

- elements determining and medical values of edible okra [J]. *Stud Trace Elements Health*(微量元素与健康研究), 2000, 17(1): 46-47.
- [5] WANG J Y, ZHOU J, TANG G P. Study on anti-fatigue effects of okra [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2003, 20(4): 316-317
- [6] The Standard of Health Food Test and Asses(保健食品检验与评价技术规范 2003 年版) [S]. 2003: 87-93
- [7] CHEN D D, PENG C. Study on anti-fatigue and anti-oxidant

- effects of *Chuanminshen violaceum* [J]. *Res Pract Chin Med*(现代中药研究与实践), 2011, 25(1): 28-30
- [8] ZHOU X Y, CHEN J, LIU C X, et al. Empirical study on anti-fatigue effect of L-Carnitine [J]. *J Trop Med*(热带医学杂志), 2011, 11(7): 740-742.
- [9] YI J, JI Y, LIU J, et al. Study on anti-fatigue effects and mechanism of *Hovenia dulcis* Thunb water extracts [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2009, 32(6): 962-965.

收稿日期: 2012-02-03

## 马钱子生物碱组分的提取和分离制备

蒋莹莹, 陈海波, 李玉燕, 朱敏, 马凤森\* (浙江工业大学, 杭州 310014)

**摘要:** 目的 建立马钱子生物碱组分的超声提取方法, 研究其分离纯化工艺。方法 以马钱子碱和士的宁含量为指标, 采用均匀设计筛选马钱子生物碱的最佳超声提取工艺, 并采用高速逆流色谱法分离其生物碱组分。结果 最佳提取工艺为 10 倍量 50%乙醇溶液(pH=5), 在 600 W 功率下超声 60 min; 应用高速逆流色谱法, 以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(3:5:3:5)为溶剂体系, 分离得到纯度为 94.1%的马钱子碱组分和纯度为 92.5%的士的宁组分。结论 本实验优选出的提取工艺稳定、经济、可行, 高速逆流色谱适用于马钱子生物碱的分离纯化。

**关键词:** 马钱子; 生物碱; 超声提取; 高速逆流色谱

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)12-1094-04

### Extraction and Isolation of Alkaloids from Strychni Semen

JIANG Yingying, CHEN Haibo, LI Yuyan, ZHU Min, MA Fengsen\* (*Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an efficient method for extracting and isolating the alkaloids from Strychni Semen.

**METHODS** With the content of brucine and strychnine as index, the ultrasonic assisted extraction process was optimized by uniform design method, and high-speed counter-current chromatography(HSCCC) was employed to separate the alkaloids.

**RESULTS** The optimum condition of extraction was as follows: ratio of solid to liquid was 1 : 10, ethanol concentration was 50%(pH=5), ultrasonic power was 600 W, and the extraction time was 60 min; the two-phase solvent system of HSCCC composed of *n*-hexane-ethyl acetate-methanol-water(3 : 5 : 3 : 5) was selected, brucine with the purity of 94.1% and strychnine with the purity of 92.5% were obtained. **CONCLUSION** The optimum extraction method is economical and feasible. HSCCC is suitable for the isolation of alkaloids from Strychni Semen.

**KEY WORDS:** Strychni Semen; alkaloids; ultrasonic extraction; high-speed counter-current chromatography

马钱子(*Strychni Semen*)为马钱子科植物马钱子(*Strychnos nux-vomica* L.)及云南长籽马钱子(*Strychnos pierriana* A.W.Hill)的干燥成熟种子, 研究发现其主要有效成分为生物碱类, 含量约为生药的 1.5%~5%, 主要为士的宁(strychnine)、马钱子碱(brucine)及其氮氧化物等, 其中士的宁含量最大, 占生物碱的 35%~50%。这 2 种生物碱既是主

要生物活性成分, 又是主要毒性成分。士的宁有强中枢兴奋作用、剧毒(成人口服 5~10 mg 就会有中毒现象, 30 mg 即可致死)。有研究表明<sup>[1]</sup>马钱子粉末及非士的宁生物碱部分有明显抗炎作用, 士的宁部分无此作用, 提示在治疗风湿痹症的临床应用上, 去士的宁的生物碱组分的药效较为显著, 且毒性比士的宁低, 因此定向提取分离马钱子生

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y2111194); 浙江省重大科技专项重点社会发展项目(2010C13014)

作者简介: 蒋莹莹, 女, 硕士生 Tel: (0571)88871500 E-mail: emily-one@163.com \*通信作者: 马凤森, 男, 硕士, 教授 Tel: (0571)88871500 E-mail: merrigen@126.com

物碱组分, 建立非士的宁生物碱组分的制备方法是进一步研究其药效和毒性的必要前提。

本实验通过均匀设计试验优选马钱子生物碱的超声提取方法, 并应用高速逆流色谱法分离制备去士的宁的马钱子生物碱组分。

## 1 仪器与试剂

1200 Agilent 高效液相色谱(美国 Agilent 公司); pHs-3C 酸度计(上海雷磁仪器厂); XS205 电子微量天平(Mettler-Toledo International, Inc.); CYXNW-2B 超声循环提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司); TBE300A 高速逆流色谱仪(上海同田生物技术有限公司)。

马钱子购于杭州华东中药饮片有限公司, 批号: 101011, 经该公司质检科郑霄鹰主管药师鉴定为马钱科植物马钱(*Strychnos nux-vomica*. L.)的干燥成熟种子; 马钱子碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110706-200505, 纯度 95.9%); 士的宁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110705-200306, 纯度 97%); 乙腈、庚烷磺酸钠为色谱纯; 乙酸乙酯、正己烷、甲醇等试剂均为分析纯。

## 2 马钱子生物碱组分的提取方法

### 2.1 含量测定方法

**2.1.1 色谱条件** 安捷伦 XDB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.01 mol·L<sup>-1</sup> 庚烷磺酸钠与 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾等量混合(10%磷酸溶液调 pH 为 2.8)(21:79)为流动相, 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 260 nm。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取士的宁对照品 6.0 mg, 马钱子碱对照品 5.0 mg, 分别用甲醇溶解并定容于 25 mL 量瓶。分别量取 2 mL 于同一 10 mL 量瓶, 流动相定容, 即得。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 称取制马钱子 200 g, 粉碎, 加 10 倍量 50%乙醇溶液(pH=5)超声提取 60 min(功率 600 W), 滤过, 于旋转蒸发仪中浓缩, 精密量取 1 mL 浓缩液, 用 20 mL 甲醇超声助溶, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 用甲醇定容于 25 mL 量瓶, 再取 2 mL 于 10 mL 量瓶, 流动相定容, 即得供试品溶液。

**2.1.4 标准曲线的制作** 取“2.1.2”项下对照品溶液, 分别进样 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件检测, 记录色谱图。相应的对照品峰面积积分值为纵坐标,

进样量(μg)为横坐标进行线性回归, 得到马钱子碱回归方程为  $Y=1\ 616.5X-7.873\ 3$ ,  $r=0.999\ 9$ , 表明马钱子碱进样量在 0.2~2.0 μg 内线性关系良好。得到士的宁回归方程为  $Y=1\ 746.1X-12.767$ ,  $r=0.999\ 9$ , 表明士的宁进样量在 0.24~2.4 μg 内线性关系良好。

**2.1.5 仪器精密度试验** 精密吸取对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 连续进样 6 次, 计算峰面积的 RSD 值分别为 0.15%, 0.18%, 说明此方法的仪器精密度良好。

**2.1.6 重复性试验** 精密吸取同一批号提取液 6 份, 每份 1 mL, 按“2.1.3”项下方法处理, 进样检测, 计算得到马钱子碱和士的宁峰面积的 RSD 值均为 0.015%, 说明此方法的重复性良好。

**2.1.7 加样回收率测定** 取同一已知含量(马钱子碱 4.90 mg·mL<sup>-1</sup>, 士的宁 5.86 mg·mL<sup>-1</sup>)的马钱子药材提取液 6 份, 每份 1 mL, 各加 20 mL 含马钱子碱 0.25 mg·mL<sup>-1</sup>、士的宁 0.3 mg·mL<sup>-1</sup> 的甲醇溶液, 混匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 用甲醇定容于 25 mL 量瓶, 再取 2 mL 于 10 mL 量瓶, 流动相定容, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 1。测得马钱子碱和士的宁的平均回收率为 100.0%, 100.5%, RSD 值分别为 0.78%, 0.95% ( $n=6$ )。说明此方法准确度良好。

表 1 马钱子碱回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 1 Results of recovery test( $n=6$ )

组分名称	原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率/%	RSD/%
马钱子碱	4.90	5.0	9.89	99.8	100.0	0.78
	4.90	5.0	9.86	99.2		
	4.90	5.0	9.90	100.0		
	4.90	5.0	9.91	100.2		
	4.90	5.0	9.97	101.4		
	4.90	5.0	9.87	99.4		
士的宁	5.86	6.0	11.83	99.5	100.5	0.95
	5.86	6.0	11.87	100.2		
	5.86	6.0	11.93	101.2		
	5.86	6.0	11.98	102.2		
	5.86	6.0	11.84	99.7		
	5.86	6.0	11.88	100.3		

## 2.2 马钱子生物碱超声提取法的优化

**2.2.1 均匀设计试验及结果** 每次称取 200 g 制马钱子, 粉碎, 加入 10 倍量乙醇溶液(pH=5)超声提取, 以乙醇浓度( $X_1$ )、提取时间( $X_2$ )、超声功率( $X_3$ )为 3 个主要影响因素, 每个因素考察 5 个水平, 选用  $U_{10}(10^8)$  使用表进行均匀实验, 以马钱子总生

物碱提取量为主要评价指标进行均匀设计, 试验设计及结果见表 2。

表 2  $U_{10}(10^8)$  均匀设计试验及结果

Tab 2 Design and results of  $U_{10}(10^8)$  uniform test

序号	乙醇浓度 $X_1/\%$	超声时间 $X_2/\text{min}$	超声功率 $X_3/\text{W}$	马钱子碱 提取量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	士的宁 提取量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	20	60	400	6.06	6.79
2	35	60	600	9.48	10.76
3	50	50	1 000	8.07	9.62
4	65	50	200	9.29	11.56
5	80	40	400	6.01	8.09
6	20	40	800	6.09	7.19
7	35	30	1 000	6.37	7.34
8	50	30	200	7.55	9.06
9	65	20	600	4.96	6.21
10	80	20	800	5.33	6.63

**2.2.2 均匀设计实验结果分析** 以马钱子总生物碱提取率为指标, 将均匀设计试验结果输入计算机进行多元回归处理, 得回归方程:  $Y = -1.8773 + 0.2448X_1 + 0.08223X_2 - 0.002281X_1^2$ , 复相关系数为 0.8887,  $F = 7.5165 > F_{0.05}$ ,  $P < 0.05$ 。由方程拟合出的优化条件为乙醇浓度 50%, 超声时间 60 min, 超声功率 600 W。

**2.2.3 验证试验** 依照最优条件下验证试验, 测定结果显示马钱子碱提取量为  $9.94 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 与均匀设计试验预测结果接近, 表明该提取工艺稳定、可行。

### 3 高速逆流色谱分离马钱子生物碱组分的研究

#### 3.1 马钱子总生物碱的纯化

参考文献及前期试验, 称取马钱子粉末适量, 加入 10 倍量 50% 乙醇溶液(盐酸调 pH 5.0), 超声 60 min, 超声功率为 600 W, 提取液减压蒸馏得浸膏, 加入 10 倍量  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 溶液, 超声使其分散均匀, 用 40% NaOH 溶液调 pH $\approx$ 12, 再用二氯甲烷分次萃取, 合并萃取液, 减压干燥除去二氯甲烷, 得到纯化的马钱子总生物碱, 放置干燥器中备用。

#### 3.2 两相溶剂体系的选择

在分液漏斗中配制正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(3:5:3:5)混合溶液, 两相溶剂体系充分振摇后静置, 30 s 后分层。上相作为固定相, 下相作为流动相。

#### 3.3 样品溶液的制备

称取“3.1”项下方法制得的马钱子总生物碱 400 mg, 用 10 mL 流动相和 10 mL 固定相超声助

溶,  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 即得样品溶液。

### 3.4 高速逆流色谱分离过程

用最大流速将固定相泵入并充满分离螺旋管, 开启检测器, 检测波长为 254 nm,  $800 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  启动主机, 将流动相以  $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  的流速泵入管柱, 待流动相从管柱出口流出, 基线稳定后, 将“3.3”项下的样品溶液由进样器注入, 管柱出口流出物根据色谱图手动收集, 通过与生物碱对照品比较, 用 HPLC 检测并用面积归一化法分析其纯度。该溶剂体系保留率为 54.1%。分离结果见图 1, 组分 I 为混合组分, 马钱子碱纯度为 79.9%, 组分 II 为马钱子碱, 纯度为 94.1%, 组分 III 为士的宁, 纯度为 92.5%。

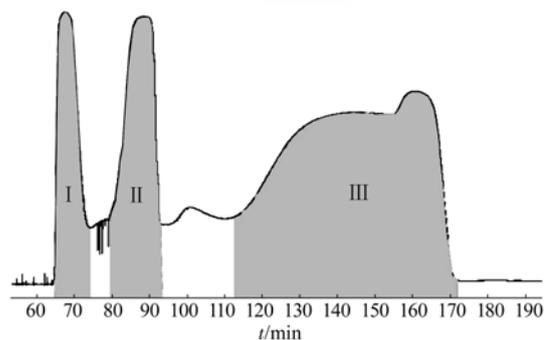


图 1 马钱子生物碱高速逆流色谱图

Fig 1 Chromatogram of the crude extracts from Strychni Semen

### 4 讨论

参考文献[2-5]以马钱子碱和士的宁含量为指标, 本课题组通过对热回流、微波辅助、超声辅助提取方法的比较, 综合考虑提取效率、有机溶剂用量及试验操作的安全性, 选择超声辅助提取法为优选方法。文献中所采用的超声提取设备均为普通的超声清洗器, 并不适用于扩大生产, 且具有安全隐患, 本实验研究采用高效安全的专业化循环超声提取设备, 并针对其性能特点进行马钱子生物碱提取方法的优化。

高速逆流色谱广泛应用于植物中生物碱的分离制备, 相较于传统的分离方法, 其具有分离制备量大, 分离效率高, 适用范围广等特点。马钱子中主要生物碱成分士的宁和马钱子碱的结构相似, 为两者的分离制备带来困难, 高速逆流色谱法应用于两者的分离国内外少见报道, 实验室前期参考文献筛选了叔丁基甲醚-乙腈-水<sup>[6]</sup>、氯仿-甲醇-水、正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水等溶剂体系, 样品在各体系中上下相的分配系数  $K$  均满足分离

要求(0.5<K<2),但叔丁基甲醚-乙腈-水体系在固定相中加入保留酸,同时在流动相中加入洗脱碱,利用pH值的突变来分离生物碱,其收集液中目标组分成盐,后处理步骤繁琐,且易引入其他杂质;氯仿-甲醇-水体系用于分离马钱子生物碱易产生严重的乳化现象;而正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系为高速逆流色谱常用的溶剂体系,国内外未见文献报道将其应用于马钱子生物碱的分离制备。本课题组经比较研究后选择该方法,不仅所使用的有机溶剂均易挥发,后处理简便,且规模分离所得去土的宁马钱子生物碱组分适用于后续药效毒理实验及制剂的制备。

## REFERENCES

[1] XU L J, WEI S C, LU F E, et al. Comparison of effects of

several portions derived from Semen Strychni on experimental arthritis [J]. J Tongji Med Univ(同济医科大学学报), 2001, 30(6): 564-565.

[2] ZOU J G, XU X L, LIU Y Y. Ultrasonic-assisted extraction of alkaloids from Semen Strychni by response surface analysis [J]. Sci Food(食品科学), 2009, 30(6): 111-114.

[3] ZOU J G, LIU F, XU X L, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of total alkaloids from Semen Strychni [J]. Sci Food(食品科学), 2010, 31(8): 116-119.

[4] LI H, XU Z S, CHEN Z P, et al. Orthogonal test for optimizing the brucine extraction process [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2009, 25(6): 446-447.

[5] QI Y, CHEN J, CAI B C, et al. Strychnos alkaloid extraction and purification processes and study of anti-tumor [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(3): 405-408.

[6] LI H, LIU X, CAI H, et al. Separation and purification of brucine and strychnine from *Strychnos nux-vomica* L. by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2010, 38(12): 1703-1707.

收稿日期: 2012-03-02

## 不同干燥方法对鸡蛋花挥发油化学成分的影响

张璐, 张斌, 陈飞龙\* (南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

**摘要:** 目的 对比鸡蛋花不同干燥方法对其挥发油成分的影响。方法 采用水蒸汽蒸馏法进行挥发油提取,并用气相色谱质谱联用技术对挥发油进行了分离和鉴定,采用面积归一化法确定各成分的相对百分含量。结果 挥发油提取率:鲜品0.15%、阴干0.05%、晒干0.02%。气相色谱鉴定出58种成分,最后确定28种,主要为橙花叔醇、金合欢醛、苯甲酸苄酯、水杨酸苯甲酯、苯甲酸香叶酯、橙花基芳樟醇异构体、 $\alpha$ -异戊酸松油酯等。结论 鸡蛋花的干燥方法阴干优于晒干,既保存了挥发油的含量也降低了毒性成分。鸡蛋花挥发油易受日照、温度、放置时间的影响,因此加工过程中应严格按照规范操作。

**关键词:** 鸡蛋花; 干燥; 挥发油; 气相色谱质谱联用

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)12-1097-04

## Effects of Different Drying Methods on the Components of Essential Oil in *Plumeria Rubravar Actifolia*

ZHANG Lu, ZHANG Bin, CHEN Feilong\* (College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To evaluate the effects of different drying methods on the essential oil from *Plumeria rubra* L. var. *actifolia* Bailey. **METHODS** To extract the essential oil by steam distillation, separate and identify by GC-MS. The relative contents in percentage were calculated with area normalization method. **RESULTS** Essential oil extraction rates were 0.15%, 0.05% and 0.02% for fresh, drying in the shade and drying in the sun samples, respectively. In 58 substances, 28 were identified from *Plumeria rubra* L. var. *actifolia* Bailey, such as d-nerolidol, farnesol, benzyl benzoate, geranyl benzoate, neryl linalool isomer and  $\alpha$ -terpinyl isovalerate. **CONCLUSION** The *Plumeria rubra* L. var. *actifolia* Bailey drying in the shade is better than drying in the sun. It is favorable to keep the content of the essential oil and reduce toxicity. The essential oil of *Plumeria rubra* L. var. *actifolia* Bailey is easily affected by sunshine, temperature and storage time. Standard operation is very important in production.

作者简介: 张璐, 女, 实验师 Tel: (020)61648264 E-mail: ulgnahz@163.com

\*通信作者: 陈飞龙, 男, 硕士, 实验师 Tel: (020)62789112 E-mail: 11195719@163.com