

红栓菌液体发酵条件下马钱子中土的宁和马钱子碱的质量分数变化

刘学湘, 潘扬*, 蒋亚平, 韦庆芳

(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029)

摘要: 在单因素实验条件优化的基础上, 采用 L16(45) 正交试验, 以土的宁和马钱子碱的质量分数为主要考察指标, 结合菌体生物量, 研究不同碳源、氮源、装液量、中药量、菌球数量以及发酵时间对红栓菌发酵马钱子的影响, 优化红栓菌液体发酵马钱子的最佳培养基和培养条件。优化工艺为: 以麦芽糖为碳源, 豆饼粉为氮源, 装液量为 100 mL (250 mL 的三角瓶), 加入 0.25 g 马钱子细粉, 接入 3 个大小均一的红栓菌菌球, 28 °C 摇床培养 5 d。与发酵空白比较, 红栓菌—马钱子发酵液中土的宁和马钱子碱的质量分数总和降低了 8.74%, 菌体生物量达 10.6 g/L, 增加 37.7%, 同时马钱子碱氮氧化物和土的宁氮氧化物的质量分数增加。马钱子能促进红栓菌菌体的生长, 液体发酵培养可达到降低马钱子中毒性成分质量分数的目的。

关键词: 马钱子; 红栓菌; 液体发酵; 土的宁; 马钱子碱

中图分类号: R 285.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)03-0294-08

Determination of the Content of Strychnine and Brucine in *Strychnos nux-vomica* L. by the Liquid Fermentation with *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Franeh

LIU Xue-xiang, PAN Yang*, JIANG Ya-ping, WEI Qing-fang

(College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: Based on the results of the single factor (carbon and nitrogen sources), the effect of broth content, mycelial pellet amount, powder weight and fermentation time on alkaloids content and biomass growth were further discussed by using L16 (45) orthogonal test. The optimized culture conditions were acquired and listed as follows: maltose is carbon source, soybean cake powder is nitrogen source and liquid volume of 100 mL (a 250 mL flask), by adding 0.25 g powder, inoculated three evenly sized mycelial pellet, cultured at 28 degrees celsius for 5 days. After optimization the total content of strychnine and brucine in the culture medium reduced 8.74% compared with the control. Biomass could reach 10.6 g/L. Its rising rate was 37.7%. Meanwhile strychnine N-oxide and brucine N-oxide increased. The results showed the drug could promote the fungal growth and it can decrease the content of toxic constituents by

收稿日期: 2011-04-15

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金项目(06 KJB360083); 江苏省“青蓝工程”项目。

作者简介: 刘学湘(1973-), 女, 江西南昌人, 中药学博士, 讲师, 主要从事中药发酵技术方面的研究。E-mail: xxliu2008@yahoo.com.cn

* 通信作者: 潘扬(1964-), 男, 江苏扬州人, 中药学博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药发酵技术方面的研究。

E-mail: y. pan2006@163.com

liquid fermentation.

Key words: *Strychnos nux-vomica* L., *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Franeh, liquid-state fermentation, strychnine, brucine

中药马钱子是国家规定的毒性中药管理品种,为马钱科植物 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子,临床疗效显著,具有散结消肿、通络止痛之功效。它含有多种化学成分,主要有效成分为土的宁(strychnine,以下简称 Stry)和马钱子碱(brucine,以下简称 Bru),同时又是主要的毒性成分。由于它的治疗量与中毒量十分接近,安全范围小,用之不当往往可引起惊厥、抽搐等中毒反应,甚至危及生命,因此在临床应用上受到一定的限制。为了保证马钱子临床应用的安全有效,针对其减毒研究开展了大量的工作,多集中在规范炮制、合理配伍^[1-4]、限制用量、剂型改革^[5-8]等方面。即便如此,临床上中毒现象仍有发生。

作者运用液体发酵技术,选择固体发酵菌种筛选出来的优良的红栓菌 *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Franeh 为发酵菌种,在一定条件下对马钱子进行发酵培养,设定不同的发酵参数,优化液体发酵的培养基和培养条件,采用高效液相色谱法分析发酵前后发酵液中生物碱质量分数的变化。

1 材料与方法

1.1 仪器

立式压力蒸汽灭菌器 LDZX-50KB;上海申安医疗器械厂产品;超净工作台 403;无锡县空气净化设备厂产品;摇床:上海市离心机械研究所产品;隔水式电热培养箱 PYX-DHS;上海医疗器械七厂产品;202 型电热恒温干燥箱:上海索普仪器有限公司产品;AE240 分析天平:METTLER 公司产品;岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪、SPD-10AVP/10AVVP 紫外检测器、ERC-3415 α 溶剂输送泵:日本岛津公司产品;高速万能粉碎机:河北黄骅齐家务科学仪器厂产品;数显温控水浴锅:国华产品;B-169 Vacuum-System 抽滤泵: BüCHI 公司产品;SYZ-A 石英亚沸高纯水蒸馏器:江苏金坛国胜仪器厂产品。

1.2 药材与试剂

生马钱子药材:购自南京市药业股份公司,经潘扬研究员鉴定为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-*

vomica L. 的干燥成熟种子。临用前粉碎过 80 目筛。

对照品:土的宁购自日本和光(WAKO)纯药工业株式会社,批号 990317, HPLC 归一化法确定纯度为 99.0%;马钱子碱购自日本半井(NACALAI)药业株式会社,批号 M9F5231;土的宁氮氧化物 StryNO,自制,由土的宁经半合成而成,经 UV、IR、¹HNMR、¹³CNMR 和 MS 确定结构^[9];马钱子碱氮氧化物 BruNO,自制,经 UV、IR、¹HNMR、¹³CNMR 和 MS 确定结构^[10]。

供试菌种红栓菌 *Trametes cinnabarina* (Jacq.) Fr.:由南京中医药大学药用菌与中药生物技术研究所分离、鉴定、传代并保藏。

主要试剂:麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、氯化铵、磷酸二氢钾、无水硫酸镁、碳酸钙、氯仿、十二烷基硫酸钠,均为分析纯;甲醇、乙腈为色谱纯;重蒸水自制。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基的制备 母种培养基:即 PDA 培养基。

液体培养基组成(g/L):葡萄糖 20 g,蚕蛹粉 10 g, KH₂PO₄ 1.5 g, MgSO₄ 0.75 g, CaCO₃ 1.25 g, VB₁ 10 mg, 初始 pH 值自然。

发酵培养基:用不同的碳源和氮源分别替代液体培养基中的葡萄糖和蚕蛹粉,其它营养成分同液体培养基,同时加入适量的马钱子粉。

以上 3 种培养基均在 0.105 MPa, 121 °C 灭菌 30 min。

发酵空白对照 I:马钱子粉和培养基的混合液;发酵空白对照 II:红栓菌和培养基的混合液;发酵空白对照 III:红栓菌菌丝体。

1.3.2 培养方法

1)斜面菌种的活化:无菌条件下将红栓菌接种于斜面培养基上,27~28 °C 培养箱中避光培养 4~5 d,置 4 °C 冰箱保存,备用。

2)液体菌种的制备:将活化好的斜面菌种接入液体培养基中,置 27~28 °C, 140~160 r/min 摇床培养 4~5 d,即得。

3)液体发酵培养:250 mL三角瓶中加入适量的马钱子粉和液体发酵培养基,无菌条件下接入红栓菌菌球,置于27~28℃摇床培养,140~160 r/min,所有试验均重复3次。

1.3.3 发酵条件的优化

1)单因素试验

碳源的筛选:以1 g/dL豆饼粉为氮源,考察不同碳源(葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和玉米粉)对菌体生物量和发酵液中马钱子中Stry和Bru质量分数的影响,加入量为2%。

氮源的筛选:选择优选的碳源,考察不同氮源(豆饼粉、蛋白胨、酵母膏、酵母粉、蚕蛹粉和氯化铵)对菌体生物量和发酵液中Stry和Bru质量分数的影响,加入量为1%。

2)正交试验

通过单因素试验选择得到最佳的碳源和氮源。在此基础上,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验,进一步考察装液量(A)、菌球数(B)、中药加入量(C)和发酵天数(D)等4个因素对菌体生物量、发酵液中Stry和Bru含量的影响,正交试验的因素水平见表1。

表1 红栓菌液体发酵马钱子条件的正交试验设计

Tab.1 Orthogonal design of culture conditions

水平	因素			
	A 装液量/ mL	B 菌球数/ 个	C 中药加入 量/g	D 发酵 天数/d
1	50	1	0.25	2
2	75	2	0.5	3
3	100	3	0.75	4
4	125	4	1	5

1.3.4 菌体生物量的测定 将发酵液4 000 r/min离心10 min,沉淀物用自来水洗涤多次,收集菌丝

体,80℃烘干至恒重,称重计算生物量。

生物量/(g/L)=DCW×1 000/V。式中DCW为菌体干重(g),V为发酵液体积(mL)。

1.3.5 发酵液中生物碱的含量测定

1)色谱条件:色谱柱Lichrospher S C18(4.6 mm×300 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(38:62),每1 000 mL流动相加入磷酸二氢钾3.4 g和十二烷基硫酸钠1.7 g;流速:1 mL/min;柱温:30℃;检测波长:260 nm;进样量10 μL。

2)对照品溶液的制备:精密称取对照品BruNO 5.03 mg,StryNO 5.01 mg,Bru 5.06 mg,Stry 4.99 mg,分别置5 mL量瓶中,加甲醇适量使溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精密量取上述BruNO、StryNO、Bru、Stry溶液40 μL、120 μL、0.6 mL、1.2 mL,置同一5 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品混合溶液的贮备液(每毫升各含BruNO 8.050 μg,StryNO 24.05 μg,Bru 0.121 4 mg,Stry 0.239 5 mg)。

3)供试品溶液的制备:发酵液4 000 r/min离心10 min,精密吸取上清液20 mL,滴加氨水2滴,混匀后加入氯仿萃取3次,分取氯仿层,水浴蒸干,残渣加甲醇使溶解并定容至5 mL量瓶中,摇匀,0.45 μm滤膜滤过,滤液供HPLC测定用。

4)线性关系的考察:精密量取对照品混合溶液的贮备液,用甲醇分别按1/2,1/4,1/8,1/16进行倍量等度稀释,摇匀,即得。连同贮备液分别注入高效液相色谱仪。分别以BruNO、StryNO、Bru、Stry对照品溶液的质量(μg)为横坐标(X),色谱峰的面积值(mAbs)为纵坐标(Y),绘制标准曲线,见表2。

表2 马钱子中4种生物碱对照品线性关系考察结果

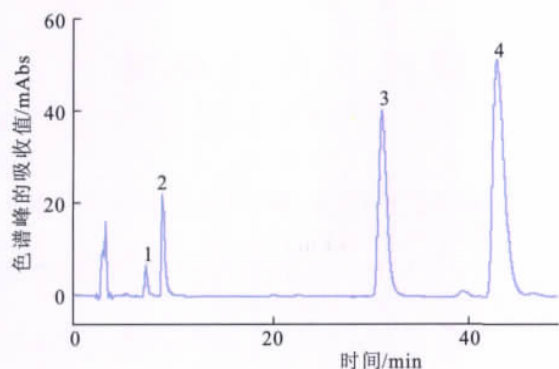
Tab.2 Result of linear relationship of four alkaloids in *Strychnos nux-vomica* L.

化合物	标准曲线	γ	线性范围/μg
BruNO	$Y=1\,068\,660X+701$	0.999 9	0.005 030~0.080 48
StryNO	$Y=1\,829\,458X-1\,214$	0.999 9	0.015 03~0.240 5
Bru	$Y=1\,584\,534X+2\,362$	0.999 9	0.075 90~1.214
Stry	$Y=1\,440\,244X+18\,837$	0.999 9	0.149 9~2.398

2 结果与分析

2.1 样品 HPLC 图

各样品溶液 HPLC 图见图 1~3。



1. 马钱子碱氮氧化物; 2. 土的宁氮氧化物; 3. 马钱子碱; 4. 土的宁

图 1 混合对照品溶液 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of four standard mixed solution

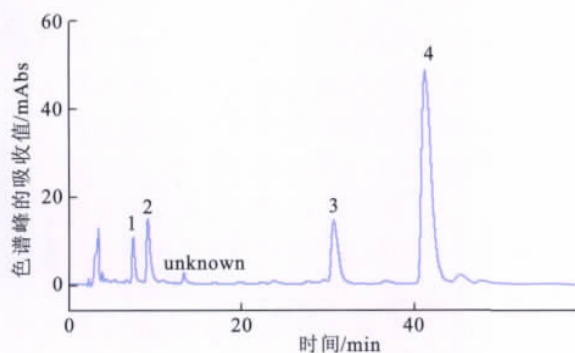


图 2 红栓菌-马钱子发酵液 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatogram of fermentation solution

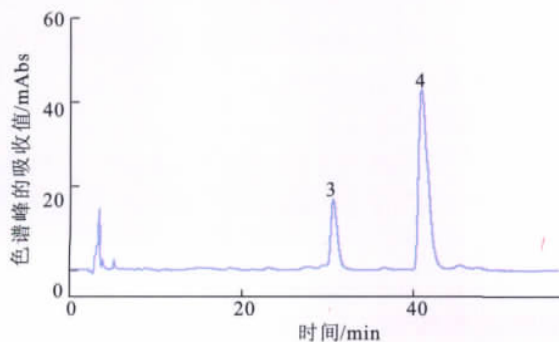


图 3 空白对照 I 溶液 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatogram of blank solution I

2.2 不同碳源对菌丝体生物量和发酵液中生物碱质量分数的影响

以豆饼粉为氮源,选择葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和玉米粉作为红栓菌发酵马钱子的碳源,测定发酵第 5 天的菌体生物量和发酵液中生物碱的质量分数,结果见图 4~6。

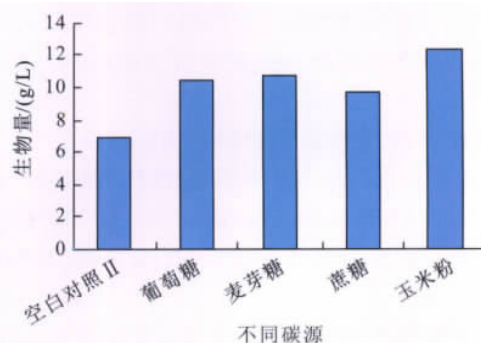


图 4 碳源对菌体生物量的影响

Fig. 4 Effects of carbon source on biomass

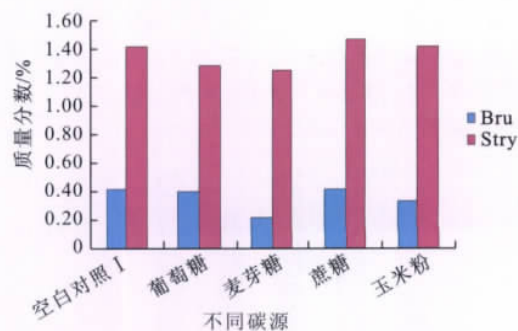


图 5 碳源对发酵液中马钱子碱和土的宁质量分数的影响

Fig. 5 Effects carbon sources on the content of brucine and strychnine

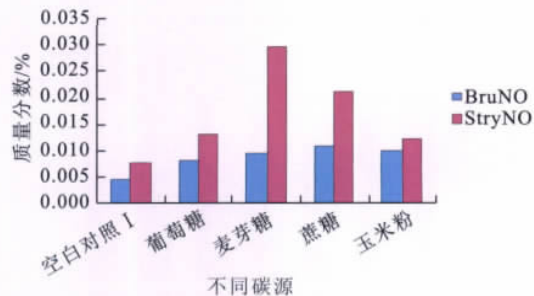


图 6 碳源对发酵液中马钱子碱氮氧化物和土的宁氮氧化物质量分数的影响

Fig. 6 Effect of carbon source on the content of brucine N-oxide and strychnine N-oxide

与发酵空白对照 II 相比,玉米粉培养的菌体生

物量最大,其次为麦芽糖、葡萄糖和蔗糖。

与发酵空白对照 I 相比,麦芽糖发酵培养液中 Stry 和 Bru 的质量分数均最低,而发酵液中 Bru 质量分数较低的为玉米粉培养液,Stry 含量较低的为葡萄糖培养液;所有发酵培养液中 StryNO 和 BruNO 的质量分数均有所增加,其中 BruNO 增加最为明显的是蔗糖培养液,是空白对照的 2.3 倍,StryNO 增加最为明显的是麦芽糖培养液,是空白对照的 3.9 倍。

综合菌体生物量和四种生物碱含量的变化分析,以麦芽糖为碳源的培养液能最大程度地降低马钱子中 Stry 和 Bru 的含量,增加 StryNO 的质量分数,同时又有较高的生物量,因此选择最佳碳源为麦芽糖。

2.3 不同氮源对菌丝体生物量和发酵液中生物碱质量分数的影响

在以部分优化的最佳碳源麦芽糖的基础上,选择豆饼粉、蛋白胨、酵母膏、酵母粉、蚕蛹粉和氯化铵作为红栓菌发酵马钱子的氮源,测定发酵第 5 天的菌体生物量和发酵液中生物碱的质量分数,结果见图 7~9。

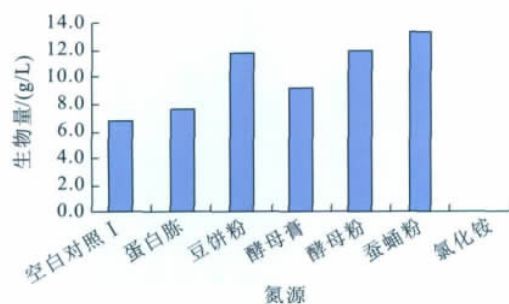


图 7 氮源对菌体生物量的影响

Fig. 7 Effect of nitrogen sources on on biomass

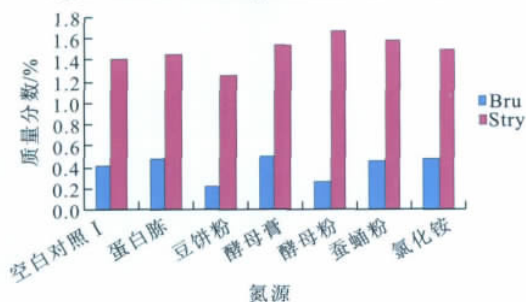


图 8 氮源对发酵液中马钱子碱和土的宁质量分数的影响

Fig. 8 Effect of nitrogen sources on brucine and strychnine content

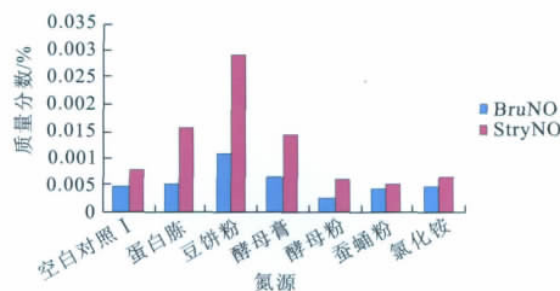


图 9 氮源对发酵液中马钱子碱氮氧化物和土的宁氮氧化物质量分数的影响

Fig. 9 Effect of nitrogen sources on the content of brucine N-oxide and strychnine N-oxide

与发酵空白对照 II 相比,蚕蛹粉发酵培养的菌体生物量最大,其次为酵母粉、豆饼粉、酵母膏和蛋白胨,而氯化铵培养未见红栓菌菌球产生,表明有机氮比无机氮更有利于菌丝体的生长,可能是真菌更容易利用有机氮中的氨基酸,而免去利用无机氮自身合成的过程。

与发酵空白对照 I 相比,仅有豆饼粉发酵培养液中 Stry 和 Bru 的质量分数以及酵母粉发酵培养液中 Bru 的质量分数有所降低,且以豆饼粉为氮源的培养液降幅最大;发酵培养液中 StryNO 和 BruNO 的质量分数增加的有豆饼粉、酵母膏和蛋白胨培养液,其余氮源的培养液中两者的质量分数均未见增加,且以豆饼粉为氮源的培养液增幅最大,分别为空白的 3.8 倍和 2.3 倍,和前面的碳源筛选结果一样。

综合菌体生物量和 4 种生物碱质量分数的变化分析,以豆饼粉为氮源的培养液能最大程度地降低马钱子中 Stry 和 Bru 的质量分数,增加 StryNO 和 BruNO 的质量分数,同时又有较高的菌体生物量,因此最佳氮源为豆饼粉。

2.4 正交试验

选择最佳碳源麦芽糖和最佳氮源豆饼粉的基础上,添加发酵培养基中的其他营养成分,按正交试验表设计的因素水平进行实验,结果见表 3 和表 4。

由表 4 可知,影响红栓菌菌体生物量的因素 A、C、D 均具有显著性,主次顺序为 $A > C > D > B$;影响发酵液中 Stry 和 Bru 质量分数之和的因素 D 具有显著性,主次顺序为 $D > B > A > C$ 。

综合两方面因素,因素 D,即发酵天数在本发

酵过程中是一个具有显著性影响的因素。随着发酵时间的延长,红栓菌菌体生物量不断增加,至第4天达最大值,之后由于营养物质的渐渐缺乏,不再适于菌丝的生长,菌体生物量开始下降。而发酵液中 Stry 和 Bru 的质量分数变化从第4天开始大幅下降。若继续发酵至第6天,会出现菌体老化、自溶的现象。所以液体发酵天数以5 d为宜。

综上所述,以 Stry 和 Bru 质量分数为主要指标,菌体生物量为次要指标,确定红栓菌液体发酵马钱子的优化发酵工艺为 $A_3B_3C_1D_4$,即以麦芽糖为碳源,豆饼粉为氮源,250 mL 三角瓶装入 100 mL 液体培养基,添加 0.25 g 马钱子细粉,接入3个大 小均一的红栓菌菌球,发酵培养5 d。

表 3 正交试验结果
Tab. 3 Result of orthogonal test

编号		因素					生物量/ (g/L)	Bru 质量 分数/%	Stry 质量 分数/%	(Bru+Stry) 质量分数/%
		A	B	C	D	E				
1		1	1	1	1	1	4.4	0.493	1.644	2.137
2		1	2	2	2	2	6.1	0.521	1.837	2.358
3		1	3	3	3	3	9.3	0.535	1.846	2.381
4		1	4	4	4	4	10.3	0.305	1.605	1.910
5		2	1	2	3	4	9.8	0.499	1.739	2.238
6		2	2	1	4	3	7.4	0.141	1.434	1.575
7		2	3	4	1	2	10.0	0.410	1.361	1.771
8		2	4	3	2	1	9.8	0.505	1.748	2.253
9		3	1	3	4	2	11.7	0.294	1.649	1.943
10		3	2	4	3	1	13.7	0.499	1.751	2.250
11		3	3	1	2	4	7.3	0.394	1.225	1.619
12		3	4	2	1	3	8.9	0.450	1.458	1.908
13		4	1	4	2	3	14.6	0.565	1.857	2.422
14		4	2	3	1	4	12.7	0.420	1.366	1.786
15		4	3	2	4	1	11.6	0.206	1.155	1.361
16		4	4	1	3	2	11.1	0.533	1.839	2.372
生物量	K_1	30.1	40.5	30.2	36.0	39.5				
	K_2	37.0	39.9	36.4	37.8	38.9				
	K_3	41.6	38.2	43.5	43.9	40.2				
	K_4	50.0	40.1	48.6	41.0	40.1				
	R	19.9	2.3	18.4	7.9					
质量分数	K_1	8.787	8.741	7.704	7.602	8.001				
	K_2	7.837	7.970	7.865	8.651	8.445				
	K_3	7.720	7.132	8.364	9.242	8.287				
	K_4	7.941	8.442	8.352	6.790	7.552				
	R	1.067	1.609	0.660	2.452					

表 4 正交试验方差分析
Tab. 4 Variance analysis of orthogonal test

方差来源	自由度	生物量				士的宁和马钱子碱含量			
		离差平方和	方差	F 值	显著性	离差平方和	方差	F 值	显著性
A	3	52.29	17.43	193.67	***	0.1767	0.0589	2.07	
B	3	0.77	0.26	2.85		0.3698	0.1233	4.33	
C	3	48.70	16.23	180.37	***	0.0855	0.0285		
D	3	9.16	3.05	33.93	***	0.8921	0.2974	10.43	*
E	3	0.27	0.09			0.1152	0.0384	1.35	

$F_{0.05}(3,3)=9.28$, $F_{0.01}(3,3)=29.46$ 。

2.5 验证实验

为进一步考察工艺的可靠性及稳定性,以优化的发酵工艺制备 3 份样品进行验证,优化后发酵工艺的菌体平均生物量可达 10.6 g/L,与发酵空白 II 比较,增加了 37.7%;与发酵空白 I 比较,Stry 和 Bru 的质量分数和平均值为 11.70%,降低了 8.74%。说明此优化的发酵工艺合理可行。另检测到 StryNO 和 BruNO 的质量分数分别为 0.020 62%、0.010 38%,而发酵空白 I 未能检测到。

3 结 语

通过优化红栓菌液体发酵马钱子的培养条件得到的数据,分析如下:

- 1) 中药加入量与菌体生物量的关系:马钱子对红栓菌的生长起着促进作用,且菌体生物量与中药加入量(0.25~1 g)成正相关。
- 2) 中药加入量与化学成分变化的关系:0.25 g 马钱子粉的加入量能够使红栓菌分泌的酶有效地降解其中的毒性成分,随着中药量的不断增加,发

酵液中 Stry 和 Bru 的质量分数呈上升的趋势。所以控制中药的添加量对于药用真菌发挥正常的代谢功能起着重要作用。

3) 发酵时间与化学成分变化的关系:一般来说,在真菌生长期其耐受有毒底物的能力比较弱。本实验发酵第 3、4 天发酵液中的 Stry 和 Bru 质量分数较高,到了第 5 天质量分数则大幅下降,说明发酵时间是一个重要的因素。

4) 装液量与化学成分变化的关系:250 mL 的三角瓶装液量为 75~125 mL 范围内,发酵液中 Stry 和 Bru 质量分数变化不明显,而当装液量减少至 50 mL 时,发酵液中 Stry 和 Bru 的质量分数达最大,说明过多的通气量并不能给红栓菌发酵带来好处,反而会抑制红栓菌的生长代谢。

5) 接种量与化学成分变化的关系:本实验中接入 3 个红栓菌菌球培养,能使发酵液中 Stry 和 Bru 的质量分数降至最低,如果接入 4 个菌球反而会使其质量分数增高,所以接种量要适当。

参考文献(References):

[1] 李玉萍,冯翰,李秋红,等. 马钱子散的配伍减毒增效实验研究[J]. 辽宁中医杂志,2008,35(10):1554—1555.
LI Yu-ping, FENG Han, LI Qiu-hong, et al. Decreasing toxicity and increasing efficacy on the compatibility of *Nux vomica* Powder: a experiment study[J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2008,35(10):1554—1555. (in Chinese)

[2] 闫静,朱海光,刘志强,等. 马钱子与甘草配伍前后生物碱成分的变化规律[J]. 分析化学研究简报,2007,35(8):1218—1220.
YAN Jing, ZHU Hai-guang, LIU Zhi-qiang, et al. Studies on the alkaloid components in *Strychnos nux vomica* L. un-combined and combined with *Glycyrrhiza uralensis* Fisch[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2007,35(8):1218—1220. (in Chinese)

[3] 饶光立,李桂兰,陈建平,等. 花仙子胶囊有关的急性毒性试验研究[J]. 中药新药与临床药理,2000,11(1):23—25.

- RAO Guang-li, LI Gui-lan, CHEN Jian-ping, et al. A study on the acute toxicity test of Huaxianzi capsule [J]. **Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology**, 2000,11(1):23—25. (in Chinese)
- [4] 李晓丽,宋振华,秦林. 马钱子配伍赤芍前后毒性及镇痛抗炎作用的实验研究[J]. **中国中西医结合杂志**, 1998,18:286—289.
LI Xiao-li, SONG Zhen-hua, QIN Lin. Experimental study on the toxicity and analgesic and anti-inflammatory of *Semen strychni* used singly or in combination with *Radix paeoniae Rubra* [J]. **Chinese Journal Integration Medicine**, 1998,18:286—289. (in Chinese)
- [5] 宋金春,吕桦,邓睿园,等. 马钱子碱固体脂质纳米粒制备及质量评价[J]. **中国药物应用与监测**, 2009,6(1):45—48.
SONG Jin-chun, LU Hua, DENG Rui-yuan, et al. Preparation and quality evaluation of brucine solid lipid nanoparticles [J]. **Chinese Journal of Drug Application and Monitoring**, 2009,6(1):45—48. (in Chinese)
- [6] 王琳,蔡宝昌,李伟东,等. 马钱子碱长循环脂质体的制备和质量评价[J]. **中国药理学杂志**, 2006,41(18):1397—1400.
WANG Lin, CAI Bao-chang, LI Wei-dong, et al. Preparation and quality evaluation of brucine long-circulating liposomes [J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 2006,41(18):1397—1400. (in Chinese)
- [7] 张路,简江波,袁媛,等. 纳米马钱子碱脂质体制备工艺研究[J]. **中成药**, 2005,27(6):632—637.
ZHANG Lu, JIAN Jiang-bo, YUAN Yuan, et al. Preparation of brucine liposomes [J]. **Chinese Traditional Patent Medicine**, 2005,27(6):632—637. (in Chinese)
- [8] 袁红宇,郭立玮,薛焰,等. 超细粉体技术对马钱子中土的宁在体内分布的影响[J]. **南京中医药大学学报:自然科学版**, 2002,18(1):27—28.
YUAN Hong-yu, GUO Li-wei, XUE Yan, et al. Effect on the distribution of strychnine in *Semen strychni* in vivo by fine levigation technique [J]. **Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine: Natural Science**, 2002,18(1):27—28. (in Chinese)
- [9] 潘扬,张弦,潘自皓,等. 正交设计法确定土的宁氮氧化物半合成最佳条件的研究[J]. **中国药理学杂志**, 2008,43(17):1346—1349.
PAN Yang, ZHANG Xian, PAN Zi-hao, et al. Study on optimization of experimental conditions for semisynthesis of strychnine N-oxide by orthogonal design [J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 2008,43(17):1346—1349. (in Chinese)
- [10] 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 Dong-jun, LIU Liang-jing, LIU Xue-xiang, et al. Analysis of NMR data of brucine N-oxide isolated from *Semen strychni* fermented by *Trametes cinnabarina* [J]. **Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine: Natural Science**, 2009,25(2):125—128. (in Chinese)