

編號：CCMP97-RD-101

輻射照射抑制火麻仁發芽之研究 (2-2)

周鳳英
國立清華大學

摘 要

本計畫係依照行政院衛生署中醫藥委員會96年度中藥品質管制暨中醫政策類委託研究計畫，研究重點1-4，火麻仁經炮製後之發芽研究提出。本研究目的為建立輻射照射抑制火麻仁出芽之方法。火麻仁為植物大麻(*Cannabis sativa* LINN.)之乾燥果實，是中醫用藥亦為鴿禽類之添加飼料。目前國內使用之火麻仁主要由中國大陸進口，屬於限制輸入貨品，對此中藥材之進口規定是經炮製後不具發芽力之火麻仁始得進口，唯目前進口之炮製後火麻仁之發芽率尚無確切完全抑制，造成進口時之困擾。

本計畫為期二年，目前執行第二年之研究。輻射照射於清華大學原科中心照射廠進行，因新鮮火麻仁經繁複手續申請仍無法進口，故以綠豆、芝麻及炮製之火麻仁評估抑制種子發芽所需之輻射劑量，並以不同溫度及劑量率下進行輻射照射處理，照射後之種子樣品並立即進行發芽率、種子中多酚氧化酶(polyphenol oxidase)之活性測試，照射後火麻仁進行成分分析，並探討經照射是否影響火麻仁之致突變性。照射後樣品並進行貯存實驗，於三個月後再次進行上述測試。結果顯示綠豆及芝麻經4 kGy照射後僅存不正常發芽，6 kGy照射已完全抑制發芽，市售火麻仁經照射後其外觀及脂肪酸成分、酸價、過氧化價等無明顯影響，輻射照射並無增高其突變性，顯示輻射照射是抑制種子發芽之適當方法。

關鍵詞：火麻仁、輻射照射、抑制發芽

Number: CCMP97-RD-101

Study of Germination Inhibition of Cannabis Semen by Gamma Irradiation(2-2)

F. I. Chou

National Tsing Hua University

ABSTRACT

This project is based on the major research focuses 1-4 “study of the germination activity of roasted Cannabis semen”, proposed by the Committee on Chinese Medicine and Pharmacy, Department of Health, Executive Yuan. The aim of this research is to set up the optimal irradiation condition for Cannabis semen(CS) germination inhibition by the use of gamma ray. CS, the dried seed of *Cannabis sativa* LINN., has been used as a traditional Chinese medicine to enhance human health, and also has been considered as a healthy supplemental dietary for pigeons. CS is subjected to the import restriction by the examination of its germination activity in Taiwan. Most of CS is imported from China, and it must be roasted for germination inhibition. However, some of the imported CS still have germination activity, thus the commodities are encountered by customhouse detention. Therefore, the control of germination activity of CS is urgently required.

This project lasts two years, at present studies for the second year project. Because the procedure for entering the freshly harvested and un-roasted CS was heavy and complicated, the samples have not imported. Therefore, the roasted CS, mung beans and sesame were used for accessed the germination activity before and after exposed to a serial doses of gamma radiation in the cobalt-60 hot cell at National Tsing Hua University. Gamma irradiation was performed under various temperature and dose rates, and the irradiated seeds were performed for germination efficiency and polyphenol oxidase activity tested. The irradiated roasted CS was performed for composition analysis. Ames test was used to determine the mutagenic potential of irradiated CS. Three months of post-irradiation storage was also performed. Results showed that mung beans, sesame cannot germinated normally

after 4 kGy of irradiation, and the germination was completely inhibited after 6 kGy of irradiation. None obviously radiation effects on chemical composition including of fatty acid distribution, acid values, peroxide values of CS was investigated. Moreover, none mutagenic potential was detected in irradiated CS. From our results, germination inhibition was certified by gamma irradiation.

Keywords: Cannabis semen, Gamma irradiation, Germination inhibition

壹、前言

本計畫係依照行政院衛生署中醫藥委員會96年度中藥品質管制暨中醫政策類委託研究計畫，研究重點1-4火麻仁經炮製後之發芽研究提出。

火麻仁為桑科(Moraceae)植物大麻(*Cannabis sativa* LINN.)之乾燥果實，中藥用火麻仁呈卵圓形，果皮薄易破碎，種皮褐綠色，內有乳白色種仁⁽⁶⁾。富油性、味淡、微辛⁽⁴⁾。中醫藥典中所記載的火麻仁，主要療效為潤燥、滑腸、通淋、活血，能夠治療腸燥便秘、痢疾、消渴以及月經失調等症狀^(3, 5)。目前國內使用之火麻仁主要由中國大陸進口，屬於限制輸入貨品，臺灣每年火麻仁之進口量約為2000噸，其中約20噸為中藥用，其餘多用為禽類飼料⁽¹⁰⁾。中藥用進口火麻仁之中文貨名為：中藥用大麻子、仁（火麻子、仁），不具發芽活性者⁽¹⁰⁾。中華民國海關進口之規定中藥材火麻仁是經烘焙、不具發芽活性、無法發芽種植者始得進口。但中藥商進口火麻仁之貨品曾遭關稅局檢出部分仍具發芽能力者，而被海關扣留、罰鍰，造成中藥進口之困擾。

生產火麻仁之大麻為“桑科植物大麻”，與“印度大麻”為同屬植物，印度大麻(*C. sativa* L. var. *indica* Lamark)的葉、莖、枝梢含有四氫大麻酚(Tetrahydrocannabinol；THC)、大麻酚(Cannabinol；CBN)、大麻二酚(Cannabidiol；CBD)等統稱為Cannabinoids的麻醉成分⁽¹⁵⁾。火麻仁雖未檢出含有印度大麻所含之CBD、CBN、THC等Cannabinoids成分，亦無大麻之鎮痛、抗扭曲藥理作用⁽⁸⁾，但植物中之成分確具有類似印度大麻之肌肉鬆弛、呼吸抑制等藥理作用。由於大麻中含之致幻物質易被不法分子用來提煉毒品，造成社會危害，因此，大麻的種植與利用受到社會的質疑與否定。

火麻仁之營養成分豐富，含有20～25%的蛋白質、20～30%的碳水化合物、10～15%的可溶性纖維，及豐富的礦物質，特別是磷、鉀、鎂、鈣、鐵和鋅等；含有18種氨基酸（其中7種為必需氨基酸）和12種必需脂肪酸。此外，大麻種子油中還含有花生四烯酸、棕櫚油、硬脂酸等對人體有益的營養成分^(13-14, 19)。除藥用外，火麻仁亦常用在畜、禽的飼養中作為飼料添加物，用於改善肉質和增進毛髮、羽毛的光澤。臺灣盛行之賽鴿活動，亦常使用火麻仁為賽鴿之穀類飼料。火麻仁富含之亞麻子油被認為對禽類生長上等品質的羽毛有特別的效能，亦是很好的維他命來源，尤其所含之不飽和脂肪酸對禽類的動脈健康及心臟強健很重要，上述健康條件為長程賽鴿必須具備的。目前火麻仁的炮製無法達有

效完整抑制發芽，因此造成中藥用藥無法進口，及禽類飼養添加物缺乏的問題。

輻射照射用於食品、農產品的保鮮、滅菌、抑制發芽之研究大約於1940年代開始，世界原子能總署於1950年參與此研究工作，至1988年已有33個國家准許食品照射，而至1990年則增為37個國家，所接受照射之食品種類相當廣泛，如馬鈴薯、穀類、大蒜、生薑、草莓、乾燥蔬菜、冷凍蝦、雞肉及香辛料等。目前輻射照射用於食品之保存已被多數國家承認是一種食品加工及保存方法，因特定劑量之加馬線照射對食品無殘毒，食品可在新鮮狀態或包裝後照射，以延長食品的保存期限，且不須加熱或添加防腐劑等^(25, 28-31)。由24個成員國組成的“國際輻照食品研究計畫機構”於1970年~1981年，進行了長達10年的輻照食品的衛生安全性研究，結果證實劑量在10 kGy以下輻照的食品是可以安全食用的。1997年FAO/IAEA/WHO輻照食品衛生安全聯合專家委員會更提出新的建議，不管輻照食品的照射劑量是低於或高於10 kGy，輻照食品是消化安全、營養適當的。此論點表明：輻照食品的照射劑量已無上限限制⁽³²⁻³⁴⁾。我國照射食品工作，於1979年由食品工業發展研究所首先針對大蒜、生薑、洋蔥及馬鈴薯等農產品進行研究，用於抑制其發芽生根，也促使衛生署於1985年核准14項農產品可接受照射，更於1991年研究香菇照射以達抑制蟲害，並期以刺激香味之產生。此外，並推廣照射大蒜⁽⁷⁾，要求照射食品要在包裝盒上標示記號，以提供消費者正確之訊息，與選擇使用照射食品的機會，更期望照射技術能為國內農業製造更多的加工方式，增進全民利益。

加馬線照射在抑制植物發芽之應用及其所需照射劑量對植物種子發芽之抑制機制已有許多文獻報告⁽²⁷⁾，主要作用為破壞種子中的染色體，使植物的生長代謝無法進行而達到抑制發芽之目的。例如：板栗收穫後有一段休眠期，在休眠期內栗果沒有發芽的危險。休眠期過後若遇到適宜的環境條件，栗果幼芽便開始生長發芽，因而降低栗果的商品價值和食用品質。⁶⁰Co加馬線照射對栗果的抑芽具有顯著效果，經250 Gy以上劑量照射的栗果全部不能發芽，200 Gy以下劑量照射的板栗雖然還具有一定的發芽能力，但發芽率明顯地低於對照組⁽¹¹⁾。扁豆亦可以輻射照射達到抑制發芽之效果，研究中經0.2 kGy照射處理後發芽率低於50%，經1.0 kGy照射後完全不能發芽⁽²⁰⁾。對於去外種皮的銀杏種子以不同劑量⁶⁰Co加馬射線處理後，結果顯示50 Gy以上劑量處理的種子已不能發芽⁽¹²⁾。60 Gy照射對大蒜有明顯抑制發芽的效果，成分分析結果顯示短時間儲存不影響其脂肪酸組成，但經儲存五個月後的脂肪酸則有些改變

(26)。生薑輻射照射抑制發芽的最適照射劑量為0.08~0.4 kGy，最高耐受劑量為0.4 kGy。結合聚乙烯蔬菜專用保鮮膜之包裝技術，生薑以適當劑量照射後能常溫下中長期貯藏，貯藏120天保鮮率可達到90%以上。在0.08~0.25 kGy的照射劑量範圍內，不會引起生薑之維生素C和鈣質含量的損失⁽¹⁾。

輻射照射可用於抑制小麥、豆類等種子之發芽，已有許多文獻報導⁽²⁷⁾。本研究室亦曾探討加馬輻射照射抑制綠豆發芽之效應，以加馬線照射應是克服進口火麻仁因烘焙不完全所致發芽問題的最佳方法。利用鈷-60之加馬射線照射農產品，可達到抑制發芽、防制蟲害之目的，此類應用於農產品之劑量低於滅菌之劑量限值10 kGy，是安全可靠之技術。但各種細胞對輻射之敏感度皆不相同，即使皆為豆類，其抑制發芽所需劑量仍有所差異，但其出芽率皆隨著照射劑量的增加而降低。本計畫原擬以輻射照射處理火麻仁，評估其發芽活性，同時分析照射後火麻仁之成分變化、酸價及過氧化價，研訂最適照射條件，使進口之火麻仁均能完全達有效抑制發芽，以合乎法規的要求，解決中藥火麻仁之進口問題。火麻仁為大麻植物(*Cannabis sativa* Linnaeus)的種子，在植物分類上原為桑科Moraceae植物，現已獨立成為大麻科Cannabaceae。大麻科中只有大麻*Cannabis*和葎草*Humulus*兩個屬。大麻屬只有大麻(*C. sativa* L.)一個種及其亞種印度大麻(*C. sativa* L. subsp. *indica*)，而此兩種種子皆為管制進口藥品。唯新鮮火麻仁無法進口，亦無法以與火麻仁同屬類源植物（同屬不同種）之種子取代試驗，故改以綠豆、芝麻及炮製火麻仁測試輻射對其發芽率之抑制效果，以市售火麻仁評估照射對其成分之影響。

貳、材料與方法

本研究為探討以輻射照射抑制火麻仁發芽之最適照射劑量與照射條件，照射劑量需達完全抑制火麻仁發芽之效果，且對市售火麻仁之成分、外觀需不造成明顯影響，以解決炮製後火麻仁之發芽抑制不完全而造成無法進口的問題，並建立輻射照射抑制火麻仁發芽之技術平台。

一、採購不同產地來源之市售經炮製火麻仁

與中藥商接洽分別由台中、台南及高雄等地採購四個不同產地來源經炮製之市售火麻仁樣品，進行發芽率、含水率等實驗，下列所有實驗均以每批樣品進行三重複測試。

二、含水率測定

植物種子中之含水量與其發芽率及儲存壽命具有密切的相關性，且含水量的多寡將會影響經輻射照射之發芽抑制率，故進行發芽試驗及輻射照射處理前之火麻仁先測定其樣品含水率。含水量的測定一般採用烘乾法，每一來源及不同處理之樣品均作5重複，每重複逢機取稱約100克之種子。

- (一) 將秤量瓶之瓶、蓋分開於100°C之烘箱中烘乾1小時後，蓋上蓋子取出置於含有足量乾燥劑的乾燥皿內，使其冷卻。待冷卻後秤量連蓋秤量瓶之重量。
- (二) 將待測種子加入秤量瓶後迅速蓋上蓋子，秤量並紀錄總重（鮮重）。
- (三) 將秤量瓶放入103 °C之烘箱中，打開蓋子，烘乾種子及秤量瓶。
- (四) 含油量高者適用低溫法於103 °C烘乾17小時；含油量低者適用高溫法於131 °C烘乾1至2小時。火麻仁樣品屬含油量較高之種子，故使用低溫法進行烘乾。
- (五) 達烘乾時間後蓋上蓋子，迅速將之移入乾燥皿中使其冷卻。待冷卻後秤量並紀錄總重（乾重）。
- (六) 將鮮重扣除乾重所得之值為烘乾之水分含量，即可計算出各種子之含水率(moisture)。

三、火麻仁發芽率試驗

(一) 火麻仁之催芽及發芽測試

各批次不同產地來源之市售火麻仁樣品逢機取30克（約1000粒）種子進行發芽率試驗。觀察並紀錄各批次樣品之發芽率、出芽

長度及植株生長狀況。為降低種子萌發期間遭受微生物感染之機率，種子先以30 %之雙氧水浸泡15分鐘，再以無菌水沖洗種子數次後，分別浸泡48小時後（20 °C、避光催芽），將催芽後之種子移至發芽床置入植物生長箱中，於控光（12小時光照）、控溫（20 °C）培養培養7~14天。每日添加適量無菌水以保持發芽床濕潤，所採用之發芽床為以10 kGy輻射照射滅菌後之濾紙，具有一定強度、質地好、吸水性強、保水性佳、pH值介於6.0~7.5之間，且不含可溶性色素或其他化學物質。每日觀察並計數發芽數，並拍照紀錄。

(二) 非生理反應之出芽測試：因市售炮製過火麻仁催芽後約有0.3%之不正常出芽，為確定其不正常出芽之性質進行以下測試。

1. 低溫下之出芽測試：秤取30克（約1000粒）之市售火麻仁浸泡於4 °C的無菌水中，以冰浴的方式置入4 °C冰箱中使其保持低溫，於黑暗中浸泡24、48、72小時。低溫下種子中之酵素活性被抑制，觀察及火麻仁之出芽長度是否會隨時間增長，或為是否有非生理性，只因細胞膨脹所致”假性”出芽之現象，拍照紀錄之。
2. 種子烘乾後之出芽測試：秤取30克（約1000粒）之火麻仁，置入100°C烘箱中烘乾1、2 hr以破壞其種子中之酵素後，分別以無菌水於20°C黑暗中浸泡24、48、72小時催芽，觀察火麻仁是否有出芽之現象並拍照紀錄。
3. 以綠豆及芝麻種子進行出芽率測試：因綠豆及芝麻亦為植物之乾燥種子，以之進行照射劑量與發芽率之相關測試可與火麻仁樣品之輻射照射抑制發芽率作一比較。秤取15克（約200粒）乾燥綠豆種子，以無菌水浸泡6小時，於20°C的環境下避光催芽，將催芽後之種子移至發芽床置入植物生長箱中，於控光（12小時光照）、控溫（20°C）培養培養7~14天。每日添加適量無菌水以保持發芽床之濕潤，每日觀察計數發芽數、出芽長度及植株生長狀況，並拍照紀錄。芝麻則成取1克（約700粒）以無菌水浸泡3小時，於25 °C的環境下避光催芽，將催芽後之種子移至發芽床置入植物生長箱中，於上述相同培養條件下培養7~14天。

四、發芽酵素活性測試⁽¹⁶⁾

經由文獻指出⁽²⁾多酚氧化酶(polyphenol oxidase)活性與小麥穗發芽率具有正相關性，因此本研究以多酚氧化酶(polyphenol oxidase)活性為指標，分析市售乾燥火麻仁經炮製後是否仍具有發芽活性。

- (一) 取50克火麻仁樣品，以磨碎機先將樣品研磨成粉末狀，秤取5克火麻仁粉末，加入30 mL的phosphate buffer(pH 7.0、0.1 M)內含0.25% Triton100，以均質機攪打90秒後，再以20000 xg離心20分鐘，所得上清液即為蛋白質粗萃取液。
- (二) 取0.1mL蛋白質粗萃液、0.2 mL苯鄰二酚(Catechol)溶液(0.5M)與1.9 mL phosphate buffer(pH 7.0、0.1 M)經震盪混和後放入石英管中，置於波長測定為420 nm的分光光度計中，測定一分鐘內其吸光值的變化。另準備一管不含酵素之反應液作為空白組試驗。

五、輻射源及輻射劑量率測定

樣品照射於清華大學原子科學技術發展中心之照射熱室中進行。使用之射源為鈷六十，由不鏽鋼密封包覆，射源釋出之加馬線能量為1.17及1.33 MeV，照射熱室之環境背景值 $<0.2 \mu\text{Sv/h}$ 。輻射劑量測定以硫酸亞鐵水溶液劑量計(Frick's dosimeter)進行。其成分包括0.001M FeSO_4 ，0.001M NaCl 及含飽和空氣之0.8 N硫酸水溶液。因輻射能之作用使亞鐵離子(Fe^{2+})氧化成鐵離子(Fe^{3+})，以304 nm光譜通過劑量計溶液分析鐵離子的濃度測量之。此系統測量之劑量範圍較大，誤差較小(1~2%)。且若以0.01 M之 CuSO_4 加入硫酸亞鐵溶液中，因銅離子的還原作用減少溶氧之消耗，可使測量劑量範圍增至 10^5 Gy 。

六、加馬線照射抑制發芽探討

依照我們先前對加馬抑制綠豆發芽及文獻所載用於抑制植物種子發芽所需輻射劑量(0.5~10 kGy)照射，探討加馬對種子樣品之抑制發芽效果。受測樣品包括不同批次之市售火麻仁與對照比較之芝麻及綠豆樣品，將受測樣品分裝於包裝袋中，分別攜入鈷六十照射熱室，置於距離射源特定距離之照射架上，照射架以每分鐘10轉旋轉，使照射品能得到均勻的輻射照射劑量，照射於不同時間點取樣，以得到所需之照射劑量。使用照射溫度為10 °C及20 °C，照射劑量率為0.5、1、2.3 kGy/hr分別進行火麻仁之輻射照射，測試上述不同溫度及劑量率下之照射條件，對抑制受測種子發芽活性之影響，於進行照射後立刻催芽種植及經三個月儲存後催芽測試發芽率。

七、火麻仁經加馬照射前、後之外觀顏色測定

對於照射前、後之市售火麻仁樣品，以色差計(color meter: model TC-8600A, Tokyo Denshoku Co.)測定樣品之Hunter L (亮度)、a (+紅

色度、-綠色度)、b(+黃色度、-藍色度)值,探討照射是否影響其外觀色澤。將顆粒完整無破碎之火麻仁裝入直徑3 cm之圓形石英槽中,佈滿底面後測量整個底面之顏色。每一樣品進行5重複之測量。

八、火麻仁經加馬照射前、後之脂肪酸含量分析

對於脂肪含量高的樣品,輻射照射處理需特別注意樣品中脂肪酸劣化及油脂過氧化的影響。火麻仁的脂肪含量高達30%,照射對其脂肪酸的成分影響有探討的必要。故取適量市售火麻仁經秤重包裝後,以可完全抑制種子發芽之最適照射條件進行輻射照射,隨後進行其脂肪酸組成分析,並以未經照射者為對照組,瞭解火麻仁經輻射照射後是否影響其成分。

其實驗步驟為:樣品依AOAC之方法萃油⁽¹⁸⁾,取適量粗油以BF₃/CH₃OH甲酯化後以GC分析脂肪酸組成。稱取適量火麻仁樣品加混合溶劑(CHCl₃:CH₃OH = 2:1)萃取,於60 °C加熱回流1h,過濾後加入60 ml BF₃/乙醚溶液於60 °C冷卻20 min後,加入5 ml飽和NaCl液及1 ml正乙烷振盪,靜置取上清液進行氣相色譜分析。氣相色譜分析條件如下:使用管柱:Supelco wax10, 30 m× 0.25 mm× 0.25 μm,柱溫為150 °C保持2 min,以5 °C/min升溫至195 °C後,保持30 min。氫火焰離子化檢測器(HFID)之環境溫度為25 °C,N₂流速為35 ml/min,注射樣品量為0.5 μl。

九、火麻仁照射前、後之酸價分析

參考CNS 3647 N6082 食用油脂檢驗法(酸價之測定)進行之,酸價之定義為中和每一克油脂中游離脂肪酸所需之氫氧化鉀毫克數,酸價愈高表示樣品的酸敗程度愈高。將市售火麻仁樣品(5-10克)打碎均質後稱取適量於250 ml錐形瓶中,加100 ml之正己烷,以超音波振盪器振盪2小時,使之萃取完全。以濾紙過濾後,將澄清液倒入濃縮瓶中濃縮,至濃縮瓶中剩下少許液體,再加50 ml之正己烷清洗錐形瓶之殘留物。再以濾紙過濾,將澄清液倒入濃縮瓶中,真空濃縮機濃縮至乾。準確吸取0.1N硫酸溶液25 ml加入50 ml之去離子水及2滴酚酞指示劑,以0.1N氫氧化鉀酒精溶液滴定至呈淡紅色(維持30秒不變)為其終點,計算其當量濃度係數。 $F=V/25$ (V為0.1N氫氧化鉀標準酒精溶液之滴定量)

十、火麻仁照射前、後之過氧化價分析

過氧化價依A.O.A.C.法分析之⁽¹⁸⁾。將市售火麻仁樣品打碎均質後稱取適量於250 ml錐形瓶中,加100 ml之正己烷,以超音波振盪器振盪

2小時，使萃取完全。以濾紙過濾後，將澄清液倒入濃縮瓶中，經濃縮至瓶中剩下少許濃縮液後，再加50 ml之正己烷，以清洗錐形瓶中之殘留物，再以濾紙過濾一次，將所得澄清液倒入濃縮瓶中，以真空濃縮機濃縮至乾。再加30 ml冰醋酸-氯仿(3/2, V/V)混合液，振盪使之完全溶解後。加0.5 ml之飽和碘化鉀溶液，搖動1分鐘。加30 ml去氧蒸餾水搖動30秒，加澱粉指示劑（此時呈藍黑色）。以0.01N硫代硫酸鈉標準溶液滴定，至藍黑色消失，另作一空白試驗，計算樣品之0.01N硫代硫酸鈉溶液消耗量。

十一、致突變率測試(Ames test)⁽²⁴⁾

致突變的測試多利用測試微生物之DNA突變情形，以瞭解樣品對微生物基因的傷害及其影響程度。其中以Ames test是最常用來偵測致突變物的方法之一，具有簡單、快速、經濟等優點。此檢測方法所使用之*Salmonella typhimurium* (TA菌株) 菌株無法自行合成組胺酸且具有多突變性，本實驗選用TA100之測試菌株，TA100於hisG46位置產生突變，hisG gene 含有histidine生合成時之第一個酵素的基因訊息，其將-GGG-(proline)取代為-GAG-(leucine)，所以TA100可用來檢測造成base-pair取代作用的突變劑。實驗所使用之培養基中缺乏histidine缺陷株成長所需之histidine，因此只有少數自發性回復突變之菌落會產生。若測試樣品具有致突變性時，菌落數會高於自發性回復突變菌落數，菌落並隨樣品的濃度提高而增加。實驗中添加S9 Mix（大白鼠肝臟活化酵素），主要為模擬活體的代謝情況，使得在早期未被偵測的致癌前趨物或原致癌物(Procarcinogens)，經由肝臟微粒體酵素及輔助因子的作用後，轉變為具致突變性之代謝產物得以在生物體外直接被偵測出來。

其實驗步驟為：

- (一) 於2 mL soft agar內加入0.1 mL隔夜活化之TA菌株，與0.1 mL受測樣品及0.2 mL 0.5 mM Histidine/biotin溶液混合。
- (二) 實驗分兩組進行，一組加入0.5 mL S-9 Mix，另一組不加作為對照組，混合均勻後傾倒於預先製備之minimal agar上。S-9 Mix在4°C下可維持4~5小時之活性，故需於實驗當天新鮮配製，未使用完之S-9 Mix隨即丟棄不可重複使用。
- (三) 待soft agar凝固，於37°C倒置培養48小時後計數菌數。

參、結果

一、受測種子樣品含水率測定

植物種子發芽過程水分之吸收主要分為三階段，包含吸水期、延滯期及胚根萌發期。各階段間轉折之門檻點對種子發芽過程及其發芽率均極重要。種子中之含水量將影響輻射照射後種子之發芽率及輻射照射之抑制發芽效果。故輻射照射處理前之火麻仁及綠豆先測定其樣品含水率，每一來源（台中、台南、高雄）之樣品均為5重複，計算種子之含水率(moisture)。實驗結果測得市售火麻仁樣品平均之含水率為 $8.39 \pm 0.17\%$ 。其中由台中採購之火麻仁樣品含水量最高(9.3 %)，台南次之(8.8 %)，其次為高雄之樣品(7.1 %)，而乾燥綠豆樣品平均之含水率為 $13.35 \pm 0.47\%$ 。

二、市售火麻仁發芽率試驗

參考台大種子研究室發芽試驗結果調查，鑑別種子發芽需注意以下狀況：

- (一) 種子生理試驗常將可目視之胚根或胚莖突出的包覆組織當作已發芽種子，計算時可能會產生誤差。
- (二) 少數死種子會因胚根吸水產生物理性膨脹而突出表面，若將之計算為發芽種子則會產生誤差。
- (三) 試驗者可自行定義一胚根（莖）長度的標準，不足者即不計算為發芽者。

本計畫中為判斷火麻仁種子之發芽情形是否因種子胚仍具有酵素活性而造成正常發芽現象，或是因為種子吸水膨脹所造成之物理現象，將發芽試驗分為三部分進行：

1. 出芽測試

國際種子檢查協會(International Seed Testing Association，簡稱ISTA)

對種子發芽率的檢查規則中並未規定種子在發芽檢驗前需先消毒，但由於種子表面經常附有各種細菌、黴菌等微生物，因此有些研究者於進行發芽試驗前會以殺菌劑、雙氧水或次氯酸鈉溶液來處理種子。本研究中取上述4個不同批次外觀完整之市售火麻仁各約1000顆進行發芽率探討，將樣品先以30%雙氧水浸泡15分鐘以降低種子萌發期間遭受為生物性感染的機率，再以無菌水浸泡48小時催芽後(黑暗中、20°C)，鋪於濕潤之培養床上，移入生

長箱中，每日添加適當無菌水於20 °C下培養，於第1、3、5日時計數種子之發芽數量並拍照紀錄。於黑暗中泡水催芽48小時後可見所有樣品中僅有少數火麻仁似有出芽的情形（圖一），此不正常出芽率約0.4~1%，於發芽床上繼續培養3天後，其胚根長度約為3~4 mm，量測所有出芽樣品之種子長度及其所露出胚根之長度，計算其平均值結果(如表一)所示。但培養至2週均未見其繼續增長，且所有出芽之胚根長度均短於種子長度，可定義為不正常出芽，而此市售火麻仁種子之正常發芽率為0%。

2. 非生理性之出芽判定

- (1) 低溫抑制酵素活性下催芽：秤取30 （約1000 ）之火麻仁，將火麻仁於黑暗中浸泡於4 °C及10 °C的冰水中24~48小時，觀察其是否仍有出芽現象。結果(如圖二)所示，浸泡於冰水中48小時後可見整批樣品中僅有少數火麻仁種子有出芽的現象，將火麻仁種子移至發芽床上繼續培養3~7天，出芽數目並未增加，且已出芽之火麻仁種子其胚根無繼續延長生長之現象。將種子浸泡於冰水中可抑制種子酵素活性而使種子無法正常發芽，因此推測此出芽現象為種子因吸水膨脹而露出胚根之物理現象而非生理性發芽。
- (2) 高溫破壞酵素活性：秤取30 （約1000 ）之火麻仁樣品，放入100°C之烘箱中烘乾1~2小時後，以無菌水於20 °C黑暗中浸泡24~48小時，觀察是否仍有出芽現象。結果(如圖三)所示，浸泡48小時後可見整批樣品中僅有少數火麻仁種子有出芽的現象（出芽率<1%）。將浸泡後之種子移至發芽床上培養3~7天，其出芽種子數目並未增加，且已出芽之種子其胚根無繼續延長生長現象。以高溫將種子烘乾可同時破壞種子之酵素活性使之無法正常發芽，因此推測此出芽現象為少數種子於炮製前已有微露之胚根，經烘乾後水分減少胚根縮入種殼內，因吸水膨脹而又露出胚根，此為物理現象而非生理性發芽。

持續觀察不正常出芽之上述火麻仁至第7天，可見所有火麻仁之出芽並無繼續生長、增長、或分化成根、莖的狀態，判斷此出芽均為不正常發芽或稱為死芽。此外，火麻仁種子經過冰浴抑制酵素活性及烘乾使酵素失去活性後，於黑暗中浸泡無菌水避光催芽，仍皆有出芽的現象。綜合以上之結果，推測此出芽現象為種子因吸水膨脹所造成之物理現象

而非活種子之發芽現象，而實驗中所取市售火麻仁之種子正常發芽率為0%。

此試驗以芝麻種子進行高溫破獲酵素活性之相同測試，取未經處理之芝麻浸泡（圖四A），催芽12小時當看見部分樣品有些微出芽現象時，將此樣品放入65°C烘箱乾燥6小時後，少部分芝麻仍可見其出芽點（圖四B），再將此樣品以無菌水濕潤培養24小時，可見芝麻原已些微出芽之部分，雖經烘乾但泡水後仍膨脹變長（圖四C），且均無法繼續生長。此實驗印證火麻仁樣品於炮製前可能已有部分發芽，顯示芝麻有與火麻仁相同的非生理出芽現象。

三、輻射照射對種子發芽率的影響

（一）火麻仁出芽測試：

1. 照射後未經貯存立即種植：取上述各批次市售乾燥火麻仁分為未經照射及經2、4、6、8、10 kGy不同劑量照射處理（1000 / 組），照射後之火麻仁立即以上述方式浸泡催芽、移至發芽床中置入植物生長箱培養，每日計數並觀察種子之發芽數量。結果不同來源樣品之出芽皆無法繼續生長分化成正常植株，屬因吸水膨脹而露出胚根之“不正常發芽”。計數各處理之發芽數量，其三重複之平均出芽率結果（如表二）所示，各處理出芽率有明顯差異，其出芽率範圍為0.1~1.15%，其中以批次D由高雄採樣之火麻仁樣品的出芽率最高，整體結果可見不同批次之市售乾燥火麻仁經輻射照射後之不正常出芽率與照射劑量間並無明顯相關性，顯示市售炮製火麻仁於照射前已無法正常發芽，所有種子之正常發芽率為0%。
2. 照射後貯存三個月後種植：取各批次市售乾燥火麻仁經2、4、6、8、10 kGy不同劑量照射處理後，於室溫下貯存三個月後進行上述發芽試驗。計數各處理之發芽數量，其三重複之平均出芽率結果（如表三）所示，結果可見各不同來源樣品之出芽率仍有明顯差異，樣品之出芽率範圍為0.11~0.95%，但皆屬不正常出芽，已出芽之種子皆無法繼續生長分化成正常植株。

（二）輻射照射對芝麻種子發芽率之影響：

取市售黑芝麻樣品分為未經照射(0 kGy)及經1、2、3、4、6 kGy不同劑量照射處理，照射後以無菌水浸泡3小時避光催芽、移至發芽床中置入植物生長箱培養（25°C、12小時光照），每日計

數並觀察種子之發芽數量。培養至第三天可見芝麻樣品之發芽數與照射劑量具有明顯之相關性，結果（如圖五）所示，0 kGy處理之芝麻培養至第三天可見明顯之根系、根毛生長均勻濃密，已具有展開之子葉。1 kGy處理者其根系已稍受影響，經2 kGy處理者其根系明顯較短，隨著照射劑量的增加種子的發芽數量隨之減少，其中4及6 kGy處理者雖有部分種子出芽，但出芽長度只有1~3 mm，與未照射者有顯著差異。計算此第三天之出芽率，樣品0 kGy及經1、2、3、4、6 kGy照射後之出芽率分別為90.2、88.2、82.7、80.6、77.4及51.3%。（如圖六）所示持續觀察至第6天之芝麻生長狀況，未經照射者植株最高，可見子葉生長；1 kGy處理者之植株高度明顯低於未經照射者，且其子葉的大小亦小於未經照射者。經2、3 kGy照射後之芝麻幾乎不見正常之莖部及子葉生長，且隨劑量增加，植株萎縮變色的數量隨之提高。顯示3、4、6 kGy高劑量處理之植株雖仍有出芽現象，但其無法正常分化，生長應屬不正常出芽。

（三）輻射照射對乾燥綠豆種子發芽率之影響：由96年成果得知乾燥綠豆經6及8 kGy照射後可達完全抑制發

芽。故取市售乾燥綠豆種子分為未經照射(0 kGy)及經1、2、3、4 kGy不同劑量照射處理（200 /組，三重複），照射後以無菌水浸泡6小時避光催芽、移至發芽床中置入植物生長箱培養（25°C、12小時光照），每日計數並觀察種子之發芽數量。培養至第三天，綠豆種子之發芽數與照射劑量即可觀察到具有明顯之相關性，隨著照射劑量的增加，種子的發芽率及生長速度隨之降低。樣品未經照射及經1、2、3、4 kGy照射後之出芽率分別為99.2、95.6、92.7、86.6及73.4%。觀察種子根部之發育情形，可見未經照射者根毛濃密其初生根皆有向地性，但隨著照射劑量增加，綠豆之根毛的發育越趨不健全。照射劑量越高者幾乎不見根毛生長，且根部較為瘦小、褐化。培養至第五天，高劑量照射之種子根部幾乎已停止生長，並出現褐化乾枯的現象（圖七）。綠豆莖部之發育亦有隨照射劑量的增加而生長越趨於緩慢之現象。培養至第六天，未經照射及1 kGy照射者其莖部之生長速度大於根部，未經照射者其莖部長度已可達20~50 mm，以高劑量照射者莖部長度僅有1~1.5 cm無法正常生長。培養至第14天，照射劑量為1 kGy者，大多數種子可發芽但生長速度較未經照射者慢，部分仍可分化為植株，但已有少數種子有褐化及死亡的現象；照射劑量為2 kGy時，種子的生長發育速度明顯變

慢，死種子及褐化種子的數目也相對增加，部分種子可見第一對子葉半露，但生長速度緩慢或有停止生長的現象。當照射劑量達3 kGy以上，大部分種子已停止生長（根、莖部長度約達15 mm），種子褐變死亡的現象也越明顯（圖八A）。（圖八B）為上述各處理樣品於培養第6、8、10、12、14天所測量之植株莖部長度平均值，結果顯示未經照射者隨培養天數增加莖部明顯增長，至第14天時測得平均長度為 147.6 ± 7.2 mm；1 kGy處理者及植株亦隨培養天數增加莖部有增長，但長度均低於未經照射者。而經2、3、4 kGy照射處理者其莖部長度於6天至14天均維持於20~26 mm，顯示高劑量照射可明顯抑制綠豆植株出芽及生長。

四、劑量率對種子發芽率的影響

秤取30（約1000）市售火麻仁樣品以夾鏈袋分裝好後，以不同照射劑量率(0.5、1、2.3 kGy/hr)分別照射0、2、4 kGy。照射後之火麻仁立即以無菌水浸泡6小時後避光催芽、移至發芽床中置入植物生長箱培養（25°C、12小時光照），每日計數並觀察種子之發芽數量並比較相同照射劑量不同劑量率間之出芽率的差異。結果顯示不同劑量率條件照射0、2、4 kGy之火麻仁種子經催芽48小時後皆可見樣品中有部分種子之出芽現象（圖九），但出芽數目（出芽率均 $<0.5\%$ ）與劑量率並無明顯的相關性，將出芽之種子繼續培養7天，露出之胚根並無繼續生長分化成正常植株之現象，顯示此火麻仁樣品均為無發芽活性之樣品，其種子正常發芽率為0%。

本研究亦以綠豆探討輻射照射劑量率與發芽率之相關性。取乾燥綠豆以上述相同照射劑量(0、2、4 kGy)、不同照射劑量率(a) 0.5、(b) 1、(c) 2.3 kGy/hr之條件進行照射，照射完成後依上述實驗方法浸泡催芽，於控溫(25°C)、控光（12小時光照）條件下培養7~14天，每日計數種子發芽數並比較不同劑量率間之差異。結果顯示，劑量率 1 kGy/hr之發芽率較0.5、2.3 kGy/hr之發芽率好。觀察培養第5天之綠豆根部發育情形，可見(b)組相對於(a)、(c)組而言，其根毛較為濃密且根尖部分白晳肥胖，其餘兩組之根尖部分則有褐化的現象且較細瘦（圖十）。觀察培養第八天之各處理樣品之生長（如圖十一），可見綠豆莖部的發育狀況亦以劑量率1 kGy/hr之樣品生長速度最快，在相同照射劑量的條件下比較三者莖部直立之高度及莖部總長度皆以(b)組之樣品為最佳，且1 kGy/hr處理者其子葉全露及半露的種子數量均略高於0.5及2.3 kGy/hr處理者。在培養達14天時，(b)組子葉半露之種子數目多於其餘兩組，褐變死亡

之種子數目也較其餘兩組少。當照射劑量達2 kGy時，發芽率最高者為(b)組94%，其次為(c)組90.5%，發芽率最低者為(a)組89%；當照射劑量達4 kGy時，發芽率差異越趨明顯，最高者為(b)組達82.5%，其次(c)組為73%，發芽狀況最差者為(a)組67%。整體而言，在劑量率1 kGy/hr條件下進行照射之綠豆樣品其發芽率、生長速率及植株生長情形皆優於其餘兩者（劑量率0.5 kGy/hr、2.3 kGy/hr），而劑量率2.3 kGy/hr之樣品植株之發育狀況較劑量率0.5 kGy/hr之樣品為差。且綠豆經2、4 kGy照射後所萌發之植株皆無法正常生長。

五、照射溫度對種子發芽率的影響

秤取30（約1000）市售火麻仁樣品以夾鏈袋分裝好後，以不同照射溫度(10 °C、20 °C) 相同照射總照射劑量(0、2、4 kGy)之條件進行照射。照射後之火麻仁立即以上述方式浸泡催芽、移至發芽床中置入植物生長箱培養，每日計數並觀察種子之發芽數量並比較相同照射劑量、不同照射溫度之間出芽率的差異。結果顯示，不同照射溫度條件照射後之火麻仁種子經過泡水避光催芽48小時後，有部分種子有出芽之現象（圖十二），但出芽數目與照射溫度之間並無明顯的相關性（出芽率均<0.5%），將出芽之種子繼續培養7天，露出之胚根並無繼續生長分化成正常植株之現象，顯示此火麻仁樣品均無發芽活性，其種子正常發芽率為0%。

照射溫度對綠豆種子發芽率之影響：取乾燥綠豆樣品以相同劑量率、劑量，但不同溫度(10°C、20°C) 下照射。照射完成後以無菌水浸泡6小時避光催芽、移至發芽床中置入植物生長箱培養（25°C、12小時光照）條件下培養7~14天，每日計數並觀察種子之發芽數量，並比較不同照射溫度間之差異。結果（如圖十三）所示，輻射照射皆抑制種子之發芽，但於低溫(10°C)下進行照射之種子其發芽率及植株發育狀況皆較於20°C條件下照射之種子略佳。上述樣品培養至第八天時，分別計數其各種生長情況，結果（如圖十四）所示，可見經照射後之樣品生長情形與未經照射者有明顯差異，比較於10及20°C下經相同劑量照射之樣品，其子葉全露及半露的數量，無論照射1、2、4 kGy其10°C處理者之植株生長均略佳於20°C處理者。

六、火麻仁種子之發芽活性測試

以多酚氧化酶(polyphenol oxidase)活性為指標，多酚氧化酵素普遍存在於蘋果、馬鈴薯、香蕉及絲瓜等蔬果類中，當蔬果組織受到傷害後

暴露於空氣中，酚類化合物會轉變為褐色的黑色素而造成組織褐變。因此實驗中亦測試香蕉之多酚氧化酵素活性作為對照組。實驗結果（如圖十五）所示，市售炮製火麻仁、乾燥綠豆種子及荔枝果皮中無法測得多酚氧化酶之活性，而作為對照組之香蕉果皮則可測得酵素活性。荔枝果皮無法測得多酚氧化酵素活性之結果與文獻相符合。根據文獻所載荔枝果皮中的活性於採收後24小時內會快速下降，因此無法偵測(17)。

有關多酚氧化酵素與種子發芽活性相關性之探討的文獻甚少，於2006年麥類作物學報⁽²⁾指出多酚氧化酶活性與小麥穗發芽率成正相關，但酶含量與酶活性之間並無顯著相關性，因此根據本實驗結果，推測市售火麻仁種子經炮製後已失去酵素活性或種子內並無多酚氧化酶存在。因此，參考台大種子研究室發芽試驗測試種子發芽活性之方法，以TEZ檢查法（氯化三苯基四唑 triphenyl tetrazolium chloride，或簡稱TTC、TZ法）進行種子活性分析，並以乾燥綠豆種子作為對照組。經輻射照射後之綠豆種子其發芽率隨照射劑量增高而越低，而以TTC檢查法對照射後之綠豆種子進行染色，隨照射劑量增高，種子染色之紅色越淡，且染色不均勻之現象越明顯，表示經照射後之種子失去其發芽活性（圖十六）。將市售經炮製火麻仁種子以TTC檢查法進行染色，結果樣品僅於胚部有部分呈現不均勻之紅色（圖十六），顯示此為不具發芽活性之種子，比對前述實際發芽率測試之結果，確認此火麻仁種子均無發芽活性。市售經炮製火麻仁種子之正常發芽率為0%。

七、火麻仁經加馬照射前、後之外觀顏色測定

各批次火麻仁於照射前事先測定外觀顏色，因產地來源不同及炮製過程處理方法之差異導致各批次火麻仁未經照射前樣品間顏色即有差異（表四）。經輻射照射後，其外觀顏色相較於未照射之樣品並未有明顯的差異。根據所測得之L、a、b數值，經4 kGy照射後樣品a、b數值略微下降。但整體而言，火麻仁樣品外觀顏色大多偏紅、黃色，經輻射照射後並無明顯改變其外觀顏色。

八、火麻仁經加馬照射前、後之脂肪酸含量分析

(一)輻射照射處理後立即測定：對於脂肪含量高之樣品經輻射照射後需特別注意樣品中脂肪酸劣化及油脂過氧化之影響。經由測定結果顯示，市售火麻仁主要脂肪酸成份為亞麻油酸(linoleic acid)、 α -次亞麻油酸(α - linoleic acid)、油酸(oleic acid)及棕櫚酸(palmitic acid)，經輻射照射後脂肪酸主要成份含量之變化差異不大（表五）。其中

棕櫚酸、硬脂酸(stearic acid)、花生酸(arachidic acid)之含量隨照射劑量越高有略為提高之現象。棕櫚酸經4 kGy照射後由7.63上升至7.72；硬脂酸由2.97上升至2.99；花生酸由0.80上升至0.82；亞麻油酸則有隨照射劑量增加而減少之趨勢，由54.06下降至53.88。隨著輻射照射劑量的增加，單元不飽和脂肪酸的含量變異不大，多元不飽和脂肪酸有隨照射劑量增加而漸減的趨勢，由76.45% 略為降低至76.29%，而飽和脂肪酸成份則由12.17%略為提升至12.3%。但以整體而言，輻射照射對於火麻仁脂肪酸之成份影響不甚明顯。

- (二)輻射照射處理後貯存三個月後測定：經由測定結果顯示，市售火麻仁經輻射照射處理後，於室溫下貯存三個月，其成份中含量較少之己酸及辛酸於貯存後即無法測得（表五）。棕櫚酸、硬脂酸及 γ -次亞麻油酸之含量較貯存前略為偏高。棕櫚酸由7.6~7.7之間上升至7.8~7.9之間；硬脂酸由2.98提升至3.03； γ -次亞麻油酸則由0.96提升至1.01。經貯存三個月之後，飽和脂肪酸之含量由12.2%略為提升至12.4%，但整體而言，貯存後之火麻仁樣品其脂肪酸之成份並無顯著差異。

九、火麻仁經加馬照射前、後之酸價及過氧化價分析

- (一)輻射照射處理後立即測定：根據文獻報導油脂經照射後其酸價及過氧化價值會上升，（如表六）所示，市售火麻仁中含豐富之脂肪酸，於輻射照射前測定其酸價為2.59 mg KOH/g，過氧化價為17.37 meq/kg。經輻射照射後，照射劑量達2 kGy時，其酸價及過氧化價值分別為2.65 mg KOH/g及15.33 meq/kg；當照射劑量達4 kGy時，酸價及過氧化價值分別為2.27 mg KOH/g及15.52 meq/kg。實驗結果顯示，市售火麻仁樣品經輻射照射劑量達4 kGy時，酸價及過氧化價值有略為上升之趨勢，但與照射劑量並無明顯之正相關性。
- (二)輻射照射處理後貯存三個月後測定：市售火麻仁於室溫下貯存三個月後測定其酸價為2.61 mg KOH/g及過氧化價值為15.71 meq/kg。經照射劑量2 kGy處理之火麻仁樣品於貯存三個月後測定其酸價及過氧化價值分別為3.07 mg KOH/g及16.57 meq/kg；當照射劑量達4 kGy，貯存三個月後之酸價及過氧化價值分別為2.76 mg KOH/g及16.11 meq/kg。實驗結果顯示，市售火麻仁樣品經輻射照射處理後於室溫下貯存三個月，酸價及過氧化價值有略為上升之趨勢，但與照射劑量並無明顯之正相關性。

十、致突變性測試

以安姆試驗判斷一物質是否有致突變性之標準，為當測試樣品所誘導之回復突變菌落數(His^+ revertants)高於自發回復突變菌落數之兩倍以上，或具有濃度反應關係及表示次測試樣品具有致突變性。試驗結果（如圖十七）所示，經輻射照射(2 kGy、4 kGy)後之樣品，其誘導*Salmonella typhimurium* TA100 菌株之 His^+ revertants 菌落數目均與自發性回復突變之菌數相近，而作為對照組織商業化致突變劑 2-aminifluorene(2-AF) 則可明顯地誘導菌株回復突變。此實驗結果證實以輻射照射抑制種子發芽不會誘發其致突變性。

肆、討論

根據實驗結果，市售經炮製之火麻仁於水中浸泡吸濕後有極少數種子出現出芽之現象，但此出芽現象應為少數火麻仁種子於炮製前已有些微之出芽（胚根），經烘乾後之乾燥胚根體積變小，縮入種殼內。種子一旦吸水膨脹破裂則露出胚根，此為物理現象而非正常發芽之生理現象。因此，以不同照射劑量處理之火麻仁種子其出芽率與照射劑量並無顯著之相關性，推測造成其出芽率高低與火麻仁炮製前之稍有出芽狀況及炮製手法過程具有密切之相關性。以多酚氧化酶活性作為指標，探討市售經炮製火麻仁之發芽活性，結果顯示市售炮製火麻仁種子中無法測得多酚氧化酶之活性。而以TTC染色法分析種子胚部之生命力，火麻仁種子其胚部及子葉部份呈現染色不均勻，子葉部分均不見紅色染色，顯示此種子無發芽活性。綜合以上之結果顯示市售火麻仁種子不具生命活力及發芽活性，且證實火麻仁之正常發芽率為0%，而少數種子之出芽為非正常發芽之生理現象。

本實驗室對多種中藥材研究結果顯示受測中藥材經所需滅菌劑量照射後之藥材外觀及品質無明顯變化，且照射前、後之指標成份含量或主成份之HPLC圖譜亦無明顯差異^(21-22, 35)，加馬射線照射可同時達到抑制發芽及滅菌的效果，應是中藥滅菌貯存之良好方法。由我們的實驗結果顯示，經輻射照射劑量最高達4 kGy處理後，火麻仁的外觀、顏色、脂肪酸組成、酸價及過氧化價均無明顯變異。於1980年由Fruin等人以安姆試驗證實冷凍肉類食品經輻射照射後不具致突變性，並於1997年FAO/IAEA/WHO輻照食品衛生安全聯合專家委員會提出建議，輻照食品之照射劑量低於10 kGy，輻照食品為消化安全且營養適當的。本研究以安姆試驗評估經照射後之火麻萃取物對*Salmonella typhimurium* TA100菌株是否具致突變性，結果顯示照射劑量於4 kGy內之火麻仁萃取物不具有致突變性。

伍、結論與建議

本研究完成火麻仁的種源、主要成分及功效等相關資料的蒐集，參考國際種子檢查規則與基隆海關對火麻仁發芽之測試方法進行比對，建立評估火麻仁發芽率之方法，作為國內火麻仁進口評估之參考。

因未炮製火麻仁無法進口，故以市售火麻仁、綠豆及芝麻三種種子進行輻射照射對發芽抑制率之測試，以市售火麻仁進行輻射照射後對樣品外觀色澤及成分之影響測試。結果顯示市售火麻仁種子不具生命活力及發芽活性，其正常發芽率為0%，而少數種子之出芽為非正常發芽之生理現象。以6 kGy照射可對乾燥綠豆、芝麻達顯著抑制發芽，而4 kGy照射對綠豆及芝麻雖分別有73.4%及77.4%的發芽率，但其植株均無法繼續生長。相同劑量照射下(4 kGy)，種子含水量較高之發芽抑制率較高，10 °C低溫照射之抑制發芽率較20 °C照射者為低。此外照射劑量率亦影響其抑制發芽率，綠豆以0.5 kGy/h劑量率照射者（4 kGy照射之發芽率為67%）抑制發芽效果較1及2.3 kGy/h為高（4 kGy照射之發芽率分別為82.5%及73%），即照射條件會顯著影響發芽率。

已完成市售火麻仁經特定照射條件處理後之外觀顏色、脂肪酸、酸價、過氧化價及突變率等分析，結果經抑制綠豆及芝麻發芽所需之照射劑量(4 kGy)處理對火麻仁種子之成分及外觀並無明顯影響，顯示輻射照射是抑制種子發芽之適當方法。本研究因未炮製火麻仁無法進口，故經計畫審查改以綠豆及與火麻仁相近之芝麻種子進行輻射照射抑制發芽測試，與火麻仁所需之抑制發芽劑量或有差異，若新鮮火麻仁能進口，本實驗室可即刻進行所需抑制發芽之劑量測試。

建議未來若有管制（物品）藥品進口以做為研究用時，請由政府單位專責進口後交付學術單位進行之。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號CCMP97-RD-101提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

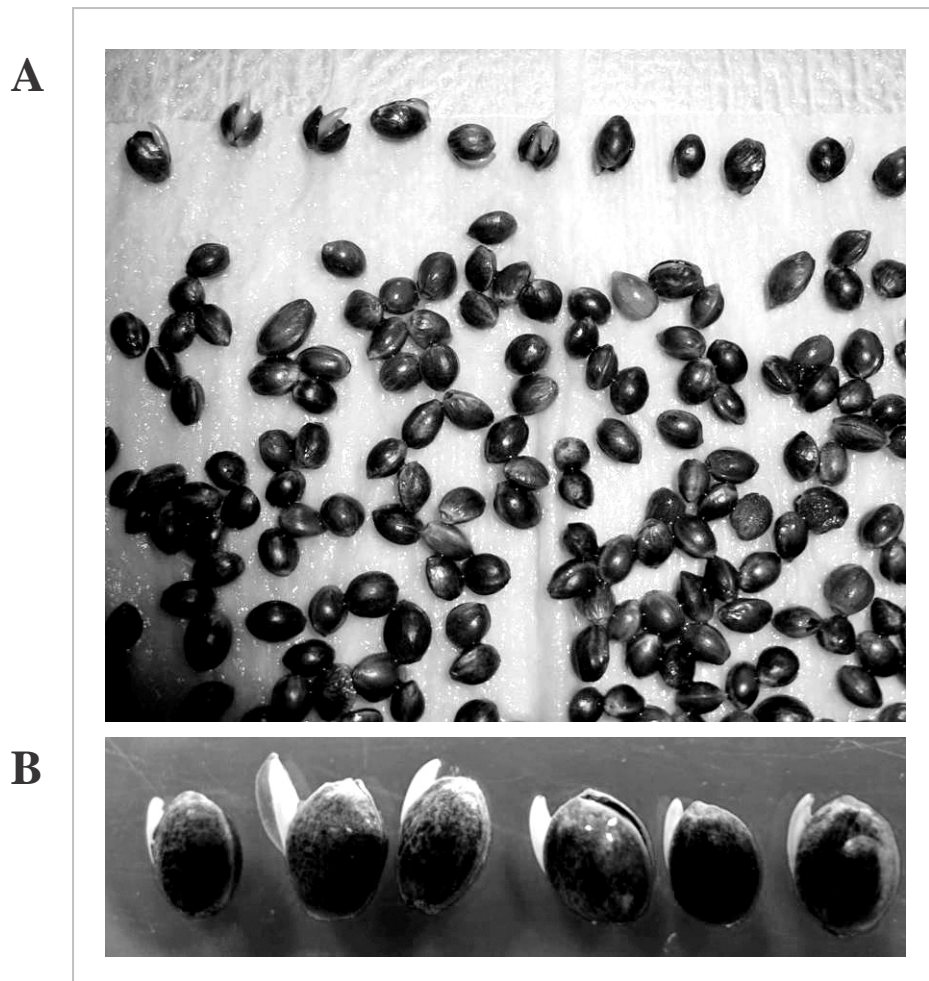
1. 王守經、馮雙慶、於子厚、孫守義、鄒積萬、雷鵬。2003。生薑輻照抑制發芽貯藏工藝研究。核農學報，17(2)：115-118。
2. 王鳳寶、傅金鋒、董立峰。2006。多酚氧化酶活性與小麥抗穗發芽的關係及抗穗發芽新品種秦麥三號的選育。麥類作物學報。26(5)：97-100。
3. 行政院衛生署中華藥典中藥集編修小組，中華中藥典，第一版。行政院衛生署，台北，民國93年。
4. 行政院衛生署中醫藥委員會，中藥材品質管制—組織型態學鑑定，第一版。行政院衛生署中醫藥委員會，台北，民國88年。
5. 行政院衛生署中醫藥委員會，中藥對照用指標成分物理化學資料彙編。行政院衛生署中醫藥委員會，台北，民國91年。
6. 行政院衛生署中醫藥委員會，臺灣常用藥用植物圖鑑，第二版。行政院衛生署中醫藥委員會，台北，民國92年。
7. 吳家駒、楊瑞森、錢明賽、郭俊德。1996。照射蒜頭推廣工作。核子科學，33(1)：52-57。
8. 李志恆。1995。大麻及其類緣植物、種子的鑑別比對，成分分析，藥理及毒理研究。八十四年度衛生署委託研究計畫執行成果報告。計畫編號：DOH84-TD-090。
9. 李欣。1998。對《中國藥典》大麻仁的討論。現代中藥研究與實踐，3(12)：58。
10. 財政部關稅總局。2007。我國進出口貨物數量與價值（正本）查詢表，<http://web.customs.gov.tw/statistic/statistic/mnhStatistic.asp>。
11. 張建偉、陳云堂、楊保安、胡秀菊、孟祥峰、劉秋芳。2002。⁶⁰Co γ射線輻照對板栗果影響效應的研究。食品科學，23(9)：108-112。
12. 梁紅、蔡業統、劉勝洪。1999。銀杏種子輻照效應及其保鮮的初步研究核農學報，13(1)：11-16。
13. 陳建華，臧鞏固，趙立寧，李育君，唐慧娟。2003。大麻化學成分研究進展與開發我國大麻資源的探討。中國麻業，25(6)：266-271。
14. 楊永紅，誠靜容。2004。大麻的實驗分類學研究。中國麻業，26(4)：164-169。
15. 鄭建詒、陳本、鄭守訓。1982。大麻仁與印度大麻種子之比對鑑定研究。藥物食品檢驗局調查研究年報，2：6-12。
16. 鮑金勇、趙國建、梁淑如、楊明珊、楊公明。2005。香蕉皮多酚氧化酶和過氧化物酶特性之研究。食品科技。11：17-20。
17. 簡秋燕、謝慶昌。2004。荔枝果皮褐化與多酚氧化酵素及過氧化酵素之

關係。興大園藝。29(1)：1-10。

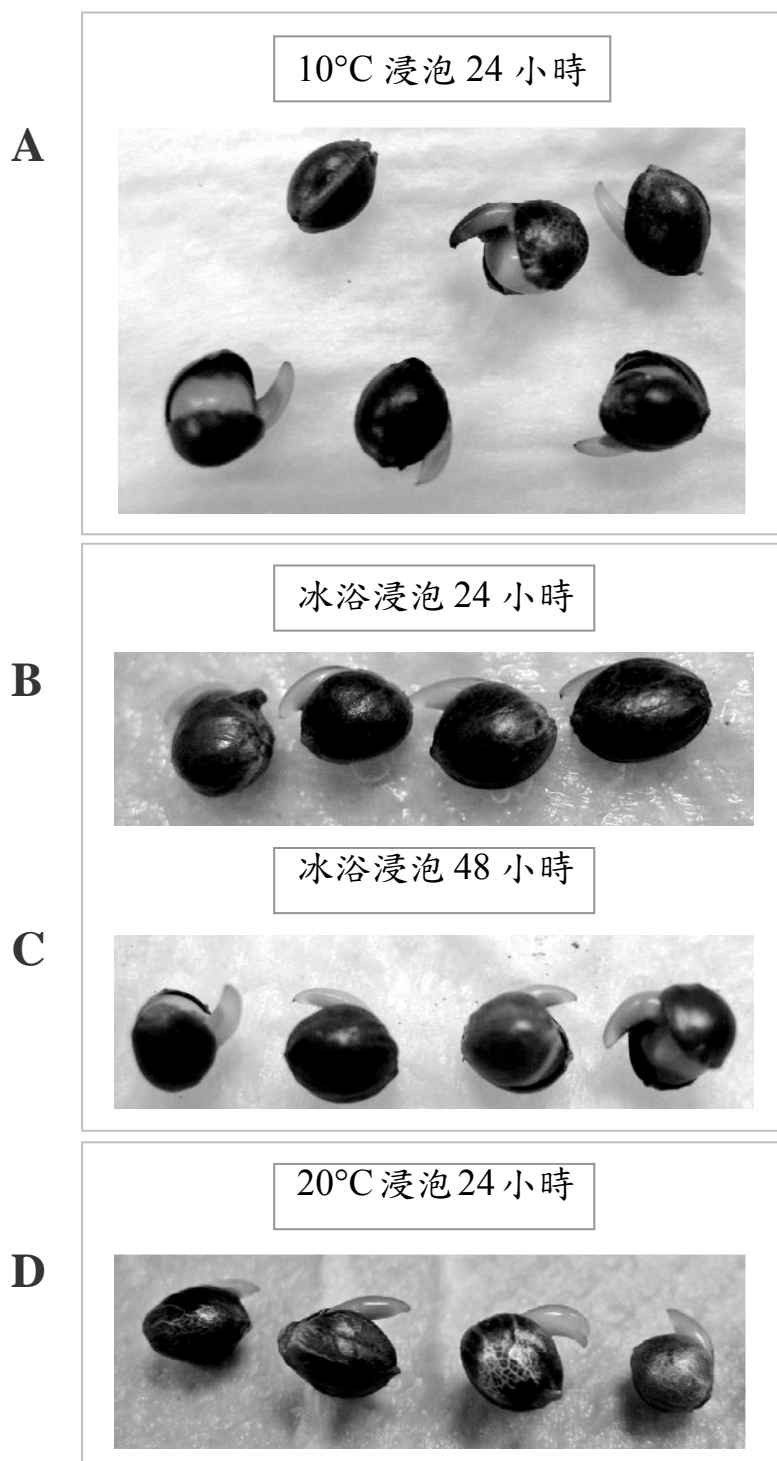
18. A.O.A.C. 1990. Peroxide value of oils and fats titration method, In Official Methods of Analysis, 15th Ed.(Helrich, K., rd.), Sec 965.33 pp.656. Association of Official Analytical Chemists, Virginia.
19. Callaway JC., 2004. Hempseed as a nutritional resource. An overview. *Euphytica*, 140: 65-72.
20. Chaudhuri SK. 2002. A simple and reliable method to detect gamma irradiated lentil(*Lens culinaris* Medik.) seeds by germination efficiency and seedling growth test. *Radia Phy and Chem*, 64(2): 131-136.
21. Chou FI., Chung HP., Wen HW., Wei YY., Chen CT., Chang CG. 2001. Sterilization of Chinese medicinal herbs with cobalt 60 gamma irradiation. *Nucl Sci J*, 38: 279-288.
22. Chou FI., Wen HW., Chung HP. 2005. The Effect of Gamma Irradiation on Microbial Decontamination and Chemical and Sensory Characteristic of Lycium Fruit. *Radia Phy and Chem*, 75: 593-603.
23. Huang SL., Chen YF., Chiang WC. 1994. Amino acids, fatty acids and proximate composition of the seed of adlay. *Food Sci,(Taiwan, R.O.C.)* 21: 67-74.
24. Mortelmans K., Zeiger E. 2000. The Ames Samonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455: 29-60.
25. Ouattara B., Giroux M., Smoragiewicz W., Saucier L., Lacroix M. 2002. Combined effect of gamma irradiation, ascorbic acid, and edible coating on the improvement of microbial and biochemical characteristics of ground beef. *J Food Prot*, 65: 981-987.
26. Perez MB, Avelandano MI, Croci CA. 2007. Growth inhibition by gamma rays affects lipids and fatty acids in garlic sprouts during storage. *Postharvest Biol Technol.* 44(2): 122-130.
27. Ramakrishna N, Lacey J, Smith JE. 1991. Effect of surface sterilization, fumigation and gamma-irradiation on the microflora and germination of barley-seeds. *Int J Food Microbiol*, 13(1): 47-54.
28. Sommer NF., Fortlage RG. 1996. Ionizing radiation for control of post-harvest diseases of fruits and vegetables. *Adv Food Res*, 51: 147-193.
29. Stone CA., Odin C., Howard J., Mumaw LD. 1994. High-School Experiments in Food Irradiation. *Abs Pap Am Chem Soc*, 207: 91-NUCL.
30. Takehisa M., Ito H. 1986. Experiences of Food Irradiation in Japan. *Food Rev Int*, 2: 19.
31. Thakur BR., Singh RK. 1994. Food Irradiation-Chemistry and Applications.

- Food Rev Int, 10: 437-473.
32. WHO, 1981. Wholesomeness of irradiated food: report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, WHO Tech. Rept, Ser No. 651. World Health Org., Geneva.
 33. WHO, 1988. Food Irradiation: A technique for preserving and improving the safety of food. WHO, Geneva.
 34. WHO, 1999. High dose irradiation. In: Wholesomeness of Food Irradiated with Doses Above 10 kGy, vol. 890. World Health Organization Technical Report Series, Geneva.
 35. Wen, HW., Chung, HP. Wang, YT. and Chou. FI. 2008. Efficacy of gamma irradiation for protection against postharvest insect damage and microbial contamination of the adlay. Postharvest Biology and Technology. 50:208-215.

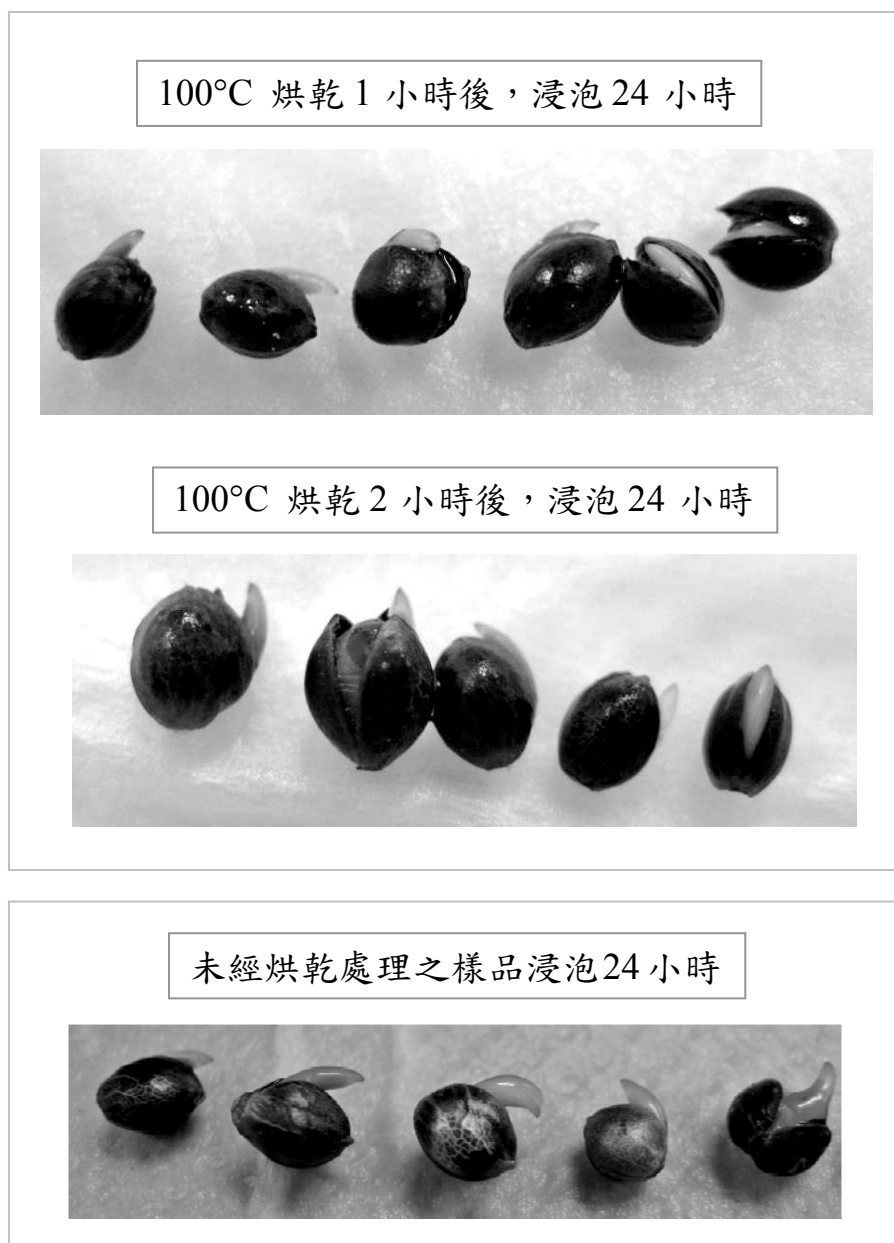
柒、圖、表



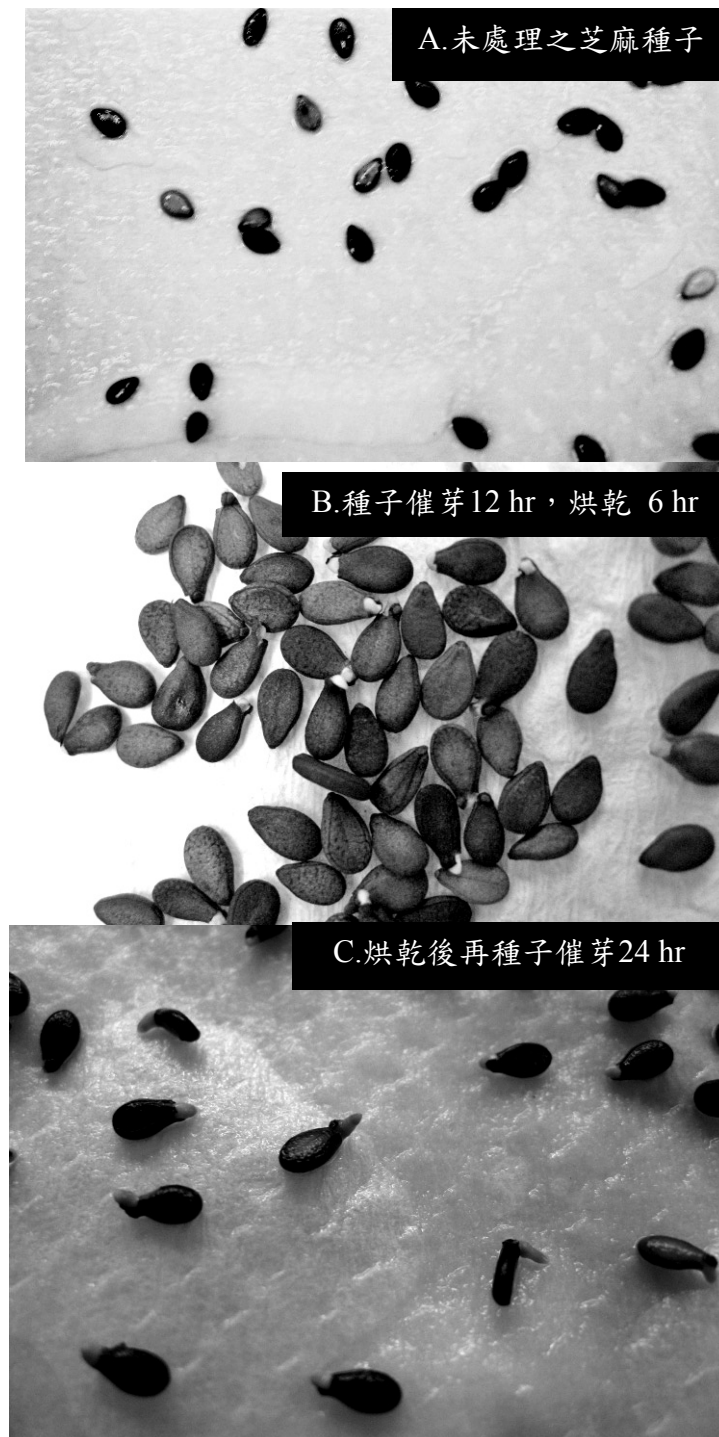
圖一 各批次未經照射之市售火麻仁先泡水催芽48小時後，鋪於濕潤之培養床上，移入生長箱於黑暗中培養48小時，A.可見整批樣品中僅少數火麻仁種子有出芽，多數為完全不發芽的種子；B.將上述出芽之火麻仁放大觀察可見其出芽長度有些不同，但此出芽現象皆屬不正常出芽。



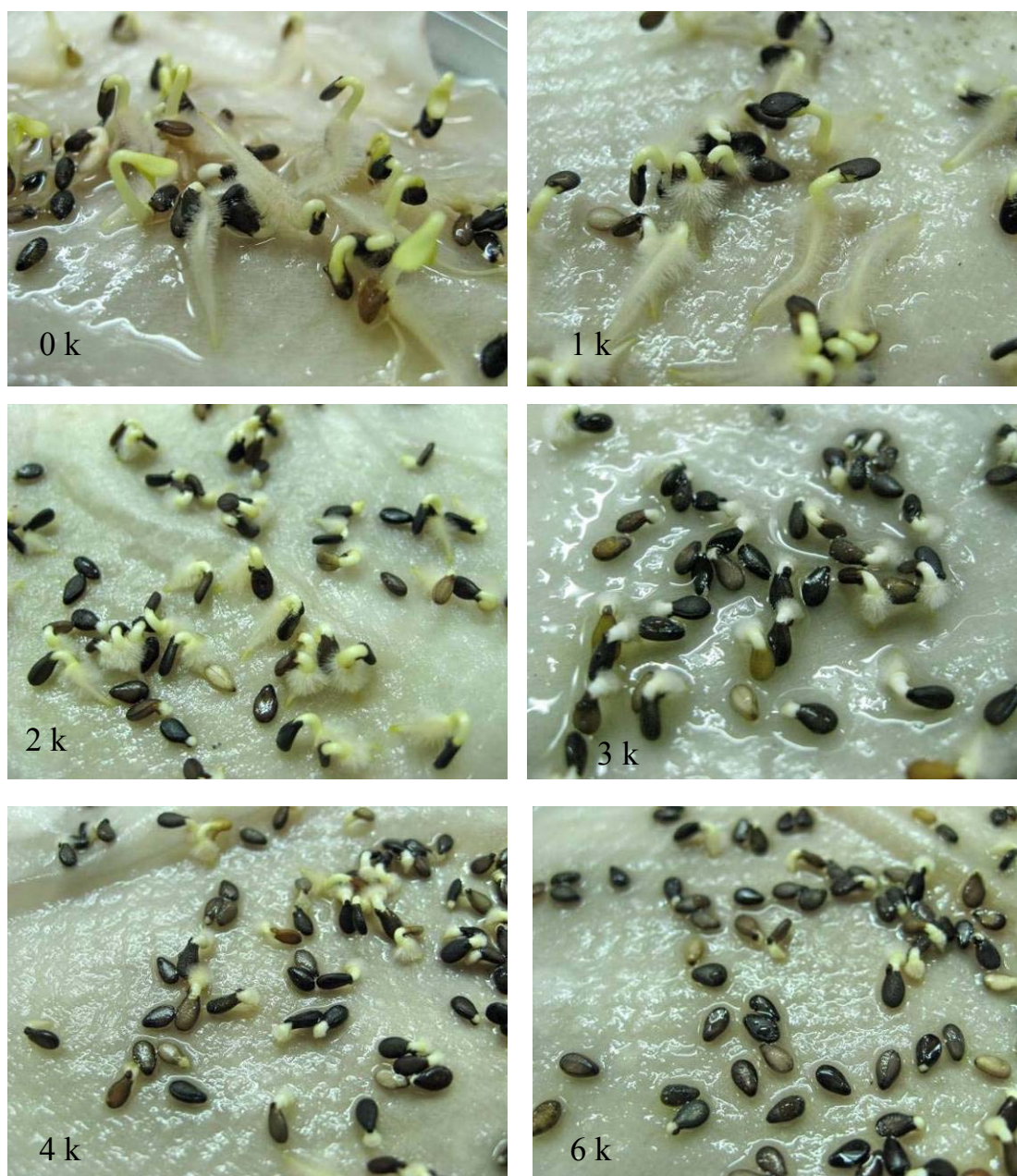
圖二 A. 為將火麻仁種子於10°C冰水中避光催芽浸泡24小時後；B. 為將火麻仁種子以冰浴避光催芽浸泡24小時後；C. 為將火麻仁種子以冰浴避光催芽浸泡48小時後；D. 為於常溫20°C無菌水浸泡24小時(控制組)後，所挑出之少數出芽種子。將出芽之種子於濕潤濾紙上繼續培養5~7天，其胚根皆無繼續生長分化之現象，故此出芽現象屬非生理性出芽。



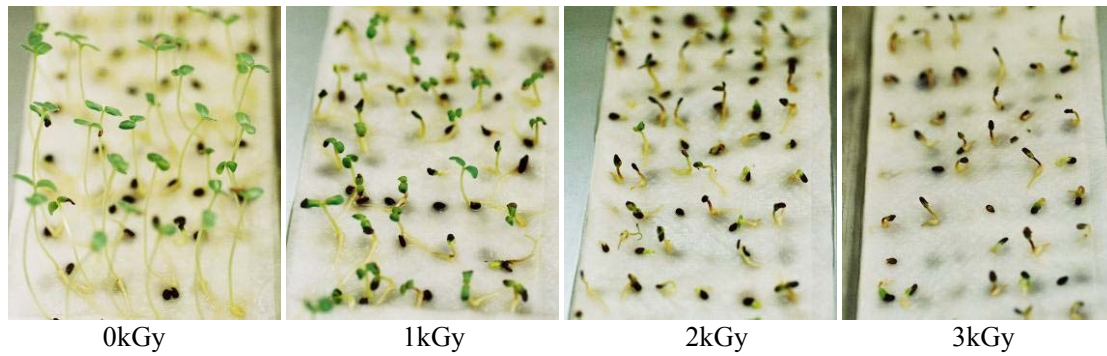
圖三 A.將火麻仁種子於100°C烘箱中烘乾1小時後，避光催芽浸泡24小時後之少數出芽種子；B.將火麻仁種子於100°C烘箱中烘乾2小時後，避光催芽浸泡24小時後之少數出芽種子；C.未經烘乾處理之火麻仁種子，以無菌水避光浸泡24小時後之少數出芽種子。將出芽之種子於濕潤濾紙上繼續培養5~7天，其胚根皆無繼續生長分化之現象，確認此出芽現象屬非生理性出芽。



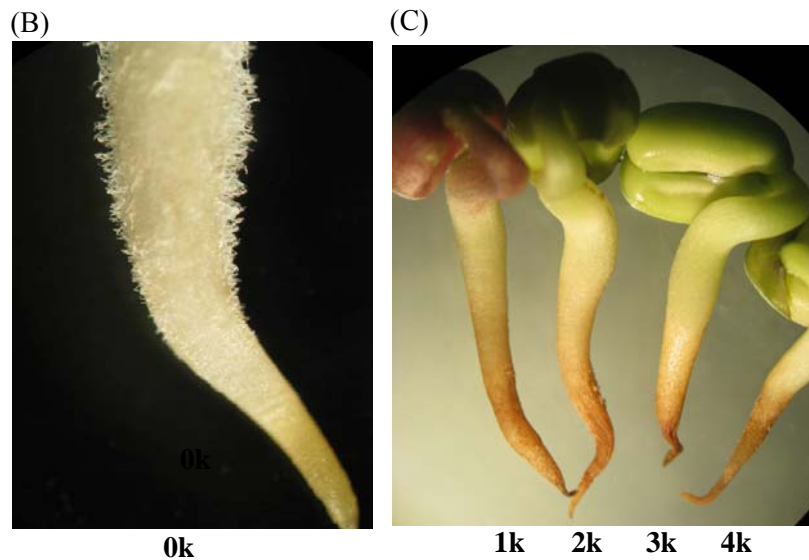
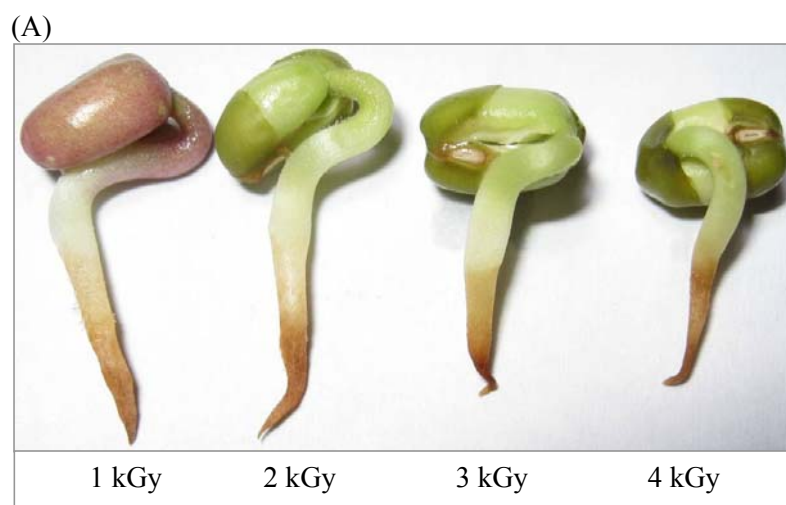
圖四 A. 未經處理之芝麻種子；B. 將芝麻避光催芽12小時後，可見少數種子有出芽現象，將之於烘箱中烘乾6小時後，可見芽變短，原本外露於種殼之芽縮入種殼內；C. 經烘乾處理之芝麻再以無菌水避光浸泡24小時後，可見已縮入種殼內之芽再度伸長膨脹外露。將出芽之種子於濕潤濾紙上繼續培養5~7天，其胚根皆無繼續生長分化之現象，故此出芽現象屬非生理性出芽。



圖五 芝麻樣品未經照射（0 kGy）及經1、2、3、4、6 kGy照射後培養3天之種子出芽及生長狀況。胚根之伸展及根毛之發展隨照射劑量增高而變差。



圖六 芝麻樣品未經照射（0 kGy）及經1、2、3 kGy照射後培養6天之種子生長狀況。植株之高度及子葉之生長隨照射劑量增高而下降。

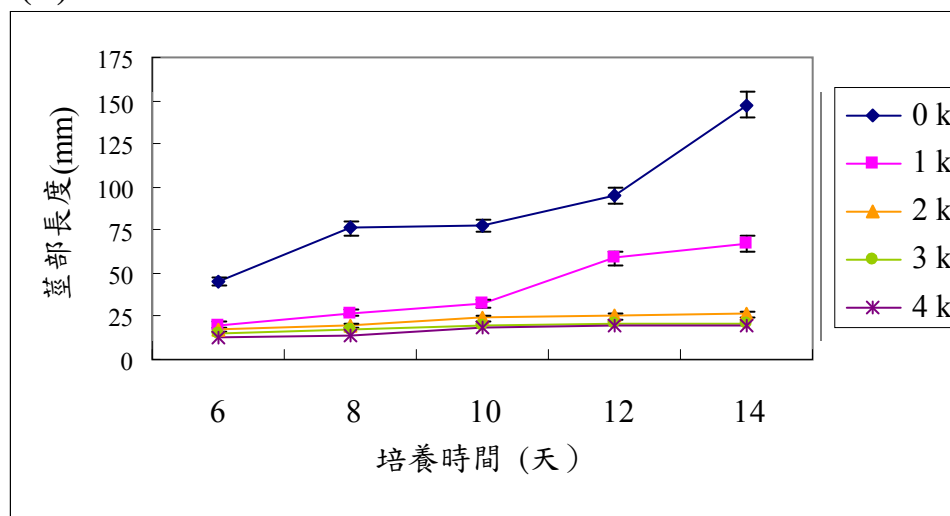


圖七 乾燥綠豆種子於發芽床上培養至第五天根部發育之狀況與照射劑量之相關性：(A)根部生長狀況隨著照射劑量增加而趨於不健全；(B)於顯微鏡下觀察未經照射之種子根部發育狀況良好；(C)於顯微鏡下觀察隨照射劑量增高，種子胚根部發育之長度下降、根毛發育不全、根點褐化。

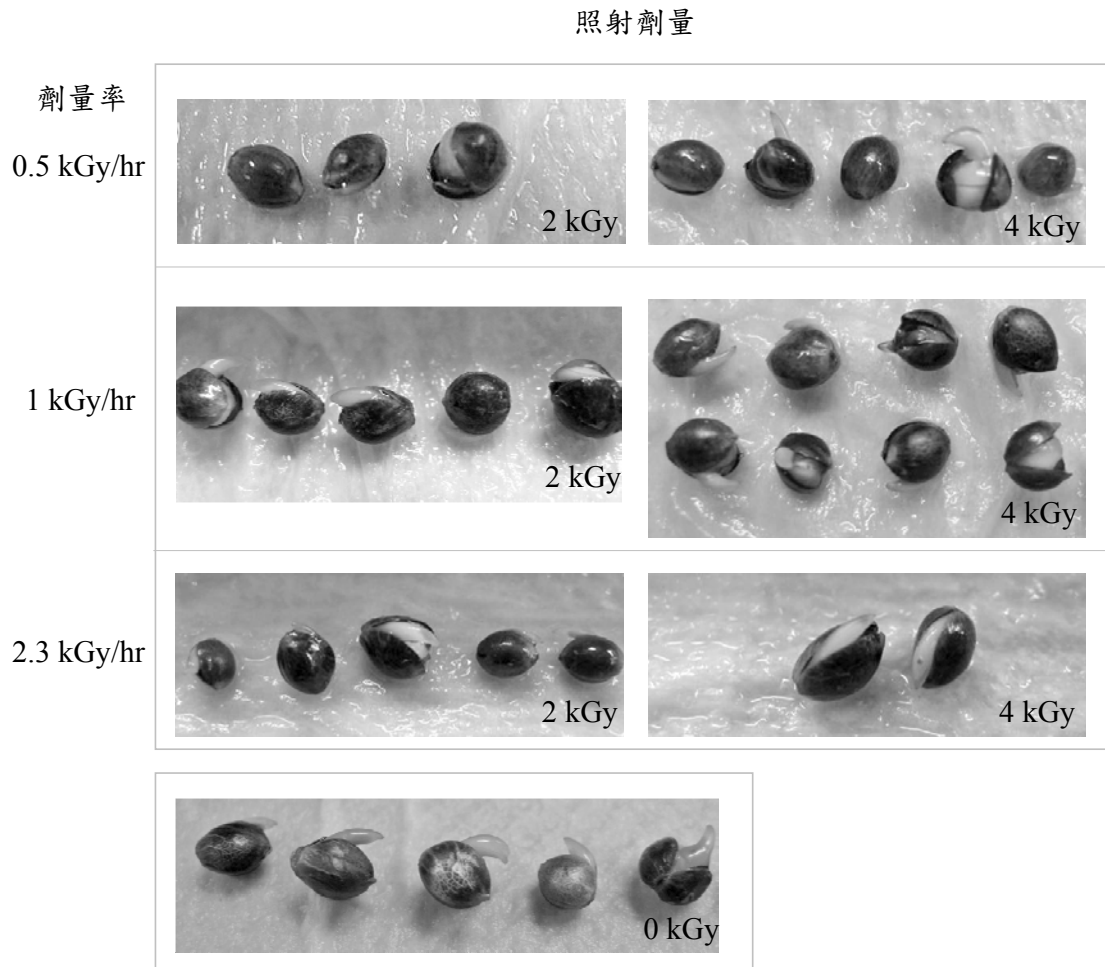
(A)



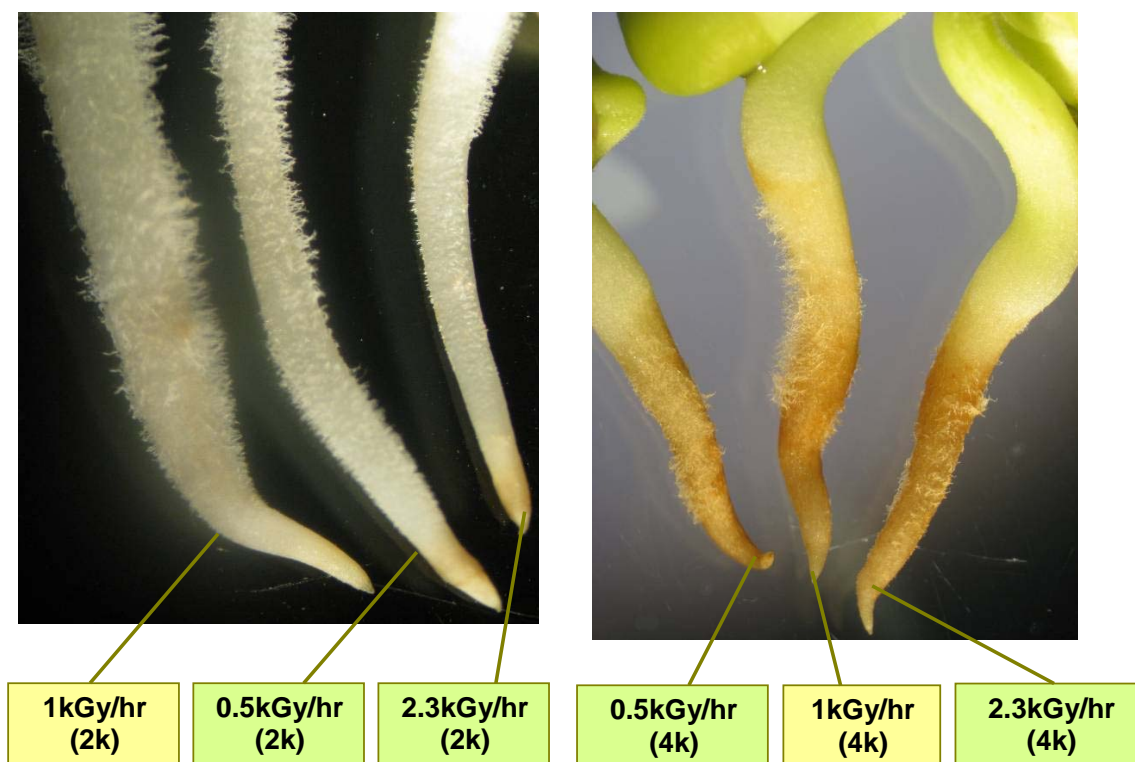
(B)



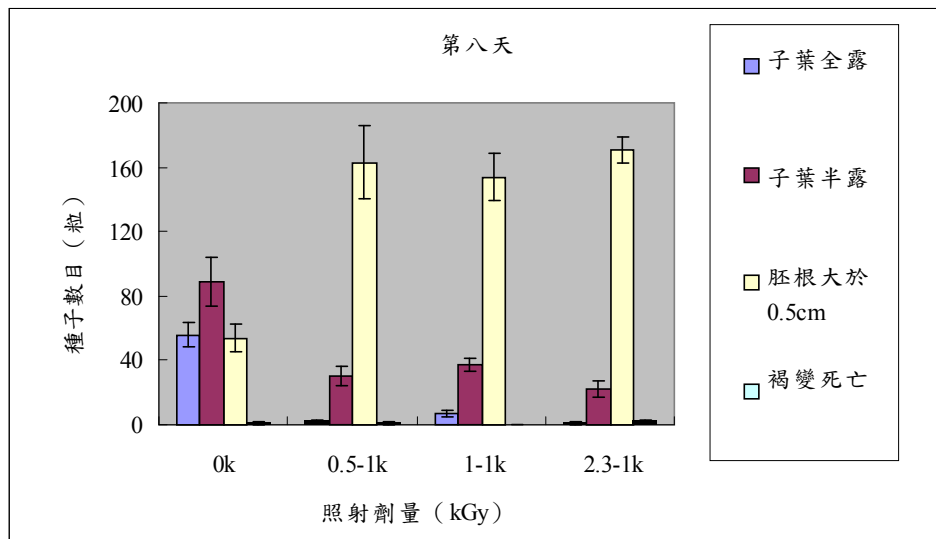
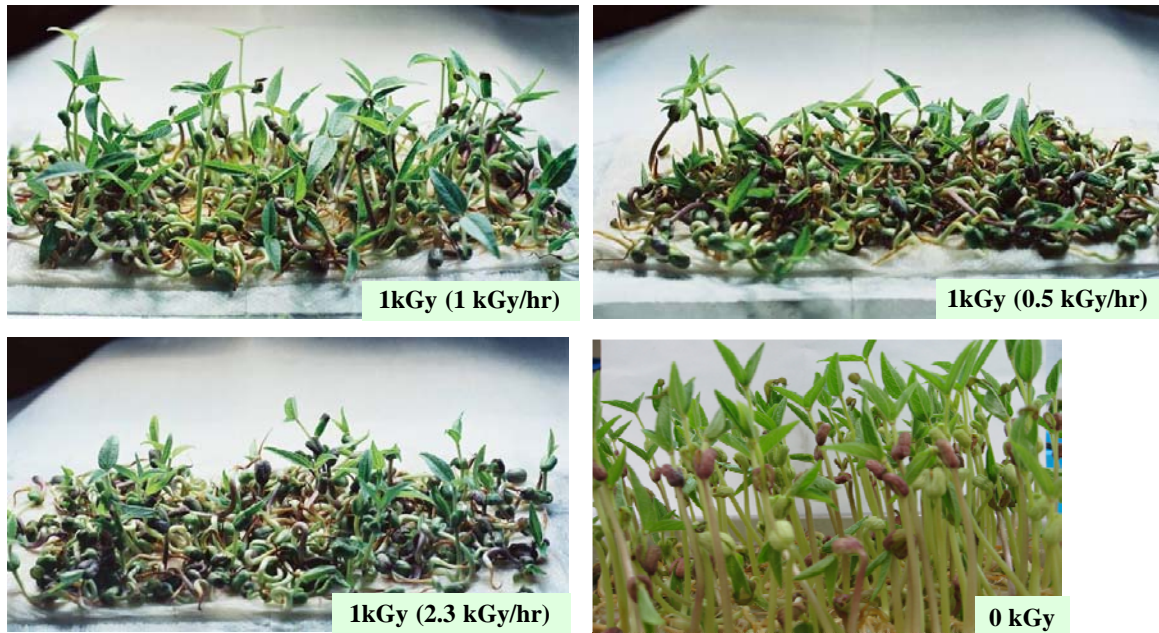
圖八 乾燥綠豆種子於發芽床上控溫(25°C)、控光(12小時光照)條件下培養期間生長發育狀況與照射劑量之相關性：
(A)綠豆各處理於發芽床上培養至第十四天之植株外觀；(B)不同處理於培養不同天數時所量測之植株莖部平均長度(mm)。



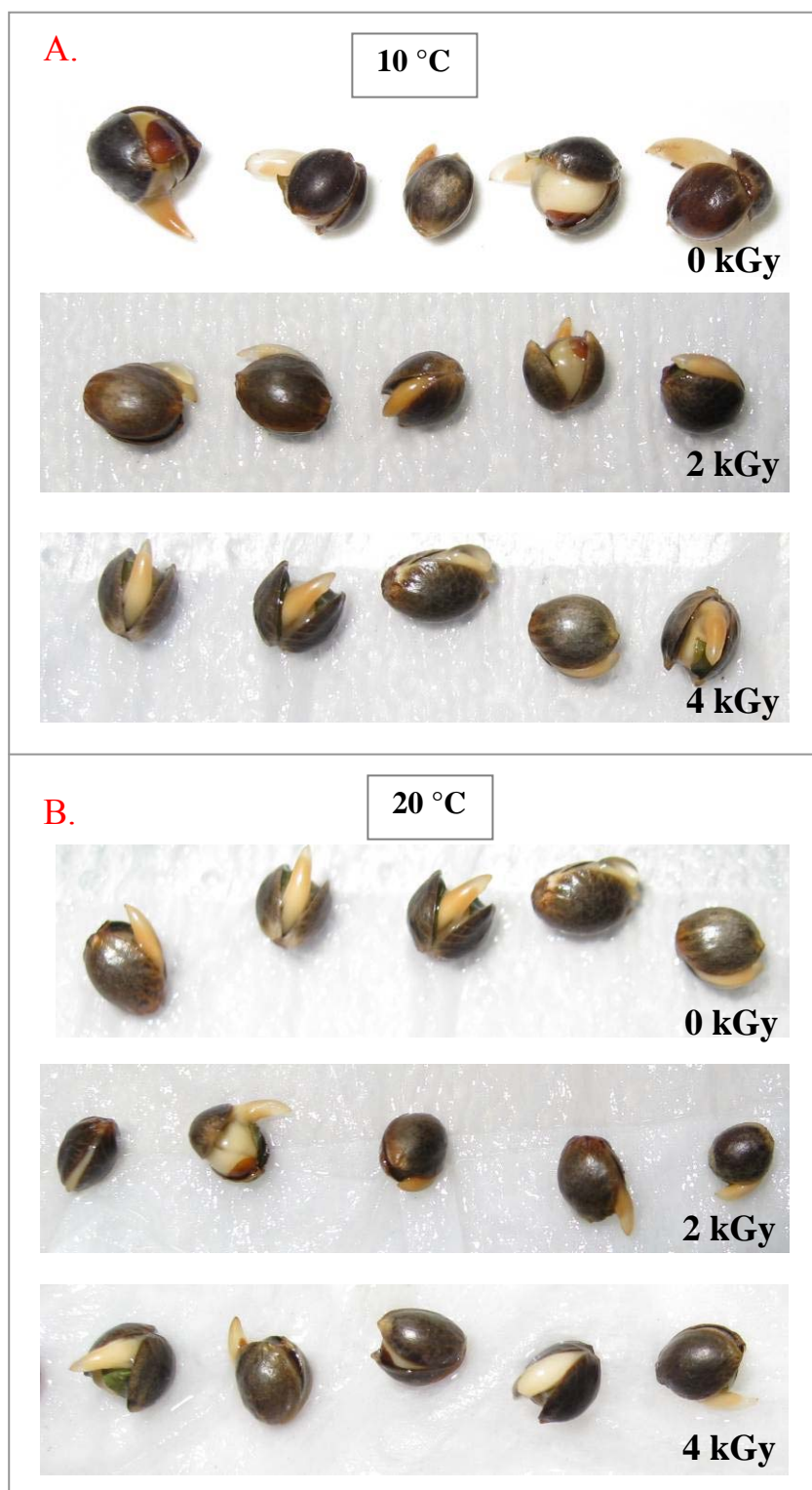
圖九 取出芽率最高之批次D(高雄)火麻仁樣品約1000 種子，以不同劑量率相同總照射劑量之條件進行照射後，於20 °C黑暗中泡水催芽48小時後，取有出芽的樣品觀察其出芽現象，結果皆屬不正常出芽，且此出芽率與劑量、劑量率皆無關。



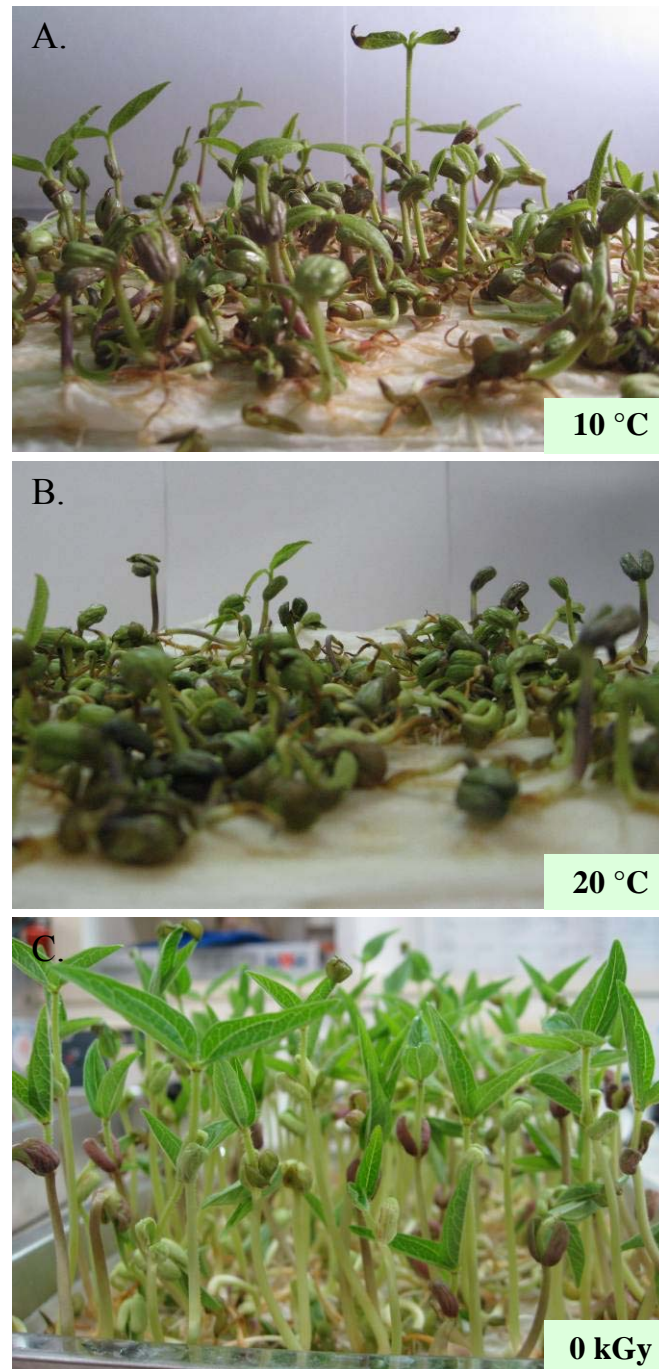
圖十 於相同照射劑量(2、4kGy)、不同劑量率(0.5、1、2.3 kGy/hr)條件下進行輻射照射之綠豆種子，於發芽床上控溫(25 °C)、控光(12小時光照)條件下培養五天後，於顯微鏡下觀察其胚根及根毛發育，均以1 kGy/hr劑量率照射者較佳。



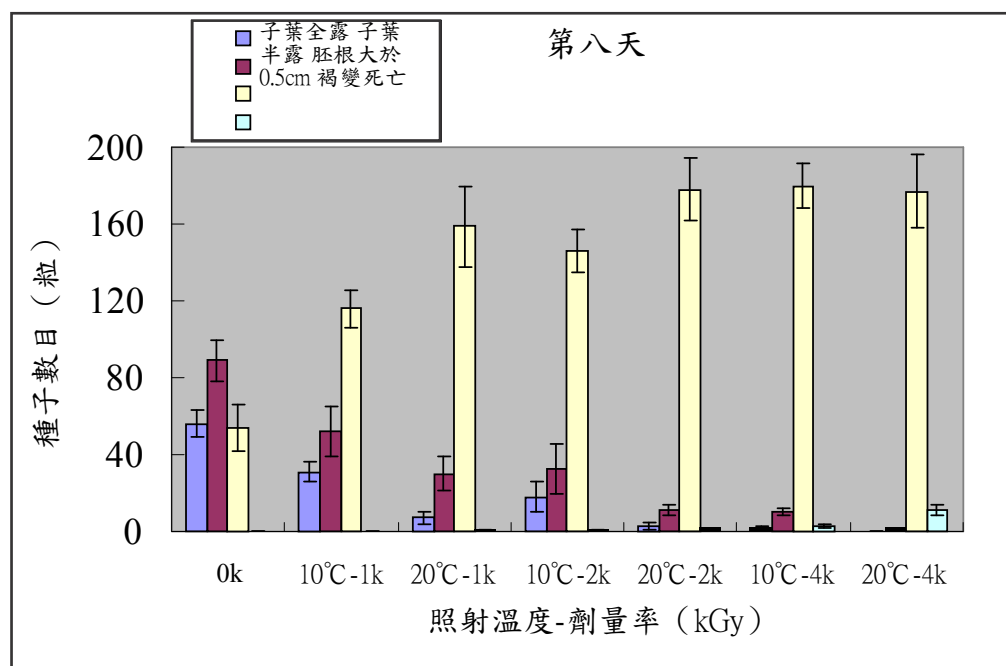
圖十一 上圖：綠豆樣品以不同照射劑量率（0.5、1、2.3 kGy/hr）照射1 kGy後，於25 °C培養至第八天觀察其生長狀況。下圖：將上述各處理之不同生長狀態分別進行計數（三重複），顯示照射率不同時會影響其發芽率，以1 kGy/hr劑量率照射之樣品生長狀況稍佳。



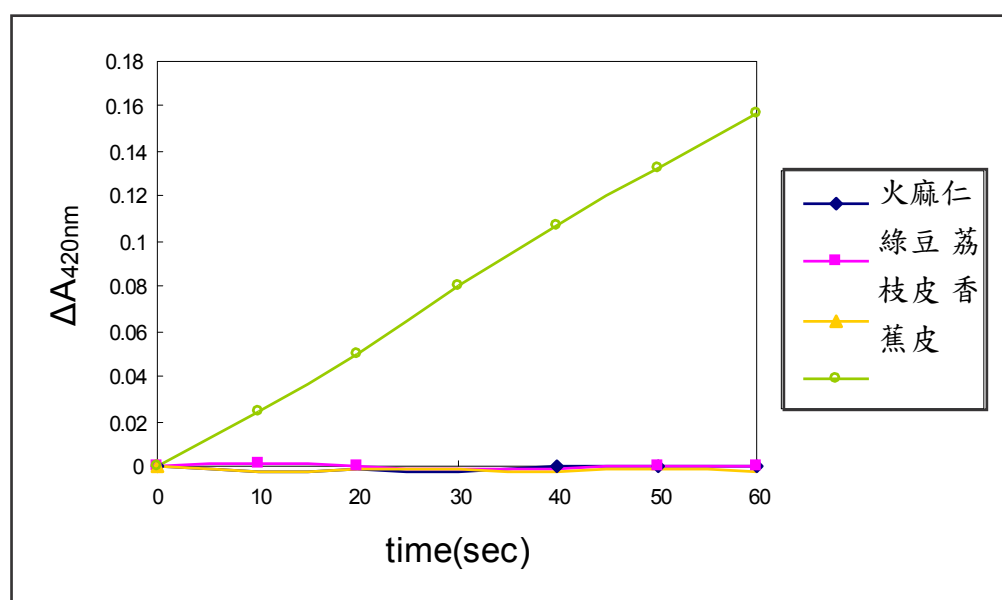
圖十二 取批次D(高雄)火麻仁樣品約1000 種子，以不同照射溫度(10°C、20 °C)進行0k、2k及4k總照射劑量之條件進行照射後，於20 °C黑暗中泡水催芽48小時後觀察其出芽現象，結果皆屬不正常出芽，且出芽率與照射溫度無關，且輻射照射劑量與此不正常出芽現象無相關性。



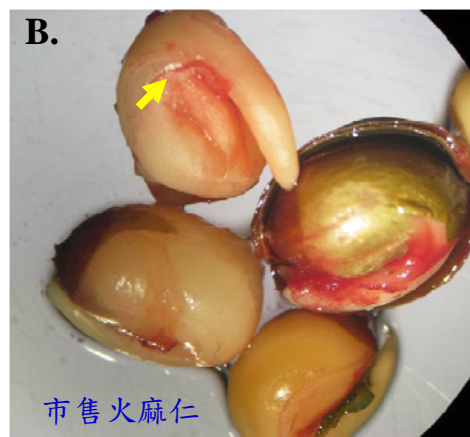
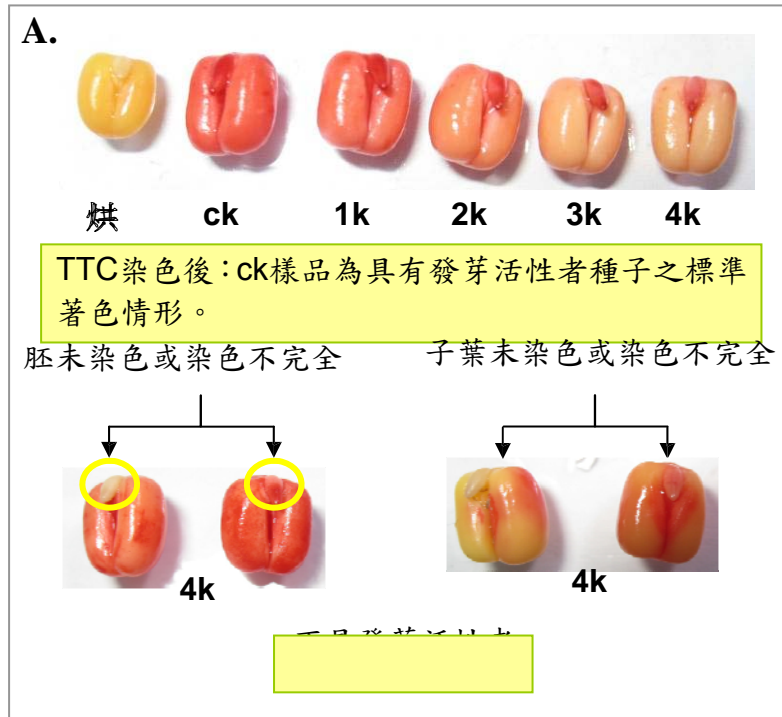
圖十三 市售乾燥綠豆樣品分別以10 °C及20 °C照射1kGy(劑量率為1 kGy/hr)處理後於20 °C培養第至八天之生長狀況，照射溫度為10 °C之綠豆樣品生長狀況較20 °C培養為佳，圖C為未照射之綠豆樣品之生長狀況(控制組)。



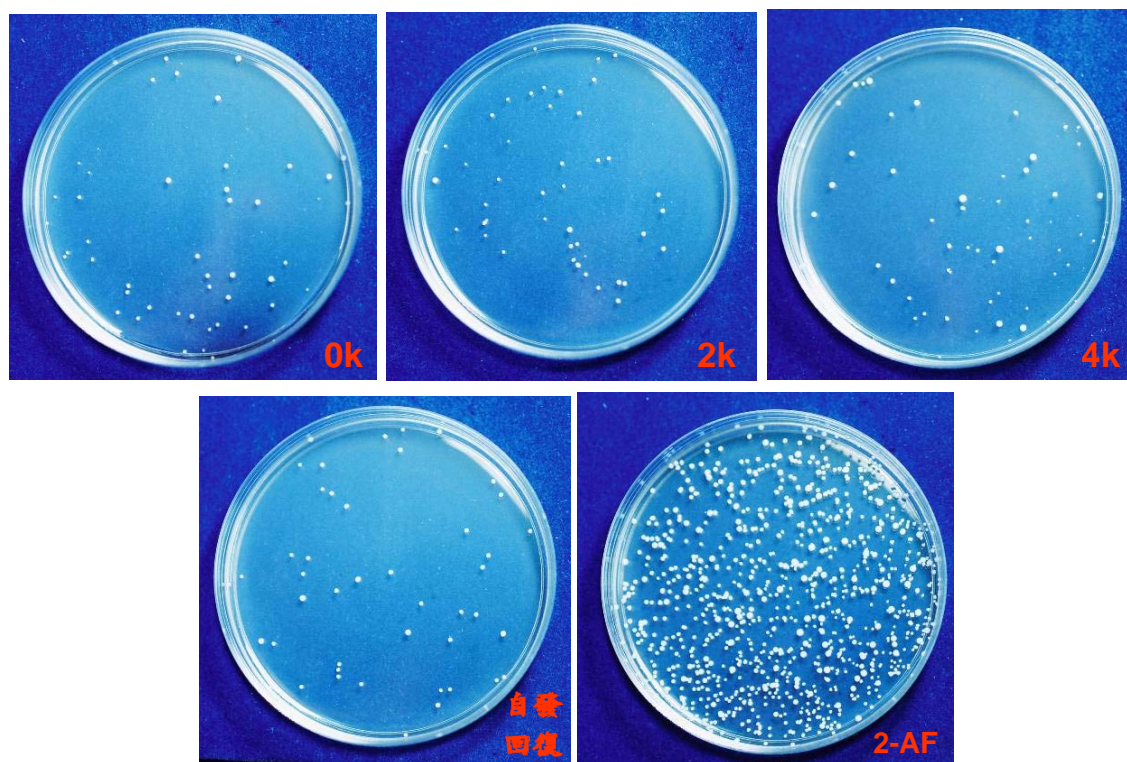
圖十四 市售乾燥綠豆樣品分別以10 °C及20 °C照射1kGy(劑量率為1 kGy/hr)處理後於20 °C培養第至八天之生長狀況，依其不同生長狀況計數其數量（三重複）。照射溫度為10 °C之綠豆樣品生長狀況較20 °C培養為佳，0k為未照射之綠豆樣品之生長狀況(控制組)。



圖十五 以多酚氧化酶之活性作為測試火麻仁種子發芽活性之指標，實驗結果顯示市售炮製火麻仁、乾燥綠豆種子及荔枝果皮中無法測得多酚氧化酶之活性，而作為對照組之香蕉果皮則可測得酵素活性。



圖十六 以氯化三苯四氮唑法(TTC法)測試綠豆及市售火麻仁種子胚部之生命活力：(A)具有生命活力之綠豆種子(ck)之胚部及子葉部份可被均勻的染為紅色，而不具發芽活性者則有顏色較淡或著色位置不均勻之現象。(B) 經過泡水48小時催芽後移至發芽床中培養24小時之火麻仁樣本，挑選已出芽及未出芽之火麻仁樣本並撥除其外殼，進行TTC染色，結果僅於胚部有部分呈現紅色，表示已出芽及未出芽火麻仁種子均不具有發芽活性。



圖十七 以未經照射處理及經照射處理(2 kGy、4 kGy)之火麻仁樣品萃液處理後其*S. typhimurium* TA100菌株之His⁺ revertants菌落數目均與自發性回復突變之菌數相近，而作為對照組之商業化致突變劑2-aminifluorene(2-AF) 則可明顯地誘導菌株回復突變。

表一、各批次之市售乾燥火麻仁經輻射照射後培養第五天出芽之種子及胚根長度

樣品編號及採樣處	照射劑量(kGy)											
	0 k		2 k		4 k		6 k		8 k		10 k	
	種子長 (mm)	胚根長 (mm)	種子長 (mm)	胚根長 (mm)	種子長 (mm)	胚根長 (mm)	種子長 (mm)	胚根長 (mm)	種子長 (mm)	胚根長 (mm)	種子長 (mm)	胚根長 (mm)
A(台中)	5.49±0.21*	4.37±0.52	4.99±0.41	3.63±0.61	4.93±0.29	3.68±0.78	4.92±0.33	3.58±0.37	4.97±0.44	3.55±0.38	5.62±0.06	4.51±0.64
B(台南)	5.45±0.45	3.68±0.59	5.59±0.19	3.87±0.93	5.24±0.41	3.59±0.49	5.17±0.47	3.61±0.49	5.29±0.29	3.64±0.72	4.98±0.47	3.85±0.72
C(高雄)	4.81±0.36	3.41±0.47	5.25±0.21	4.53±0.88	5.43±0.37	3.32±0.48	4.94±0.19	3.37±0.54	4.98±0.60	3.52±0.97	5.48±0.36	3.73±0.44
D(高雄)	4.58±0.48	3.39±0.45	4.53±0.39	3.31±0.56	4.35±0.39	3.22±0.34	4.44±0.56	2.82±0.55	4.62±0.49	3.21±0.35	4.64±0.59	3.28±0.84

*為量測整批樣品中所有出芽種子之種子長度及胚根長度的平均值±其標準偏差值。所有樣品之胚根長度均短於火麻仁種子長度，依台大種子研究室之資料，本試驗中之出芽可定義為不發芽或不正常出芽。

表二、不同批次之市售乾燥火麻仁經輻射照射後立即種植培養第五天之出芽率(%)

樣品 編號	照射劑量(kGy)					
	0 k	2 k	4 k	6 k	8 k	10 k
A(台中)	0.41±0.03*	0.61±0.04	0.41±0.05	0.1±0.02	0.41±0.05	0.2±0.04
B(台南)	0.64±0.05	0.45±0.02	0.55±0.06	0.73±0.05	0.64±0.04	0.45±0.03
C(高雄)	0.73±0.04	0.19±0.02	0.45±0.05	0.27±0.06	0.27±0.05	0.19±0.05
D(高雄)	1.15±0.05	0.58±0.06	0.42±0.08	1.11±0.06	0.74±0.03	0.21±0.04

註：出芽率(%)指所取測試樣品中，所有已出芽種子數所佔之百分比，樣品之出芽以3~4 mm胚根長度為指標。

*為每一批樣品中各取三重複測試，計算其出芽率平均值±標準偏差。

表三、不同批次之市售乾燥火麻仁經輻射照射後，於室溫下貯存三個月後種植培養第五天之出芽率(%)

樣品 編號	照射劑量(kGy)					
	0 k	2 k	4 k	6 k	8 k	10 k
A(台中)	0.72±0.06	0.41±0.03	0.41±0.02	0.11±0.02	0.2±0.01	0.2±0.02
B(台南)	0.64±0.05	0.55±0.04	0.73±0.04	0.45±0.03	0.27±0.03	0.36±0.05
C(高雄)	0.45±0.05	0.64±0.04	0.45±0.05	0.27±0.02	0.36±0.04	0.19±0.03
D(高雄)	0.95±0.06	0.68±0.05	0.89±0.06	0.58±0.04	0.74±0.04	0.42±0.04

註：出芽率(%)指所取測試樣品中，所有已出芽種子數所佔之百分比，樣品之出芽以3~4 mm胚根長度為指標。

*為每一批樣品中各取三重複測試，計算其出芽率平均值±標準偏差。

表四、不同批次之市售乾燥火麻仁輻射照射前、後之外觀顏色變化差異

批次		照射劑量(kGy)		
		0k	2k	4k
A	L	46.33±1.70	47.79±1.86	45.27±1.49
	a	2.33±0.81	2.91±0.98	1.95±0.50
	b	18.72±0.27	18.76±0.67	16.53±0.58
B	L	43.91±1.6	44.13±1.78	43.23±0.87
	a	1.50±0.54	1.95±1.00	1.69±0.57
	b	15.99±0.84	17.16±1.25	15.91±0.55
C	L	45.57±1.33	45.63±1.19	43.66±0.89
	a	2.74±0.74	2.42±1.24	2.16±0.80
	b	18.35±1.83	17.68±0.56	16.11±1.17
D	L	40.09±1.38	38.34±2.58	40.03±2.34
	a	2.04±0.40	2.04±1.12	1.46±0.52
	b	15.63±0.80	15.38±1.01	15.33±0.98

A：台中 B：台南 C：高雄 D：高雄

表五、市售火麻仁於輻射照射後之脂肪酸含量與照射後經貯存三個月後之脂肪酸含量

照射劑量(kGy)	0 k		2 k		4 k	
脂肪酸	照射後 未貯存	照射後 貯存 三個月	照射後 未貯存	照射後 貯存三 個月	照射後 未貯存	照射後 貯存 三個月
己酸(caproic acid)	0.07	-	0.07	-	0.08	-
辛酸(caprylic acid)	0.04	-	0.04	-	0.03	-
肉豆蔻酸(myristic acid)	0.06	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06
十五酸(pentadecanoic acid)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
棕櫚酸(palmitic acid)	7.63	7.89	7.64	7.9	7.72	7.85
棕櫚油酸(palmitoleic acid)	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12	0.12
十七酸(margaric acid)	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
硬脂酸(stearic acid)	2.97	3.02	2.98	3.04	2.99	3.03
油酸(oleic acid)	10.81	10.64	10.78	10.82	10.83	10.69
亞麻油酸(linoleic acid)	54.06	53.86	53.97	53.95	53.88	53.9
α -次亞麻油酸(α -linolenic acid)	20.86	20.94	20.93	20.7	20.87	20.89
γ -次亞麻油酸(γ -linolenic acid)	0.96	1	0.96	1	0.97	1.02
十八碳四烯酸(octadecatetraenoic acid)	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.47
花生酸(arachidic acid)	0.8	0.81	0.81	0.8	0.82	0.81
鱈油酸(gadoleic acid)	0.42	0.42	0.42	0.41	0.43	0.42
二十碳二烯酸(eicosadienoic acid)	0.09	0.1	0.09	0.09	0.09	0.09
二十二酸(behenic acid)	0.31	0.34	0.32	0.31	0.32	0.33
芥子酸(erucic acid)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
二十三酸(tricosanoic acid)	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
二十四酸(lignoceric acid)	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
單元不飽和脂肪酸(%)	11.38	11.21	11.37	11.38	11.41	11.26
多元不飽和脂肪酸(%)	76.45	76.38	76.43	76.22	76.29	76.37
飽和脂肪酸(%)	12.17	12.41	12.21	12.4	12.3	12.37
ω -3脂肪酸(%)	21.34	21.42	21.41	21.18	21.35	21.36

表六、市售火麻仁於輻射照射後及照射後經貯存三個月後之酸價、過氧化價變化

照射劑量(kGy)	0 k		2 k		4 k	
	照射後 未貯存	照射後 貯存三 個月	照射後 未貯存	照射後 貯存三 個月	照射後 未貯存	照射後 貯存三 個月
酸價(mg KOH/g)	2.59	2.61	2.65	3.07	2.27	2.76
過氧化價(meq/kg)	17.37	15.71	15.33	16.57	15.52	16.11

