

文章编号:1006-3080(2012)02-0195-05

## 不同粒径马钱子粉中马钱子碱、土的宁的含量分析与比较

倪力军, 盖群, 陈露, 张立国  
(华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237)

**摘要:**为考察粒径对马钱子粉中活性(毒性)成分含量的影响,制备了20~200目下的马钱子粉样品;采用扫描电子显微镜(SEM)观察各样品的微观形貌,利用薄层色谱法(TLC)对各样品进行定性鉴别并用高效液相色谱法(HPLC)测定各样品中马钱子碱、土的宁含量。结果表明:不同粒径下马钱子粉样品微观形态组成比例存在差异,而且马钱子碱、土的宁含量不同,马钱子碱(或土的宁)在部分样品中的含量存在显著性差异。因此在马钱子药粉入药时,应严格控制其粒径,结果显示宜将马钱子粉的粒径控制在100~200目之间。

**关键词:**马钱子; 马钱子碱; 土的宁; 粒径; SEM; TLC; HPLC  
**中图分类号:**R917 **文献标志码:**A

## Analysis and Comparison of Content Dependence of Brucine and Strychnine on Different Particle Sizes of Semen Strychni Powder

NI Li-jun, GAI Qun, CHEN Lu, ZHANG Li-guo  
(School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** To study the effect of the particle size on the active (toxic) component contents of Semen Strychni powder, 20—200 mesh of Semen Strychni powder samples were prepared. The micro morphology of these samples were characterized by scanning electron microscope (SEM) and the samples were qualitatively identified by TLC. The contents of brucine and strychnine of each sample were determined by HPLC. The results indicated that there existed some differences between morphology compositions of Semen Strychni powder samples with different particle sizes. Moreover, the contents of brucine, strychnine of different samples were different, and the contents of brucine (or strychnine) in some samples of Semen Strychni powder were significantly different. So when Semen Strychni powder is applied to traditional Chinese medicine, its particle size should be highly controlled. Upon the results of the research, the particle size of Semen Strychni powder had better be 100—200 mesh.

**Key words:** Semen Strychni; brucine; strychnine; particle size; SEM; TLC; HPLC

马钱子具有通络止痛、散结消肿的功效,是临床上治疗风湿性疾病、神经系统疾病等<sup>[1]</sup>的常用中药材,经炮制的马钱子药材多采用粉末形式入药(如腰痛宁胶囊、风湿马钱片等)<sup>[2]</sup>。马钱子中马钱子碱与

土的宁既是有效成分也是有毒成分而且马钱子药材的起效剂量与中毒剂量相差很小<sup>[3-4]</sup>。相关研究表明,半夏块茎、葛根等药材不同粒径药粉中的有效成分含量不同<sup>[5-6]</sup>,药粉粒径还对某些药材中活性成分

收稿日期:2011-11-21

作者简介:倪力军(1963-),女,湖南益阳人,教授,博士,研究方向为中药、天然产物质量分析与控制。E-mail:nljfy@sina.com

通讯联系人:张立国,E-mail:zlgfyt@sina.com

的溶出<sup>[7-8]</sup>有影响;另有研究报道不同粒径下马钱子粉急毒实验结果存在显著差异<sup>[9-10]</sup>。可见药粉粒径对中药有效成分的含量、溶出及药理学实验结果均会产生影响。由于马钱子药材的特殊性(有毒成分同时为有效成分),应就粒径对马钱子碱与土的宁含量、溶出及毒理的影响进行充分研究,为马钱子入药粉碎粒径的选择提供指导和依据,在降低用药风险的同时保证药物疗效。为此,本文对不同粒径下马钱子粉进行微观形貌及定性分析,并测定和比较不同粒径下马钱子粉中马钱子碱、土的宁含量。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验药材

制马钱子由承德颈复康药业有限公司提供;将 50 °C 下干燥 2 h 后的制马钱子粉碎后,分别过 20、40、60、100、140、200 目标准筛,制得马钱子全粉及 20~40、40~60、60~100、140、200 目马钱子粉。

### 1.2 实验试剂

马钱子碱对照品(批号 110706-200505,中国药品生物制品检定所)、土的宁对照品(批号 110705-200005,中国药品生物制品检定所);乙腈(色谱纯,德国 MERCK 公司)、庚烷磺酸钠(批号 34590 阿拉丁,离子色谱级);甲苯、丙酮、乙醇、浓氨水、盐酸、甲醇、氢氧化钠、无水硫酸钠、三氯甲烷,均为分析纯。

### 1.3 实验仪器

FW177 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);HWS-28 型电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司);Quanta TM250 环境扫描电子显微镜;Nicomp380 Z3000 激光粒度仪;岛津 20 AD-RX 高效液相色谱仪(日本岛津公司);AR 1140 / C 型分析天平(美国 Ohaus 公司);雷磁 S-25 型数显 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);SHB-3 型循环水真空泵(上海申生科技有限公司);DZF-6050 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);20、100、140 目标准筛(上海宝蓝实验仪器制造有限公司);40 目标准筛(浙江绍兴越东仪器筛具厂);60 目标准筛(浙江上虞市肖金五金仪器厂);200 目标准筛(南京东脉科仪有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 扫描电镜表征

使用 Quanta TM250 环境扫描电子显微镜对各粒径马钱子粉进行表征,观察其表面结构,结果见图 1。由图可见,全粉中存在不同大小的胚乳及表皮细胞;20~40 目马钱子粉中为大颗粒胚乳及成块的表皮细胞;40~60、60~100 目马钱子粉基本均为胚乳细胞颗粒;140 目样品中开始有打散成丝状的表皮细胞出现。随着样品颗粒越来越小,其中包含的表皮细胞比例越来越高。

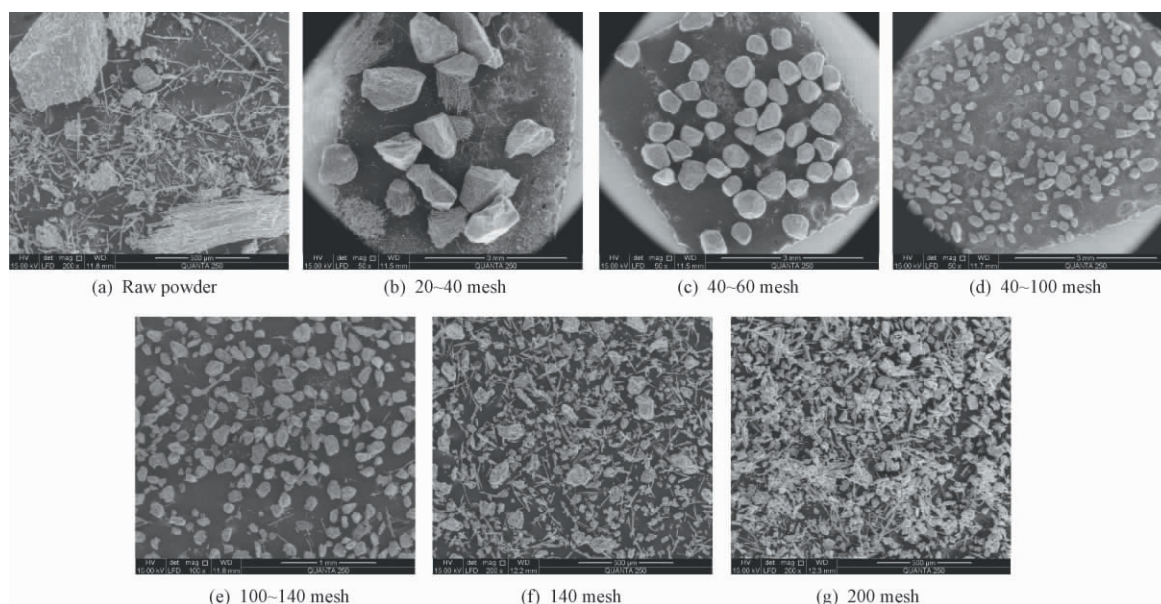


图 1 各粒径马钱子粉样品扫描电镜图

Fig. 1 SEM micrographs of Semen Strychni powder with different particle sizes

## 2.2 马钱子粉粒度分布

使用 Mastersizer 2000 激光粒度仪,对各粒径马钱子粉样品采用干法测试其粒度分布。结果见图2及表1。

## 2.3 马钱子样品薄层色谱鉴别

按照《中华人民共和国药典》2010 年版第1部中方法<sup>[2]</sup>,对不同粒径马钱子粉进行定性鉴定,结果见图3。测量各原点到相应斑点中心的距离(A)及原点到溶剂前沿的距离(B),并计算其  $R_f$  值( $R_f = A/B$ ),结果为马钱子碱、土的宁的  $R_f$  值分别为0.44、0.58。

表1 不同粒径马钱子粉粒度测试结果

Table 1 Results of particle size determination of Semen Strychni powder samples

Parameter	Particle size/ $\mu\text{m}$			
	$D(4,3)$	$d(0.1)$	$d(0.5)$	$d(0.9)$
20~40 mesh	960.046	555.747	990.930	1461.577
40~60 mesh	525.325	373.987	510.709	695.455
60~100 mesh	293.632	172.263	258.897	293.632
100~140 mesh	150.152	99.202	143.976	209.614
140 mesh	43.823	10.072	33.195	91.486
200 mesh	41.195	10.964	35.278	77.414

$D(4,3)$ —Volume-weighted average;  $d(0.1)$ ,  $d(0.5)$ ,  $d(0.9)$ —10%, 50%, 90% of the cumulative distribution in the vertical axis of the corresponding particle size, respectively



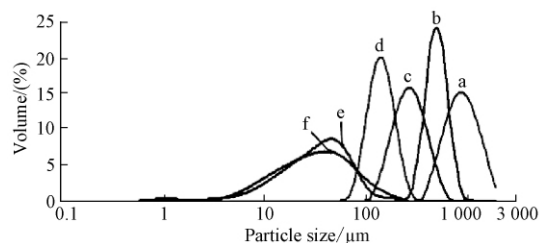
a—Raw powder; b—Reference substance of brucine; c—Reference substance of strychnine; d—20~40 mesh; e—40~60 mesh; f—60~100 mesh; g—100~140 mesh; h—140 mesh; i—200 mesh; j—Extracts of Semen Strychni; k—Mixed reference substance of brucine and strychnine

图3 不同粒径马钱子粉薄层色谱图

Fig. 3 Thin-layer chromatogram of Semen Strychni powder with different particle sizes

## 2.4 马钱子碱、土的宁 HPLC 含量测定方法的建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱采用 Inertsil ODS-SP 柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5 $\mu\text{m}$ ), 流动相 A (乙腈), B (0.01 mol/L 庚烷磺酸钠与 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液等体积混合,  $\omega = 10\%$  磷酸调节 pH 为 2.72), 流动相 A 与 B 的体积比为 30:70, 检测波长



a—20~40 mesh; b—40~60 mesh; c—60~100 mesh; d—100~140 mesh; e—140 mesh; f—200 mesh

图2 不同粒径马钱子粉粒度分布情况

Fig. 2 Particle size distribution of Semen Strychni powder with different particle size

254 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.2 马钱子碱、土的宁对照品溶液 精密称量马钱子碱对照品 0.0054 g, 土的宁对照品 0.0060 g。分别加三氯甲烷溶解后, 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度、摇匀, 即得质量浓度分别为 0.54 mg/mL 的马钱子碱、0.60 mg/mL 的土的宁对照品溶液。

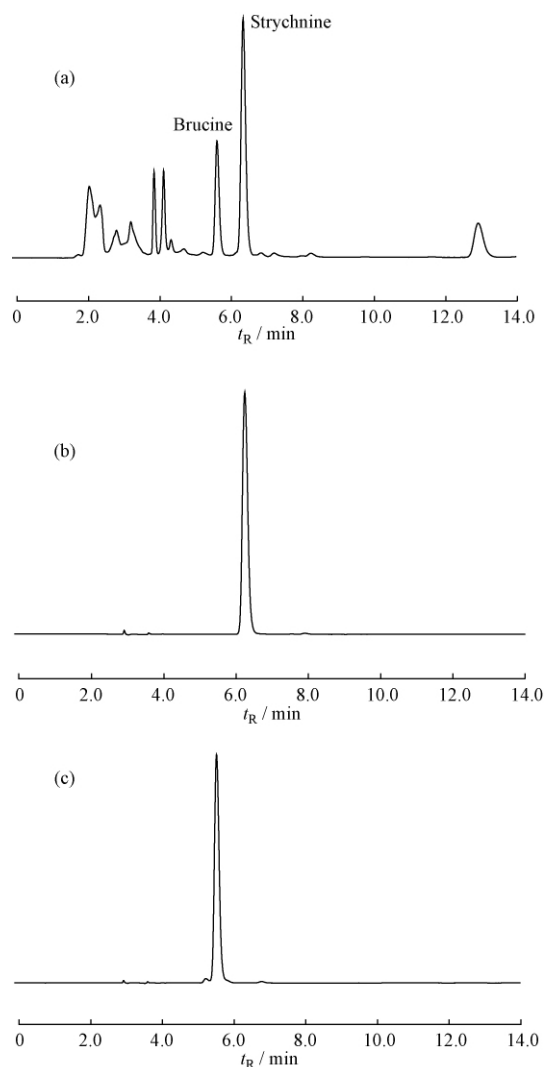
2.4.3 供试品溶液的制备 按照《中华人民共和国药典》2010 年版第1部中马钱子含量测定方法<sup>[2]</sup>, 其中马钱子全粉、20~40 目、40~60 目样品经进一步粉碎至完全通过 60 目筛。马钱子碱的出峰时间为 5.589 min, 土的宁的出峰时间为 6.319 min。标准品及样品色谱图见图4, 马钱子碱、土的宁对照色谱峰峰形尖锐, 对称性好且样品峰与对照品峰对应良好。

2.4.4 标准曲线的绘制 取马钱子碱标准品溶液、土的宁标准品溶液, 分别进样 0.1、0.3、0.5、1.0、2.0  $\mu\text{L}$ 。以质量 (ng) 为横坐标, 峰面积为纵坐标分别绘制马钱子碱、土的宁的标准曲线如下:

$$y = 1880.4x - 15692$$

$$y = 2291.5x - 20825$$

相关性均为 1, 表明马钱子碱、土的宁在 54~1080 ng 及 60~1200 ng 范围内线性关系良好。



(a)—Test sample; (b)—Reference substance of strychnine;  
(c)—Reference substance of brucine

图4 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms

2.4.5 精密度实验 分别取 0.54 mg/mL 马钱子碱、0.6 mg/mL 土的宁标准品溶液,在同样条件下,连续进样 8 次进行测定,马钱子碱相对标准偏差为 0.26%;土的宁相对标准偏差为 0.48%。表明方法的精密度很好。

2.4.6 稳定性实验 取马钱子全粉样品溶液,分别于 0、2、4、6、8、12 h 时进样进行测定,马钱子碱、土的宁相对标准偏差分别为 0.20%、0.25%。表明方法在 12 h 内稳定性很好。

2.4.7 重现性考察 按照供试品溶液的制备方法,分别制备 6 个马钱子 60~100 目样品溶液进行测定,以马钱子碱峰面积及土的宁峰面积计,马钱子碱、土的宁相对标准偏差分别为 0.83%、2.28%。表明方法的稳定性良好。

2.4.8 加样回收率考察 精密称取马钱子碱对照

品 0.0180 g、土的宁对照品 0.0440 g,分别置于 5 mL 容量瓶中,用三氯甲烷定容至刻度,摇匀即得到 3.60 mg/mL 马钱子碱对照品溶液、8.80 mg/mL 土的宁对照品溶液。取已知含量的 40~60 目马钱子样品 6 份,每份约 0.3 g,加入 3.0 mL 氢氧化钠溶液,混匀,放置 30 min 后,分别精密加入上述马钱子碱对照品溶液 0.833 mL、土的宁对照品溶液 0.795 mL 后,用三氯甲烷补足 20 mL,其余操作与 2.4.3 节药典方法相同,按 2.4.1 节色谱条件测定马钱子碱及土的宁的含量,进样量 4  $\mu$ L。实验结果表明:6 个样品的马钱子碱加样回收率为 97.66%~102.63%,平均回收率为 100.38%,相对标准偏差 1.97%;土的宁加样回收率为 96.06%~100.87%,平均回收率为 98.37%,相对标准偏差为 2.17%。

2.4.9 样品含量测定 按 2.4.3 节方法进行样品测定( $n=3$ ),结果见表 2。

表 2 不同粒径下马钱子粉样品中马钱子碱、土的宁的含量

Table 2 Brucine and strychnine content in different particle size powder

Mesh	$w_B$ / (%)	RSD/ (%)	$w_S$ / (%)	RSD/ (%)	$w_B + w_S$ / (%)
Raw powder	1.23	0.78	2.40	0.66	3.63
20~40	1.03	1.74	2.43	2.36	3.46
40~60	1.00	1.35	2.29	1.57	3.29
60~100	1.11	2.88	2.66	2.54	3.77
100~140	1.08	1.36	2.52	0.56	3.60
140	1.08	1.97	2.47	1.72	3.55
200	1.00	0.63	2.30	1.89	3.30

B—Brucine; S—Strychnine

2.4.10 不同样品间马钱子碱(或土的宁)含量的显著性检验 本文采用成对  $t$  检验法(显著性水平  $\alpha=0.05$ )比较不同粒径马钱子粉样品中马钱子碱(或土的宁)含量有无显著性差异<sup>[11]</sup>。设两个马钱子粉样品中马钱子碱(或土的宁)含量测试的均值分别为  $\bar{x}_1$  和  $\bar{x}_2$ ,若做假设  $H_0$ ,即假设两样品中所得马钱子碱(或土的宁)均值没有差异,则根据两样品的单一标准偏差  $s_1$  和  $s_2$  做综合标准偏差的计算

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (1)$$

$t$  值按下式计算

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (2)$$

式中,  $n_1$  和  $n_2$  分别为两样品测试次数,  $t$  的自由度为  $n_1 + n_2 - 2$ 。假设  $t(\alpha, f)$  为显著性水平为  $\alpha$ 、自由度

为 $\beta$ 的 $t$ 分布表对应的数值,如果 $|t| \geq t(\alpha, f)$ ,则否定原假设,即两样品中马钱子碱(或土的宁)含量有显著性差异。 $t$ 检验结果分别如表 3 与表 4 所示。除表

中加灰背景的数据所对应的样品间的马钱子碱(或土的宁)含量无显著性差异外,其余样品间的马钱子碱(或土的宁)均有显著性差异。

表 3 不同粒径下马钱子粉中马钱子碱含量的成对  $t$  检验结果

Table 3 Significance  $t$  test results of brucine content in powder of Semen Strychni seed with different particle sizes

Mesh	Raw powder	20~40	40~60	60~100	100~140	140	200
Raw powder	0	17.007 5	24.385 0	6.241 1	15.282 8	11.697 8	34.754 6
20~40		0	2.519 9	-3.769 2	-3.396 1	-2.679 4	2.707 3
40~60			0	-5.617 4	-6.799 8	-5.220 2	-0.340 1
60~100				0	1.690 0	1.662 8	5.826 5
100~140					0	0.168 2	8.171 2
140						0	5.702 3
200							0

$$t(\alpha, f) = t(0.05, 4) = 2.776 5$$

表 4 不同目数下马钱子粉中土的宁含量的成对  $t$  检验结果

Table 4 Significance  $t$  test result of strychnine content in powder of Semen Strychni seed with different particle sizes

Mesh	Raw powder	20~40	40~60	60~100	100~140	140	200
Raw powder	0	-0.983 2	4.731 8	-6.702 9	-10.521 6	-2.914 2	3.503 8
20~40		0	3.609 7	-4.587 7	-2.810 2	-1.031 1	3.067 8
40~60			0	-8.509 0	-10.625 1	-5.716 9	-0.412 9
60~100				0	3.482 8	4.173 3	7.808 3
100~140					0	2.065 4	8.446 7
140						0	4.842 6
200							0

$$t(\alpha, f) = t(0.05, 4) = 2.776 5$$

### 3 结 论

(1)从马钱子各粒径样品的薄层色谱图可看出,各粒径下马钱子粉样品均含有马钱子碱与土的宁且马钱子碱、土的宁的比移值  $R_f$  分别为 0.44、0.58。

(2)不同粒径下马钱子粉中马钱子碱与土的宁含量不同,根据样品的扫描电镜结果分析造成这种差异的原因可能为马钱子种皮与胚乳细胞中马钱子碱、土的宁含量不均。

(3)根据各样品中马钱子碱、土的宁含量的成对  $t$  检验结果,粒径对本文制备的大部分马钱子粉样品中马钱子碱、土的宁含量有显著影响,仅 100~200 目粒径范围的样品中马钱子碱、土的宁含量无显著性差异。从马钱子粉中生物碱含量的稳定性角度而言,宜将马钱子粉粒径控制在 100~200 目。

#### 参考文献:

[1] 林昌松,陈纪藩,刘晓玲,等.马钱子药理研究及临床应用概

况[J].中药新药与临床药理,2006,17(2):158-161.

- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(第1部)[M].北京:中国医药科技出版社,2010:48,584,1191.
- [3] 王琦玮,刘良,黄光照.马钱子的毒理学研究进展[J].法医学杂志,2004,20(3):183-184.
- [4] 许凤全,冯兴华.马钱子中毒及其安全使用[J].药物不良反应杂志,2008,10(6):426-428.
- [5] 曾建红,彭正松,陈旭,等.半夏块茎不同粒径总生物碱含量的研究[J].时珍国医国药,2008,19(4):829-830.
- [6] 刘蕊,戴娜桑,李健,等.不同粒径粉碎对葛根主要有效成分葛根素溶出影响的研究[J].中兽医医药杂志,2011(1):40-43.
- [7] 丁志平,孙毅坤,乔延江.不同粒径黄连粉体中小檗碱体外溶出研究[J].北京中医药大学学报,2004,27(3):60-62.
- [8] 刘莉,刘强,吴苗,等.化橘红不同粒径粉末的粉体特性及体外溶出[J].广东药学院学报,2010,26(1):20-22.
- [9] 郭忠聪,蔡光先,王宇红,等.三种不同粒径马钱子粉的药效对比研究[J].中医药导报,2009,15(7):11-13.
- [10] 华春玉.不同粒径马钱子粉的急性毒性实验[J].药物研究,2001,20(12):776.
- [11] 倪力军,张立国.基础化学计量学及其应用[M].上海:华东理工大学出版社,2011:36-39