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine**, 2009, 27(4): 815–816. (in Chinese)
- [10] 祁艳, 陈军, 蔡宝昌, 等. 马钱子总生物碱提取纯化工艺及抗肿瘤研究[J]. 中成药, 2010, 32(3): 405–408.
QI Yan, CHEN Jun, CAI Baochang. Research of extraction process and anti-tumor activity of *Strychnos* alkaloids [J]. **Chinese Traditional Patent Medicine**, 2010, 32(3): 405–408. (in Chinese)
- [11] 李彦超, 蔡宝昌, 李伟东, 等. 马钱子总生物碱的测定及其提取条件的正交设计优选[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(1): 43–46.
LI Yanchao, CAI Baochang, LI Weidong, et al. Determination of total alkaloids in semen strychni and optimization of its extraction conditions by orthogonal design [J]. **Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology**, 2004, 15(1): 43–46. (in Chinese)
- [12] 魏秀德, 杨波, 范里, 等. 马钱子生物碱提取工艺的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2011, 33(2): 195–198.
WEI Xiude, YANG Bo, FAN Li, et al. Study on extraction technology of alkaloid in semen strychni [J]. **Journal of Jilin Agricultural University**, 2011, 33(2): 195–198. (in Chinese)
- [13] Cai B C, Hattori M, Namba T. Processing of nux vomica (II): Changes in alkaloid composition of the seeds of *Strychnos nux-vomica* on traditional drug-processing[J]. **Chem Pharm Bull**, 1990, 38(5): 1295–1298.
- [14] 刘学湘, 潘扬, 王丽, 等. 反相离子对 HPLC 法同时测定马钱子中四种生物碱的含量[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(9): 698–702.
LIU Xuexiang, PAN Yang, WANG Li, et al. Simultaneous determination of four alkaloids in processed semen strychni by ion pair P-HPLC[J]. **Chin Pharm J**, 2010, 45(9): 698–702. (in Chinese)
- [15] 王丹丹, 李俊松, 蔡宝昌. HPLC 法同时测定马钱子中 4 种生物碱类成分的含量[J]. 药学与临床研究, 2009, 16(6): 523–524.
WANG Dandan, LI Junsong, CAI Baochang. Simultaneous determination of four alkaloids in processed semen strychni [J]. **Pharmaceutical and Clinical Research**, 2009, 16(6): 523–524. (in Chinese)
- [16] 潘扬, 张弦, 潘自皓, 等. 正交设计法确定士的宁氮氧化物半合成最佳条件的研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(17): 1346–1349.
PAN Yang, ZHANG Xian, PAN Zihao, et al. Study on optimization of experimental conditions for semi-synthesis of strychnine N-oxide by orthogonal design[J]. **Chin Pharm J**, 2008, 43(17): 1346–1349. (in Chinese)