

金門龍鳳藥酒之成分分析及品質管制之研究

賴宏亮¹ 陳嘉琪¹ 黃秀琴² 吳天賞³

1. 國立屏東科技大學 農園生產系

2. 嘉南藥理科技大學 藥學系

3. 國立成功大學 化學系

中文摘要

金門龍鳳酒之藥材經組織切片及 TLC 進行基原鑑定，並使用 HPLC 進行金門龍鳳酒之成分分析，開發出包含五味子中 gomisin A, schizandrin、山茱萸中 loganin、肉桂中 cinnamic acid, cinnamaldehyde 及當歸中 scopoletin, ferulic acid 等七種指標成分之多成分同時定量分析方法。同時以不同萃取體積與不同萃取溫度等條件探討金門龍鳳酒對品質之影響。

金門龍鳳酒之試料通過保持在 30°C 恆溫之 HPLC 層析管(Inertsil ODS-2, 4.6 mm I.D.×250 mm)，移動相採用 20%及 70% acetonitrile 之混和溶液，並用磷酸調整 pH 值為 3.0，進行梯度沖提法，以 1.0 mL/分之流速沖提。七種指標成分之檢測使用 UV 偵測器，偵測波長設定 250 nm。這個分析法對於金門龍鳳酒中七種指標成分是安定且值得信賴之定量法。

關鍵詞：金門龍鳳酒，五味子醇 A，五味子素，番木鱉苷，桂皮酸，桂皮醛，萹荳，阿魏酸。

前言

產品之優劣取決於品質與有效性，在「研發中草藥的步驟與展望」第一項亦指出「提昇與管控中草藥的品質」，要推動中草藥，最先決條件要提昇與管控中草藥的品質，一旦中草藥品質參差不齊，就會影響到療效。行政院衛生署 公告“自民國九十年元月一日起，申請葛根湯、小青龍湯、加味逍遙散、桂枝湯、甘露飲、麻杏甘石湯、補中益氣湯、六味地黃丸、黃連解毒湯、獨

活寄生湯等十方濃縮製劑以及自民國九十二年二月一日起再公告增加知柏地黃丸、龍膽瀉肝湯、辛夷清肺湯、血府逐瘀湯、杞菊地黃丸、消風散、清心蓮子飲、四逆散、定喘湯、柴葛解肌湯等十方濃縮製劑之國產及輸入新案藥品查驗登記及藥品許可證有效期間展延時，應依附件「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」檢附相關資料辦理，未能檢附該項資料者，新案無法獲准查驗登記，藥品許可證有效期限不得展延”。「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」中，規定每一處方中應選擇來自不同原料藥之二種以上指標成分予以定量，目前雖只公告葛根湯等二十個方劑須作指標成分之定量，但這是將來中草藥發展之必然趨勢。

近年來筆者之研究室已建立數種方劑之 HPLC 分析方法，藥酒為中醫藥常用的製劑劑型，傳統製法以酒類浸泡或加熱萃取，因此溫度、時間等萃取條件將是影響成分變化及產品製程的重要因素。因此本研究將以金門龍鳳酒為對象，結合藥材基原鑑定、藥材指標成分 TLC 鑑定，同時開發各種指標成分 HPLC 分析方法，並經同日間(inter-day)、異日間(intra-day)及回收率(recovery)等確效試驗之驗證，開發安定、再現性良好且值得信賴之多指標成分同時定量分析技術，可減少藥材或製劑的分析時間，提高定量之效率，並建立檢驗標準，達到品質管制之目的，以確保醫療用製劑之有效性及安全性。

內容

一、材料

(一)處方依據：衛生署公告中藥酒劑基準方

(二)處方內容：五味子 6.3mg、山萸肉 12.5mg、巴戟天 6.3mg、肉蓯蓉 12.5mg、肉桂 2.5mg、當歸 3.8mg、原料酒加至 1.0mL。

(三)指標成分及內部標準物質

五味子：gomisin A、schizandrin 自行單離純化。

山萸肉：loganin 自行單離純化。

肉桂：cinnamic acid, cinnamaldehyde 購自 Fluka。

當歸：scopoletin, ferulic acid 購自 SIGMA。

內部標準物質：nobiletine (40 µg/mL)。

(四)試藥及溶媒

95% Ethanol (公賣局)、超純水 (18MΩ, Millipore)、Acetonitrile (LC 級)、Methanol (LC 級)、Phosphoric acid (特級) (Millipore)、95% ethanol、無水酒精、xylene、n-butanol、t-butanol、formalin、faster green、safranin、glycerol、ethylacetate、toluene、chlorform、ether、n-hexane、冰醋酸、30% H_2SO_4 、Dragendorff、矽膠 TLC 片、Balsam、麻油、石蠟塊、0.45 μm 濾膜等。

二、方法

(一)金門龍鳳藥酒處方中各藥材之組織切片基源鑑定

藥材中之赤芍、甘草、肉桂、烏藥、草烏、川烏等藥材以滑動式切片機切片法進行組織切片，其餘藥材則以石蠟包埋切片法進行組織切片。

1.滑動式切片機切片法

將藥材固定於滑動式切片機之藥材固定夾中，以鋼刀進行切片，並將所得薄片先浸泡於甘油水(甘油與水等量混合)中，再選擇較佳之薄片進行染色。染色以 1% Safranin 之 50% EtOH 溶液染色 16 小時後，以水洗淨多餘之 Safranin 再分別以 50% EtOH、70% EtOH、85% EtOH 及 95% EtOH 脫水後再以 0.5% Faster green 之 95%EtOH 溶液染色 1 分，95% EtOH 洗淨多餘 Faster green，以濾紙吸乾溶液即可鏡檢。

2.石蠟包埋切片法

將藥材以固定、脫水、滲蠟、埋蠟、切片、張貼切片、染色脫水及封片等步驟進行染色切片。

(1)固定

將藥材切成約 $0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{cm}^3$ 之大小，加入固定液 (70%EtOH 90mL+冰醋酸 5mL+formalin 5mL)中浸置 5 小時，再以 50% EtOH 沖洗 30 分。

(2)脫水

以 t-butanol 及 95% EtOH 與水之各種不同混合液(TBA)，將藥材逐次換置於混合液中進行脫水。

(3)滲蠟

將脫水後之藥材置於 30 mL 之固定瓶內，在瓶口放置一摺疊之濾紙，內置入約 3-4 塊小石蠟塊，再蓋上瓶蓋，並將整個固定瓶置於 60~65°C 烘箱內約 14 小時，使石蠟慢慢融化而流下瓶底進行滲蠟。滲完蠟後將瓶蓋打開，同樣置於烘箱內 12 小時，使 TBA 揮發而留下液體之純蠟。

(4)埋蠟

趁固定瓶內之石蠟還是液狀時，以夾子取出藥材置於一不銹鋼之模型容器內，一個模型內放入 4 個藥材小塊，並以切面向外排好，再加入液蠟、冷卻、凝固。

(5)切片

將凝固之藥材埋蠟模型之蠟塊切成四塊，並將四邊多餘之蠟塊剔除，將切面之蠟修切至露出藥材，再將切面之對面邊之蠟固定於一小木塊之支持物上，夾於滾動式切片機之固定夾中以進行切片，切好之薄片置於水浴式石蠟伸展器內將薄片伸展。

(6)張貼切片

先以蛋白及甘油之(2:1)之混合液取一滴置於載玻片上，塗開，放於加熱板上 40-45°C 烘乾。再將此載玻片撈起伸展器中之薄片置於加熱板中烘乾，以進行染色脫水及封片。

(7)染色脫水及封片

將藥材之薄片進行下列之溶蠟、染色、脫水及封片之步驟。

Xylene	10 分
Xylene : 無水酒精(1 : 1)	3 分

無水酒精	3 分
95% EtOH	3 分
85% EtOH	3 分
70% EtOH	3 分
50% EtOH	3 分
1% Safranin 之 50% EtOH 溶液	16 小時
水洗淨多餘染料	
50% EtOH	3 分
70% EtOH	3 分
85% EtOH	3 分
95% EtOH	3 分
0.5% Faster green 之 95%EtOH 溶液	1 分
95% EtOH 洗淨多餘 Faster green	
無水酒精洗二次	每次 3 分
Xylene：無水酒精(1：1)	3 分
Xylene	5 分
Balsam 封片	

染色後，於顯微鏡下觀察、拍照存檔，並與文獻中所記載之各藥材組織切片比對，以確定各藥材之基源。

(二)金門龍鳳藥酒處方中各藥材之指標成分 TLC 鑑定

1. 藥材之甲醇萃取檢品溶液

先將金門龍鳳藥酒處方中各藥材經絞碎機絞碎後，稱取各藥材約 10g，分別加甲醇 100mL，於水浴器中加熱迴流 30 分，冷卻後過濾，取濾液，濃縮並以甲醇定容至 10mL，作為藥材檢品溶液(1)。

2. 藥材標準指標成分溶液

秤取金門龍鳳藥酒處方各藥材之指標成分各約 1mg 於 10mL 之量瓶中，加甲醇溶解，並定容至 10mL，作為標準溶液。若無指標成分之藥材，則以甲醇萃取檢品溶液，當標準之指標成分溶液。

3. 金門龍鳳藥酒處方中各藥材之指標成分 TLC 鑑定

取一 10cm x 5cm 之矽膠 TLC 片，由底部往上 0.7cm 處劃上一

直線，由左至右分別點上指標成分標準溶液及藥材甲醇萃取檢品溶液，各 5 μ L，分別以適當展開溶媒展開，紀錄展開至頂點之距離，風乾 TLC 片，於 UV 燈下照射或以 30% H₂SO₄ 或 Dragendorff' reagent 呈色劑呈色，比較指標成分標準溶液及藥材甲醇萃取檢品溶液，所呈現之色點及 R_f 值之間之差異，並以照相裝置拍照存檔。

(三)金門龍鳳藥酒 HPLC 分析

1. 高效液相層析儀系統配備：Hitachi 系統

- (1) Autosampler L-7200
- (2) UV/Vis Detector L-7420
- (3) Pump L-7100
- (4) Interface D-7000
- (5) Data analysis : Computer control

2. 分析條件

- (1) Column : Inertsil 5 ODS-2, 4.6 I.D.×250mm.
- (2) 移動相：10%及 60% acetonitrile (各以磷酸調其 pH 值為 2.8) 進行梯度沖提，沖提程式如表 1。
- (3) 注入量：20 μ L.
- (4) 流速：1.0 mL/min.
- (5) 檢出波長：UV250 nm.

3. 方劑檢品之製備

(1) 不同倍數量之米酒(20°)浸泡萃取

五味子 6.3 g、山萸肉 12.5 g、巴戟天 6.3 g、肉蓯蓉 12.5 g、肉桂 2.5 g、當歸 3.8 g，共計 43.9g。以市售米酒 (20°) 添加藥材量之 2 倍 (87.8 mL)、4 倍 (175.6 mL)、8 倍 (351.2 mL)、12 倍 (526.8 mL)、16 倍 (702.4 mL)、20 倍 (878.0 mL) 等不同體積之溶媒，在室溫下靜置 3 星期進行萃取，經過濾後，探討其指標成分含量之差異性。

(2) 不同溫度萃取條件

上述金門龍鳳酒藥材量添加 1.0 L 市售米酒(20°)在室溫下靜置 3 星期、45°C 萃取 24 小時、60°C 萃取 12 小時、煮沸迴流萃取 3 小時等不同萃取條件，探討其指標成分含量之差異性。

4. 檢品製備

取上述製備各金門龍鳳酒之萃取液經減壓濃縮後，定容至 100 mL 並添加內部標準物質後，經 0.45 μm 濾膜過濾成爲 HPLC 定量分析對象。

5. Calibration curve 之建立

精確量取各對照標準品並添加適量之 70% methanol 稀釋調配成一一系列不同濃度溶液 loganin 依序爲 18.75、37.5、75.0、150.0 及 300.0 $\mu\text{g/mL}$ ；scopoletin 爲 3.125、6.25、12.5、25.0 及 50.0 $\mu\text{g/mL}$ ；ferulic acid 爲 1.25、2.5、5.0、10.0 及 20.0 $\mu\text{g/mL}$ ；cinnamic acid 爲 2.5、5.0、10.0、20.0 及 40.0 $\mu\text{g/mL}$ ；cinnamaldehyde 爲 4.5、9.0、18.0、36.0 及 72.0 $\mu\text{g/mL}$ ；schizandrin 爲 12.5、25.0、50.0、100.0 及 200.0 $\mu\text{g/mL}$ ；gomisin A 爲 5.0、10.0、20.0、40.0 及 80.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

上述各標準品溶液皆添加適量內部標準品，並經 0.45 μm 濾膜過濾後，供製作標準曲線之溶液，各取 20 μL 注入 HPLC 進行分析，以標準品與內部標準品各波峰面積比爲 y 軸及標準品之濃度爲 x 軸，繪圖製作檢量線，並求得標準曲線之線性回歸方程式 ($y = ax + b$) 及相關係數(r)。

6. 分析方法之確效試驗 (validation)

(1) 同日內 (intra-day)、異日內 (inter-day)

取上述配製完成之檢量線各標準品溶液低、中、高三種濃度，同一濃度之標準品溶液分別於 24 小時內及每 24 小時間隔以循環方式分析三次，並分別計算同濃度檢品所得之對照標準品面積比值之平均值、標準偏差及變異係數。

(2) 回收率(recovery)

取標準萃取液 1.5 mL，分別添加低、中、高三種不同濃度之

指標成分標準品溶液，且每一濃度均重複操作三組，添加適量之標準品，經 0.45 μm 過濾膜過濾，以供 HPLC 分析，依所求得之檢量線推算，求分析所得之指標成分含量為添加入之百分率。

三、結果與討論

(一)金門龍鳳藥酒處方中各藥材之基原鑑定

1. 當歸

[藥材性狀]：本品略呈圓柱形，粗而厚之根莖，其直徑為 1~3.5cm，下部有支根 3~5 條或更多。全長 15~25cm。表面黃棕色至棕褐色，具有縱皺紋及皮孔。歸頭直徑 1.5~4.5cm，具環紋，上端圓柱。其歸身表面凹凸不平，支根（歸尾）直徑 0.5~1cm，上粗下細，多扭曲。質柔韌，橫斷面黃白色或淡黃棕色。而形成層環狀黃棕色。

[組織構造]：主根，栓皮層由 5~7 層薄膜栓皮細胞所構成。其下方有厚角組織 4~9 層。裂隙很多，髓線 3~10 列。樹脂道 (20~50 μm) 靠近形成層愈小，往皮部樹脂道愈大 (80~100 μm)。導管為單獨或數個集合於外方，外方排列稍密而內方則較疏。其徑為 40~60 μm 。導管周圍之細胞呈厚角狀。放射組織於中心附近不能辨認。澱粉粒，單粒，徑 10~15 μm 以下。偶而有 2~4 複粒。

依本品之外觀型態⁷⁾及組織切片觀察，並與文獻比對，鑑定本品為繖形科(Umbelliferae)之當歸 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 之乾燥根。

2. 肉桂

[藥材性狀]：本品呈卷筒狀，長 30~40cm，寬 3~10cm，厚 0.2~0.8cm，樹皮表面灰棕色，稍粗糙，有不規則的細皺紋及橫向突起的皮孔，有時候可見灰白色的環紋；內表面呈黃褐色，略平坦，有細縱紋，劃之顯油痕，斷面平坦呈顆粒狀，仔細觀察，有由石細胞群排成之環帶。栓皮大多除去，也有未去栓皮者。折斷面，可見外層棕色，

內層紅棕色而油潤(顏色較重),兩層之間有黃棕色的線紋一條。

[組織構造]:木栓細胞由數列細胞構成,並伴有厚膜化且呈強木化反應之石栓細胞含黃褐色單寧質。栓皮層下接 3~4 層線性延長之細胞。第一次皮部下方有石細胞群,形成內鞘石細胞環,環外常伴有纖維束。第二次皮部有髓線細胞 2~3 列,並有石細胞,徑約 45~80 μm 粘液細胞,油細胞。尚有少量之草酸鈣小針晶(5~7 μm)。柔細胞及髓腺細胞充滿澱粉粒(10~15 μm)。此外尚含有赤褐色之 Tannin。

依本品之外觀型態⁸⁾及組織切片⁸⁾觀察,並與文獻比對,鑑定本品為樟科(Lauraceae)之肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 之乾燥樹皮。

3.五味子

[藥材性狀]:本品呈扁球形而不規則,果肉皺縮,柔軟,徑約 5~8mm,表面暗紅色。內含種子 1~2 枚,棕黃色,有光澤,堅硬。

[組織構造]:外果皮為一系列類方形、類長方形之表皮細胞。中果皮為類長方形、類方形之薄壁細胞,切線性延長,約為十餘層。內含澱粒。內果皮為一系列類方形薄壁細胞。種皮最外層有一列石細胞呈柵狀形,細胞壁厚,具有小孔溝。在下方之石細胞則呈類圓形,類長橢圓形,徑約 40~55 μm 。種脊部位具有纖維束、維束管。其上下具有柔細胞,油細胞呈類方形,內含揮發油。種皮內表皮細胞呈類圓形,類橢圓形。胚乳細胞呈類多角形,含脂肪油。

依本品之外觀型態⁹⁾及組織切片⁹⁾觀察,並與文獻比對,鑑定本品為木蘭科(Magnoliaceae)之北五味子 *Schizandra chinensis* (Turcz) Baill.之乾燥成熟果實。

4.山茱萸

[藥材性狀]:本品多皺縮破裂,不完整乾燥果肉,長 1~1.5cm,寬

約 0.5cm，表面紫紅色至紫黑色，有光澤，質柔軟。

[組織構造]：果皮表皮細胞呈長方形，類長橢圓形，直徑約 12~30 μm ，周壁增厚，腔內含淡黃色內含物。中果皮細胞多為皺縮呈橙棕色，細胞內含有深褐色之色素塊，內側有維管束，具螺旋紋導管，徑約 8~30 μm 。石細胞單獨散生，存於中果皮組織中。

依本品之外觀型態¹⁰⁾及組織切片¹⁰⁾觀察，並與文獻比對，鑑定本品為山茱萸科(Cornaceae)之山茱萸 *Macrocarpium officinale* (Sieb. et zucc. Nakai.)之乾燥成熟果肉。

5. 巴戟天

[藥材性狀]：本品為扁圓柱形，略彎曲，長短不一，皮部橫裂成連珠狀，直徑 0.5~2cm。表面灰褐色，有縱皺紋，皮部脆，有些皮部橫向斷離露出木部，木部強韌，皮部非常發達。斷面皮部厚，易與木部剝離。

[組織構造]：木栓層由 5~10 層木栓細胞構成，呈棕色壁稍厚，微木化。皮層有石細胞斷續排列成環，近栓皮層，石細胞呈類圓形，類長方形，類方形，成群或單個散生。直徑 25~45 μm ，長約 200 μm 。韌皮部較寬，近形成層處，柔細胞中含有許多草酸鈣針晶束，長 13~20 μm 。形成層明顯。木質部導管主要為有緣孔紋導管，單獨或 2~3 個並一起，徑約 30~75 μm ，木質部纖維大多成束。木質部呈凹凸淺齒輪狀，約占根直徑的 1/3。

依本品之外觀型態¹¹⁾及組織切片¹¹⁾觀察，並與文獻比對，鑑定本品為茜草科(Rubiaceae)之巴戟天 *Morinda officinalis* How 之乾燥根。

6. 肉蓯蓉

[藥材性狀]：本品呈扁圓柱形，稍彎曲，長 4~10cm，直徑 2~6cm。表面灰棕色或棕褐色。密被覆瓦狀肉質鱗葉。質硬，微有柔性，折斷面棕褐色。可見到點狀維管束，呈淡棕色。

[組織構造]：本品莖橫切面，外皮黃棕色，細胞皺縮。靠近外皮的幾裂薄壁細胞呈切向延長，其餘薄壁細胞多呈類圓形。維管束有數個，呈深波狀排列。每一個維管束呈長條形或菱形，由木質部及韌皮部相合而成。

依本品之外觀型態¹²⁾及組織切片¹²⁾觀察，並與文獻比對，鑑定本品為列當科(Orobanchaceae)之肉蓯蓉 *Listanthe deserti* 之乾燥帶鱗片的肉質莖。

(二)金門龍鳳藥酒製品中指標成分 TLC 檢驗

- 1.當歸藥材之指標成分 TLC 檢出；展開溶媒：CHCl₃：MeOH(6：1)
- 2.肉桂藥材之指標成分 TLC 檢出；展開溶媒：Toluene：EtOAc(1：1)
- 3.巴戟天藥材指標成分 TLC 檢出；展開溶媒：n-Hexane：EtOAc(1.5：1)
- 4.山萸肉藥材指標成分 TLC 檢出展開溶媒：Benzene：acetone(9：1)
- 5.五味子藥材之指標成分 TLC 檢出；展開溶媒：Toluene：EtOAc(9：1)
- 6.肉蓯蓉藥材之指標成分 TLC 檢出；展開溶媒：n-BuOH：冰醋酸：水(7：2：1)

(三)HPLC 分析方法之開發

1.指標成分之分離

以 loganin、scopoletin、ferulic acid、cinnamic acid、cinnamaldehyde、schizandrin、gomisin A 等為指標成分，開發金門龍鳳酒之 HPLC 分析方法。由層析圖所示，loganin 之滯留時間為 18.09 分、scopoletin 為 27.72 分、ferulic acid 為 29.69 分、cinnamic acid 為 42.21 分、cinnamaldehyde 為 44.48 分、schizandrin 為 51.17 分、gomisin A 為 53.87 分、內部標準物質 nobiletine 為 49.77 分，並經空白湯劑及 HPLC-PDA 之檢測，在此分離條件下 8 個成分之波峰未受到方劑中其他成分干擾，均有良好分離效果，故本分析方法應可做為金門龍鳳酒品質檢測之條件。(圖 1,2)

2.確效試驗

各指標成分在低、中、高濃度之 intra-day 及 inter-day 檢測結果，inter-day 之 CV 值有大於 intra-day 之傾向，大體上僅少數大於 5 % 外，其餘均小於 5 %，再現性良好。Recovery 檢測則在

96.53±4.56~113.67 ±3.97 之間，具有良好的回收率。(表 2, 3)

3. 檢量線之製作

Loganin：在 18.75~300.0 µg/mL 濃度範圍標準曲線方程式為

$$y = 0.0201x + 0.0267 \quad (r = 1.0000)$$

Scopoletin：在 3.125~50.0 µg/mL 濃度範圍標準曲線方程式為

$$y = 0.0268x - 0.0058 \quad (r = 0.9999)$$

Ferulic acid：在 1.25~20.0 µg/mL 濃度範圍標準曲線方程式為

$$y = 0.0527x - 0.0693 \quad (r = 0.9944)$$

Cinnamic acid：在 2.5~40.0 µg/mL 濃度範圍標準曲線方程式為

$$y = 0.0464x + 0.0331 \quad (r = 0.9996)$$

Cinnamaldehyde：在 3.125~50.0 µg/mL 濃度範圍標準曲線方程式為

$$y = 0.0201x + 0.0212 \quad (r = 0.9998)$$

Schizandrin：在 12.5~200.0 µg/mL 濃度範圍標準曲線方程式為

$$y = 0.0272x + 0.0909 \quad (r = 0.9997)$$

Gomisin A：在 5.0~80.0 µg/mL 濃度範圍標準曲線方程式為

$$y = 0.0322x + 0.0337 \quad (r = 0.9995)$$

以上各指標成分之檢量線均可得到良好的直線關係，並可求出各指標成分濃度及含量。

4. 定量結果

(1) 不同倍數量之米酒 (20°) 浸泡萃取

根據定量結果顯示 7 種指標成分均在 8 倍 (351.2 mL) 或 12

倍(526.8 mL)體積之米酒 (20°) 萃取下已達最高含量之趨勢。因此，金門龍鳳酒之萃取溶媒體積應為藥材量之 8 倍 (351.2 mL) 或 12 倍 (526.8 mL) 為最適當。(表 4)

(2)不同溫度萃取條件

根據定量結果顯示 loganin、scopoletin、ferulic acid、cinnamic acid、cinnamaldehyde 等 5 種指標成分均隨萃取溫度越高含量有越高之傾向，而 schizandrin、gomisin A 則有降低之趨勢。(表 5)

參考文獻

1. Lay, H. L., Chan, H. J. and Lin C. F. 1997. Simultaneous analysis of six components in “Chai-Hu-Kuei-Chih-Tang” by high performance liquid chromatography. *J. Food Drug Anal.* 5(4): 381-390.
2. Lay, H. L., Chen, C. C. 2000. Simultaneous analysis of eight components in “Pin-Wei-San” by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 23(9): 1439-1450.
3. Lay, H. L., Sheu C., Wu, Y. S. and Kuo J. H. 2000. The development of manufacturing and analytical method of Hwan-Shio-Dan softgel. *J. Food Drug Anal.* 8(1): 35-43.
4. Lay, H. L., Shih I. J., Yeh, C. H., Lin, C. F. and Liang, J. W. 2000. Simultaneous determination of five constituents in “Tzyy-Yun-Gau” medicine by high performance liquid chromatography. *J. Food Drug Anal.* 8(4): 304-308.
5. Lay, H. L., Huang S. C., Chen, C. C., and Wu T. S. 2003. Studies on the component analysis and quality control in tonic wine preparation of King-Mon-Long-Fong-Jyo.. *J. Food Drug Anal.* 11(3): 201-208.
6. Horng-Liang Lay, Chia-Chi Chen and Shu-Tuan Chiang. 2004. Simultaneous Analysis of Nine Components in “Byi-Liang-Tang” Preparation by High Performance Liquid Chromatography. *J. Food Drug Anal.* 12(2): 115-119.
7. a. 姚達木等，新編中國藥典，旺文出版社，1999，台北，p.173。
b. 黃泰康，常用中藥成分與藥理手冊，中國醫藥科技出版社，1994，北京，p.863。
8. a. 姚達木等，新編中國藥典，旺文出版社，1999，台北，p.169。
b. 黃泰康，常用中藥成分與藥理手冊，中國醫藥科技出版社，1994，北京，p.824。

9. a. 姚達木等，新編中國藥典，旺文出版社，1999，台北，p.78。
 - b. 行政院衛生署中醫藥委員會，中藥材品質管制組織形態學鑑定，行政院衛生署中醫藥委員會，1999，台北，p.95。
 - c. 黃泰康，常用中藥成分與藥理手冊，中國醫藥科技出版社，1994，北京，p.526。
10. a. 姚達木等，新編中國藥典，旺文出版社，1999，台北，p.32。
 - b. 行政院衛生署中醫藥委員會，中藥材品質管制組織形態學鑑定，行政院衛生署中醫藥委員會，1999，台北，p.97。
 - c. 黃泰康，常用中藥成分與藥理手冊，中國醫藥科技出版社，1994，北京，p.368。
11. a. 姚達木等，新編中國藥典，旺文出版社，1999，台北，p.96。
 - b. 行政院衛生署中醫藥委員會，中藥材品質管制組織形態學鑑定，行政院衛生署中醫藥委員會，1999，台北，p.405。
 - c. 黃泰康，常用中藥成分與藥理手冊，中國醫藥科技出版社，1994，北京，p.636。
12. a. 姚達木等，新編中國藥典，旺文出版社，1999，台北，p.172。
 - b. 黃泰康，常用中藥成分與藥理手冊，中國醫藥科技出版社，1994，北京，p.85。

Studies on the component analysis and quality control in tonic wine preparation of King-Mon-Long-Fong-Jyo

Horng-Liang Lay¹, Chia-Chi Chen¹, Shio-Chyn Huang² and Tian-Shung Wu³

1. Department of Plant Industry, National PingTung University of Science & Technology
2. Department of Pharmacy, Chia-Nan University of Pharmacy and Science
3. Department of Chemistry, National Cheng Kung University

The origin of King-Mon-Long-Fong-Jyo crude drugs were identified by microscopic and TLC examination, and an HPLC method for simultaneous determination of seven marker substances was established for the quality control in tonic wine preparation of “King-Mon-Long-Fong-Jyo”. These marker substances were gomisin A and schizandrin from *Schizandrae* Fructus, loganin from *Corni* Fructus, cinnamic acid and cinnamaldehyde from *Cinnamomi* Cortex, and scopoletin and ferulic acid from *Angelicae* Radix. Different rice wine extraction volume and extraction temperature conditions were performed to evaluate quality of King-Mon-Long-Fong-Jyo.

Extracted samples were run through the HPLC column (Inertsil 5 ODS-2, 4.6 I.D. × 250mm.) at 30°C and the column was developed with a mixture of 20% acetonitrile and 70% acetonitrile (adjusted to pH3.0 with phosphoric acid) aqueous solution and then employed linear gradient elution method at a flow-rate of 1.0 mL/min. An UV 250 nm was used for the detection of the marker substances.

Relative standard deviations of intra- and inter-day analysis were less than 5%. This separation method could be successfully applied for the simultaneous determination of seven marker substances in “King-Mon-Long-Fong-Jyo”.

Keywords : King-Mon-Long-Fong-Jyo, gomisin A, schizandrin, loganin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, scopoletin, ferulic acid.

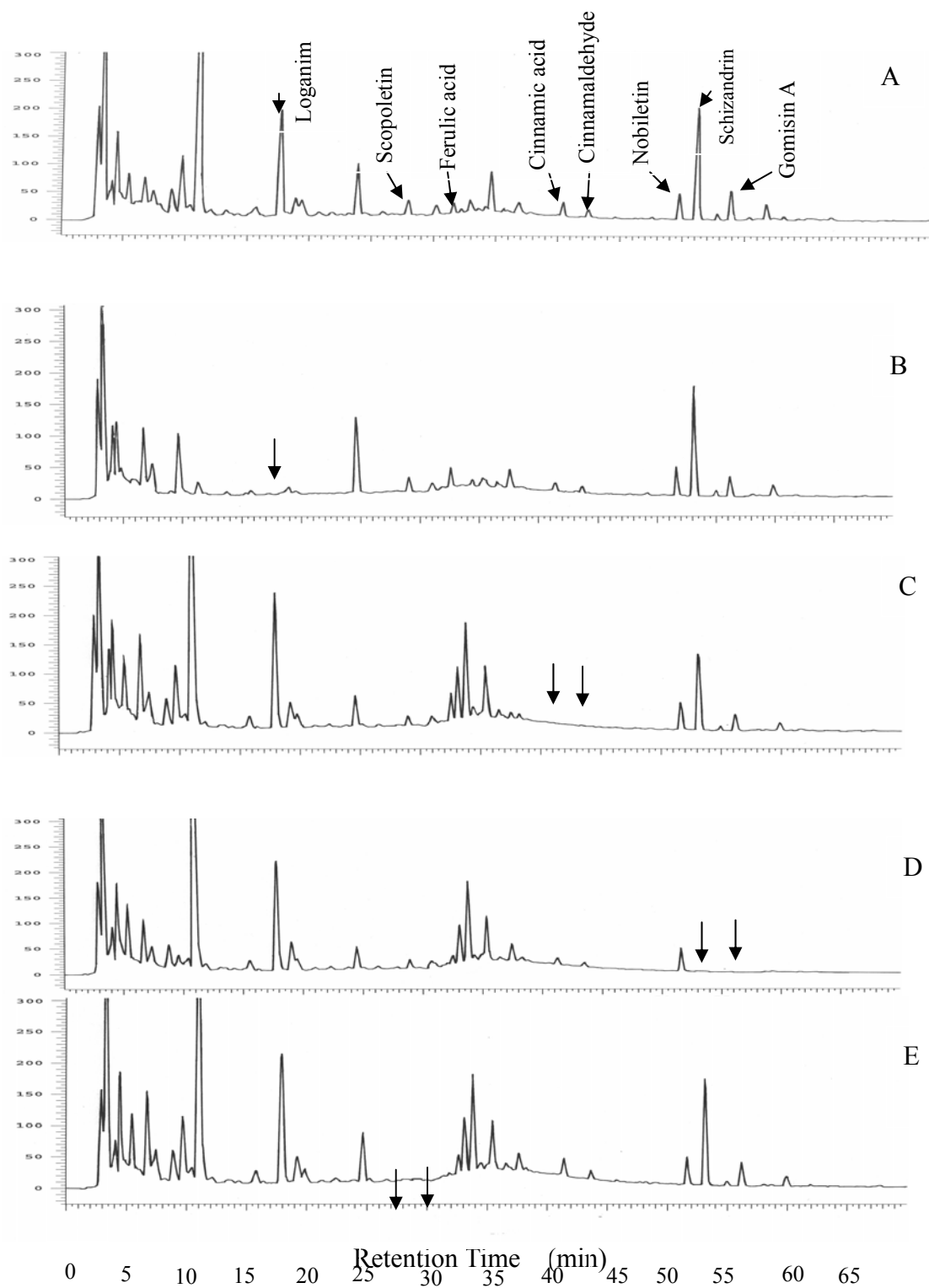


圖 1. 金門龍鳳酒標準湯劑及空白湯劑之指標成分及內部標準物質之層析圖

Figure 1. Chromatograms of marker substances in standard solutions of King-Mon-Long-Fong-Jyo made from incomplete materials.
 A : King-Mon-Long-Fong-Jyo standard solution containing nobiletin as internal standard.
 B : King-Mon-Long-Fong-Jyo standard solution without Corni Fructus.
 C : King-Mon-Long-Fong-Jyo standard solution without Cinnamonomi Cortex.
 D : King-Mon-Long-Fong-Jyo standard solution without Schizandrae Fructus.
 E : King-Mon-Long-Fong-Jyo standard solution without Angelicae Radix.

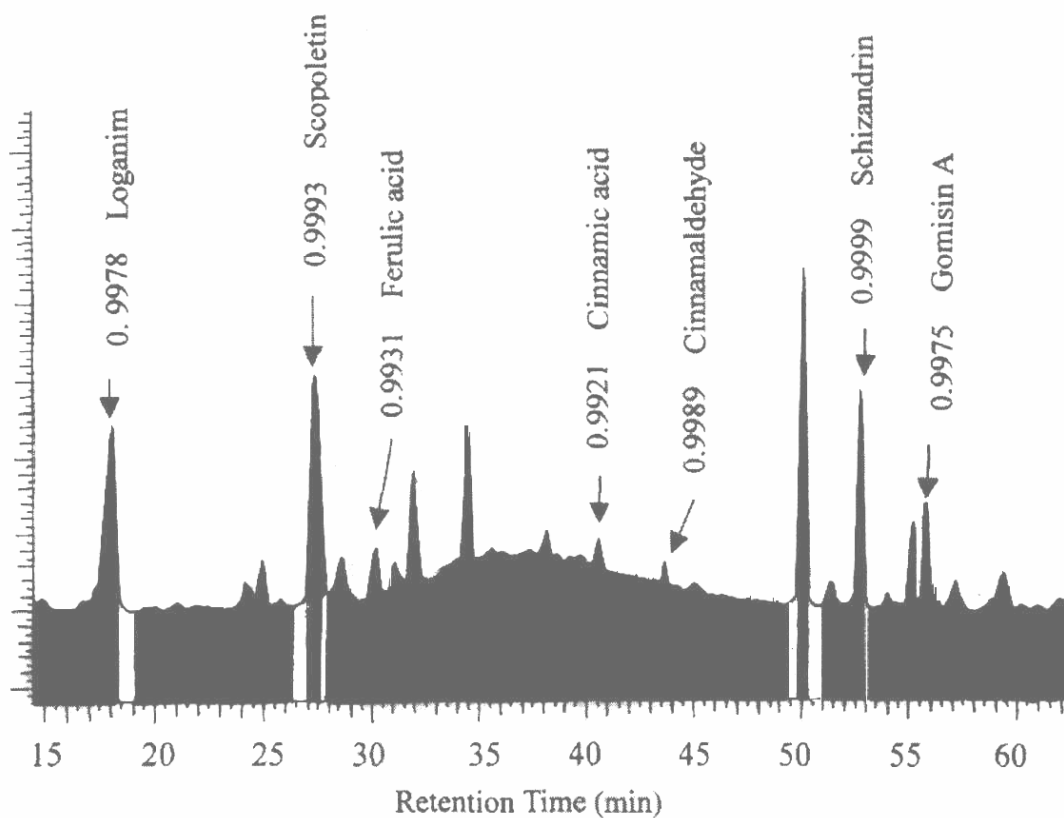


圖 2. 利用 HPLC-PDA 檢測金門龍鳳酒標準溶液之各指標成分之波峰純度

Figure 2. Peak purity of each marker substance in standard solutions by HPLC photodiode array detector of King-Mon-Long-Fong-Jyo

表 1. 移動相 A 及 B 之梯度程式

Table 1. Gradient elution program using mobile phase A and B

Time (min)	Flow rate (ml/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	100	0
10	1.0	95	5
15	1.0	90	10
25	1.0	80	20
50	1.0	0	100
60	1.0	0	100
70	1.0	100	0

A: 20% acetonitrile (adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid).

B: 70% acetonitrile (adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid).

表 2. 金門龍鳳酒之同日間及異日間之分析

Table 2. Intra-day and inter-day analysis of King-Mon-Long-Fong-Jyo

Compound	Concentration (μ g/mL)	CV(%)	
		intra-day (n=5)	inter-day (n=4)
Loganin	18.750	0.76	4.18
	75.000	0.74	2.38
	300.000	0.73	2.47
Scopoletin	3.125	3.03	4.30
	12.500	2.89	2.58
	50.000	1.69	1.73
Ferulic acid	1.250	4.90	4.56
	5.000	3.46	3.95
	20.000	2.72	3.42
Cinnamic acid	2.500	3.17	5.32
	10.000	1.37	3.05
	40.000	1.83	1.10
Cinnamaldehyde	4.500	3.28	4.73
	18.000	0.99	2.98
	72.000	1.69	3.15
Schizandrin	2.500	3.17	2.72
	50.000	0.79	2.37
	200.000	1.75	1.82
Gomisin A	5.000	4.67	3.74
	20.000	2.37	2.86
	80.000	0.45	1.68

表 3. 金門龍鳳酒之添加試驗

Table 3. Recovery test of King-Mon-Long-Fong-Jyo

Compound	Concentration (μ g/mL)	Recovery (%)
Loganin	18.750	106.18 \pm 4.65
	75.000	101.04 \pm 2.18
	300.000	103.74 \pm 4.42
Scopoletin	3.125	97.93 \pm 4.06
	12.500	102.35 \pm 2.27
	50.000	100.62 \pm 0.98
Ferulic acid	1.250	107.11 \pm 4.12
	5.000	103.04 \pm 4.57
	20.000	101.06 \pm 4.57
Cinnamic acid	2.500	103.11 \pm 4.09
	10.000	101.85 \pm 1.77
	40.000	100.12 \pm 0.68
Cinnamaldehyde	4.500	101.86 \pm 4.89
	18.000	99.90 \pm 3.36
	72.000	99.58 \pm 1.16
Schizandrin	2.500	111.69 \pm 4.60
	50.000	116.44 \pm 2.20
	200.000	113.67 \pm 3.97
Gomisin A	5.000	98.70 \pm 2.60
	20.000	102.18 \pm 1.29
	80.000	96.53 \pm 4.56

表 4. 金門龍鳳酒不同倍數量之米酒 (20°) 浸泡萃取之指標成分含量
Table 4. Content of marker substance in six different rice wine extraction volumes of King-Mon-Long-Fong-Jyo

Compound	2-fold	4-fold	8-fold	12-fold	16-fold	20-fold
Loganin	63.12±4.87	65.60±4.45	66.70±2.83	67.70±3.81	63.80±4.99	62.82±4.20
Scopoletin	6.60±5.90	6.98±3.77	7.80±4.46	7.72±3.50	7.80±4.19	7.28±6.20
Ferulic acid	3.60±1.97	3.48±2.96	4.20±5.35	3.56±5.07	3.52±3.21	3.36±2.54
Cinnamic acid	1.36±1.53	2.14±3.27	3.52±4.92	3.74±4.19	3.60±3.32	3.70±5.31
Cinnamaldehyde	1.38±6.25	2.38±6.10	4.96±7.10	5.06±4.99	4.68±7.67	5.04±2.88
Schizandrin	21.10±3.38	28.60±5.93	30.44±5.22	31.16±4.06	31.76±5.09	31.46±2.47
Gomisin A	6.50±5.58	6.94±4.99	7.44±2.15	7.80±4.47	8.04±3.91	8.00±5.27

※ Data represented as mean (mg/one dose) ± C.V. value (%).

One dose : *Schizandrae* Fructus 6.3 g, *Corni* Fructus 12.5 g, *Morindae* Radix 6.3 g, *Cistanchis* Herba 12.5 g, *Cinnamonomi* Cortex 2.5 g and *Angelicae* Radix 3.8 g.

表 5. 金門龍鳳酒不同溫度萃取條件之指標成分含量
Table 5. Content of marker substance in four different extract conditions of King-Mon-Long-Fong-Jyo

Compound	Room temp. (25 °C) 3weeks	45°C , 24hr	60°C , 12hr	Boiling (90°C) , 3hr
Loganin	59.32±3.07	57.82±1.54	62.28±4.52	73.02±2.54
Scopoletin	6.46±4.19	10.20±2.36	14.38±1.67	16.68±3.14
Ferulic acid	2.80±6.21	3.42±6.38	3.68±1.70	4.48±1.88
Cinnamic acid	2.22±5.79	2.46±6.41	2.42±2.86	4.58±2.91
Cinnamaldehyde	1.20±7.24	1.82±4.62	1.44±6.04	2.04±6.27
Schizandrin	27.64±6.44	28.44±4.84	27.34±3.98	22.12±1.07
Gomisin A	8.80±3.61	6.74±1.36	5.56±5.41	4.20±7.09

※ Data represented as mean (mg/one dose) ± C.V. value (%).

One dose : *Schizandrae* Fructus 6.3 g, *Corni* Fructus 12.5 g, *Morindae* Radix 6.3 g, *Cistanchis* Herba 12.5 g, *Cinnamonomi* Cortex 2.5 g and *Angelicae* Radix 3.8 g.