

常山

(DICHROAE RADIX)

常山 MI

一、藥材採購及鑑定.....	2
二、藥材性狀描述 (圖 1).....	2
三、藥材組織顯微鑑別(圖 2).....	2
四、藥材粉末顯微鑑別(圖 3).....	2

常山 HPLC

一、材料.....	6
二、儀器及層析管柱.....	6
三、實驗藥品及試劑來源.....	6
四、方法.....	6
五、結果.....	9

常山 TLC

一、方法.....	18
二、萃法選擇及濃度測試.....	19
三、觀察方式選擇.....	20
四、十批常山樣品檢測.....	21

常山

(DICHROAE RADIX)

一、藥材採購及鑑定

收集 10 批來自全臺北、中、南、東各地不同通路之中藥販賣業或中藥製造業的藥材樣品，確認所收集之藥材為常山的乾燥根。

二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：常山

生藥名：DICHROAE RADIX

英文名：Dichroa Root

基原：虎耳草科 Saxifragaceae 植物常山 *Dichroa febrifuga* Lour. 的乾燥根。

採收加工：秋季採挖，除去鬚根，洗淨，曬乾。

藥材性狀：本品為裁切過之片狀藥材，飲片大小不一，表面棕黃色，具縱皺紋，外皮易剝落，剝落處露出黃色木部，質堅硬，不易折斷，折斷時有粉塵飛揚；橫切面黃白色，髓線類白色，呈放射狀。氣微，味苦。

生長分佈：落葉灌木植物，高 1~2 m。生長於林蔭濕潤山地，或栽培於林下。

花期 6~7 月，果期 8~9 月。分佈甘肅，江西，湖北，湖南，安

徽，江蘇，陝西、四川、貴州、雲南、廣東、廣西、福建等地。

藥材主產於四川、貴州。

三、藥材組織顯微鑑別(圖 2)

1. 木栓層為數列木栓細胞。
2. 栓內層窄，少數細胞內含樹脂塊或草酸鈣針晶束。
3. 韌皮部較窄，薄壁細胞組成亦含樹脂塊或針晶束。
4. 形成層呈不規則波環狀，草酸鈣針晶束較多。
5. 木質部發達，占主要部分，木化，髓線寬窄不一。
6. 導管呈多角形，單個散在或數個相聚。
7. 薄壁細胞內含澱粉粒。

四、藥材粉末顯微鑑別(圖 3)

1. 本品粉末淡黃色。
2. 木纖維細長，壁稍厚，孔紋稍疏而細小。偏光顯微鏡下呈亮黃白色。
3. 薄壁細胞淡黃色，類多角形或類長多角形，壁稍厚，呈連珠狀。

4. 草酸鈣針晶成束，存在於長梭形或長圓形細胞中，針晶長至 $120\text{ }\mu\text{m}$ 。偏光顯微鏡下呈亮黃白色。
5. 導管多為階紋有緣紋孔導管。
6. 澱粉粒單粒類圓形或長橢圓形，直徑 $5\sim 18\text{ }\mu\text{m}$ ，臍點、層紋均不明顯；複粒少，由 2~3 分粒組成。偏光顯微鏡下呈黑圓點狀。

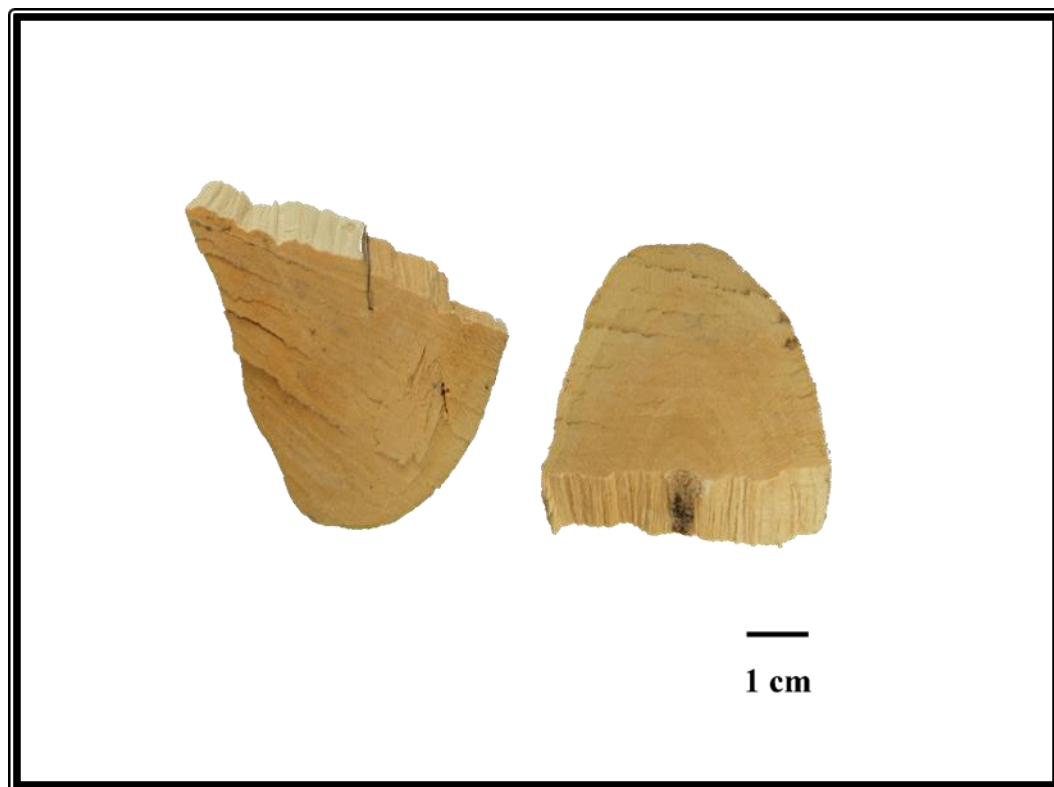


圖 1 常山藥材圖

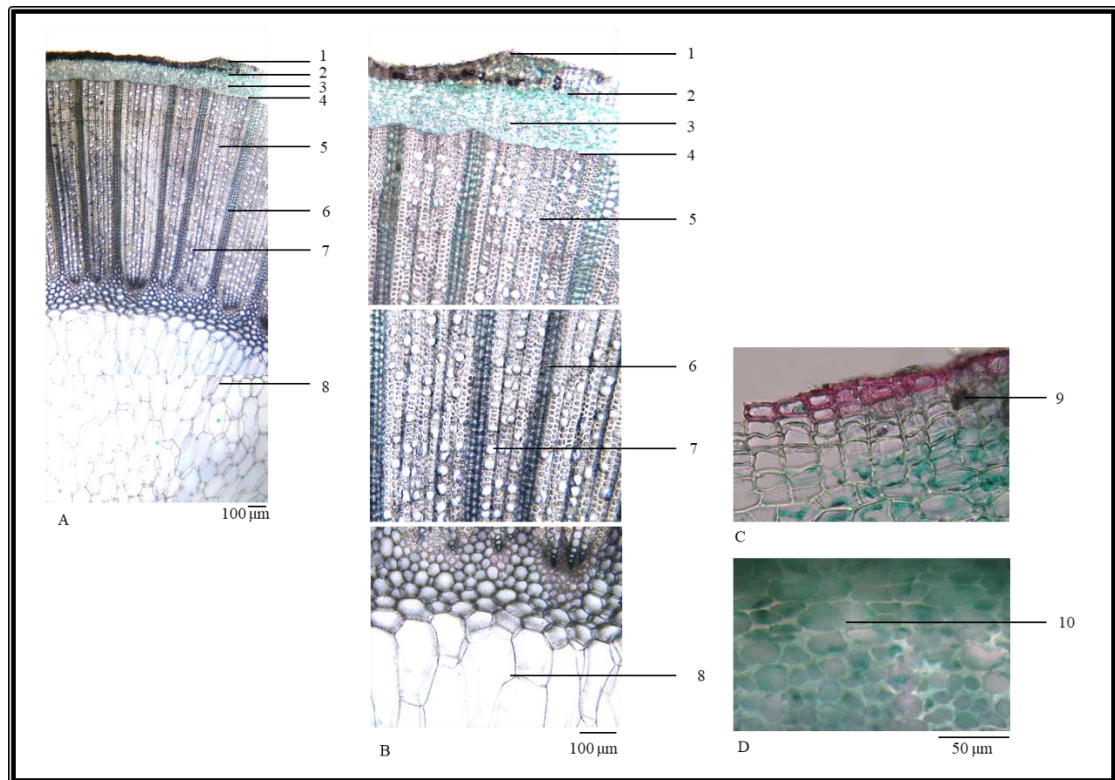


圖 2 常山根橫切面顯微特徵圖

A.橫切面圖 B.橫切面放大圖 C.栓皮層 D.草酸鈣針晶

1.木栓層 2.栓內層 3.韌皮部 4.形成層 5.木質部 6.木髓線 7.導管

8.髓部 9.樹脂塊 10.草酸鈣針晶

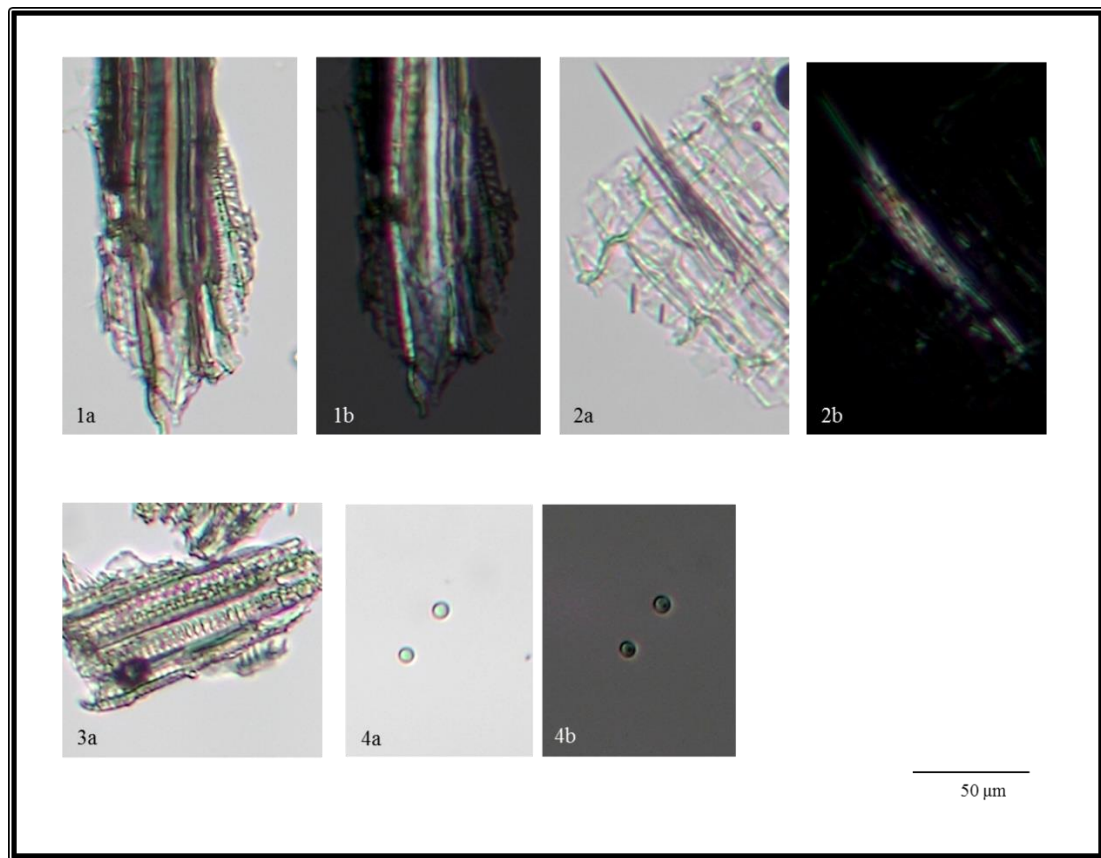


圖 3 常山粉末顯微特徵圖

a.光學顯微鏡下特徵 b.偏光顯微鏡下特徵

1.木纖維 2.薄壁細胞及草酸鈣針晶 3.導管 4.澱粉粒

常山(DICHLORAE RADIX)

一、材料

購自於臺灣各地中藥店常山藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Shimadzu LC-2040C 3D, 包含 Quaternary pump、Autosampler、Thermostatted column compartment、Diode-Array Detector；層析管柱 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)。

(二) UPLC 儀器及層析管柱

Waters AcQuity Ultra Performance LC, 包含 Binary Solvent Manager、Sampler Manager、PDA Detector；層析管柱 Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 × 2.1 mm, 1.7μm)

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

乙腈(99.9%)購自於 Sigma-Aldrich；乙醇(95%)購自於國韶實業有限公司；甲醇(HPLC grade)購自於 Merck。

(二) 標準品

標準品常山素 A(Dichrin A)購自於昇漢科技有限公司，純度 98%以上。

四、方法

(一) 最佳萃取溶媒評估

取本品粉末 7 份，每份準確稱取 1.0 g，置 50 mL 離心管中，準確加入甲醇、70%甲醇、50%甲醇、乙醇、75%乙醇、50%乙醇、水各 10 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 10 分鐘(約 5000 × g)，取上清液，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μm)，即得。每針 10 μL 注入高效能液相層析儀(HPLC)，以所測得每克重量之標準品常山素 A 最大波峰面積為最佳常山萃取溶媒。

(二) 最佳萃取次數評估

準確稱取本品粉末(過第 20 號篩網)約 1.0 g，置 50 mL 離心管中，準確加入甲醇 5 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 10 分鐘(約 5000 × g)，取上清液轉移至 5 mL 定量瓶中，加甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μm)，即得。每針 10 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

準確稱取標準品常山素 A 0.1 mg，加 1 mL 的甲醇製成每 1 mL 含常山素 A 100 µg 的標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 1.0 µg/mL 製成對照標準品溶液。

(四) 檢品溶液

準確稱取本品粉末(過第 20 號篩網)約 1.0 g，置 50 mL 離心管中，準確加入甲醇 5 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 10 分鐘(約 5000 × g)，取上清液，殘渣部分重複提取 1 次，合併上清液，轉移至 10 mL 之定量瓶中，加入甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 µm)，即得。

(五) 測定法

分別準確吸取對照標準品溶液、檢品溶液 10 µL，注入 HPLC，測定，用標準曲線分別計算溶液中常山素 A 的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取常山素 A 標準品儲備溶液適量(100 µg/mL)，以甲醇稀釋成含常山素 A 分別為 10、5.0、2.0、1.0、0.5 µg/mL 的標準品溶液。以上溶液各取 10 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)進行線性回歸，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

以常山素 A 濃度為 1.0 µg/mL 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以常山素 A 的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 重複性與穩定性試驗

1. 重複性:取同一批市售常山粉末，依常山檢品溶液製備方法平行製備 5 份常山檢品溶液，進樣測定，以常山素 A 的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性:取同一批市售常山粉末，依常山檢品溶液製備方法製備常山檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以常山素 A 的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(九) 偵測極限與定量極限試驗

1. 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。
2. 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) 添加回收率試驗

取已知常山素 A 含量的常山藥材粉末 5 份，每份準確稱取約 0.5 g，分別加入 0.2 mL 的常山素 A 溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)，並按檢品溶液製備方法操作測定。

(十一) HPLC 分析條件

1. 層析管：Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 323 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}\text{C}$
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	10	90
25	15	85
30	70	30

(十二) 臺灣市售常山含量測定

取 10 批市售常山藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μL 連續 3 針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品常山素 A 的百分含量。

(十三) 常山檢品之 UPLC 層析條件

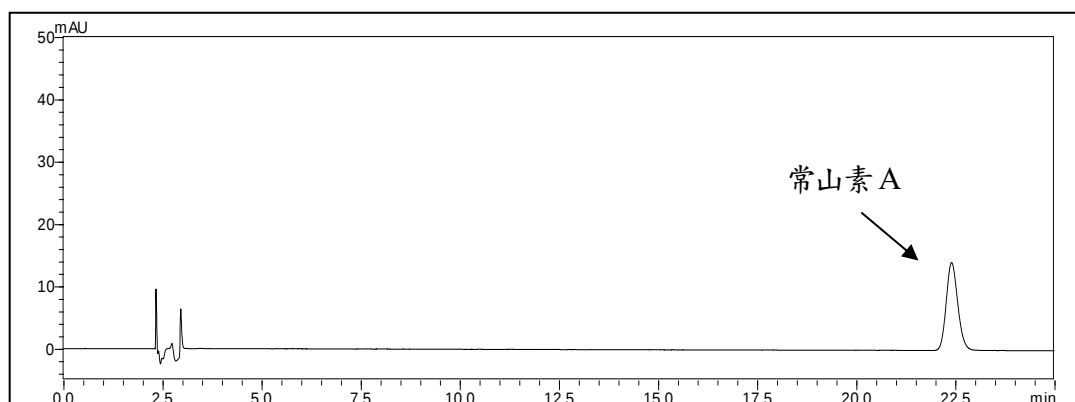
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：UV 323 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}\text{C}$
5. 注入量：1.0 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	10	90
10	15	85

五、結果

(一) 標準品常山素A之HPLC層析

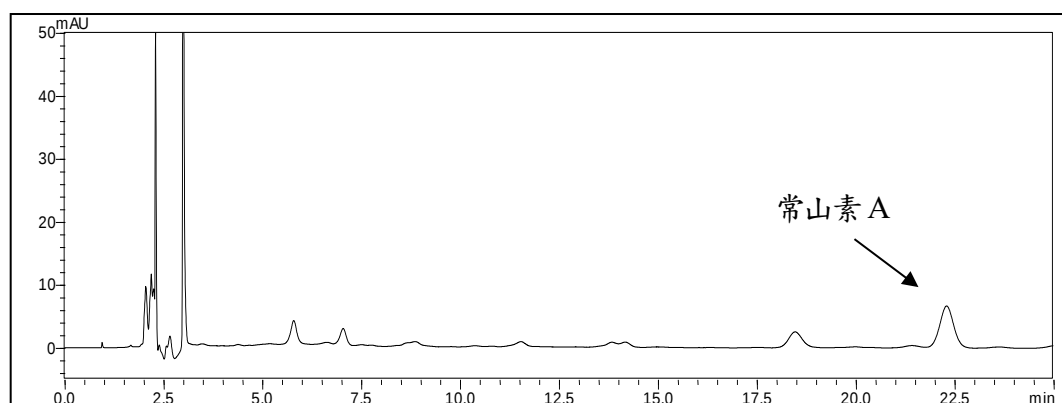
於滯留時間 22.48 分鐘處顯示常山素A 標準品波峰(圖一)。



圖一、常山素A 標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售常山檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 22.48 分鐘處顯示常山檢品中常山素 A 波峰(圖二)。分離率(R)為 6.43，托尾因子(T)為 1.00，均在系統適用性要求內。



圖二、市售常山檢品之 HPLC 層析圖

(三) 最佳萃取溶媒評估

以甲醇為溶媒時，每克藥材重量所得常山素A 的波峰面積最大，顯示甲醇為最佳萃取溶媒。

表一、不同溶媒萃取比較

溶媒	常山素 A 波峰面積(mAU)	最佳萃取
甲醇	236619	√
75% 甲醇	202111	
50% 甲醇	201398	
乙醇	175527	
75% 乙醇	225813	
50% 乙醇	201667	
水	80327	

(四) 最佳萃取次數評估

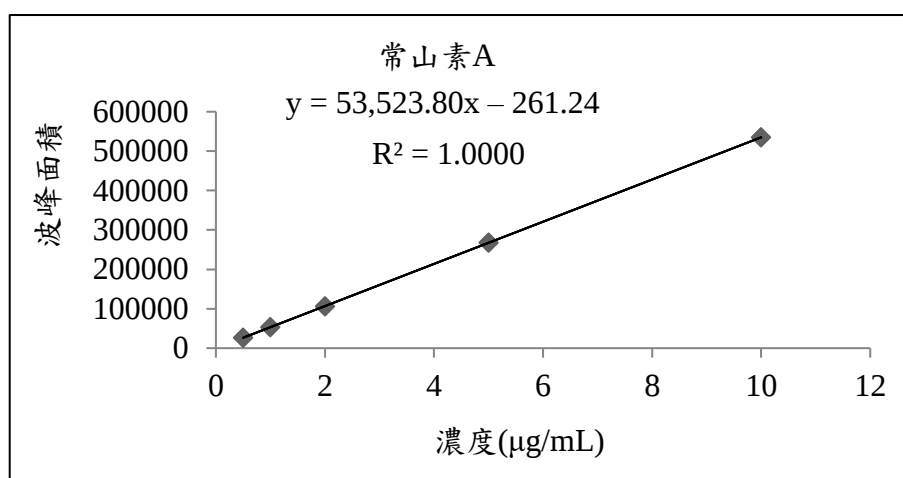
結果顯示萃取 2 次基本上已將常山素 A 萃取完全(萃取率大於 98%)。

表二、常山檢品萃取次數評估

甲醇萃取次數	常山素 A 波峰面積(mAU)
第 1 次	333725
第 2 次	157130
第 3 次	8543
第 4 次	1336

(五) 標準品常山素 A 檢量線

經不同濃度常山素 A(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 $y = 53523.80x - 261.24$ ， $R^2 = 1.0000$ ，顯示濃度在 0.5–10 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、常山素 A 之檢量線圖

表三、常山素 A 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
常山素 A	0.5–10	$y = 53523.80x - 261.24$	1.0000

(六) 精密度試驗

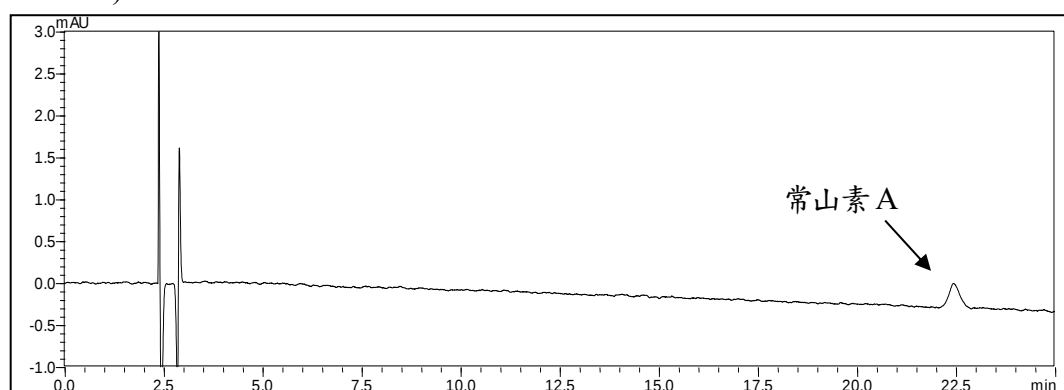
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，常山素 A 精密度之相對標準差為 0.51%，在系統適用性要求內。

(七) 重複性與穩定性試驗

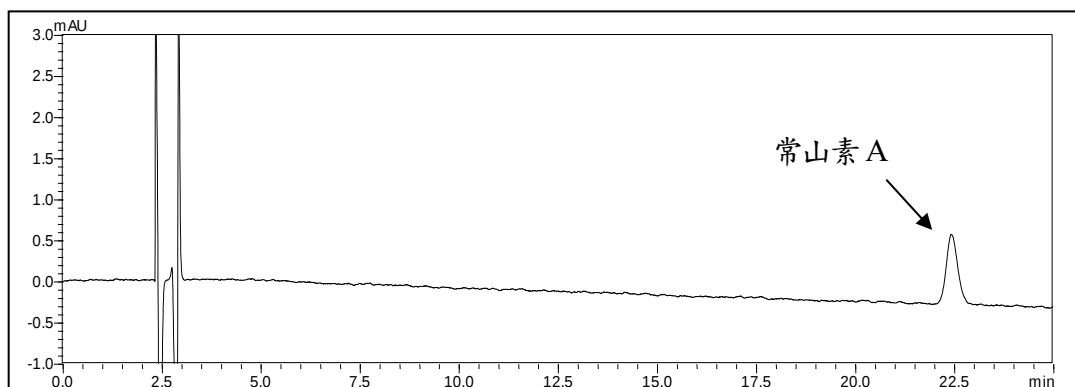
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，常山素 A 重複性之相對標準差為 2.86%，在系統適用性要求內。常山素 A 在 24 小時內穩定，穩定性之相對標準差為 2.59%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

常山素 A 偵測極限為 $0.1 \mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限為 $0.3 \mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、常山素 A 之偵測極限層析圖



圖五、常山素 A 之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	常山素 A	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	1.0 µg/mL	0.51
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.5)	2.86
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.5)	2.59
偵測極限 (n=3)	0.1 µg/mL	-
定量極限 (n=3)	0.3 µg/mL	-

(九) 添加回收率試驗

常山素 A 平均添加回收率為 100.0%，相對標準偏差為 5.00%。

表五、常山素 A 添加回收率

編號	藥材稱重 (g)	含有量 (mg)	加入量 (mg)	測得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	R.S.D. (%)
1	0.5	0.019	0.02	0.040	105.00	100.0	5.00
2	0.5	0.019	0.02	0.038	95.00		
3	0.5	0.019	0.02	0.040	105.00		
4	0.5	0.019	0.02	0.039	100.00		
5	0.5	0.019	0.02	0.038	95.00		

(十) 臺灣市售常山含量測定

10 批常山藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，常山素 A 的含量為 0.001–0.004%。由於常山素 A 的含量過低(< 0.01%)，建議不訂常山藥材指標成分常山素 A 的含量。理論板數按常山素 A 波峰計算應不低於 8000 (實際值為 19407)。

表六、臺灣市售常山檢品之常山素 A 的含量

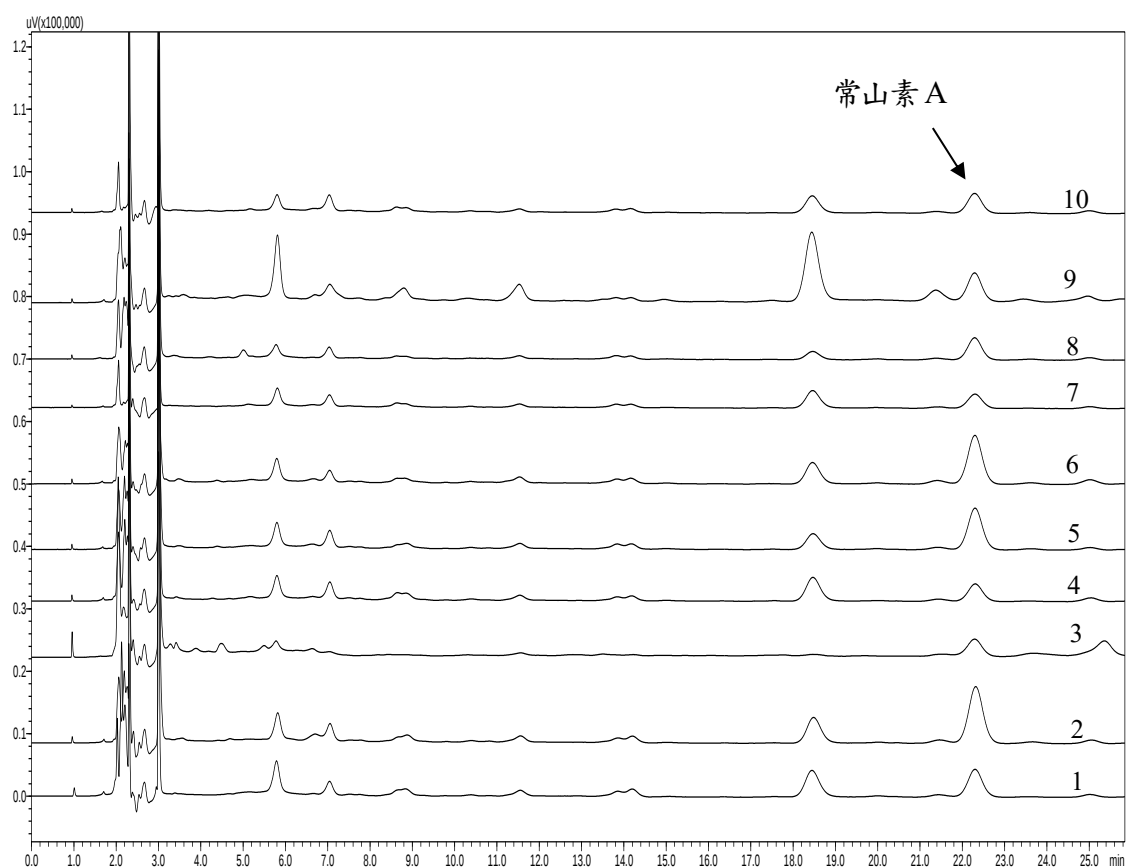
藥材編號(No.)	常山素 A 含量(%)	藥材編號(No.)	常山素 A 含量(%)
1 (SU-A)	0.002	6 (NC)	0.004
2 (SU-B)	0.004	7 (NH)	0.001
3 (SU-C)	0.001	8 (NB)	0.002
4 (CA)	0.001	9 (NK)	0.002
5 (NM)	0.003	10 (NI)	0.002

(十一) 常山藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售常山檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 323 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}$ C
5. 注入量：10 μ L
6. 移動相：

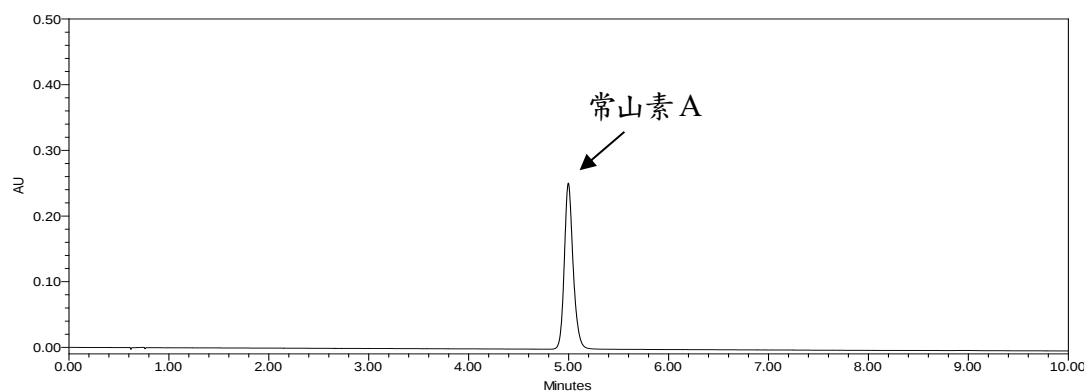
時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	10	90
25	15	85
30	70	30



圖六、10 批常山藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 標準品常山素A之UPLC層析

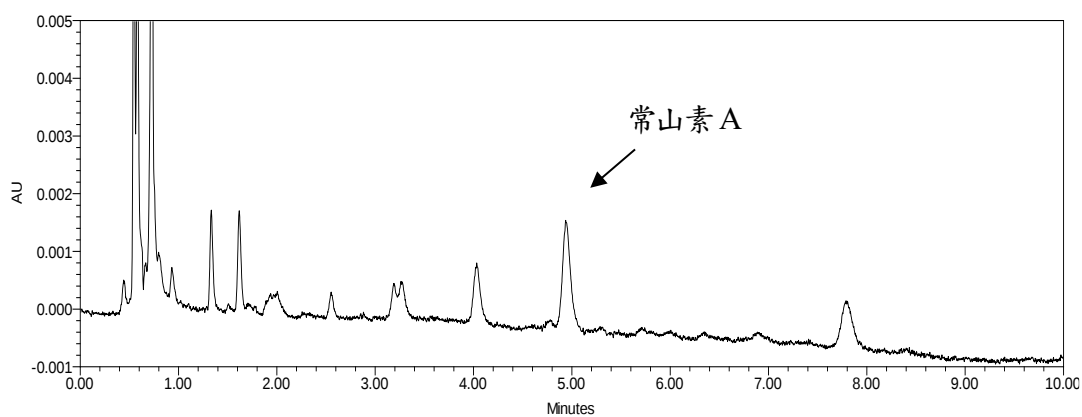
於滯留時間4.99分鐘處顯示常山素A標準品的波峰(圖七)。



圖七、常山素A標準品溶液之UPLC層析圖

(十三) 市售常山檢品之UPLC層析

於滯留時間4.94分鐘處顯示常山檢品中常山素A的波峰(圖八)。

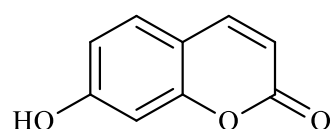


圖八、市售常山檢品之UPLC層析圖

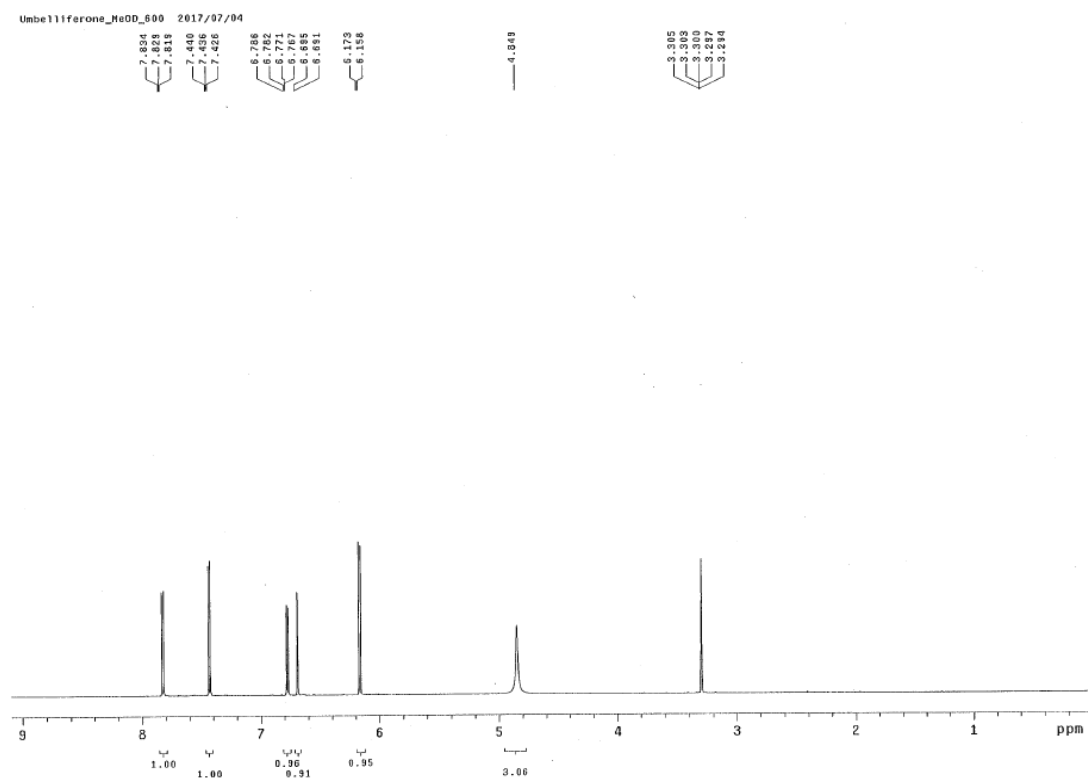
(十四) 常山素A的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_9H_6O_3$ ；分子量：162.145；熔點：230–231 °C；白色粉末。

(十五) 常山素A的結構

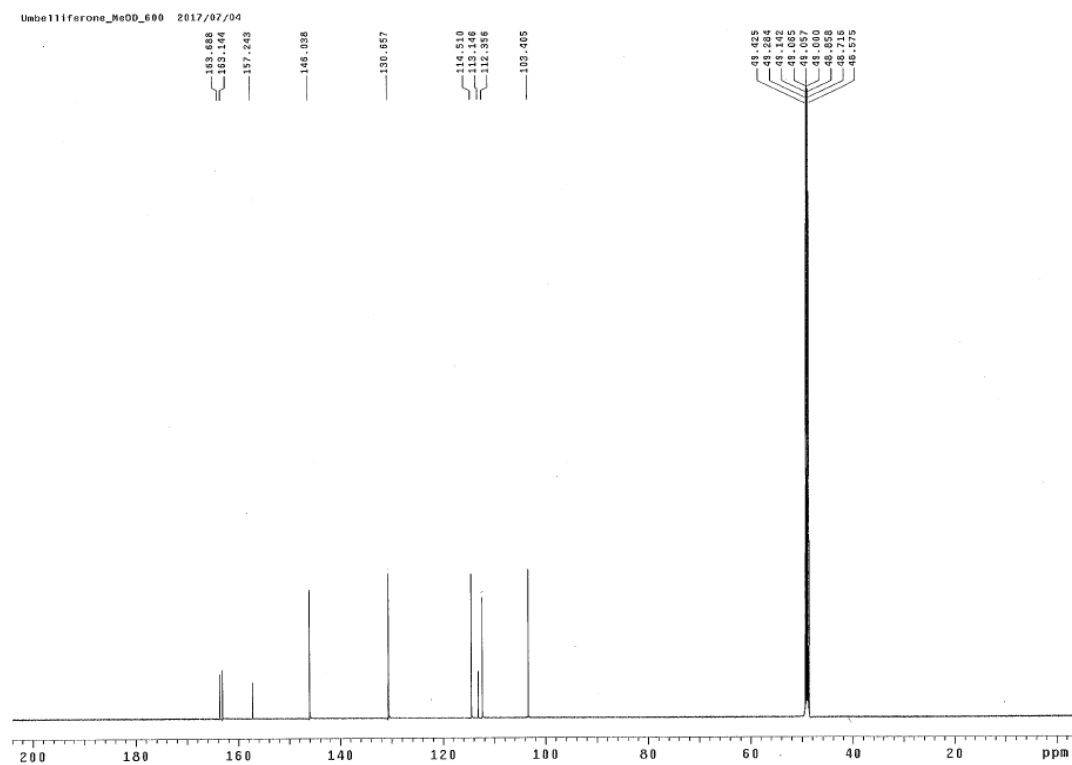


(十六) 常山素 A 的 ^1H NMR 圖譜



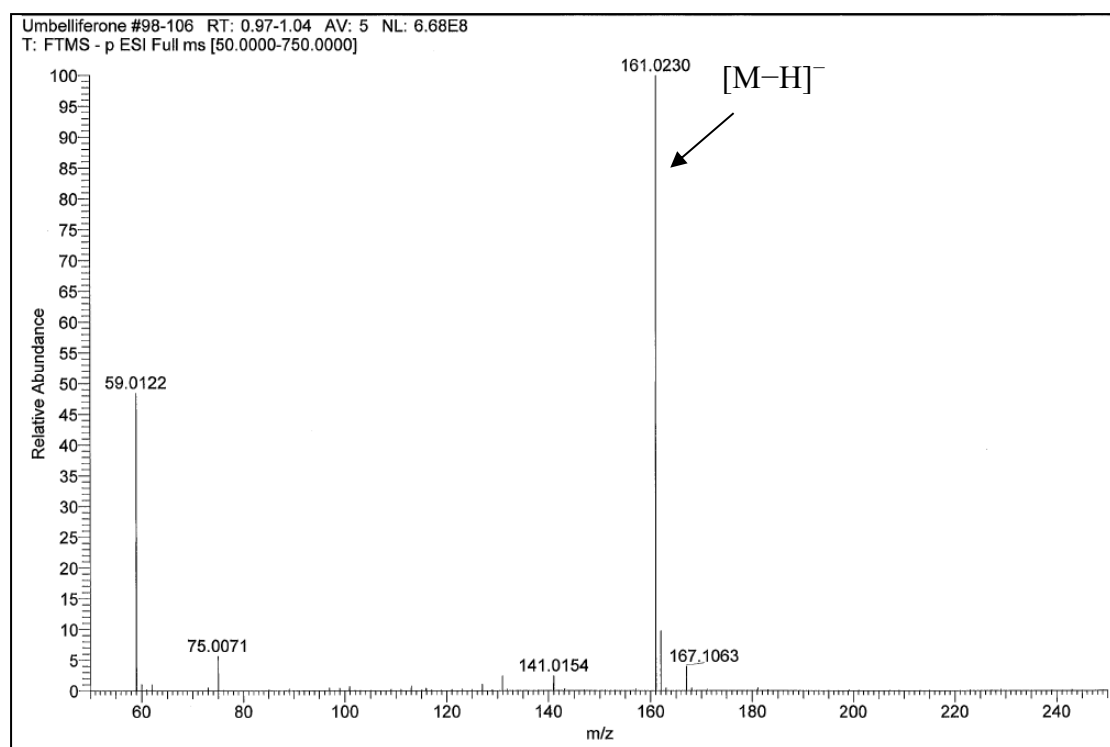
圖九、常山素 A 的 ^1H NMR 圖譜(CD_3OD)

(十七) 常山素 A 的 ^{13}C NMR 圖譜



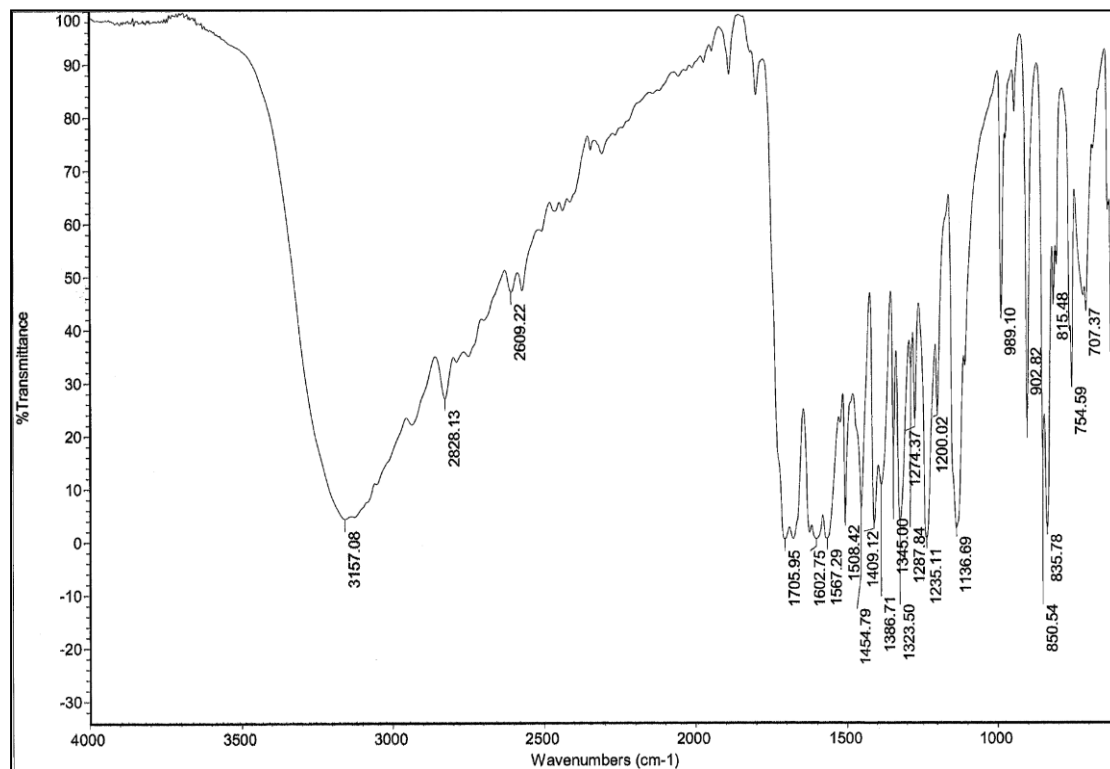
圖十、常山素A 的 ^{13}C NMR 圖譜(CD_3OD)

(十八) 常山素 A 的 ESI-MS 圖譜



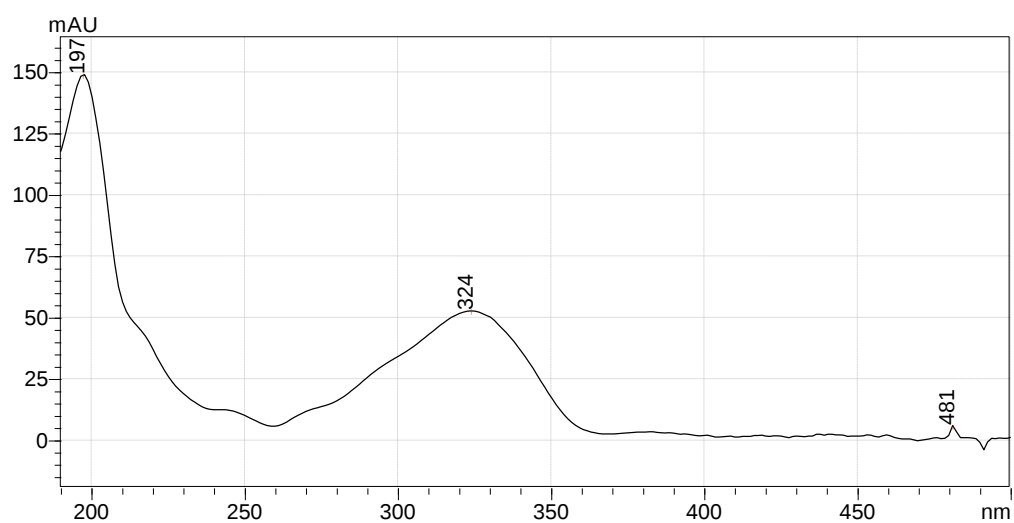
圖十一、常山素 A 的 ESI-MS 圖譜

(十九) 常山素 A 的 FTIR 圖譜



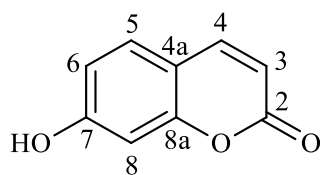
圖十二、常山素 A 的 FTIR 圖譜

(二十) 常山素 A 的 UV 圖譜



圖十三、常山素 A 的 UV 圖譜

(二十一) 常山素 A 的氫、碳化學位移



常山素 A

表七、常山素 A 的氫、碳化學位移(CD₃OD)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
2	-	163.7
3	6.17 (d, 9.0)	112.4
4	7.83 (d, 9.0)	146.0
4a	-	113.1
5	7.43 (d, 9.0)	130.7
6	6.78 (dd, 9.0, 2.4)	114.5
7	-	163.1
8	6.69 (d, 2.4)	103.4
8a	-	157.2

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

常山

生藥名：DICHROAE RADIX

英文名：Dichroa root

基 原：本品為虎耳草科(Saxifragaceae)植物常山 *Dichroa febrifuga* Lour.之乾燥根。

一、方法

(一) 檢 品 溶 液 【萃取方法 1】(自行開發)

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。

【萃取方法 2】(自行開發) ✓

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 5 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。

【萃取方法 3】(自行開發)

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

(二) 對照標準品 溶 液 取常山素 A (Dichrin A)對照標準品，加甲醇製成每 1 mL 含 10 µg 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】 (自行開發) ✓

——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (6：3：0.1)

(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 於主波長 365 nm 之紫外燈照射下檢視。

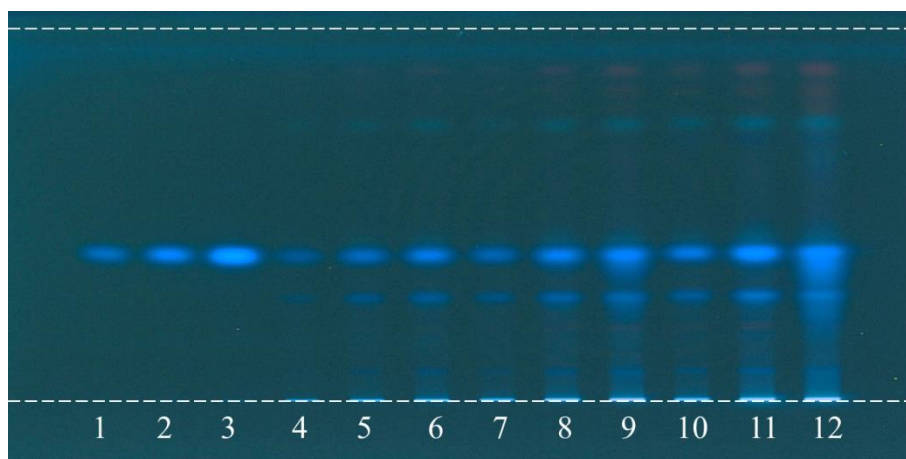
二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：106/08/01

相對溼度(RH)：54%

溫度(RT)：26 °C

【展開劑】 (自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (6：3：0.1)



編號	名稱	點注量
1, 2, 3	常山素 A (10 µg/mL)	1, 2, 5 µL
4, 5, 6	檢品溶液 1 【萃取方法 1】	2, 5, 8 µL
7, 8, 9	檢品溶液 1 【萃取方法 2】	2, 5, 8 µL
10, 11, 12	檢品溶液 1 【萃取方法 3】	2, 5, 8 µL

建議萃法：3 種萃法之檢品溶液中皆有分離與檢出標準品 7-羥基香豆素，而由於製備方法較簡便快速，且所使用的萃取溶劑量可較低，故選擇【萃取方法 2】。

建議點注量：常山素 A 標準品溶液 1 µL，檢品溶液【萃取方法 2】5 µL。

三、觀察方式選擇

實驗日期：106/08/02

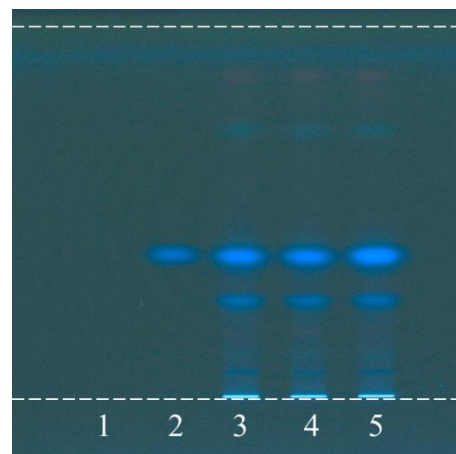
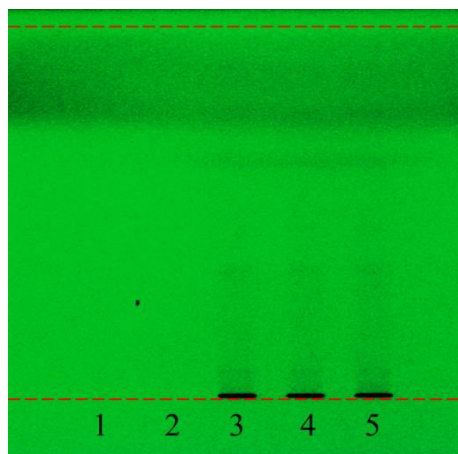
相對溼度(RH)：56%

溫度(RT)：26 °C

【展開劑】(自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (6：3：0.1)

【萃取方法 2】(自行開發)－HPTLC 紫外光(254 nm)檢出

【萃取方法 2】(自行開發)－HPTLC 紫外光(365 nm)檢出(常山素 A R_f 值為 0.39) ✓



1：Blank

2：常山素 A

3，4：檢品溶液 1

5：Spike

建議觀察方式：於紫外光(365 nm)下顯示出較紫外光(254 nm)有較多明顯之條帶及常山素 A 標準品斑點。

四、十批常山樣品檢測

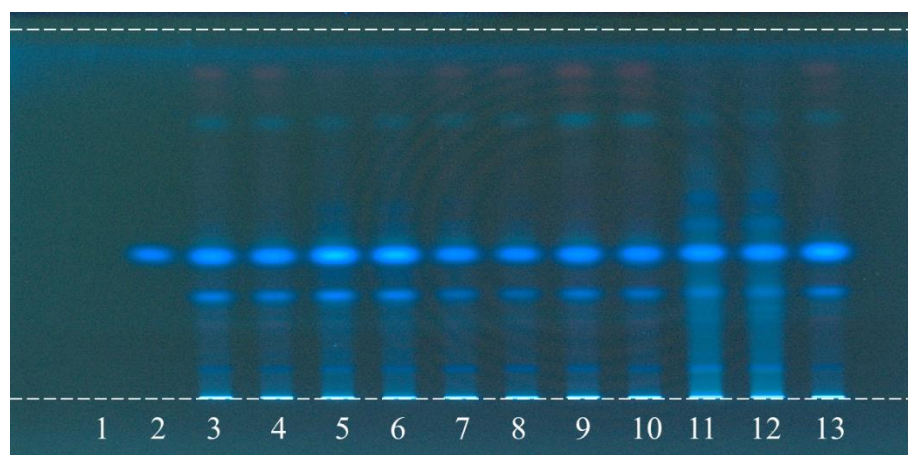
實驗日期：106/08/02

相對溼度(RH)：56%

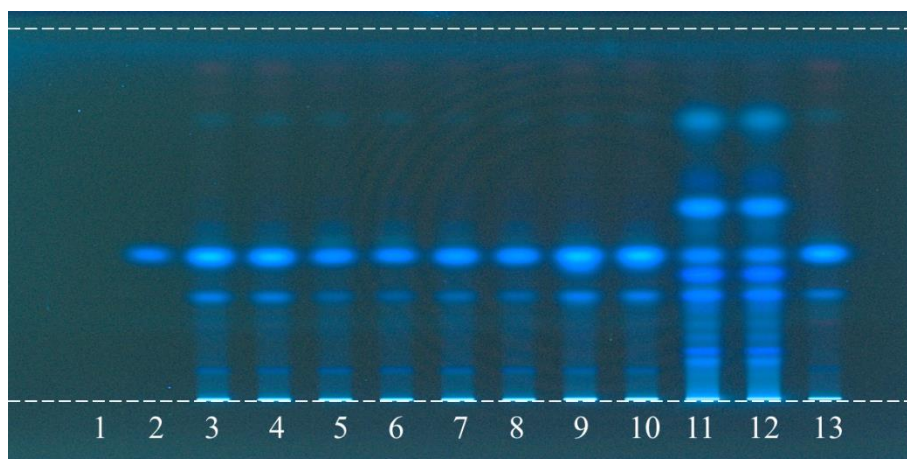
溫度(RT)：26 °C

【展開劑】(自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (6：3：0.1)

【萃取方法 2】(自行開發)－HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



1	Blank
2	常山素 A (10 µg/mL)
3 , 4	檢品溶液 1 (NB)
5 , 6	檢品溶液 2 (NC)
7 , 8	檢品溶液 3 (NH)
9 , 10	檢品溶液 4 (NI)
11 , 12	檢品溶液 5 (NK)
13	Spike (檢品溶液 1)



1	Blank
2	常山素 A (10 µg/mL)
3 , 4	檢品溶液 6 (NM)
5 , 6	檢品溶液 7 (CA)
7 , 8	檢品溶液 8 (SU-A)
9 , 10	檢品溶液 9 (SU-B)
11 , 12	檢品溶液 10 (SU-C)
13	Spike (檢品溶液 1)

結論與建議：以自行開發之【萃取方法 2】方式，並以自行開發之【展開劑】分離與檢出常山素 A，於紫外光(365 nm)下檢視較佳。