

液相色谱-串联质谱法分析贝母中 异甾体生物碱成分

杨成苓¹, 张宏祺², 陈崇宇¹, 李茂荣¹

(1. 中兴大学化学系, 台湾 台中 402; 2. 朝阳科技大学银发产业管理系, 台湾 台中 413)

摘要: 川贝母具有止咳化痰之功效, 是经济价值较高的药品, 因此市场上偶有将低价格贝母掺入其中的行为, 因此需要建立一种快速有效的方法用于贝母中异甾体生物碱的分析。本研究采用 QuEChERS 前处理技术萃取川贝母样品中贝母辛、贝母乙素及贝母甲素等异甾体生物碱, 并结合液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 进行分析。在 QuEChERS 优化条件下, 取 0.5 g 贝母样品, 添加 3 mL 含 3% 氨水的乙酸乙酯-水溶液 (75 : 25, V/V), 再加入 1 g 碳酸铵, 振荡 5 min 后, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 取 1.8 mL 上清液, 加入 20 mg 硅酸镁及 10 mg 无水硫酸镁, 并以 14 000 r/min 离心 3 min, 氮气吹干后, 用 20% 甲醇水溶液定量至 1 mL, 采用 LC-MS/MS 法在正离子扫描模式下检测。结果表明: 川贝母样品中贝母辛的线性范围为 0.1~20 $\mu\text{g/g}$, 贝母乙素和贝母甲素的线性范围为 0.05~10 $\mu\text{g/g}$; 线性相关系数 (R^2) 大于 0.992 3; 检测限为 0.005~0.03 $\mu\text{g/g}$; 日内与日间精密度的相对标准偏差介于 1.1%~17.5% 之间; 回收率介于 89.6%~97.0% 之间。应用此方法检测真实样品, 测得的异甾体生物碱含量中贝母辛为 4.35 $\mu\text{g/g}$, 贝母乙素为 0.92 $\mu\text{g/g}$, 贝母甲素为 1.39 $\mu\text{g/g}$ 。该方法具有前处理简便快速, 样品和有机溶剂用量少等优点, 可为其他贝母中生物碱的检测提供方法参考。

关键词: 川贝母; 异甾体生物碱; QuEChERS; 液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS)

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2017)01-0011-08

doi: 10.7538/zpxb.2017.38.01.0011

Determination of Isosteroidal Alkaloids in *Fritillaria* spp. by LC-MS/MS

YANG Cheng-ling¹, CHANG Hung-chi², CHEN Chung-yu¹, LEE Maw-rong¹

(1. Department of Chemistry, National Chung Hsing University, Taichung 402, China;

2. Department of Golden-Ager Industry Management,

Chaoyang University of Technology, Taichung 413, China)

Abstract: Bulbus *Fritillaria* (BF), one of the derivatives from the plant of various *Fritillaria* species, has been commonly used as expectorant and antitussive herb in traditional Chinese medicine. The value of BF is relative related to its quality, however, there is no reliable method to evaluate its quality. Therefore, it is necessary to develop a rapid and reliable method for classification of species of BF. In this study, the QuEChERS

收稿日期: 2016-03-04; 修回日期: 2016-03-27

作者简介: 杨成苓 (1991—), 女 (汉族), 台湾人, 硕士研究生, 从事质谱分析研究。E-mail: u9812039@ems.ndhu.edu.tw

通信作者: 李茂荣 (1953—), 男 (汉族), 台湾人, 教授, 从事食品、环境、中草药分析研究。E-mail: mrlee@dragon.nchu.edu.tw

(quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) as sample preparation method and combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was proposed to determine trace alkaloids of BF. The main bioactive isosteroidal alkaloids analyzed are peimine, peiminine and peimisine. The extraction efficiency of QuEChERS were systematically studied and the optimal extraction conditions were as follows: extraction of three alkaloids by using 3 mL extraction solution of ethyl acetate-water (75 : 25, V/V) which is containing 3% ammonium hydroxide and 1 g of ammonium carbonate, and then mixing by vortex condition for 5 min. The extract was cleaned with 10 mg of anhydrous magnesium sulfate and 20 mg of florisil. The extracted isosteroidal alkaloids were analyzed by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). The quantification was performed by extracted ion chromatography and MS/MS spectra was applied for identification of isosteroidal alkaloids. The linear range for peimisine is from 0.1 to 20 $\mu\text{g/g}$ and for peiminine and peimine are from 0.05 to 10 $\mu\text{g/g}$ with coefficients of determination (R^2) above 0.9923. The limit of detection (LODs) of the proposed method range from 0.005 to 0.03 $\mu\text{g/g}$. Intra-day and inter-day precisions represented in RSD% are in a range of 1.1%-17.5%. The recoveries are in a range of 89.6%-97.0%. The amount of peimisine, peiminine, peimine in a real Chuan-Beimu sample were detected by the proposed method and the amount are at 4.35, 0.92, 1.39 $\mu\text{g/g}$, respectively.

Key words: Bulbus Fritillaria; isosteroidal alkaloids; QuEChERS; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

贝母为百合科(Liliaceae)贝母属(*Fritillaria*)多年生草本植物的干燥鳞茎,主要分布在北半球温带地区,而川贝母主要分布在四川境内海拔3 000~4 000 m的灌木丛和山坡草丛。川贝母具有润肺止咳、祛痰、平喘、镇痛、抗肿瘤之功效,可用于治疗久咳、急性气管炎、支管炎等病症^[1]。2010年版《中国药典》中^[2],将川贝母 *Fritillaria cirrhosa*、暗紫贝母 *Fritillaria unibracteata*、甘肃贝母 *Fritillaria przewalskii*、梭砂贝母 *Fritillaria delavayi*、太白贝母 *Fritillaria taipaiensis* 和瓦布贝母 *Fritillaria unibracteata* 列为川贝母的法定药材来源,且依据产地、性状、大小不同又将其分为松贝、青贝、炉贝,价格也有所差异。由于贝母属种类不同,其生物碱种类和含量也不同。甾体生物碱为贝母中的生物碱之一,是贝母的主要成分。根据结构类型,甾体生物碱可分为异甾体(isosteroidal alkaloids)和甾体(steroidal alkaloids)两大类。其中,异甾体生物碱以杂环结构不同又分为瑟文型(cevanine group)、介藜芦型(jervine group)和藜芦胺型(secoso-

lanidine group);甾体生物碱则分为茄碱型(solanidine)和裂环茄碱型(secosolanidine group)^[3]。目前研究发现,异甾体生物碱为川贝母的主要有效活性成分。例如,瑟文型贝母甲素、贝母乙素及西贝素可以治疗咳嗽和平喘^[4],也有文献^[5]指出,它能够提高小鼠常压耐缺氧能力,对气喘病研究有很大帮助;介藜芦型贝母辛则具有祛痰功效,已用于抗肿瘤的相关研究^[6]。

目前,生物碱的分析方法主要有气相色谱技术(gas chromatography, GC)结合火焰离子检测器(flame ionization detector, FID)^[7]或电子游离法质谱技术(electron ionization-mass spectrometry, EI-MS)^[8]、薄膜色谱技术(thin layer chromatography, TLC)结合紫外光可见光检测器(ultraviolet-visible detector, UV)^[9],但由于大部分异甾体生物碱在结构上缺少共轭键,因此 TLC-UV 的检测灵敏度较差。由于生物碱的挥发性差,难以采用 GC-FID 及 GC-EI-MS 检测,必须以衍生化方法加上吸光团,使其吸收紫外光或硅烷化,提升其挥发性和检测灵敏度。然而衍生化方法不仅增加了样品的前处

理时间,且衍生试剂价格昂贵,不适合用于大量样品分析。毛细管电泳技术(capillary electrophoresis, CE)、高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography, HPLC)^[10-12]通常与挥发性光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)联用,但挥发性光散射检测器的灵敏度低,且只以滞留时间判定分析物,难以对复杂基质的样品进行定性定量分析。近年来,越来越多的研究采用具有高灵敏度与高选择性的液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC/MS)联用技术^[13-16]进行生物碱分析。Zhou等^[13]采用液相色谱-电喷雾离子化-飞行时间质谱联用技术(LC-ESI-TOF)检测贝母中所含甾体生物碱,利用高分辨质谱技术测得贝母中26种甾体生物碱。Li等^[14]利用液相色谱-质谱联用技术检测17种不同贝母中的27种甾体生物碱,并利用聚类分析法(hierarchical cluster analysis)分析所得结果,对17种贝母进行了分类。Zhou等^[15]利用液相色谱-电喷雾离子化-四极杆飞行时间质谱联用技术(LC-ESI-Q-TOF)探讨甾体生物碱的质谱断裂机制,并鉴定出贝母中所含的41种甾体生物碱。Luo等^[16]以液相色谱-串联质谱联用技术分析老鼠血浆中4种异甾体生物碱,测得血浆中异甾体生物碱浓度在0.2~100 $\mu\text{g/L}$ 之间。

本研究拟采用 QuEChERS 萃取和液相色谱-串联质谱技术检测贝母样品中的贝母辛(peimisine)、贝母乙素(peiminine)、贝母甲素(peimine)等异甾体生物碱,并希望该技术能应用于不同贝母的鉴别。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪、LTQ XL 线性离子阱质谱仪:美国 Thermo Scientific 公司产品。

贝母辛、贝母乙素、贝母甲素:由中国药品生物制品检定所提供;甲醇、乙腈、乙酸乙酯、氨水:均为色谱纯,德国 Merck 公司产品;氯化钠:美国 Sigma-Aldrich 公司产品;无水硫酸镁:日本 Showa 公司产品;C18 粉末、活性炭:美国 Waters 公司产品;Primary secondary amine (PSA):美国 Agilent 公司产品;Chlorifiltr:台湾

湾医全公司产品;硅酸镁:美国 Supelco 公司产品;超纯水:由美国 Millipore Simplicity 系统制得。

1.2 标准储存溶液的制备

精密称取1 mg 贝母辛、贝母乙素、贝母甲素,用甲醇定容至1 mL,配制成1 g/L 标准储存溶液,备用。

1.3 贝母样品的制备

称取0.5 g 均质化的贝母样品于15 mL 离心管中,加入3 mL 含有3%氨水的乙酸乙酯-水溶液(75:25, V/V),再加入1 g 碳酸铵,振荡萃取5 min,以4 000 r/min 离心5 min 后,取1.8 mL 上清液,加入20 mg 硅酸镁和10 mg 无水硫酸镁,以14 000 r/min 离心3 min 后,氮气吹干萃取液,以20% 甲醇水溶液定容至1 mL,待 LC-MS/MS 分析。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱:Thermo Scientific Accucore C18 柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 2.6 μm);流动相:5 mmol/L 碳酸氢铵水溶液(A)-甲醇(B);梯度洗脱:0~1 min(20%B),1~6 min(20%~40%B),6~9 min(40%~90%B),9~16 min(90%B),16~17 min(20%~40%B),17~20 min(20%B);流速0.2 mL/min;进样量5 μL 。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子扫描模式,喷雾电压4.6 kV,毛细管温度300 $^{\circ}\text{C}$,透镜电压100 V,鞘气流速35 arb,辅助气流速5 arb,质量扫描范围 m/z 150~500。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的建立

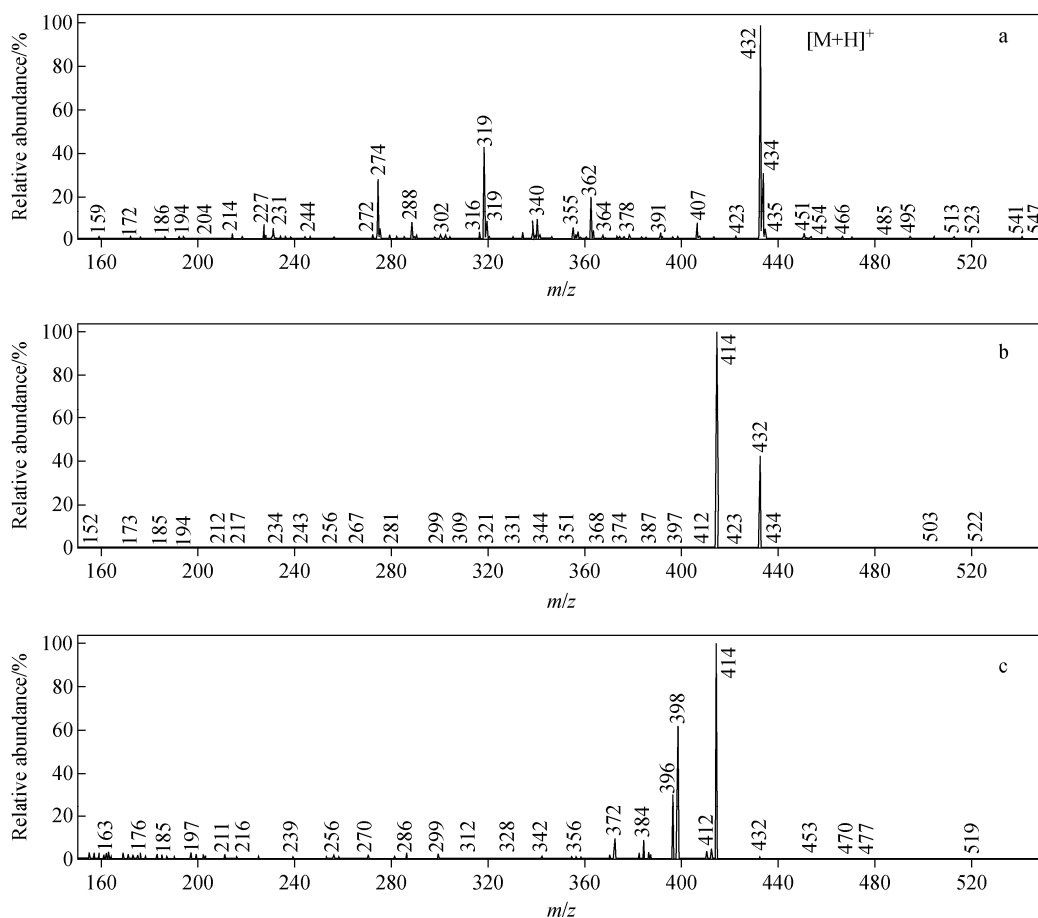
在正离子模式下,分别检测0.5 mg/L 贝母辛、贝母乙素、贝母甲素的标准溶液,全扫描模式下,基峰离子为质子化分子, $[M+H]^+$ 分别为 m/z 428、430、432。基峰离子碰撞断裂可得到子离子扫描质谱图,发现贝母辛、贝母乙素、贝母甲素的子离子基峰皆为 $[M+H]^+$ 脱去 H_2O 分子得到的 $[M+H-\text{H}_2\text{O}]^+$,分别为 m/z 410、412、414,其中贝母乙素、贝母甲素仅有此碎片离子。为获得更多的结构信息,本研究采用仪器的 Wideband Activation 子离子扫描断裂功能,得到贝母甲素的全扫描子离子质谱图

示于图 1。可见,贝母甲素产生了 $[M+H-H_2O-CH_4]^+ m/z$ 410 断裂碎片。为了避免最强子离子受其他相同分子质量和断裂途径相同的噪声干扰,选择第二强子离子作为定量离子,贝母辛、贝母乙素、贝母甲素所使用的碰撞能量和子离子断裂碎片列于表 1。

2.2 前处理方法的探讨

QuEChERS 技术为 Anastassiades 等^[17]提

出的基于溶剂提取和分布式固相萃取技术所开发的一种样品前处理方法,具有快速、简单、经济、有效、耐用、安全等特点。本研究采用 QuEChERS 法萃取贝母样品中异甾体生物碱的贝母辛、贝母乙素和贝母甲素,并对萃取溶液、吸附剂种类和添加量等参数进行优化。萃取溶液是影响 QuEChERS 萃取效率的主要因素,实验分别对 QuEChERS 法中常用的乙腈及分析



注: a. 全扫描质谱图; b. m/z 432 子离子扫描质谱图; c. 采用 Wideband activation 功能获得的 m/z 432 子离子扫描质谱图

图 1 贝母甲素(0.5 mg/L)的电喷雾游离-串联质谱图

Fig. 1 Mass spectrum of peimine (0.5 mg/L) produced by electrospray ionization-tandem mass spectrometry

表 1 正离子模式下,贝母辛、贝母乙素、贝母甲素的碰撞能量和定量离子

Table 1 Ion transition and collision energy for determination of peimisine, peiminine, and peimine in positive ion mode

异甾体生物碱 Isosteroidal alkaloids	前体离子 Precursor ion (m/z)	碰撞能量 Collision energy/eV	子离子 Product ion (m/z)
贝母辛	428	32	393
贝母乙素	430	45	396
贝母甲素	432	45	398

中常用的乙酸乙酯作为萃取溶剂的情况进行探讨。首先,加入不同比例的水,观察不同萃取溶液对分析物的萃取效率,然后同时加入 1% 氨水,使分析物达到分子态而转移至有机层,所得结果示于图 2。可见,乙酸乙酯的溶解度略高于乙腈,加入水可以提高萃取效率,这是因为水具有溶解性高、渗透力强等优点,能够渗入样品带出分析物,可以提高传质效率,但加入过多的水反而不利于分析物转移至有机层,当水加入比例

超过 50% 时,萃取效率有下降的趋势。因此,本实验选择乙酸乙酯-水溶液 (75 : 25, V/V) 作为萃取溶液。

在 QuEChERS 萃取中加入吸附剂进行样品净化,通过吸附基质中的杂质以提高信噪比。本研究比较了 C18、GCB、Chlorofiltr、硅酸镁和一级二级胺的净化效果,所得结果示于图 3。由于异甾体生物碱为类似平面杂环结构,易与 GCB 进行吸附作用,造成异甾体生物碱信号明

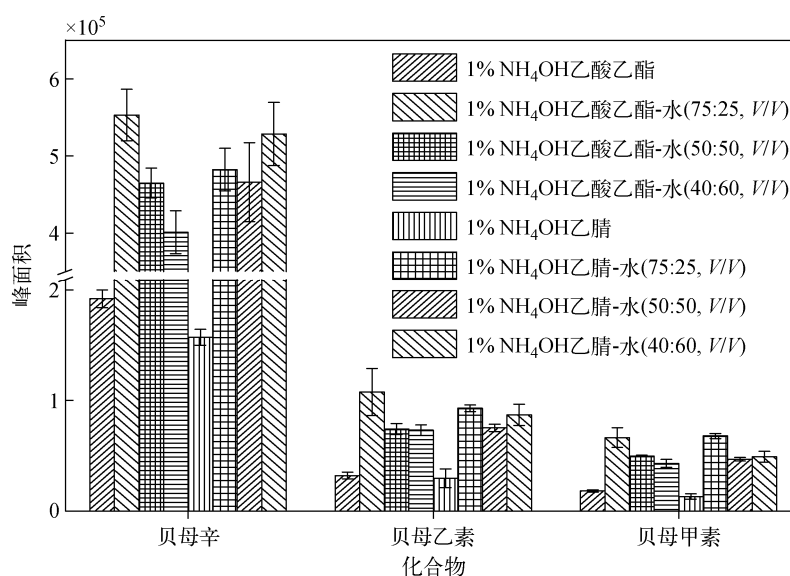


图 2 不同萃取溶液对贝母辛 (20 $\mu\text{g/g}$)、贝母乙素 (40 $\mu\text{g/g}$)、贝母甲素 (40 $\mu\text{g/g}$) 的信号强度影响

Fig. 2 Effect of extraction solvent on peak areas of peimisine (20 $\mu\text{g/g}$), peiminine (40 $\mu\text{g/g}$), and peimine (40 $\mu\text{g/g}$)

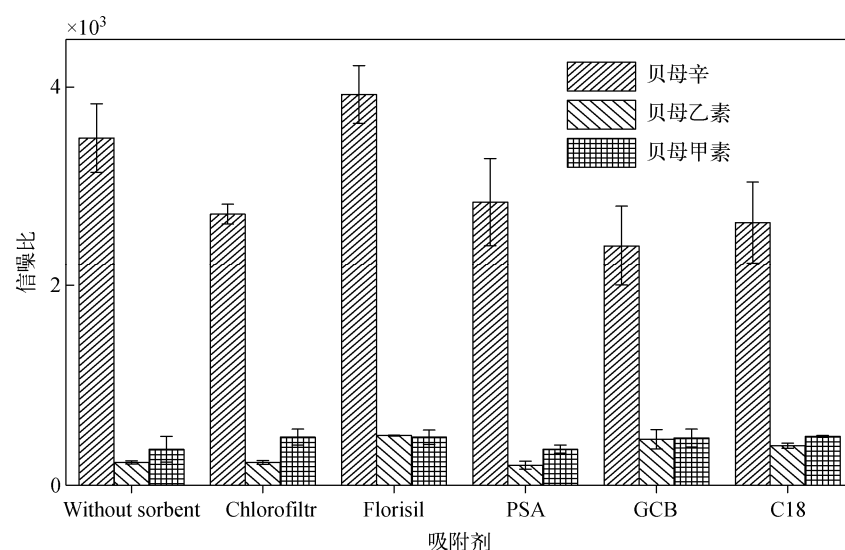


图 3 不同吸附剂对贝母辛 (20 $\mu\text{g/g}$)、贝母乙素 (40 $\mu\text{g/g}$)、贝母甲素 (40 $\mu\text{g/g}$) 的杂质净化效果

Fig. 3 Effect of sorbent on clean-up efficiency of peimisine (20 $\mu\text{g/g}$), peiminine (40 $\mu\text{g/g}$), and peimine (40 $\mu\text{g/g}$)

显下降,其他吸附作用也影响信噪比,其中以硅酸镁作为吸附剂时信噪比最大,因此本研究以硅酸镁作为优化盐类。QuEChERS 前处理技术萃取松贝中异甾体生物碱的最优化条件列于表 2。利用优化 QuEChERS 萃取条件和 LC-MS/MS 分析贝母中贝母辛、贝母乙素、贝母甲素,所得的色谱图示于图 4。

表 2 松贝中异甾体生物碱的
QuEChERS 最优化条件

Table 2 The optimal QuEChERS conditions for extraction of isosteroidal alkaloids in <i>Fritillaria</i>	
萃取参数 Extraction parameter	萃取条件 Extraction condition
萃取溶液	3 mL 乙酸乙酯:水溶液(75 : 25,V/V)
盐类	1 g 碳酸铵
吸附剂	20 mg 硅酸镁和 10 mg 无水硫酸镁

2.3 线性关系

以贝母辛、贝母乙素、贝母甲素的标准储存溶液,配制成 0.1、0.5、2、10、20 $\mu\text{g/g}$ 贝母辛,0.05、0.1、0.5、5、10 $\mu\text{g/g}$ 贝母乙素与贝母甲素的标准曲线溶液,采用优化后的 QuEChERS 和 LC-MS/MS 条件进行测定,以峰面积为纵坐标,异甾体生物碱浓度为横坐标,计算线性范围、线性相关系数、方法的检测限和定量限,其结果列于表 3。

2.4 精密度评估

本研究选择其中一份试样于同一天内连续进样 3 次,考察方法的日内精密度;将该份试样每日进样 1 次,重复 3 天,考察方法的日间精密度。结果表明:日内精密度的相对标准偏差为 1.1%~9.8%,日间精密度的相对标准偏差为 4.0%~17.5%。

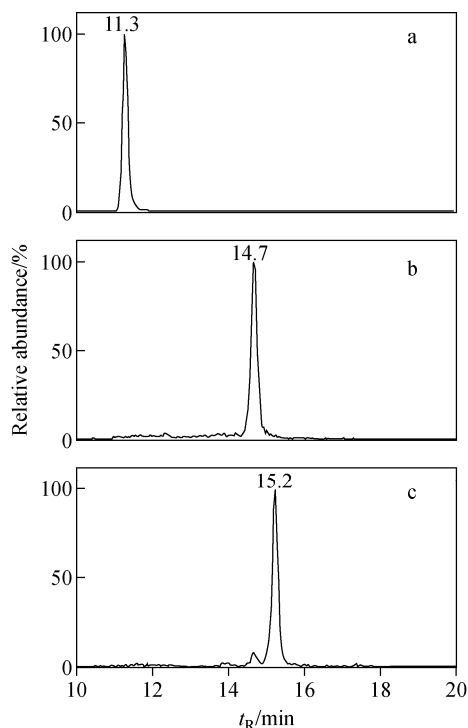


图 4 贝母中贝母辛(20 $\mu\text{g/g}$)、贝母乙素(40 $\mu\text{g/g}$)
和贝母甲素(40 $\mu\text{g/g}$)的 QuEChERS-LC-MS/MS 色谱图
Fig. 4 Mass ion chromatograms of peimisine (20 $\mu\text{g/g}$),
peiminine (40 $\mu\text{g/g}$), and peimine (40 $\mu\text{g/g}$) produced
by QuEChERS-LC-MS/MS

2.5 回收率评估

以贝母辛、贝母乙素、贝母甲素的标准储存溶液,配制成低(0.1 mg/L 贝母辛、0.05 mg/L 贝母乙素、0.05 mg/L 贝母甲素)、中(2 mg/L 贝母辛、0.5 mg/L 贝母乙素、0.5 mg/L 贝母甲素)、高(20 mg/L 贝母辛、10 mg/L 贝母乙素、10 mg/L 贝母甲素)3 种浓度的溶液,进行回收率评估。结果表明:3 个分析物在低、中、高浓度时的回收率分别为 91.2%~97.0%、89.6%~93.3%、90.4%~96.8%。

表 3 QuEChERS-LC-MS/MS 法分析贝母中异甾体生物碱的线性范围、线性相关系数、定量限和检测限

Table 3 Linear ranges, correlation coefficients (R^2), limits of quantification (LOQs) and limits of detection (LODs) for determination of isosteroidal alkaloids in <i>Fritillaria</i> by QuEChERS-LC-MS/MS				
异甾体生物碱 Isosteroidal alkaloids	线性范围 Linear range/($\mu\text{g/g}$)	线性相关系数 R^2	定量限 LOQ/($\mu\text{g/g}$)	检测限 LOD/($\mu\text{g/g}$)
贝母辛	0.1~20	0.9937	0.1	0.03
贝母乙素	0.05~10	0.9923	0.019	0.006
贝母甲素	0.05~10	0.9949	0.016	0.005

2.6 实际样品的测定

采用优化的 QuEChERS-LC-MS/MS 方法分析市售炉贝母、西藏贝母、松贝母、川贝母和真贝母中异甾体生物碱含量,不同市售贝母样品中贝母辛、贝母乙素、贝母甲素的分析结果列于表 4。结果表明,市售川贝母样品中贝母辛、贝母乙素和

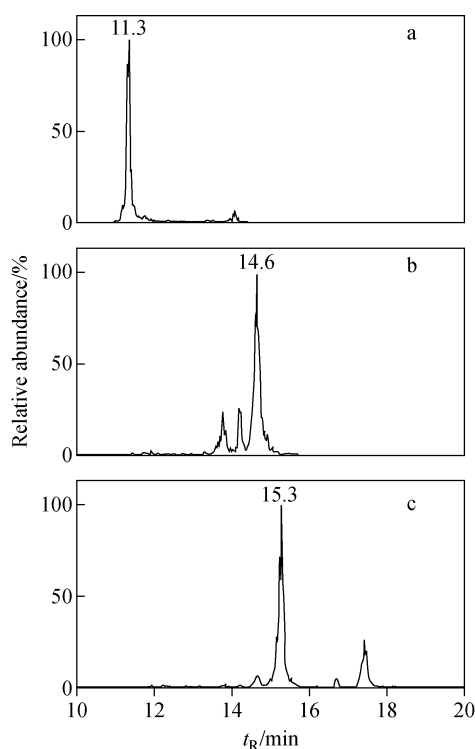
贝母甲素的含量分别为 2.86~8.26 $\mu\text{g/g}$ 、0.10~1.04 $\mu\text{g/g}$ 、0.1~2.68 $\mu\text{g/g}$ 。松贝的贝母乙素含量小于检测限范围,所以用小于定量限表示。川贝母的萃取离子色谱图示于图 5,可见,该方法可成功地分析贝母样品中所含贝母辛、贝母乙素、贝母甲素等异甾体生物碱。

表 4 QuEChERS-LC-MS/MS 分析市售川贝母样品中异甾体生物碱含量($\mu\text{g/g}$)

Table 4 Concentration of isosteroidal alkaloids in commercial *Fritillaria* products by QuEChERS-LC-MS/MS ($\mu\text{g/g}$)

异甾体生物碱	炉贝母	青贝母	西藏贝母	松贝母	川贝母	珠贝母
贝母辛	2.86	8.26	7.01	4.51	4.35	4.85
贝母乙素	0.55	1.04	N. D.	<LOQ	0.92	0.10
贝母甲素	N. D. *	2.68	N. D.	N. D. *	1.39	0.10

注: * 表示未检出



注:a. 贝母辛;b. 贝母乙素;c. 贝母甲素

图 5 市售川贝母的萃取离子色谱图

Fig. 5 Mass ion chromatograms of commercial *Fritillaria* product by QuEChERS-LC-MS/MS

3 结论

本研究采用 QuEChERS 前处理技术,结合液相色谱-串联质谱法分析贝母样品中贝母辛、贝母乙素和贝母甲素等异甾体生物碱。实验结果显示,添加 3 mL 含有 3% 氨水的乙酸乙

酯-水溶液(75:25,V/V)于 0.5 g 贝母样品中,加入 1 g 碳酸铵涡流振荡辅助萃取 5 min,以 4 000 r/min 离心 5 min 后取上清液,然后加入 20 mg 硅酸镁和 10 mg 无水硫酸镁进行净化,离心后取上清液,再以氮气吹干,最后用 20% 甲醇水溶液定容。在优化的萃取条件下,贝母样品中贝母辛的线性范围为 0.1~20 $\mu\text{g/g}$,贝母乙素和贝母甲素的线性范围为 0.05~10 $\mu\text{g/g}$,线性相关系数(R^2)大于 0.992 3,日内与日间精密度的相对标准偏差介于 1.1%~17.5%之间,回收率介于 89.6%~97.0%之间。应用此方法检测实际样品,测得贝母辛、贝母乙素、贝母甲素的含量分别为 4.35、0.92、1.39 $\mu\text{g/g}$ 。该方法具有样品前处理时间短、样品和有机溶剂用量少、灵敏度和选择性高等特点,可应用于其他中药材中特定成分的分析。

参考文献:

- [1] 赵高琼,任波,董小萍,等. 川贝母研究现状[J]. 中药与临床,2012,(6):59-64.
ZHAO Gaoqiong, REN Bo, DONG Xiaoping, et al. The research progress of Chuanbeimu[J]. Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica, 2012, (6): 59-64(in Chinese).
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [3] 肖培根,姜艳,李萍,等. 中药贝母的基原植物和药用亲缘学的研究[J]. 植物分类学报,2007,45(4):473-487.

- XIAO Peigen, JIANG Yan, LI Ping, et al. The botanical origin and pharmacophylogenetic treatment of Chinese materia medica Beimu[J]. *LI Acta Phytotaxonomica Sinica*, 2007, 5(4): 473-487(in Chinese).
- [4] PAEK K Y, MURTHY H N. High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, 68(3): 247-252.
- [5] COLE M. Formation of 6-aminopenicillanic acid, penicillins and penicillin acylase by various Fungi [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 14(1): 98-104.
- [6] 周颖, 季晖, 李萍, 等. 五种贝母甾体生物碱对豚鼠离体气管条 M 受体的拮抗作用[J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34(1): 58-60.
- ZHOU Ying, JI Hui, LI Ping, et al. Antimuscarinic function of five fritillaria alkaloids on guinea pig tracheal strips[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2003, 34(1): 58-60(in Chinese).
- [7] LI S L, LI P, LIN G, et al. Simultaneous determination of seven major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by gas chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 873(2): 221-228.
- [8] LI S L, CHAN S W, LI P, et al. Pre-column derivatization and gas chromatographic determination of alkaloids in bulbs of *Fritillaria* [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 859(2): 183-192.
- [9] 刘震东, 程世琼, 王曙. 聚酰胺薄膜色谱鉴别栽培的川贝母[J]. *华西药学杂志*, 2006, 21(1): 64-66.
- LIU Zhendong, CHENG Shiqiong, WANG Shu. Identification of cultivated *Bulbus Fritillariae Cirrhosae* by polyamid membrane chromatography[J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 21(1): 64-66(in Chinese).
- [10] 潘峰, 侯凯, 董品利, 等. HPLC-ELSD 法同时检测瓦布贝母三种生物碱的含量[J]. *核农学报*, 2014, 28(10): 1 854-1 859.
- PAN Feng, HOU Kai, DONG Pinli, et al. Simultaneous determination on three alkaloids in bulbs of *Fritillaria unibracteata* var. *wabensis* by HPLC-ELSD[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(10): 1 854-1 859(in Chinese).
- [11] 洪梅, 马彧, 李秀芬, 等. HPLC-ELSD 测定平贝母中贝母素甲的含量[J]. *中国中药杂志*, 2006, 12(31): 1 032-1 033.
- HONG Mei, MA Yu, LI Xiufen, et al. Determination of peimine in *Fritillaria ussuriensis* Maxim by HPLC-ELSD[J]. *China Journal of Chinese Material Medica*, 2006, 12(31): 1 032-1 033(in Chinese).
- [12] LI S L, LIN G, CHAN S W, et al. Determination of the major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 909(2): 207-214.
- [13] ZHOU J L, LI P, LI H J, et al. Development and validation of a liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry method for relative and absolute quantification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1 177(1): 126-137.
- [14] LI H J, JIANG Y, LI P. Characterizing distribution of steroidal alkaloids in *Fritillaria* spp. and related compound formulas by liquid chromatography-mass spectrometry combined with hierarchical cluster analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1 216(11): 2 142-2 149.
- [15] ZHOU J L, XIN G Z, SHI Z Q, et al. Characterization and identification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1 217(45): 7 109-7 122.
- [16] LUO H, ZHANG L, XU W, et al. Simultaneous determination of four main isosteroidal alkaloids of *Bulbus Fritillariae Cirrhosae* in rat plasma by LC-MS-MS[J]. *Chromatographia*, 2012, 75(13): 729-737.
- [17] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, ŠTAJNBHER D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce[J]. *Journal of AOAC International*, 2003, 86(2): 412-431.