

川貝母

(FRITILLARIAE CIRRHOSAE BULBUS)

川貝母 MI	2
一、形態:	2
二、顯微	2
川貝母 HPLC	3
一、材料	3
二、HPLC儀器及層析管柱	3
三、實驗藥品及試劑來源	3
四、方法	3
五、結果	6
川貝母 TLC	15
一、方法	15
二、萃法選擇及濃度測試	16
三、溶媒系統選擇	17
四、觀察方式選擇	18
五、十家樣品檢測	19

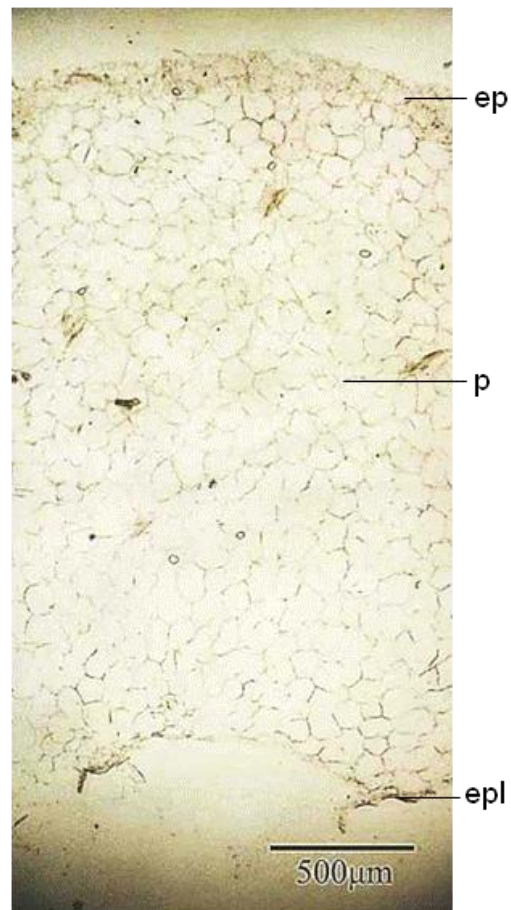
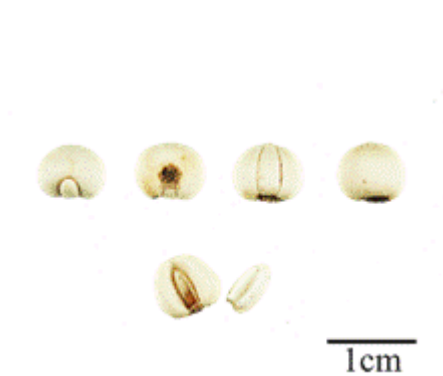
川貝母 MI

一、形態:

本品為百合科(Umbelliferae)植物暗紫貝母 *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia 乾燥的鱗莖。外型為圓錐形，表皮光滑呈淡黃白色，外層鱗葉兩瓣大小懸殊，小鱗葉接近圓柱形，緊裹於大鱗葉之中，只露出新月型的外表，稱為「懷中抱月」，鱗葉內含有新芽及小鱗葉。整體質地硬脆，味道微甜而苦。

二、顯微

本品橫切面，最外側表皮細胞，呈類長方形，表皮內由類圓形薄壁細胞組成，含有大量澱粉粒，大多呈卵形或貝殼形，臍點多為點狀，層紋細密，複粒較為少見。導管以螺旋紋為主。表皮細胞偶可見氣孔，多呈圓形或橢圓形。



略字解

ep:表皮細胞

p:薄壁細胞

epl:下表皮

川貝母(*Fritillariae Cirrhosae Bulbus*)

一、材料

購自於北中南東各地中藥店穀精草藥材共 10 家。

二、HPLC 儀器及層析管柱

SHIMADZU SCL-10Avp, 包含 pump LC-10ATvp、autosampler SIL-10AF、oven CTO-10ASvp、detector ELSD-LT II。層析管柱：Purospher® STAR RP-18 endcapped LichroCART® (150 x 4.6 mm, 5 µm)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

甲醇(99.5%)、乙腈(HPLC grade)購自友和；氨水(35%)購自益和；三氯甲烷(99.0%)購自 Merck；三乙胺(99.0%)購自和光製藥。

(二) 標準品

西貝母素(sipeimine, 又名 imperialine)購自廣翊, 純度 $\geq 90\%$ 。rutaecarpine 作內標準。

四、方法

(一) 萃取溶媒開發

參考港標平貝母的分析方法, 由於標準品西貝母素(sipeimine)含量很低, 因此取 5 g 川貝母粉進行分析。

1. 取 5 g 之市售貝母粉末(經 20 mesh 過篩), 分別置入 50 mL 濃縮瓶中。
2. 加入 10 mL 的氨水靜置 1 小時。
3. 加入 100 mL 的 20% MeOH/CHCl₃, 80 °C 加熱回流萃取 2 小時。
4. 使用 1 號濾紙過濾後將濾液減壓濃縮乾燥。
5. 加入 1 mL 的 MeOH 回溶後過濾(0.22 µm, nylon)。

(二) 萃取次數考察

取本品粉末約 5 g, 置 50 mL 濃縮瓶中, 加入 10 mL 氨水靜置 1 小時, 加入 100 mL 20% MeOH/CHCl₃ 溶劑, 80 °C 回流萃取 2 小時。以 1 號濾紙過濾後將濾液減壓濃縮乾燥, 用 1 mL 甲醇回溶後過濾(filter, 0.22 µm)即得。每針 20 µL 注入 HPLC, 殘渣部分重複上述方法多次萃取、進樣, 直到指標成分被萃取完全, 並選出最佳萃取次數。

(三) 對照標準品溶液

取標準品西貝母素(sipeimine)精確稱定 1.88 mg, 加 1 mL 的甲醇製成每

1 mL 含西貝母素(sipeimine) 1880 µg 的標準品儲備溶液。

(四) 檢品溶液

取本品粉末約 5 g，置 50 mL 濃縮瓶中，加入 10 mL 氨水靜置 1 小時，加入 100 mL 20% MeOH/CHCl₃ 溶劑，80 °C 回流萃取 2 小時。以 1 號濾紙過濾後將濾液減壓濃縮乾燥，用 1 mL 甲醇回溶後過濾(filter, 0.22 µm)。

(五) 測定法

分別精確吸取標準品溶液、檢品溶液 20 µL 注入 HPLC 測定，用檢量線計算溶液中西貝母素(sipeimine)的含量。

(六) 檢量線

精確吸取西貝母素(sipeimine)標準品儲備溶液適量 (1880 µg/mL)，以甲醇稀釋成含西貝母素(sipeimine) 1880、940、118、94、59 µg/mL 的標準品溶液。以上溶液各取 20 µL 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用標準品之波峰面積(y 軸)和標準品之濃度(x 軸)進行線性迴歸，並求得檢量線之方程式 $y=ax+b$ 與相關係數 R^2 。

(七) 精密度試驗

以西貝母素(sipeimine)濃度為 235 µg/mL 之標準品溶液連續進樣 3 針，以西貝母素(sipeimine)波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 再現性與穩定性試驗

1. 再現性：取同一家市售川貝母粉末，依川貝母檢品溶液製備方法平行製備 3 份川貝母檢品溶液進樣測定，以西貝母素(sipeimine)含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一家市售川貝母粉末，依川貝母檢品溶液製備方法製備川貝母檢品溶液，分別在 0、8 和 24 小時進樣測定，以西貝母素(sipeimine)波峰面積為指標，求出相對標準差。

(九) 偵測極限與定量極限試驗

偵測極限(limit of detection, LOD)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 3:1$ 時之濃度，作為偵測極限估計值；定量極限(limit of quantitation, LOQ)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 10:1$ 時之濃度，作為定量極限估計值。

(十) 同日間與異日間試驗

取西貝母素濃度為 59, 118 和 235 µg/mL 之標準品溶液進行同日間測試

(在 0 及 8 小時每個濃度注射三次)與異日間測試(在 0, 8 及 24 小時每個濃度注射三次)，求其相對標準偏差值(%)以評估 HPLC 分析條件之穩定性與再現性。

(十一) 添加回收率試驗

平行製備的三分檢品溶液分別取 50、100 和 100 μL ，添加西貝母素(Sipeimine)濃度為 706 $\mu\text{g/mL}$ 之混合標準品溶液 100、100 和 50 μL 。每次取 20 μL 注入 HPLC，每個檢品進行三重複。

(十二) HPLC 分析條件

1. 層析管：Purospher® STAR RP-18 endcapped LichroCART® column (150 x 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：ELSD，真空管溫度 80°C，氮氣壓力維持 50 psi。
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：20 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%, v/v)	0.01 % 三乙胺+ 0.1 % 甲醇 水溶液 (%, v/v)
0	10	90
10	30	70
45	65	35
60	90	10
65	10	90
70	10	90

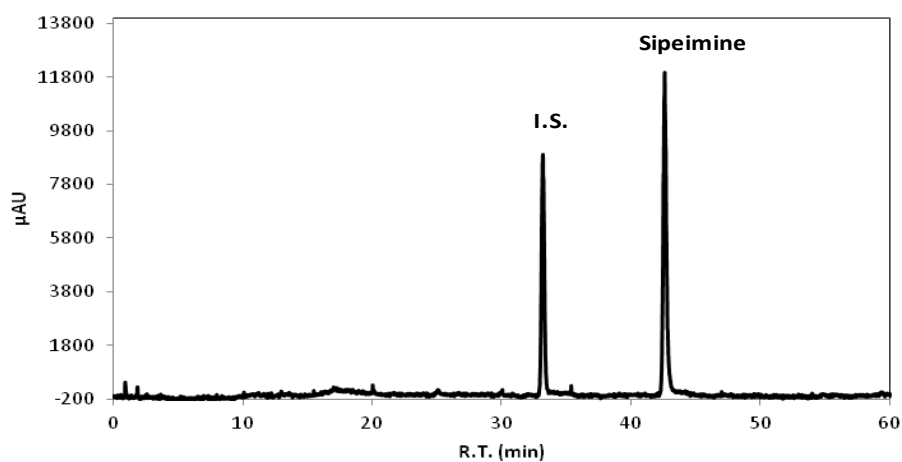
(十三) 臺灣市售川貝母含量測定

取十家市售川貝母檢品溶液各 20 μL 注入 HPLC，三重複所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品西貝母素(sipeimine)的百分比含量。

五、結果

(一) 標準品西貝母素(sipeimine)之 HPLC 層析

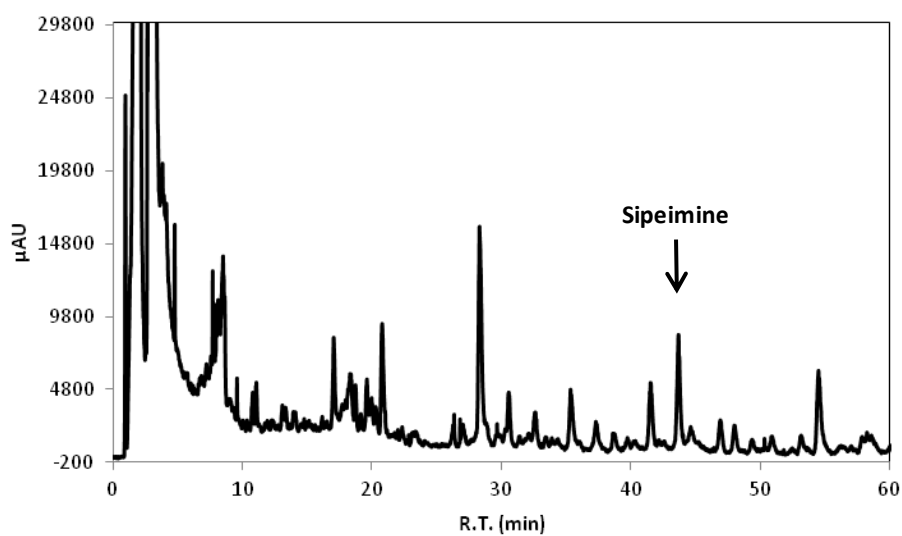
於滯留時間 42.7 分鐘處顯示標準品西貝母素(sipeimine)的波峰。



圖一、標準品西貝母素(sipeimine)溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售川貝母檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 43.3 分鐘處顯示川貝母檢品中西貝母素(sipeimine)的波峰。



圖二、市售川貝母檢品之 HPLC 層析圖

(三) 萃取次數考察

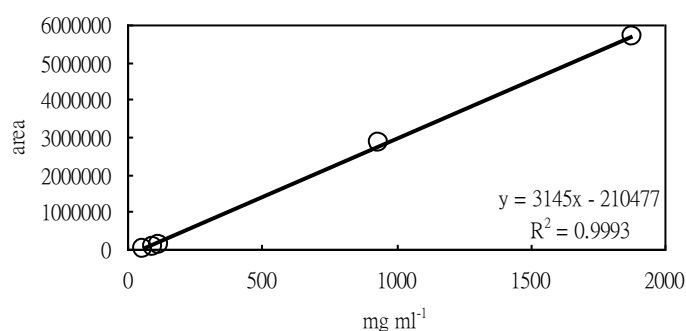
結果如表一，顯示第一次萃取之萃取率接近 100%。

表一、川貝母檢品萃取次數考察

	西貝母素(Sipeimine) 波峰面積
第一次	83873
第二次	ND

(四) 標準品西貝母素(Sipeimine)的檢量線

經不同濃度標準品西貝母素(Sipeimine)的(x)對各自層析波峰面積的反應值(y)所得到的檢量線方程式為： $y = 3145x - 210477$ ， $R^2 = 0.9993$ ，顯示濃度在 59—1880 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係。



圖三、標準品 1 之檢量線圖

表二、標準品西貝母素(Sipeimine)之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
西貝母素 (Sipeimine)	59—1880	$y = 3145x - 210477$	0.9993

(五) 再現性與精密度試驗

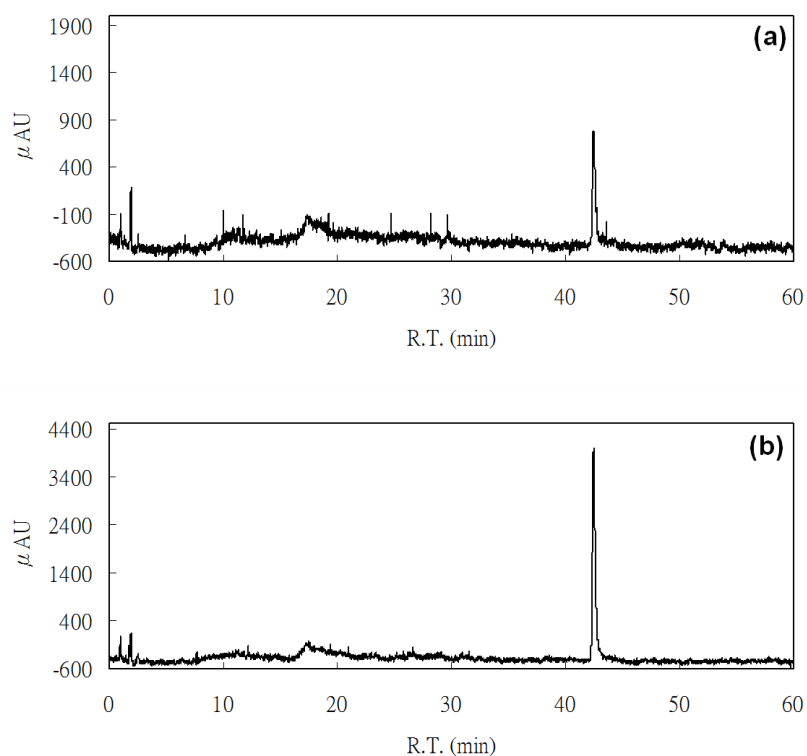
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，標準品西貝母素(Sipeimine)精密度之相對標準差為 1.4%，再現性之相對標準差為 1.3%，均在可接受的範圍以內。

(六) 穩定性試驗

由結果可以得知，標準品西貝母素(Sipeimine)在 24 小時內穩定性，相對標準差為 2.9%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(七) 偵測極限與定量極限試驗

標準品西貝母素(Sipeimine)偵測極限(limit of detection, LOD)為 16 $\mu\text{g/mL}$ ，定量極限(limit of quantitation, LOQ)為 50 $\mu\text{g/mL}$ 。



圖四、標準品西貝母素(Sipeimine)的之 LOD (a)及 LOQ (b)層析圖

表三、各項檢驗分析

檢測項目	標準品 1	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=3)	235 $\mu\text{g/mL}$	1.4
再現性 (n=3)	檢品溶液(NF)	1.3
穩定性 (n=3)	檢品溶液(NF)	2.9
偵測極限 (n=1)	16 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=1)	50 $\mu\text{g/mL}$	-

(八) 同日間與異日間試驗

由結果可以得知，標準品西貝母素(Sipeimine)在檢量線之範圍濃度內同日間的相對標準差為 2.6—3.8%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則幾乎無差異；異日間的相對標準差為 2.7—4.4%。

表四、標準品西貝母素(Sipeimine)同日間與異日間試驗

西貝母素 (Sipeimine) 濃度($\mu\text{g/mL}$)	同日間 (n=6)			異日間 (n=9)		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
59	63	1.8	2.8	64	1.7	2.7
118	111	2.8	2.6	108	4.8	4.4
235	237	9.1	3.8	237	7.3	3.1

(九) 添加回收率試驗

西貝母素的回收率介於 94.5~108.4%，相對標準差為 1.0~2.4 %。

表五、西貝母素的添加回收率

萃取液 μL	含有量 μg	添加量 μg	測得量 μg	回收率 %	RSD %
50	2.8	70.6	79.3	108.4	1.7
100	6.3	70.6	73.0	94.5	1.0
100	6.0	35.3	44.2	108.3	2.4

(十) 台灣市售川貝母含量測定

10 家川貝母藥材之含量測定結果(以乾燥品計算)，檢品之標準品西貝母素(Sipeimine)的含量介於 0.0014—0.0022%。

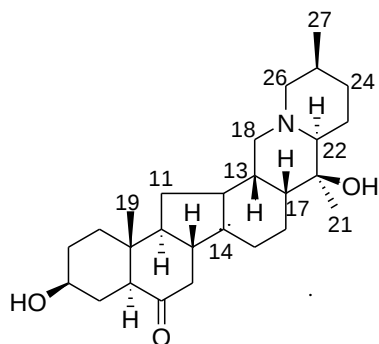
表六、台灣市售川貝母標準品西貝母素(Sipeimine)成分之含量

市售品代號	Mean $\pm$ SD %	RSD %
CD	0.0020 $\pm$ 0.0000	0.46
NI	0.0015 $\pm$ 0.0000	0.89
NJ	0.0014 $\pm$ 0.0000	1.00
SG	0.0019 $\pm$ 0.0000	2.18
SE	0.0021 $\pm$ 0.0000	1.21
SH	0.0022 $\pm$ 0.0000	2.02
SC	0.0021 $\pm$ 0.0000	0.99
NF	0.0019 $\pm$ 0.0000	1.30
NH	0.0020 $\pm$ 0.0000	1.18
SF	0.0019 $\pm$ 0.0000	0.24
CD	0.0020 $\pm$ 0.0000	0.46

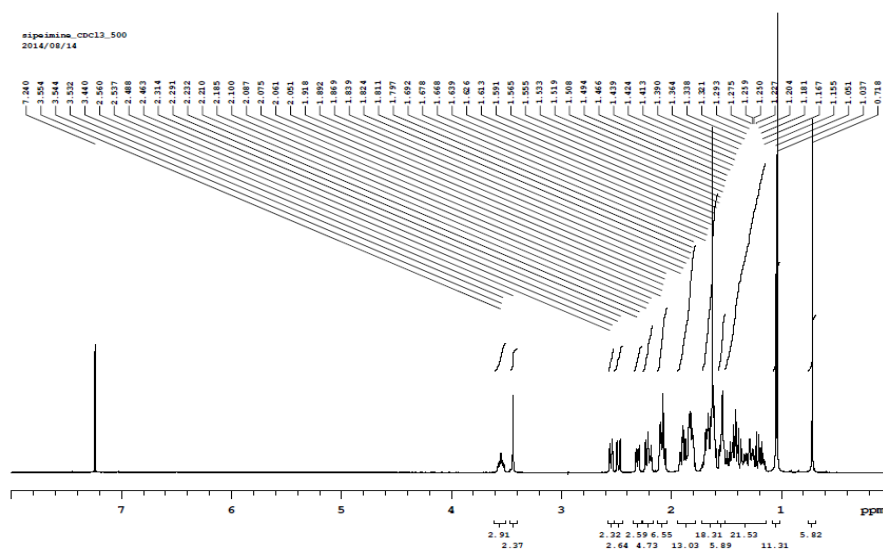
(十一) 標準品西貝母素(Sipeimine)的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{27}H_{43}NO_3$ Mol. Wt.: 429 mp: 271—274 °C

(十二) 標準品西貝母素(Sipeimine)的結構

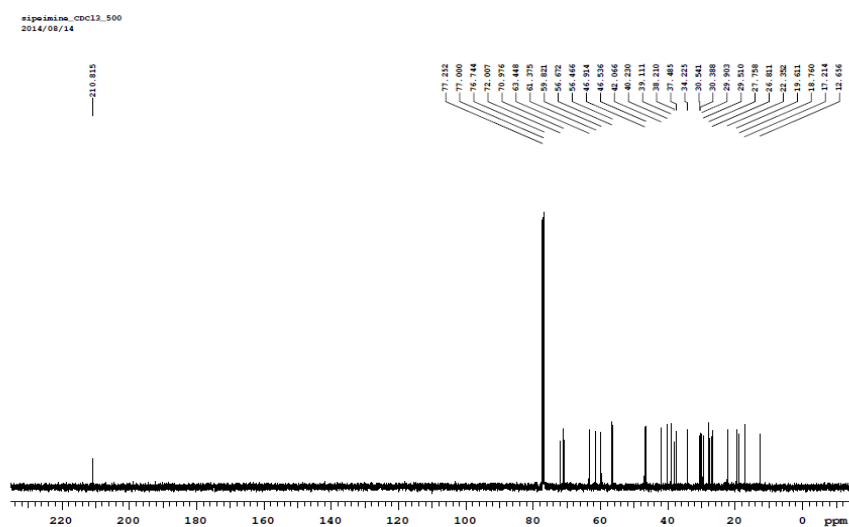


(十三) 標準品西貝母素(Sipeimine)的 1H NMR 圖譜



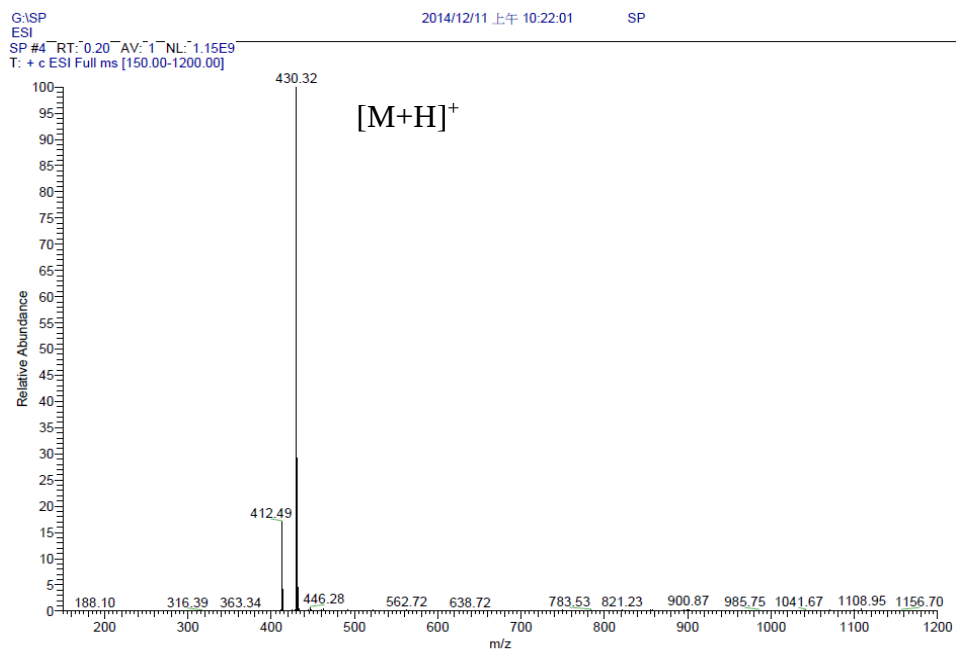
圖五、標準品西貝母素(Sipeimine)之 1H NMR 圖譜($CDCl_3$)

(十四) 標準品西貝母素(Sipeimine)的 ^{13}C NMR 圖譜



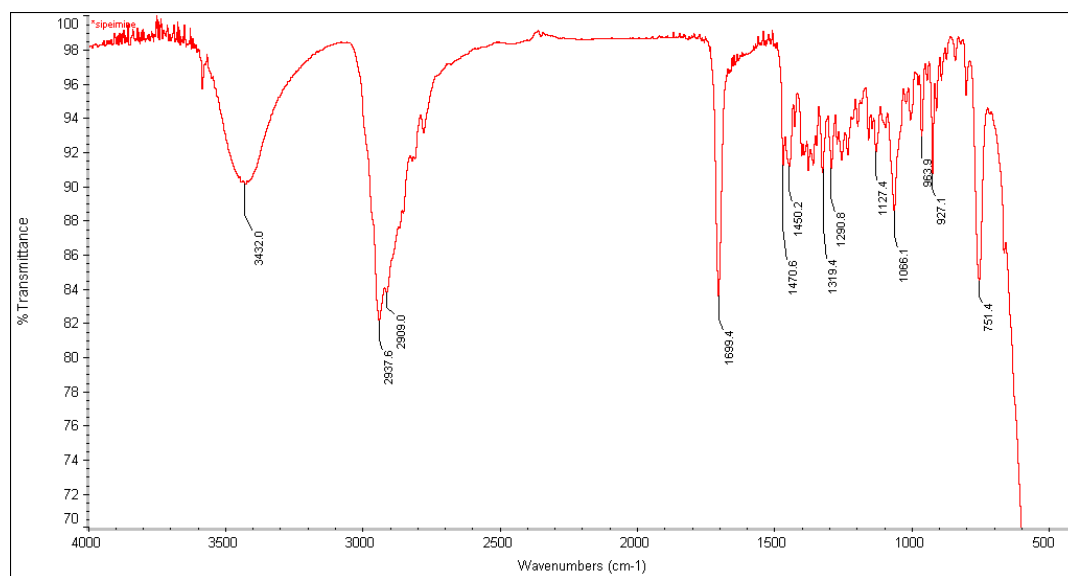
圖六、標準品西貝母素(Sipeimine)之 ^{13}C NMR 圖譜(CDCl_3)

(十五) 標準品西貝母素(Sipeimine)的 ESI-MS 圖譜



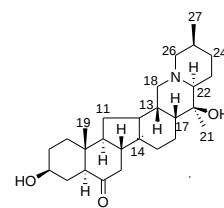
圖七、標準品西貝母素(Sipeimine)之 ESI-MS 圖譜

(十六) 標準品西貝母素(Sipeimine)的 FTIR 圖譜



圖八、標準品西貝母素(Sipeimine)之 FTIR 圖譜

(十七) 標準品西貝母素(Sipeimine)的氫、碳化學位移



表七、西貝母素(Sipeimine)的氫、碳化學位移(CDCl₃)^a

position	δ_{H} (500 MHz)	δ_{C} (125 MHz)
1		37.5 t
2		30.5 t
3	3.55 (m)	71.0 d
4		30.4 t
5		56.7 d
6		210.8 s
7	2.48 (dd, 13.0, 4.5) 2.07 (m)	46.9 t
8		40.2 d
9	1.57 (m)	56.5 d
10		38.2 s
11		29.5 t
12		39.1 d
13	2.20 (m)	34.2 d
14		46.5 d
15		26.8 t
16		18.8 t
17		42.1 d
18	2.31 (dd, 11.5, 4.5) 2.08 (m)	59.8 t
19	0.72 (s)	12.7 q
20		72.0 s
21	1.04 (s)	22.4 q
22		63.4 d
23		19.6 t
24		29.9 t
25		27.8 d
26	2.55 (br d, 11.5) 2.22 (dd, 11.5, 3.0)	61.4 t
27	1.05 (d, 7.0)	17.2 q
OH	3.44 (br s)	

^a(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm.

(十八) 參考文獻

1. 趙中振、肖培根· 當代藥用植物典， 2007， Vol. I: p.392-294， 上海世界圖書出版公司。
2. 中華人民共和國藥典第一部· 2010; p.34-35; 中國醫藥科技出版社。
3. Li SL, Lin G, Chan SW, Li P. Determination of the major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr A*. 2001; 909: 207-214.

川貝母

中文名：川貝母

生藥拉丁名：FRITILLARIAE CIRRHOSAE BULBUS

英文名：Unibract Fritillary Bulb

基 原：本品為百合科 Liliaceae 植物川貝母 *Fritillaria cirrhosa* D. Don、暗紫貝母 *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia、甘肅貝母 *Fritillaria przewalskii* Maxim.、梭砂貝母 *Fritillaria delavayi* Franch.、太白貝母 *Fritillaria taipaiensis* P. Y. Li 或瓦布貝母 *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen 的乾燥鱗莖。按性狀不同分別習稱「松貝」、「青貝」、「爐貝」和「栽培品」。夏、秋二季或積雪融化後採挖，除去鬚根、粗皮及泥沙，曬乾或低溫(40 °C–50 °C)乾燥。

一、方法

- (一) 檢品溶液 **【萃取方法 1】(中華人民共和國藥典 2015)**
——取本品粉末 10.0 g，加濃氨水 10 mL，浸泡 1 小時，加二氯甲烷 40 mL，超音波處理 1 小時，過濾，濾液蒸乾，殘渣加甲醇 0.5 mL 使之溶解，作為檢品溶液。
【萃取方法 2】(香港中藥材標準第七冊) ✓
——取本品粉末 5.0 g，加 25% 氨水 5 mL 和二氯甲烷 30 mL，超音波處理 1 小時，過濾，濾液蒸乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。
- (二) 對照標準品 取貝母辛(Peimisine)及西貝素(Sipeimine)對照標準品，加甲醇製成每 1 mL 含 1 mg 的溶液，作為對照標準品溶液。
- (三) 薄 層 板 HPTLC silica gel 60 F₂₅₄，10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm
- (四) 展 開 劑 **【展開劑 1】(中華人民共和國藥典 2015)**
——乙酸乙酯：甲醇：濃氨水：水 (18：2：1：0.1)
【展開劑 2】(香港中藥材標準第七冊) ✓
——乙酸乙酯：甲醇：25% 氨水：水 (18：2：1：0.1)
- (五) 展 開 槽 10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm
- (六) 展 開 展開槽預先平衡 15 分鐘，上行展開，展開距離 8 cm。
- (七) 顯色&檢視 浸於 1% 香荳蔻醛的 10% 硫酸甲醇試液，取出風乾後，150°C 加熱至條帶顯色清晰，於主波長 365 nm 之紫外燈照射下檢視。

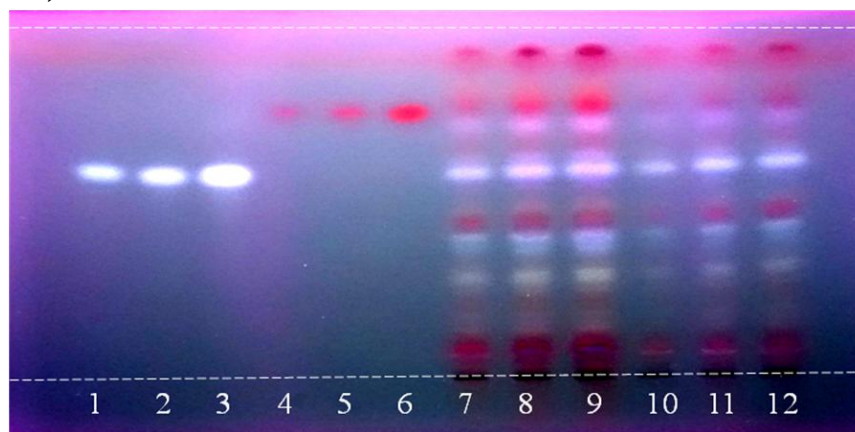
二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：104/12/07

相對溼度(RH)：45%

溫度(RT)：27 °C

【展開劑 2】(香港中藥材標準第七冊)——乙酸乙酯：甲醇：25%氨水：水 (18：2：1：0.1)



編號	名稱	含量
1，2，3	貝母辛(Peimisine) (1 mg/mL)	1，2，5 μ L
4，5，6	西貝素(Sipeimine) (1 mg/mL)	1，2，5 μ L
7，8，9	SE 檢品溶液【萃取方法 1】	4，8，12 μ L
10，11，12	SE 檢品溶液【萃取方法 2】	4，8，12 μ L

建議萃法：【萃取方法 1】及【萃取方法 2】SE 檢品溶液皆有檢出貝母辛及西貝素，而由於秤取粉末較少，製備時間也較短，故選擇【萃取方法 2】。

建議點注量：貝母辛(Peimisine)標準品溶液 2 μ L，西貝素(Sipeimine)標準品溶液 2 μ L，檢品溶液【萃取方法 2】12 μ L。

三、溶媒系統選擇

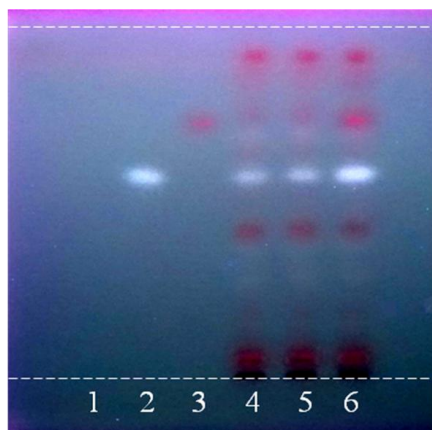
實驗日期：104/12/08

相對溼度(RH)：48%

溫度(RT)：26 °C

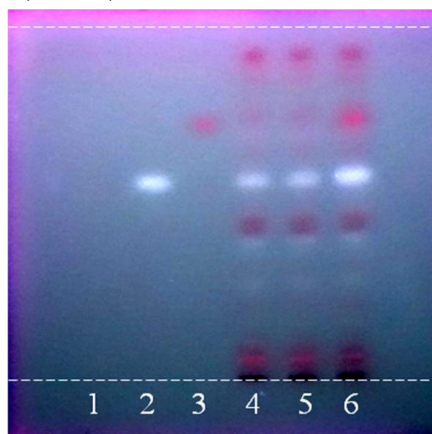
【展開劑 1】(中華人民共和國藥典 2015)——乙酸乙酯：甲醇：濃氨水：水 (18：2：1：0.1)

【萃取方法 2】(香港中藥材標準第七冊)——HPTLC 1%香莢蘭醛的 10%硫酸甲醇呈色後紫外光(365 nm)檢出(貝母辛 R_f 值為 0.58；西貝素 R_f 值為 0.74)



【展開劑 2】(香港中藥材標準第七冊)——乙酸乙酯：甲醇：25%氨水：水 (18：2：1：0.1)

【萃取方法 2】(香港中藥材標準第七冊)——HPTLC 1%香莢蘭醛的 10%硫酸甲醇呈色後紫外光(365 nm)檢出(貝母辛 R_f 值為 0.55；西貝素 R_f 值為 0.74)



1：Blank

2：貝母辛(Peimisine)

3：西貝素(Sipeimine)

4，5：SE 檢品溶液

6：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 2】方式，二者展開劑皆可於 SE 檢品溶液中分離出貝母辛及西貝素，而由於西貝素 R_f 值較趨近於中間值，故選擇【展開劑 2】。

四、觀察方式選擇

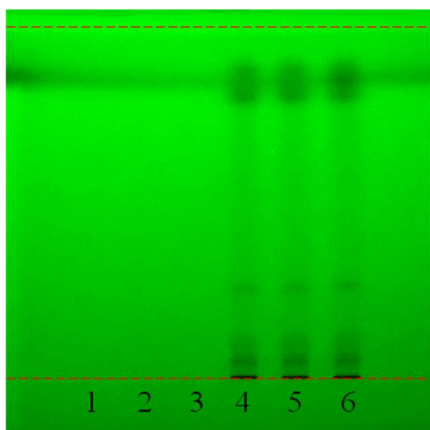
實驗日期：104/12/08

相對溼度(RH)：48%

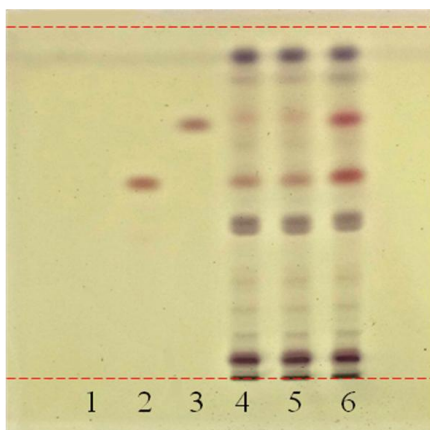
溫度(RT)：26 °C

【展開劑 2】(香港中藥材標準第七冊)——乙酸乙酯：甲醇：25%氨水：水 (18：2：1：0.1)

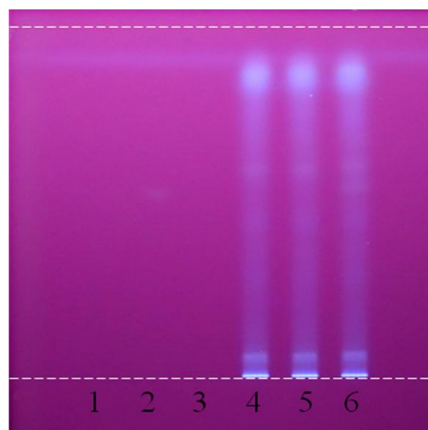
【萃取方法 2】(香港中藥材標準第七冊)——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



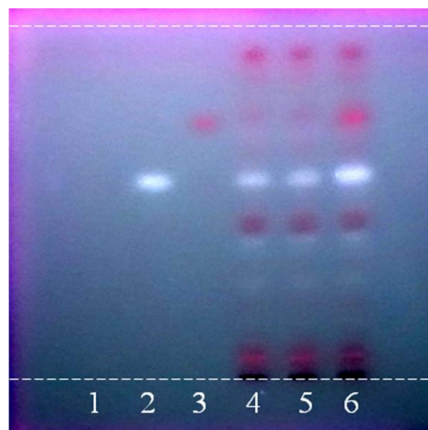
【萃取方法 2】(香港中藥材標準第七冊)——HPTLC 呈色/可見光檢出



【萃取方法 2】(香港中藥材標準第七冊)——HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



【萃取方法 2】(香港中藥材標準第七冊)——HPTLC 呈色/紫外光(365 nm)檢出



1：Blank

2：貝母辛(Peimisine)

3：西貝素(Sipeimine)

4，5：SE 檢品溶液

6：Spike

建議觀察方式：單以紫外光(254 nm 及 365 nm)檢視，貝母辛(Peimisine)及西貝素(Sipeimine)標準品主點顯示皆不清楚，經 1%香莢蘭醛的 10%硫酸甲醇呈色後，於可見光及紫外光(365 nm)下顯示出明顯之成分主點，而因香港中藥材標準第七冊是以紫外光(365 nm)下檢視，故選擇相同之檢視方式。

五、十家樣品檢測

實驗日期：104/12/09

相對溼度(RH)：53%

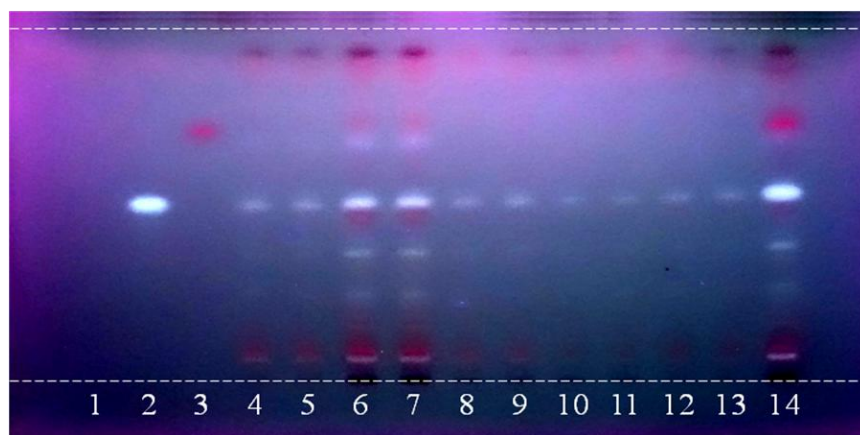
溫度(RT)：26 °C

【展開劑 2】(香港中藥材標準第七冊)——乙酸乙酯：甲醇：25%氨水：水 (18：2：1：0.1)

【萃取方法 2】(香港中藥材標準第七冊)——HPTLC 1%香莢蘭醛的 10%硫酸甲醇
呈色後紫外光(365 nm)檢出



1	Blank
2	貝母辛(Peimisine) (1 mg/mL)
3	西貝素(Sipeimine) (1 mg/mL)
4, 5	NF 檢品溶液
6, 7	NH 檢品溶液
8, 9	NI 檢品溶液
10, 11	NJ 檢品溶液
12, 13	CD 檢品溶液
14	Spike (SE 檢品溶液)



1	Blank
2	貝母辛(Peimisine) (1 mg/mL)
3	西貝素(Sipeimine) (1 mg/mL)
4, 5	SC 檢品溶液
6, 7	SE 檢品溶液
8, 9	SF 檢品溶液
10, 11	SG 檢品溶液
12, 13	SH 檢品溶液
14	Spike (SE 檢品溶液)

結論與建議：建議選用貝母辛對照標準品較西貝素佳，並建議選用以香港中藥材標準第七冊之【萃取方法 2】方式較簡便，以及採用香港中藥材標準第七冊之【展開劑 2】分離效果較佳，需以 1%香莢蘭醛的 10%硫酸甲醇試液顯色後，於可見光或紫外光(365 nm)下檢視皆可。