

編號：CCMP95-RD-029

加馬線分解中藥材人參中殘留有機氯農藥之照射平台建立及其安全性評估

周鳳英

國立清華大學 原科中心 同位素組

摘要

人參在東、西方國家常以單方形式入藥及做為食療補品，其價位高且近年來銷售量皆居北美草藥市場之前茅。因全球性的農藥不當使用，已造成農地之大量污染，尤其是有機氯農藥（organochlorine pesticides, OPCs）所需分解期長、多為脂溶性，可經由食物鏈而積聚於生物體中，因具致腫瘤、致畸胎等毒性，我國衛生署及美國 FDA 已規定不得測出或必須低於其低限值。有機氯農藥雖在部分國家已被禁用，但人參等中藥材中常可測得其殘留，是急需解決之問題。

本計畫以人參中藥材為標的，將加馬線照射應用於分解中藥材中殘留之有機氯農藥。以濃度為 0.5ppm 之 Endrin、Lindane、Endosulfan-1、Endosulfan-2、Heptachlor、Heptachlor epoxide、Aldrin、Dieldrin、p,p' -DDE、p,p' -DDD、o,p' -DDD、p,p' -DDT 12 種有機氯農藥進行加馬線照射，結果顯示加馬照射對上述有機氯農藥皆具分解效果，且農藥之分解效率隨照射劑量增高而增加。濃度 100 ppm 之有機氯殺菌劑（PCNB）經 5、10、15 kGy 照射後殘存濃度分別為 23.1、2.4 及 1.23 ppm，20 kGy 照射後 PCNB 殘存濃度已低於偵測值。經輻射照射後之 PCNB 對白絹病原菌（*Sclerotium rolfsii*）菌落之生長抑制（ED₅₀）毒性有明顯下降。以 MTT 法測試，顯示添加於人參之 PCNB 經輻射照射處理後，對 L929 纖維細胞毒性稍有下降。人參樣品經 10、15、20 kGy 照射後，進行 Rb1、Rg1、Re、Rc、Rd 指標成分分析，顯示 15 kGy 照射對指標成分不會造成影響，20 kGy 照射指標成分約有 3~7% 下降。

本研究證實加馬線照射可安全、有效分解人參之有機氯農藥並保

有其有效成份，除以提高人參的經濟價值及使用安全性外，並可做為未來其他中藥材農藥分解之技術平台。

關鍵詞【至少三項】：人參、中藥材、有機氯農藥、加馬線照射、指標成分

編號：CCMP95-RD-029

Set up an irradiation-operation system to degrade organochlorine pesticides in ginseng Chinese medicine with safety evaluation

F. I. Chou

Nuclear Science and Technology Development Center,
National Tsing Hua University

ABSTRACT

Ginseng has antioxidant and anticancer capacity, and is able to improve human immune system and blood circulation so it has been used as herbal medicine or functional food in Asia and westernized countries. However, due to the global soil contamination of organochlorine pesticides (OCPs) and their hydrophobic properties, OCPs accumulate inside organisms through the food chain and then cause cancer development. The current FDA standard of PCNB, a common fungicide used in the cultivation of ginsengs, is less than 0.01 ppm or undetectable.

The objective of this project is to investigate the feasibility of utilizing gamma irradiation to eliminate OCPs from ginseng. Twelve OCPs, including Endrin, Lindane, Endosulfan-1, Endosulfan-2, Heptachlor, Heptachlor epoxide, Aldrin, Dieldrin, p,p'-DDE, p,p'-DDD, o,p'-DDD, and p,p'-DDT were treated with different doses of gamma irradiation (0, 5, 10, 15, 20, and 25, and 30 kGy). After irradiation, OCPs were extracted and measured by GC/MS. Results showed that the degradation efficiency was related to the dosage of gamma irradiation. The amount of 100 ppm PCNB after the exposure to 5, 10, and 15 kGy were 23.1, 2.4, and 1.23 ppm, separately. After 20 kGy treatment, PCNB residue was undetectable.

Ginseng samples spiked with pentachloronitrobenzene (PCNB) were treated with different doses of gamma irradiation (0, 5, 10, 15, 20, and 25 kGy). After irradiation, PCNB were extracted and measured by GC/MS, and the changes of ginseng compositions were determined by measuring the amount of ginsenosides (Rb1, Rc, Re, Rd, and Rg1) with the use of HPLC. Moreover, MTT assay were used to compare the cytotoxicity of ginseng samples spiked with PCNB on L929 cells before and after gamma irradiation. In order to evaluate the microbial inhibition ability of PCNB, PCNB was added into PDA growth medium for *Sclerotium rolfsii* to calculate effective dose ED50 of PCNB. By comparing the ED50 of PCNB before and after gamma irradiation (0, 10, and 20 kGy), the efficiency of gamma irradiation on reducing the toxicity of PCNB was evaluated. Moreover, the ED50 value of gamma-treated PCNB to *Sclerotium rolfsii* was significantly lower than the untreated PCNB. In the MTT assay, the cytotoxicity of the gamma irradiation -treated PCNB to L929 cells was lower than that of untreated PCNB. In addition, 15 kGy of gamma irradiation did not reduce the amount of ginsenosides and 20 kGy of gamma irradiation only caused a reduction about 3~7%.

In this study, we developed the most efficient method to eliminate PCNB from ginseng with the reserve of active compositions and therapeutic efficacy of ginsengs. This developed method can improve the economic value and safety of ginseng.

Keywords : Ginseng, Chinese medicinal herbs, organochlorine pesticides, gamma-irradiation, Ginsenoside

壹、前言

中藥材之重金屬、農藥殘留影響中藥用藥安全，使之較難為開發國家所接受(Edzard, 2002)。如何解決中藥材農藥殘留的問題且不影響中藥材成分，是中醫藥行業需面臨的問題。利用現代科技改善中藥品質，發展簡易、安全、無毒有效的有機氯農藥分解或去除方法，可助中藥產業成為我國一個新的經濟增長點。由於數十年來全球各地用於滅蟲、滅菌及消滅嚙齒類動物之農藥大量被使用，多數耕地已遭受污染(Colosio et al., 1999; Contreras Lopez, 2003)。其中有機氯農藥多為脂溶性且具長效性，於土壤中難以分解，因生物性的濃縮使許多中藥材中有高於限值之農藥積聚，多種有機氯農藥可於人體脂肪組織長期積聚(Przyrembel et al., 2000)，因而具致腫瘤、畸型等毒性(Snedeker, 2001; Starek, 2003; Tanabe, 2002)，是需迫切解決的問題。

中醫藥委員會於九十二年向行政院提出「建構中藥用藥安全環境五年計畫」並於九十三年一月開始執行。冀以能切實維護臺灣每年數百萬中草藥消費者之用藥安全，若能順利推動完成將是國內中醫藥邁向品質保證的一大里程碑(林宜信, 2004)。本研究為發展中藥材人參中有機氯農藥殘留之去除方法，評估農藥去除效率及對中藥材主成分、有效性及毒性之影響，建立分解中藥材中有機氯農藥殘留之技術平台。加馬線與照射物之作用性質基本上與 X-ray 相似，正如同 X-ray 照射不因人體個子大小而受影響，藥材體型大小亦不受影響，且不會於照射物上殘留放射性。將加馬線照射應用於人參中藥材殘留有機氯農藥之分解研究，建立最適照射條件，期以簡單、不需使用有機溶劑萃取、同時有效去除中藥材中多種有機氯農藥之方法，於不影響中藥材成分下，解決中藥材有機氯殘留之用藥安全問題，以提高中藥材之實用經濟價值。

據分析報導人參植物之根部含有多種有效成分，但其中以 ginsenoside 被認為是最具藥物活性之部分，目前約有 30 種不同的 ginsenoside 被鑑別出具有各種不同的藥物特性(Anoja et al., 1999; Lee et al., 2005)。人參為常用的中藥及補品，於神農本草經上評為主補五臟之陽氣主藥，可安神，祛除滲入五腑之病氣，可明目健腸，久服則健身延年。人參具有抗氧化、抗腫瘤作用，並已用於高血糖、糖尿病之治療(Chang et al., 1999; Xie et al., 2005)，在藥理上已有相當程度的研究(Anoja et al., 1999)。人參可降低輻射照射後淋巴球中 micronucleus (小核)之產生(Lee et al., 2004^a)，餵食人參之大鼠，可提高心肌中超氧自由基捕獲酵素(SOD)之生成，並減少過氧化物之

產生及蛋白質之氧化(Fu and Ji, 2003)。研究並證實人參可以調節 SOD 基因之表現 (Kim et al., 1996)。人參萃液對人類 SK-N-MC 細胞因 PCB-52 (polychlorinated biphenyl) 所引起的細胞凋亡 (Apoptosis) 有保護效果(Lee et al., 2004^b)。體外及體內實驗皆證實人參具有抗氧化效果，因其具捕獲自由基之能力，可防止自由基對 DNA 之傷害及脂質之過氧化 (Kim et al., 2002)，並可調節免疫能力 (Wang et al., 2004)，已用於心臟病之病人及輻射治療後之病患，以減少正常細胞之傷害 (Lee et al., 2005)。基於人參之用量大、經濟價值高，卻經常測得有機氯農藥殘留，對消費者之使用安全造成威脅，故本研究選擇人參發展有機氯農藥之去除方式。

有機氯農藥的化學結構及毒性大小雖各不相同，但它們的理化性質基本相似。例如：揮發性低、化學性質穩定、不易分解、易溶於脂肪和有機溶劑等 (郝與薛，2005)。因有機氯農藥具毒性且會經由生物濃縮在哺乳動物體累積 (Aguilar et al., 2002)。有機氯農藥如，HCB、 α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC、PCNB、p,p'-DDE、o,p'-DDT、p,p'-DDD、p,p'-DDT 等除 γ -BHC 外皆不易溶於水，可因生物積聚與濃縮長期積聚於脂肪組織中，具劇毒或致腫瘤等毒性，有報導指出乳癌病患之脂肪組織中測得有機氯農藥 (Przyrembel et al., 2000)。美國、歐盟等國家皆以設立專門機構對多種樣品中的有機氯農藥殘留量進行限定，例如日本藥局方中規定總 DDT (o, ρ -DDT, ρ, ρ' -DDT, ρ, ρ' -DDD, ρ, ρ' -DDE) 限量為 0.2 ppm、總 BHC (α -, β -, γ -, δ -) 限量為 0.2 ppm；美國 FDA 亦對各項食品中之 DDT/DDE/DDD 之限量詳細規定，如加工後之乾製品 DDT 限量為 1.25 ppm、穀類限量為 0.5 ppm、豆類限量為 0.2 ppm (ATSDR, 2002)。DDT 會影響人體神經中樞及肝臟之功能 (Jaga and Dharmani, 2003)，已被全球四十九個國家禁止使用。我國亦陸續評估並禁用多種有機氯農藥，如於民國 63 年 7 月 1 日起禁用滴滴涕 (DDT)、民國 64 年 10 月 1 日起禁用蟲必死 (BHC)、民國 74 年 2 月 1 日起禁用靈丹 (γ -BHC, Lindane)、民國 79 年 7 月 1 日起禁用五氯硝基苯 (PCNB)。

本研究初步探討加馬照射應用於多種有機氯農藥分解之有效性，期同時去除多種有機氯農藥，並以人參中最常測得之有機氯農藥，五氯硝基苯(PCNB)，添加於人參中，探討加馬線照射劑量對 PCNB 有機氯殺菌劑之分解效果，照射後 PCNB 分解物之抑菌效率、細胞毒性、及所需加馬照射劑量對人參指標成分之影響，解決中藥材有機氯農藥殘留之用藥安全醫療保健相關問題。

貳、材料與方法

1、人參採樣

本研究所使用之人參為西洋參 (*Panax quinquefolium*) 之乾燥根部，向進口商採購中國大陸栽植生產之西洋參全參，並由中國醫藥學院張永勳教授進行種原鑑定後進行研究。

2、有機氯農藥之加馬照射及分解效率測試

受測之有機氯農藥為 Endrin、Lindane、Endosulfan-1、Endosulfan-2、Heptachlor、Heptachlor epoxide、Aldrin、Dieldrin、p,p'-DDE、p,p'-DDD、o,p'-DDD、p,p'-DDT 12種，將有機氯農藥配製於n-hexane溶液中，溶液中含上述12種有機氯農藥濃度各為0.5 ppm。取此農藥標準品分裝至玻璃樣品瓶中，每瓶各1 mL。於清華大學原科中心鈷六十照射熱室進行照射，將裝有農藥之玻璃樣品瓶置於距離射源特定距離的照射架上，照射架以每分鐘15轉旋轉，使照射之樣品得到均勻的輻射劑量率(劑量率為5 kGy/h)，照射溫度為室溫(25±3°C)，樣品經不同照射時間取樣，以得到0、5、10、15、20及25 kGy之輻射劑量。以氣相層析儀(GC)分析，用μECD偵測經不同劑量照射後上述綜合農藥標準品中之各農藥之殘存量。

PCNB有機氯農藥標準品係分別以2及100ppm進行上述之加馬線照射後，以色層分析質譜儀(GC/MS)分析其受加馬線照射之分解效率及分解產物。

3. 人參樣品之 PCNB 有機氯殺菌劑添加及加馬線照射及農藥殘存分析

所使用之有機氯農藥為PCNB；為使PCNB於人參藥材中均勻分佈，將人參樣品先以粉碎機進行粗粉碎(粒徑約為850μm)。取3 g人參粗粉碎之粉末樣品加入上述PCNB(in 90% MeOH)混合均勻，再將此含PCNB之人參樣品，分散加入12 g之人參粉末中，使成含有10 ppm PCNB有機氯農藥之人參樣品，共15g，以夾鏈袋包裝於室溫靜置，袋口未封隔夜後(16小時)，密封袋口，如上述方法進行加馬照射，照射劑量為0、5、10、15、20 kGy，各劑量處理皆為三重複。

人參中PCNB之萃取，係取經上述處理後之人參粉末樣品各15克，分為三重複(每一樣品各5克)，先以70%丙酮水溶液萃取，將萃液過濾後減壓濃縮去丙酮，加入鹽酸及正己烷定量成100 mL，

使PCNB分配至有機層，加入矽酸鎂去色素純化，再減壓濃縮抽乾後，以正己烷定量成5 mL，離心後取1 mL於GC中測PCNB含量，以濃度為10 ppm之上述PCNB有機氯農藥為定量分析之標準品，求取經上述步驟由人參中萃取PCNB之效率，將所測得之PCNB濃度除以萃取率，取得受測人參中之PCNB有機氯農藥濃度。

4. 人參加馬照射前、後之指標成分分析

上述添加農藥標準品之人參樣品於經上述之0、5、10、15、20 kGy加馬線劑量照射後進行指標成分分析。精確稱重5克樣品加入70%甲醇50 mL，加熱迴流15分鐘，過濾；殘渣再加70%甲醇50 mL，加熱迴流15分鐘，過濾；合併兩次濾液，加入甲醇定量至100 mL，混勻後取2.5 mL加70%甲醇稀釋到10 mL，再經0.22 μm 濾膜過濾後，每次取10 μl 注入高效液相層析儀(HPLC)中進行樣品成分分析。分析管柱為矽基質逆相碳18管柱，檢測之紫外光波長為203 nm。移動相為氬甲烷與磷酸溶液，經0.45 μm 濾膜過濾後，以流速1.0 mL/ min於30°C下進行分析。以人參皂甘Ginsenoside Rb1、Rg1、Re、Rc、Rf為人參之指標成分，將之配成濃度為500 $\mu\text{g/mL}$ 之標準品，計測人參樣品中之指標成份含量。

5. 含有機氯農藥人參加馬照射前、後之 L929 細胞毒性測試

a. 人參萃液製備

取添加 PCNB 之人參粉末，於未照射處理前及照射 10kGy 處理後，分別均勻秤取 10 g，加入二次水 100 mL，隔水加熱至沸騰萃取 1 小時，以 6000 rpm 離心 5 分鐘後，取上層液以 1 號濾紙 (Whatman) 過濾，將濾液裝於 100mL 定量瓶中，加入二次水定量至 100 mL 後混勻，分裝至離心管中，置於-20°C 冷凍備用 (萃液濃度為：100 mg 原人參粉末/mL 萃液)。各萃液於使用前經 0.22 μm 濾膜過濾成無菌萃液，再以無菌之 PBS 做適當稀釋，進行細胞型態觀察及細胞毒性測試。

b. 老鼠纖維母細胞 (L929 mouse fibroblasts cell) 之培養

本研究之細胞毒性測試依中央標準局 CNS14393-5 之規定進行，由食品工業研究所購得 CCL1 (NCTC clone 929) 細胞株進行藥物毒性測試，所使用的培養基係採用 Minimum essential medium (MEM, Gibco)，加入抗生素(100 U/ml penicillin、100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin、0.25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B)、2 mM L-glutamine、0.1mM non-essential amino acids、0.1mM sodium pyruvate 及 0.15 % w/v 碳酸氫鈉，混合均勻並調整酸鹼度至 pH

7.2，加入以 57 °C 加熱 30 分鐘去酵素活性之無菌馬血清（10% horse serum），以 0.2 μm 孔隙之濾膜過濾除菌，即為 CMEM 完全培養基。培養瓶之細胞加入 CMEM 培養基後，移至含 5 % CO_2 及 95 % 相對濕度之 37 °C 恆溫培養箱中培養。每隔二天換以新鮮的 CMEM 完全培養基，約 4~5 天後細胞長成 90% 滿度之單層細胞。細胞之繼代培養是以胰蛋白酶(trypsin/EDTA-4Na)處理，待細胞懸浮後離心收集，以培養基做適當稀釋後，種植於 24well 培養盤中（每一 well 約 4×10^4 個細胞）供進行細胞毒性實驗用。細胞貯存時，係懸浮於含 10 % DMSO 之完全培養基中，於液態氮中冷凍貯存。

c. 人參萃液處理後之細胞型態觀察

將上述均勻分散於培養盤中繼代培養之細胞，約經 24 h 待細胞貼妥後，取添加 PCNB 且經不同輻射劑量照射之人參萃液，以 PBS 稀釋成不同濃度後處理細胞，以加入同體積之 PBS 者為對照組，於 48 h 後置於倒立式顯微鏡下觀察其生長狀態。

d. 細胞毒性之分析

以 MTT 法測定上述方法中添加 PCNB 且經不同劑量照射後人參萃液之細胞之毒性（Fischer, 2003）。MTT 法是一種快速呈色法，由於細胞還原 MTT 的能力代表細胞粒腺體的活性，因此可做為細胞存活率之指標。將對數生長 (exponential growth) 之 L929 細胞，利用胰蛋白酶處理下來，均勻分散至 24 well 培養盤中經 24 小時培養後，以不同濃度之人參萃液添加於 L929 細胞中。經 48 小時培養後，以 PBS 清洗細胞二次，每一 well 中加入 900 μl 培養液及 100 μl 新鮮配置並以 0.22 μm 濾膜過濾之 MTT 溶液(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl- tetrazolium bromide, 5mg/ml, Sigma)，置於培養箱中 4 小時後，吸去上清液，加入 DMSO (1ml/well, Merck)，置振盪器上振盪，至顆粒溶解為止，用 ELISA reader 讀取波長為 570 nm 下之吸光值 (OD)，OD 值為 4~5 well 之平均值。

6. 輻射照射後之人參粉末之貯存穩定性測試

取添加有機氣農藥之人參粉末以 PE 袋包裝，以最適去農藥之照射劑量處理，另以未經照射者為對照組，將其於室溫下進行貯存，觀察其外觀、顏色變化，經 3 個月貯存後取出測定人參粉末之指標成分含量。

7. 加馬照射對 PCNB 抑菌劑之抑菌效率 (ED₅₀) 影響測試

PCNB常用為*Sclerotium rolfsii*真菌之殺菌劑，故以*S. rolfsii*菌株進行加馬線照射對PCNB之抑菌效率衰減測試。*S. rolfsii*菌株係以potato dextrose agar (PDA, Difco.)培養，PDA培養基之配製為秤取 39g PDA粉末於三角瓶中，先以少量水混合溶解，再加入水定量至1公升，以121°C加熱15分鐘滅菌，取出冷卻至約50°C時分裝至9 cm 之培養皿中，每皿約15 mL，待冷卻固化後冷藏備用。

PCNB 係溶於甲醇中，待滅菌後之 PDA 溫度約降至 50°C 時加入其中混勻（培養基中之最終甲醇濃度為 0.05% (v/v)），分裝至 9.5 cm 之培養皿中，每皿約 15 mL，培養基中之 PCNB 濃度為 10、8、6、5、4、3、2、1 μg/ml，待冷卻固化後備用。PCNB 之抑菌測試 (ED₅₀) 是將於 PDA 培養基中旺盛生長之 *S. rolfsii* 菌絲塊取 0.5 cm² 移入上述添加不同濃度 PCNB 之 PDA 培養皿中，將培養皿置於 26°C 下培養 72 小時，量取菌落直徑，菌落生長直徑以 mm 為單位。與未加農藥之對照組比較，造成菌落直徑 50% 生長抑制之藥物濃度定為 ED₅₀ (μg/ml) 值。加馬線照射前、後之 PCNB 毒性，係以其對真菌菌株 *S. rolfsii* 之菌落生長抑制百分比 (percent inhibition of mycelial growth on agar) 估算，估算式為：

$$100\% - \left[\frac{(\text{colony diameter on amended medium})}{(\text{colony diameter on control})} \times 100\% \right]$$

參、結果

1. 有機氯農藥之加馬照射分解測試分析

受測之有機氯農藥為 Endrin、Lindane、Endosulfan-1、Endosulfan-2、Heptachlor、Heptachlor epoxide、Aldrin、Dieldrin、p,p'-DDE、p,p'-DDD、o,p'-DDD、p,p'-DDT 12種，將有機氯農藥配製於n-hexane溶液中，溶液中含上述12種有機氯農藥濃度各為 0.5 ppm。樣品經0、5、10、15、20及25 kGy照射後，以氣相層析儀 (GC) 分析經不同劑量照射後上述農藥之各別殘存量。

結果如圖一所示為上述12種有機氯農藥經0、5、10、15、20、25 kGy加馬線照射後之GC圖譜，各有機氯農藥濃度經加馬線照射後皆明顯下降，圖二所示為各有機氯農藥降解百分率與加馬照射劑量之相關性，圖中可見各有機氯農藥之殘留百分比隨著照射劑量上升而下降。雖然經特定之加馬劑量照射後，各有機氯農藥之

降解效率不一，但由圖二中可見經10kGy照射後僅有Endrin之殘存率仍大於50%，其餘各受照射之有機氯農藥之殘留率皆小於50%，而經25kGy照射後Lindane、p,p'-DDT、Endosulfan-2之殘存率皆低於20%，表一所示為上述各有機氯農藥以約0.5ppm之濃度經不同劑量加馬線照射後之殘存濃度，經15kGy照射後o,p'-DDD、p,p'-DDT及Endosulfan-2之濃度已低於0.2ppm；經20kGy照射後僅有3種農藥之濃度高於0.2ppm；經25kGy照射後各有機氯農藥之殘存濃度皆低於0.2ppm。

於進行有機氯殺菌劑PCNB之加馬線照射分解測試時，因人參藥材中之含水量約為10%，為與添加入人參者相比對故將PCNB（Supelco, Bellefonte, PA, USA）配製於90% methanol水溶液中。將分別含2及100 ppm PCNB之90% methanol溶液分裝至玻璃樣品瓶中，每瓶1 ml於照射熱室進行照射，經不同照射時間取樣，以得到0、5、10、15、20、25 kGy之輻射照射劑量。進行GC分析結果如圖三所示，可見經照射後PCNB有機氯農藥之濃度隨著劑量上升而下降，2 ppm之PCNB經15 kGy照射後PCNB殘餘量為2.79%（濃度為0.056 ppm），經20 kGy照射後PCNB之濃度已低於偵測值。顯示加馬線照射對有機氯農藥有良好的分解效果。

以100 ppm之PCNB經5、10、15 kGy之加馬線照射後所得之濃度分別為23.1、2.4及1.23 ppm，當照射劑量達20 kGy時PCNB之濃度已無法測得（圖三）。圖四所示為PCNB經0、5、10、15、20、25 kGy加馬線照射後GC/MS分析之圖譜，圖A為未經照射者於8.66 min處所示為PCNB（偵測值為8648），於9.52 min處有少量之Pentachloroaniline（PCA，偵測值為206），此PCA可能為PCNB受光分解之產物，圖B為PCNB經5 kGy照射之圖譜，圖中PCNB之偵測值降為1998，為未照射前之23%，而分解產物PCA之存量偵測值大量提升為1300；圖C為PCNB經10 kGy照射後之圖譜，PCNB之殘存量降為未照射前之2.4%，而分解產物除9.5 min處之PCA外尚有二波峰形成，於7.57 min處者為Tetrachloro-5-nitrobenzene（TCNB），於7.84 min處之產物為Tetrachloro-benzenamine（TCBA）；圖D所示為PCNB經15 kGy照射後之圖譜，此時PCNB之偵測量已降至70為未照射濃度之1.23%，並於7.79、8.85 min處出現TCBA之同分異構物，圖E所示為PCNB經20 kGy照射後之圖譜，圖中已無顯示PCNB及TCNB之峰（peak）；而當照射劑量達25

kGy時，如圖F所示，除PCNB及TCNB之波峰不見外，並於6.20、7.20 min處出現Trichlorobenzeneamine (TriCBA) 之峰。

2. PCNB 殺菌劑添加於人參樣品經加馬射線照射後之 PCNB 殘存濃度及人參指標成分分析

受測之PCNB係配製於100% Methanol中。取PCNB methanol溶液，以噴霧方式均勻加入人參樣品中；人參樣品中PCNB之濃度為10 ppm，每一劑量皆三重複，以未經照射者為對照組。

將含PCNB之人參樣品經加馬線照射後，均勻秤取各5 g進行有機氯農藥含量分析。以濃度為10 ppm之上述PCNB有機氯農藥為分析標準品，求取經上述步驟由人參中萃取PCNB之效率，將所測得之PCNB濃度除以萃取率，取得受測人參中之PCNB有機氯農藥濃度。結果經5、10、15、20、25kGy照射後人參中殘留之PCNB含量分別為8.21、6.0、5.0、3.57、0.39 ppm，顯示人參中之PCNB分解率隨加馬照射劑量而上升，加馬線照射對人參中有機氯農藥有良好的分解效果。

3. 人參樣品中之指標成分分析

取未經加馬線照射及經5、10、15、20 kGy加馬線照射後之人參樣品進行指標成分分析，以未經加馬線照射者為對照組。樣品萃取後以矽基質逆相碳18管柱，進行指標成分分析，人參指標成分為Ginsenoside Rb1、Rg1、Rc、Rd、Re，計測人參樣品樣品經不同加馬線照射後之指標成份含量。表二所示為未經照射及經10、15、20kGy加馬線照射之人參樣品萃液，以HPLC測定其主要成份Ginsenoside Rb1、Rg1、Rc、Rd、Re 之含量。結果顯示，經10、15 kGy照射後人參中之ginsenoside 成分並無顯著變化，而經20 kGy劑量照射後5種人參指標成分含量減少約6 至10 %，顯示加馬線照射可提供一有效方法減低人參中之上述有機氯農藥含量，且不顯著影響人參皂苷Ginsenoside Rb1、Rg1、Rc、Rd、Re 指標成分含量。

4. 加馬照射後 PCNB 有機氯殺菌劑之抑菌生物毒性測試

加馬線照射前、後PCNB殺菌劑之生物毒性，係以其對真菌菌株，*Sclerotium rolfsii*，之菌落生長抑制毒性評估。*S. rolfsii*係培養於馬鈴薯培養基 (potato dextrose agar, PDA) 中，含PCNB培養基之配製，係將溶於90 % methanol之PCNB經0、10及20 kGy加馬劑量照射後，於待PDA滅菌後溫度約降至60°C時加入其中，培養基

中之最終methanol濃度為0.05 % (v/v)，培養基中之PCNB濃度分別為1、2、3、5、6、8、10 $\mu\text{g/ml}$ 。將於PDA培養基中旺盛生長之菌絲塊取0.5 cm^2 移入含不同濃度PCNB之PDA的培養皿（直徑90 mm）中。將上述培養皿於27°C下培養3天，菌絲生長直徑係以實際量測直徑扣除中央菌絲塊所得，以mm為單位。與未加農藥之對照組比較，造成50 %生長抑制之藥物濃度定為ED₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) 值。圖五顯示*S. rolfsii*於含不同濃度PCNB之生長情形，結果顯示隨濃度增加微生物生長抑制越明顯，添加2ppm 未經照射之PCNB者其生長已降為未加PCNB之30 %，至PCNB濃度為5ppm時已達100 %的生長抑制。而經10kGy與20kGy照射之PCNB濃度為2ppm時生長情形均高於90 %，而其對*S. rolfsii*之完全生長抑制之濃度分別為7.0 ppm 及 8.0 ppm。計算未經照射之PCNB對*S. rolfsii*之ED₅₀為1.7 ppm，經10kGy劑量照射後之PCNB對*S. rolfsii*之ED₅₀為3.4 ppm，為未經處理的2倍濃度，而經20kGy劑量照射後之PCNB對*S. rolfsii*之ED₅₀為4.6 ppm。圖六為顯示3ppm之PCNB於照射前後對*S. rolfsii*菌株之菌落生長抑制效應之差異，以生長於PDA培養基尚未添加PCNB為比較。*S. rolfsii*菌落生長於27 °C培養72小時後觀察，圖六A為*S. rolfsii*生長於未經添加PCNB之PDA培養基，可見菌絲有良好之生長，菌落已達70 mm；圖六B為*S. rolfsii*培養基添加3 ppm PCNB對*S. rolfsii*生長已受抑制，菌落無明顯增長，圖六C、D分別為*S. rolfsii*培養於添加經10、20kGy劑量照射後含PCNB之培養基中，菌落大小分別為32 及57 mm，顯示隨照射劑量增加PCNB對*S. rolfsii*的生長之生物毒性明顯降低。

5. 含 PCNB 有機氯農藥人參加馬照射前、後之 L929 細胞毒性測試

以 MTT 方法測試含不同濃度 PCNB 之人參的萃液對 L929 細胞之毒性。取繼代培養之 L929 細胞，定量種植於 24well 培養盤。將 24 well 培養盤中繼代培養之 L929 細胞更換新鮮培養液（800 $\mu\text{l/well}$ ）後，將未經照射及經 10kGy 照射之含 PCNB 人參所得之萃液經適當稀釋分別加入 200 μl ，使培養盤中最終人參濃度皆為 5mg/ml 且 PCNB 濃度為 0、1、2、3、4、5、10 ppm，於 37°C、5% CO₂ 下培養 2 天，期間不更換培養液，每一濃度以 4 個 well 進行 4 重複測試，並皆以添加無菌 PBS 者為對照組。上述細胞經培養 2 天後，以 MTT 法進行細胞毒性測試，以 PBS 清洗細胞二次後，加入 900 μl 培養液及 100 μl 新鮮配置之 MTT（5mg/mL）溶液，並以沒有細胞之 well，同時加入上述相同之培養液及 MTT 試

液當作背景值，培養 4 小時後吸去上清液，加入 1ml/well 二甲基亞風，用 ELISA reader 讀取波長為 570 nm 的吸光值。圖七為使用 MTT 方法檢測以含 PCNB 人參之萃液處理細胞後經 2 天培養之測試結果，以不加藥處理者之吸光值訂為 100%，估算各處理之細胞存活率。結果發現含 PCNB 之人參經加馬線照射後其萃液毒性較未照射者為低。人參中添加之 PCNB 濃度達 10ppm 者，其萃液對細胞已具毒性。但上述含 PCNB 之人參若經 10kGy 之輻射照射可減輕其細胞毒性。

肆、討論

本研究是將加馬線照射應用於中藥材殘留有機氯農藥之分解，證實其有效性，並以微生物測試證實有機氯殺菌劑農藥經加馬線照射後已降低其生物毒性。目前已有許多市售中藥材之農藥含量被偵測出高於限值，人參具抗氧化、抗癌、調節免疫力之功能，無論在亞洲或歐美國家皆大量使用，佔美國中草藥市場之第二位且價格高。農藥污染是人參等中藥用藥安全上之極大問題，本研究以人參為模式，進行有機氯農藥去除探討，發展加馬線輻射分解法，建立分解中藥材中農藥殘留之技術平台，期解決中藥材有機氯農藥殘留之問題。五氯硝苯為人參藥材殘留率較高之殺菌有機氯農藥，農藥殘留將影響使用者之健康，目前仍無有效、簡便去除大量原中藥材中農藥之方法保報導。中草藥通常為乾燥化之植物組織，農藥於中草藥表面或組織內部滯留，清除不易，尤以人參等多年生植物常有有機氯農藥積聚於植物組織之內部，清洗方式對有機氯農藥之去除率低。雖然有報告以超臨界液態萃取方式用於粉狀中藥之農藥萃取去除，但對於較大體積之大量原藥材中有機農藥去除仍無適當方法。加馬線照射曾用於分解土壤中之污染物，但將加馬線照射應用於分解中藥材中積聚殘留之有機氯農藥則未見報導。加馬線照射使用於滅菌處理已有許多國家認可，有文獻發表 10kGy 以下的加馬線照射可使人參達滅菌效果。1999 年 WHO 發表使用於食品照射之劑量在消費安全及營養適當性上皆無虞的。

本研究是將加馬線照射應用於分解中藥材人參中殘留之有機氯農藥，研究以 Endrin、Lindane、Endosulfan、Heptachlor、Heptachlor epoxide、Aldrin、Dieldrin、p,p'-DDE、p,p'-DDD、o,p'-DDD、p,p'-DDT、o,p'-DDT 12 種有機氯農藥進行加馬線照射，探討其受加馬線照射之分解效率。

有機氯農藥的分解可經由化學或生物的方式緩慢分解 (Langlois et al., 1970)。研究證實日光、紫外線、加馬線照射等方式處理可加速 DDT、2,4'-D 等有機氯農藥之降解 (Arkhipova et al., 1997; Bojanowska-Czajka et al., 2005; Jang et al., 2005; Poster et al., 2003; Tao et al., 2002; Zona et al., 2002)。有機氯農藥光分解反應中氫氧自由基造成含氯農藥分解之化學反應，係以 electrophilic addition 之作用選擇性攻擊農藥苯環中所接之氯原子，機制已十分清楚報導 (Legrini et al., 1993; Zhang and Yu, 2004)。加馬線照射會產生大量氫氧自由基，可有效破壞有機氯農藥中之分子結構以降解之。

因中藥材中常測得同時有多種有機氯農藥殘存，為探討加馬線照射是否同時可對多種有機氯農藥達到分解效果，本研究將 12 種常見之有機氯農藥配製混合後同時進行加馬照射，結果顯示各受照射農藥之分解率皆隨受照射劑量而上升。雖各農藥間之輻射分解效率有顯著的差異，但 20 至 25kGy 之加馬照射各受照射農藥之濃度皆已低於 0.2ppm。加馬線照射可以分解中藥材中殘留之有機氯農藥且對受照射之中藥材人參達到滅菌效果，無須添加化學物質，受照射之中藥材不受體積大小及形狀之限制。本研究對人參及其殘留機率較高之有機氯殺菌農藥 PCNB 進行加馬射線照射，並以其對 *S. rolfsii* 真菌菌株之抑制生長 (ED_{50}) 濃度，探討 PCNB 經加馬線照射後之生物毒性變化，結果顯示加馬照射可有效分解 PCNB。經 15~20kGy 之加馬照射，PCNB 之濃度已低於偵測值。由 GC/MS 中可見 PCNB 加馬照射後之主產物為 PCA，有文獻報導 PCA 之生物毒性明顯低於 PCNB (Ko and Farley, 1969)；此與本研究 PCNB 照射後抑菌毒性下降結果相符合。

由本研究加馬照射分解中藥材中之有機氯農藥進行初步探討，已證實加馬線照射可以同時有效分解中藥材人參中之多種有機氯農藥，對 PCNB 進行照射後之生物毒性測試，顯示其接受照射後之生物毒性明顯下降，但有機氯農藥受加馬線之分解效率依各有機氯農藥特性而異，加馬線對有機氯農藥之分解除受照射劑量影響外，照射之劑量率、有機氯農藥之溶劑、含水量、濃度皆影響其分解效率。此外，各中藥材中主成分之輻射耐受性亦需詳加分析，方能將此技術應用於中藥材有機氯農藥分解。

伍、結論與建議

1. 完成研究生對於輻射照射、成分分析及藥物毒性檢測等之訓練。
2. 確認人參中有機氯農藥去除之最適輻射劑量。
3. 照射前、後之農藥分析及中藥成分分析等研究結果可發表於國際期刊。
4. 可作為其他中藥材有機氯農藥去除之輻射照射方法平台，將成果數據提供醫藥衛生政策之參考，並技轉於相關產業。

【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：CCMP95-RD-029）提供經費贊助，使計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

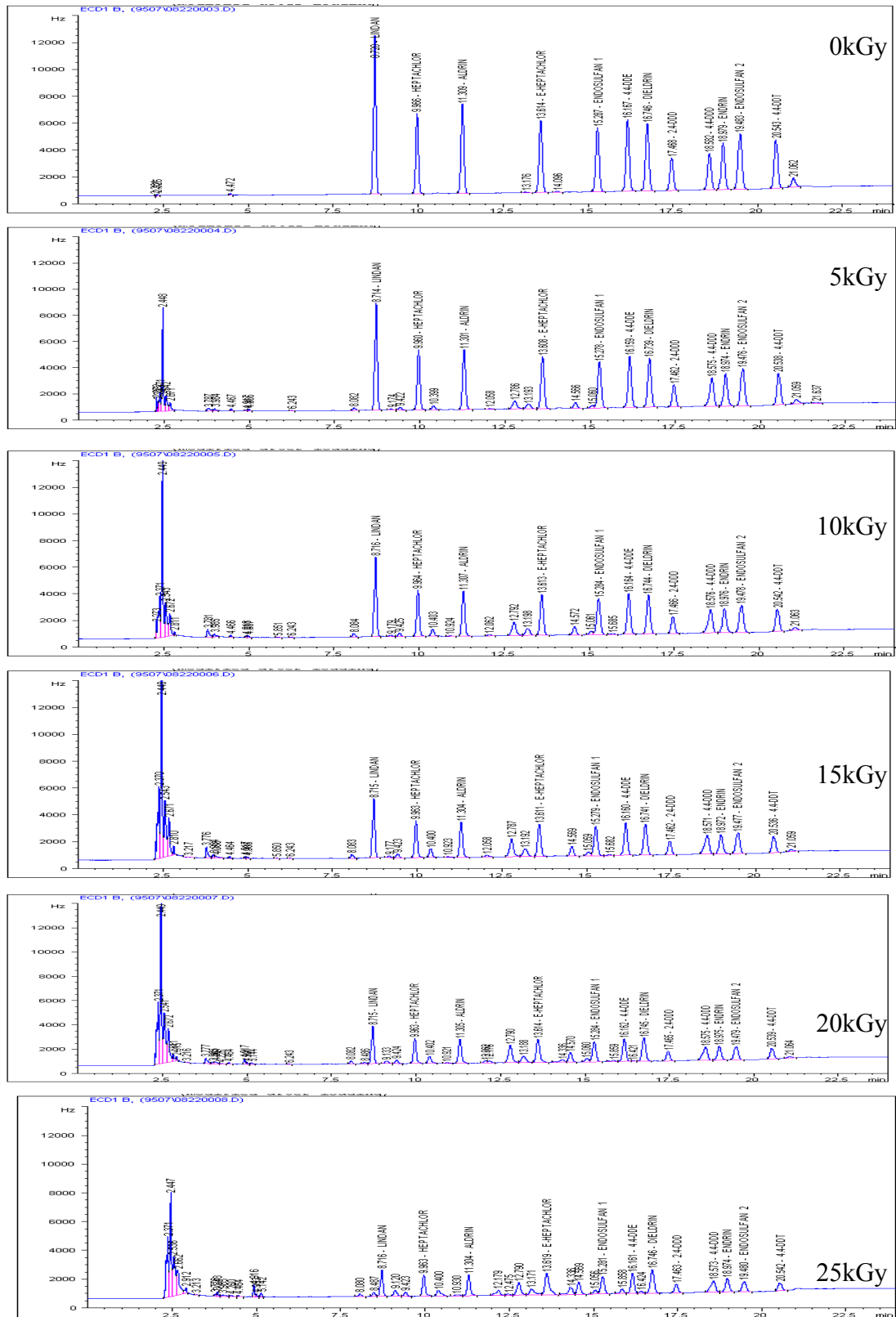
1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2002. Toxicological profile for DDT, DDE, DDD. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
2. Aguilar A, Borrell A, Reijnders PJ. 2002. Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals. *Mar Environ Res* 53(5):425-452.
3. Anoja S, Attele AS, Wu JA, Yuan CS. 1999. Ginseng pharmacology - Multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol* 58 (11): 1685-1693.
4. Arkhipova MB, Tereshchenko LY, Arkhipov YM. 1997. Photooxidative purification of water to remove organochlorine pesticide 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid). *Russian Journal of Applied Chemistry* 70 (12): 1930-1935.
5. Bojanowska-Czajka A, Drzewicz P, Kozyra C, Nalecz-Jawecki G, Sawicki J, Szostek B, Trojanowicz M. 2005. Radiolytic degradation of herbicide 4-chloro-2-methyl phenoxyacetic acid (MCPA) by gamma-radiation for environmental protection. *Ecotoxicol Environ Saf* [Article in Press].
6. Chang MS, Lee SG, Rho HM. 1999. Transcriptional activation of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase genes by panaxadiol ginsenosides extracted from *Panax ginseng*. *PTR, Phytother Res* 13 (8): 641-644.
7. Colosio C, Corsini E, Barcellini W, Maroni M. 1999. Immune parameters in biological monitoring of pesticide exposure: current knowledge and perspectives. *Toxicol Lett* 108(2-3):285-295.
8. Contreras Lopez MC. 2003. Determination of potentially bioaccumulating complex mixtures of organochlorine compounds in wastewater: a review. *Environ Int* 28(8):751-759.

9. Edzard E. 2002. Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. *Trends Pharmacol Sci* 23 (3): 136-139.
10. Fischer D, Li YX, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T. 2003. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24 (7): 1121-1131.
11. Fu Y, Ji LL. 2003. Chronic ginseng consumption attenuates age-associated oxidative stress in rats. *J Nutr* 133 (11): 3603-3609.
12. Jaga K, Dharmani C. 2003. Global surveillance of DDT and DDE levels in human tissues. *Int J Occup Med Environ Health* 16(1):7-20.
13. Jang SJ, Kim MS, Kim BW. 2005. Photodegradation of DDT with the photodeposited ferric ion on the TiO₂ film. *Water Res* 39 (10): 2178-2188.
14. Kim YH, Park KH, Rho HM. 1996. Transcriptional activation of the Cu, Zn-superoxide dismutase gene through the AP2 site by ginsenoside Rb₂ extracted from a Medicinal Plant, *Panax ginseng*. *J Biol Chem* 271 (40): 24539-24543.
15. Kim YK, Guo Q, Packer L. 2002. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology* 172 (2): 149-156.
16. Ko WH, Farley JD. 1969. Conversion of pentachloronitrobenzene to pentachloroaniline in soil and the effect of these compounds on soil Micro-organisms. *Phytopathology* 59 (1): 64-7.
17. Langlois BE, Collins JA, Sides KG. 1970. Some factors affecting degradation of organochlorine pesticides by bacteria. *J Dairy Sci* 53(12):1671-1675.
18. Lee TK, Allison RR, O'Brien KF, Khazanie PG, Johnke RM, Brown R, Bloch RM, Tate ML, Dobbs LJ, Kragel PJ. 2004a. Ginseng reduces the micronuclei yield in lymphocytes after irradiation. *Mutation Res* 557 (1): 75-84.
19. Lee JY, Kim JW, Cho SD, Kim YH, Choi KJ, Joo WH, Cho YK, Moon JY. 2004b. Protective effect of ginseng extract against apoptotic cell death induced by 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl in neuronal SK-N-MC cells. *Life Sci* 75 (13): 1621-1634.
20. Lee TK, Johnke RM, Allison RR, O'Brien KF, Dobbs LJ. 2005. Radioprotective potential of ginseng. *Mutagenesis* 20 (4): 237-243.

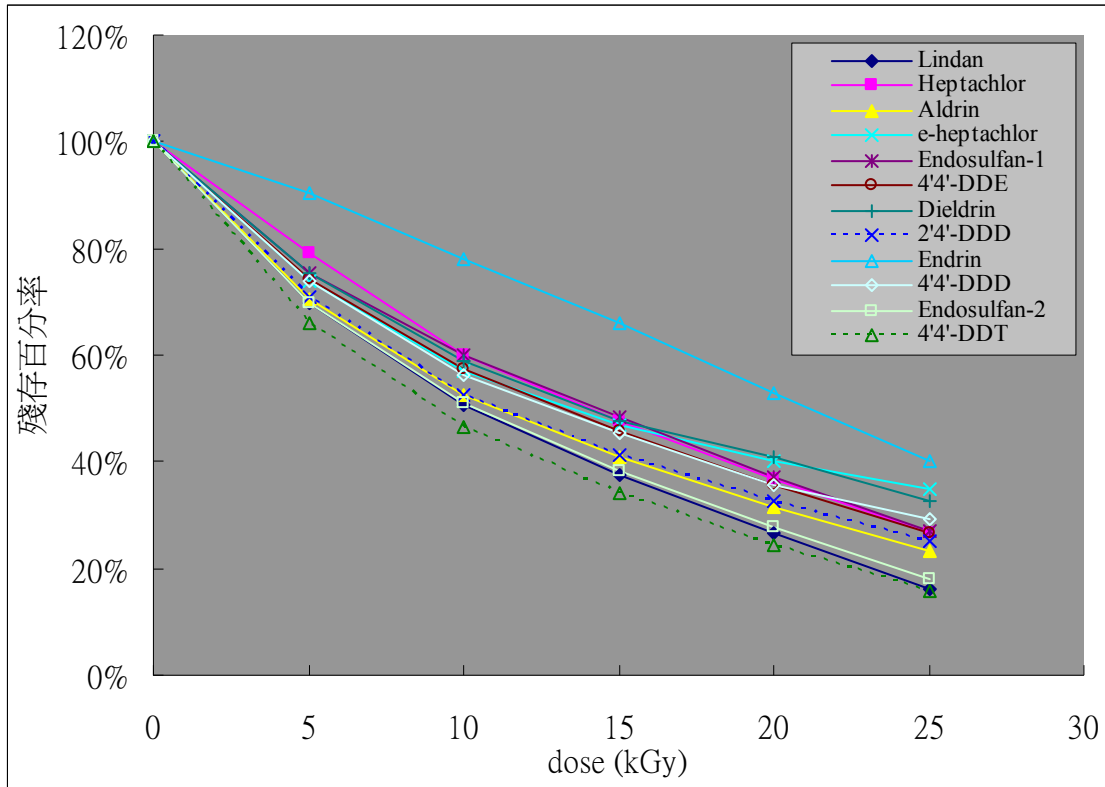
21. Legrini O, Oliveros E, Braun AM. 1993. Photochemical processes for water-treatment. *Chem Rev* 93 (2): 671-698.
22. Lippold PC, Cleere JS, Massey LM Jr, Bourke JB, Avens AW. 1969. Degradation of insecticides by cobalt-60 gamma radiation. *J Econ Entomol* 62(6): 1509-1510.
23. Poster DL, Chaychian M, Neta P, Huie RE, Silverman J, Al-Sheikhly M. 2003. Degradation of PCBs in a marine sediment treated with ionizing and UV radiation. *Environ Sci Technol* 37(17): 3808-3815.
24. Przyrembel H, Heinrich-Hirsch B, Vieth B. 2000. Exposition to and health effects of residues in human milk. *Adv Exp Med Biol* 478: 307-325.
25. Snedeker SM. 2001. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 1: 35-47.
26. Starek A. 2003. Estrogens and organochlorine xenoestrogens and breast cancer risk. *Int J Occup Med Environ Health* 16(2):113-124.
27. Tanabe S. 2002. Contamination and toxic effects of persistent endocrine disrupters in marine mammals and birds. *Mar Pollut Bull* 45(1-12): 69-77.
28. Tao X, Ma W, Zhang T, Zhao J. 2002. A novel approach for the oxidative degradation of organic pollutants in aqueous solutions mediated by iron tetrasulfophthalocyanine under visible light radiation. *Chemistry*. 15;8(6): 1321-1326.
29. Wang MQ, Guilbert LJ, Li J, Wu Y, Pang P, Basu TK, Shan JJ. 2004. A proprietary extract from North American ginseng (*Panax quinquefolium*) enhances IL-2 and IFN-gamma productions in murine spleen cells induced by Con-A. *Int Immunopharmacol* 4 (2): 311-315.
30. Xie JT, Mehendale S, Yuan CS. 2005. Ginseng and diabetes. *Am J Chin Med* 33 (3): 397-404.
31. Zhang SJ, Yu HQ. 2004. Radiation-induced degradation of polyvinyl alcohol in aqueous solutions. *Water Res* 38(2): 309-316.
32. Zona R, Solar S, Gehringer P. 2002. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by ionizing radiation: influence of oxygen concentration. *Water Res* 36(5): 1369-1374.

33. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局-農藥資訊服務網。2006。 <http://pesticide.baphiq.gov.tw/index.aspx>。
34. 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。
35. 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。
36. 林宜信，建構台灣中藥用藥安全環境。行政院衛生署中醫藥委員會，台北，民國93年12月。
37. 財政部關稅總局。2006。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>。
38. 郝麗麗，薛健。2005。有機氯農藥的多殘留分析及其在中草藥中的應用。中國中藥雜誌，30(6): 405-409。

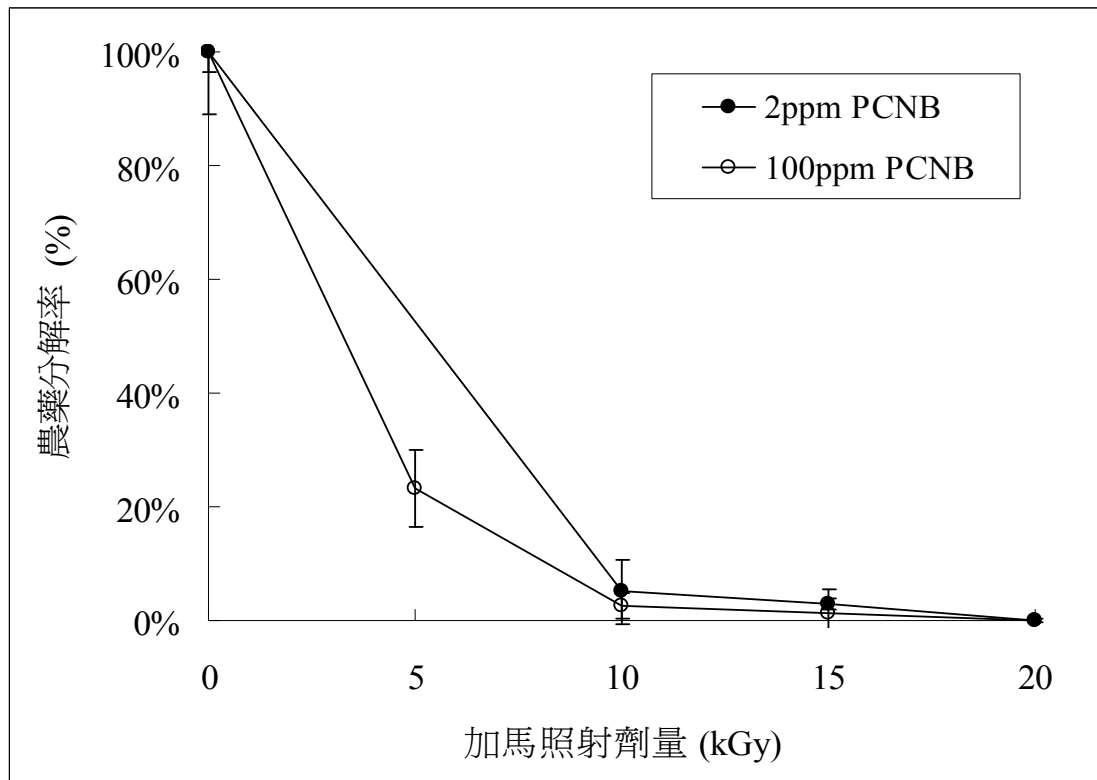
柒、圖次



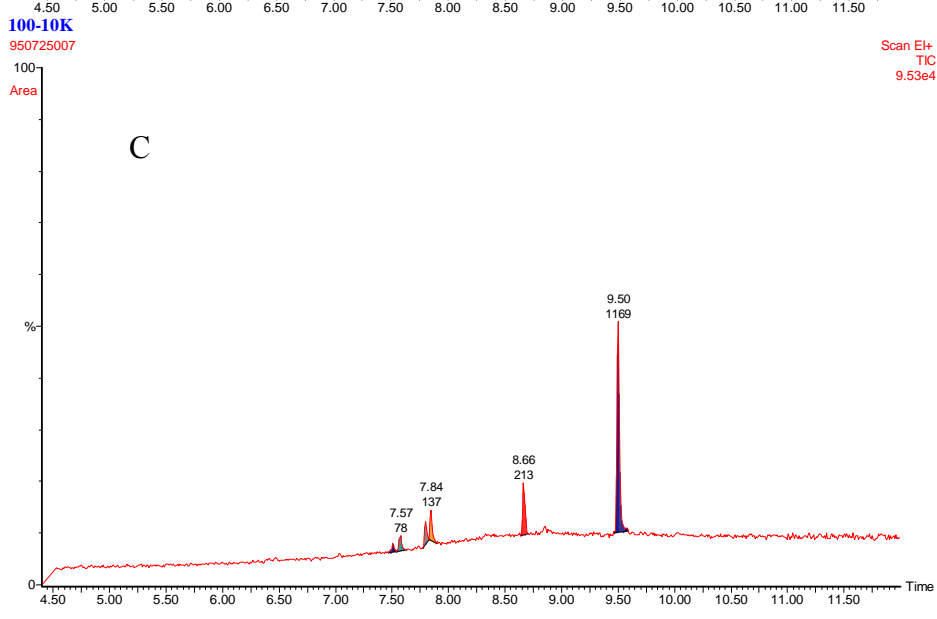
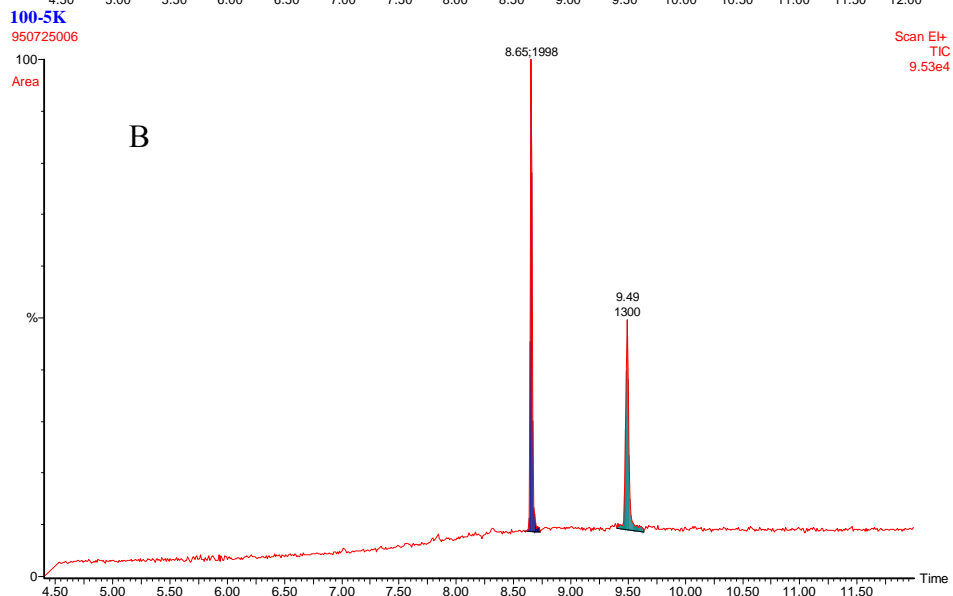
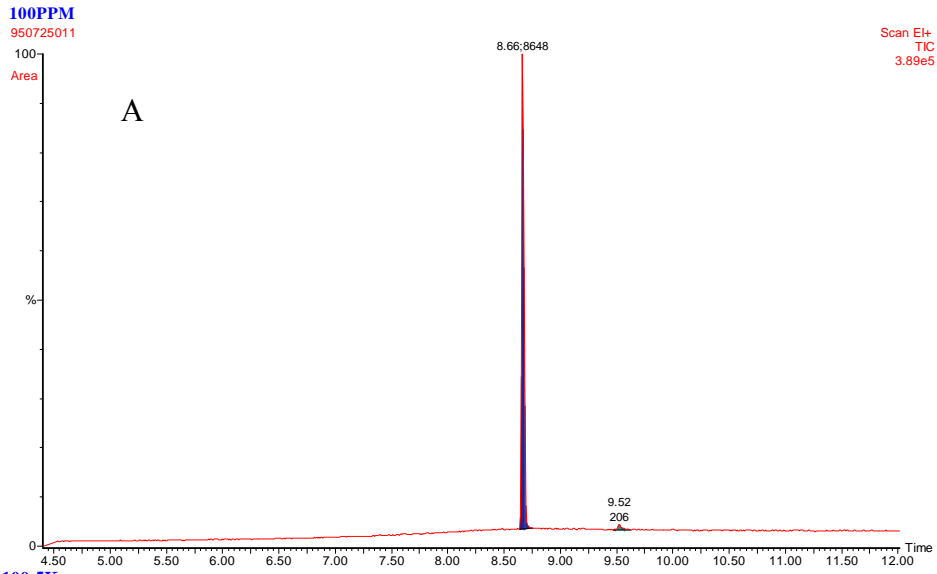
圖一、有機氯農藥 Endrin、Lindane、Endosulfan-1、Endosulfan-2、Heptachlor、Heptachlor epoxide、Aldrin、Dieldrin、p,p'-DDE、p,p'-DDD、o,p'-DDD、p,p'-DDT 經加馬線照射後之圖譜

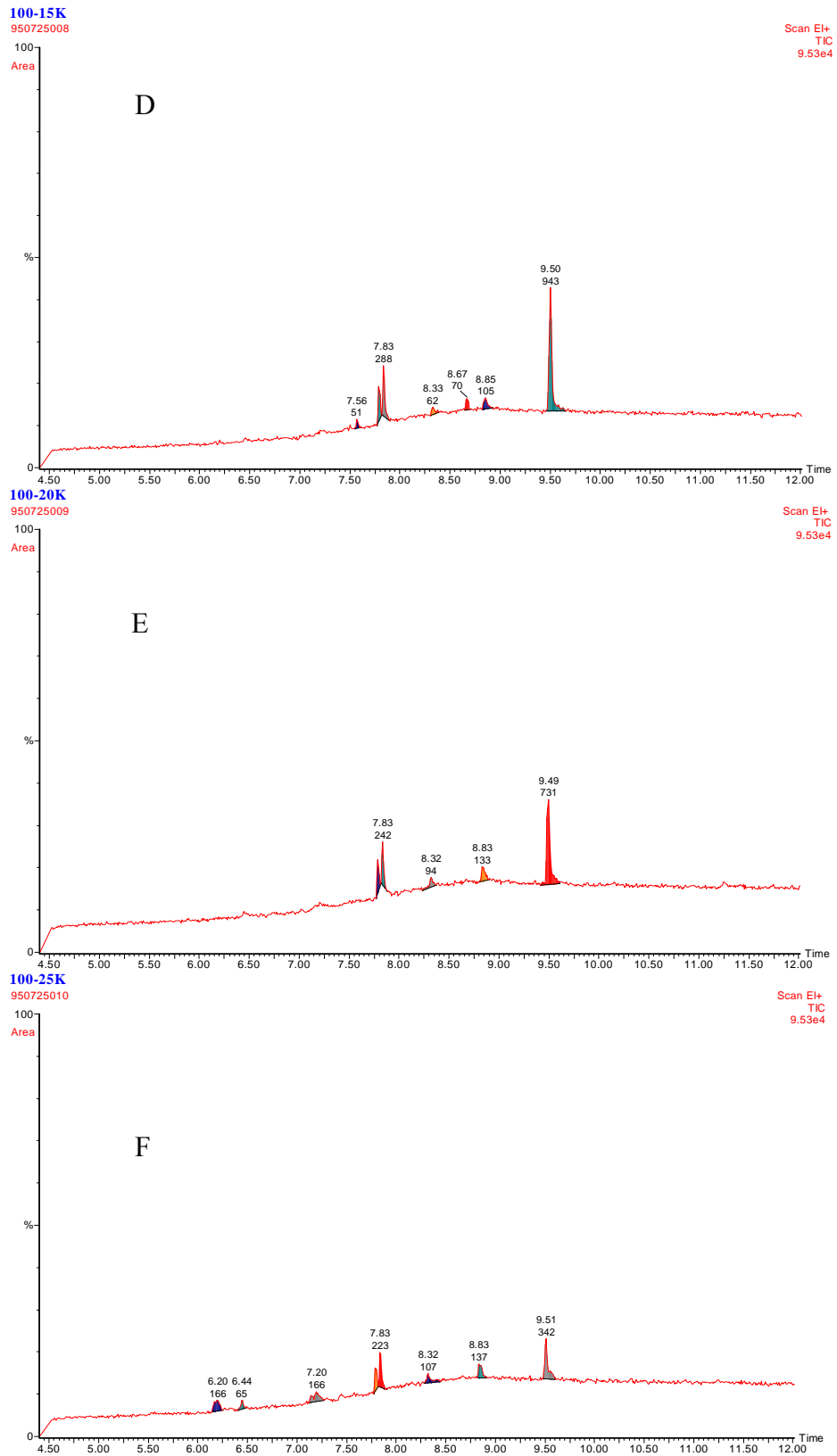


圖二、不同劑量加馬線照射後，有機氯農藥之分解效率

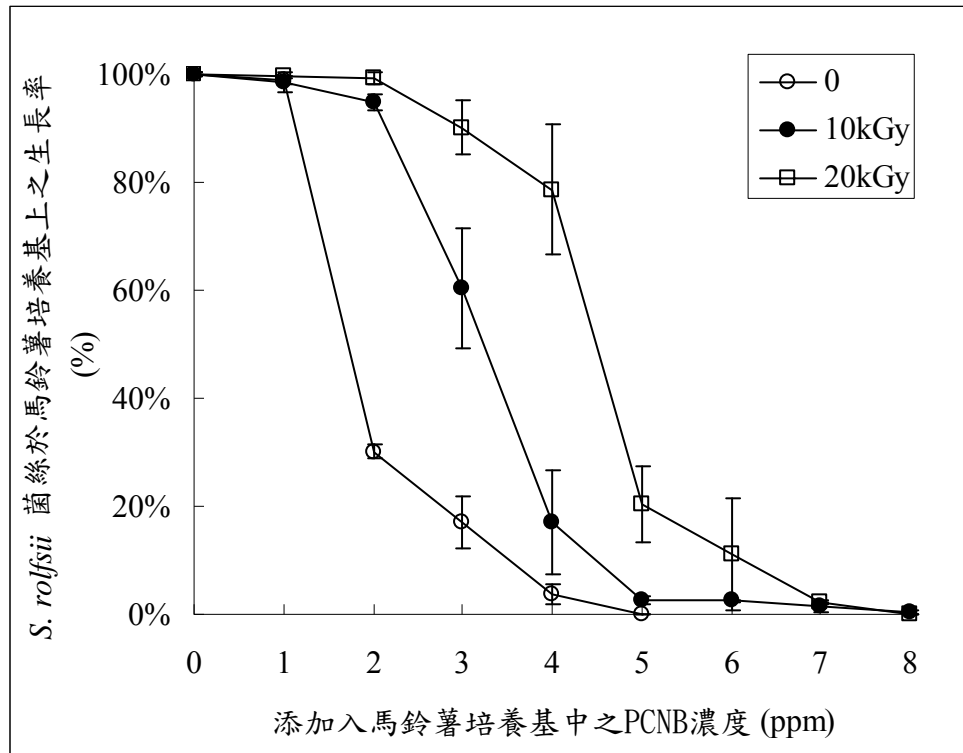


圖三、加馬照射對有機氯農藥 PCNB 之分解效率；(○)，PCNB 濃度為 100 ppm，(●)，PCNB 濃度為 2 ppm。

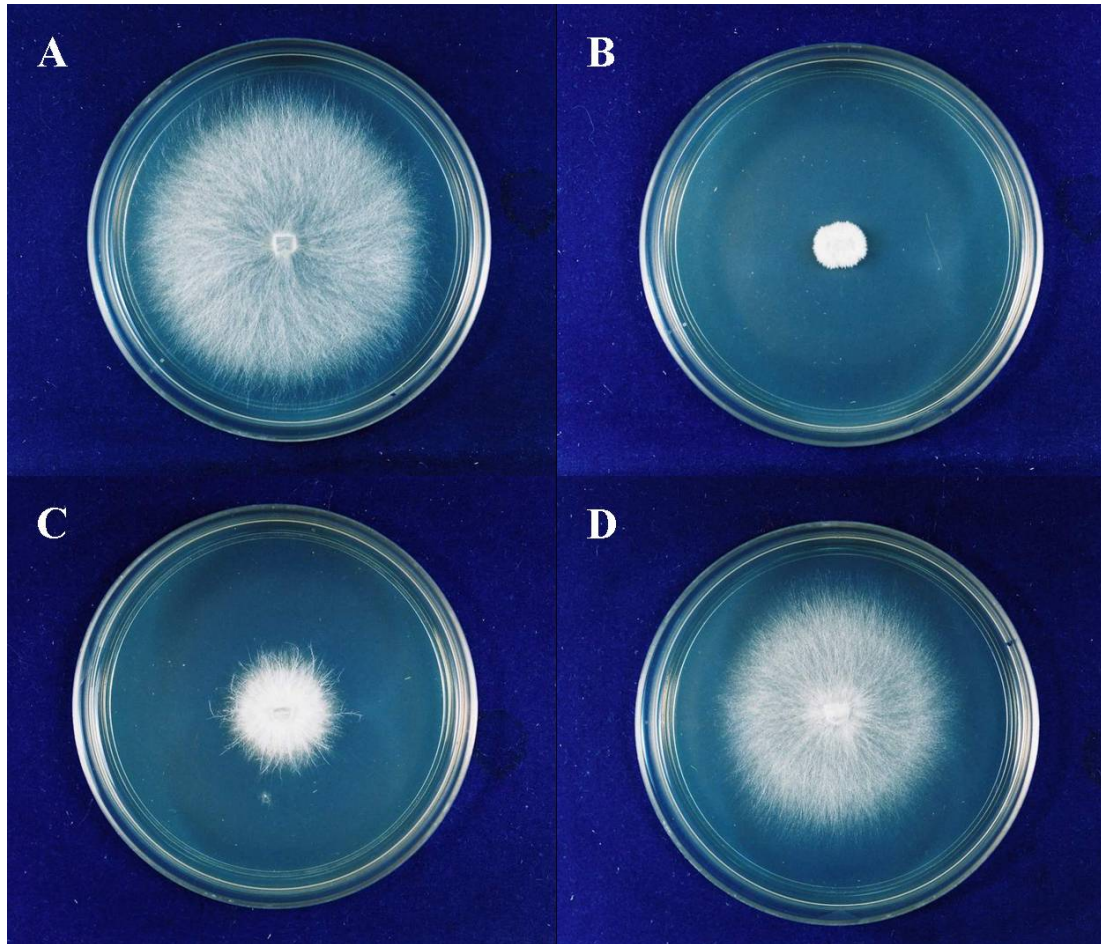




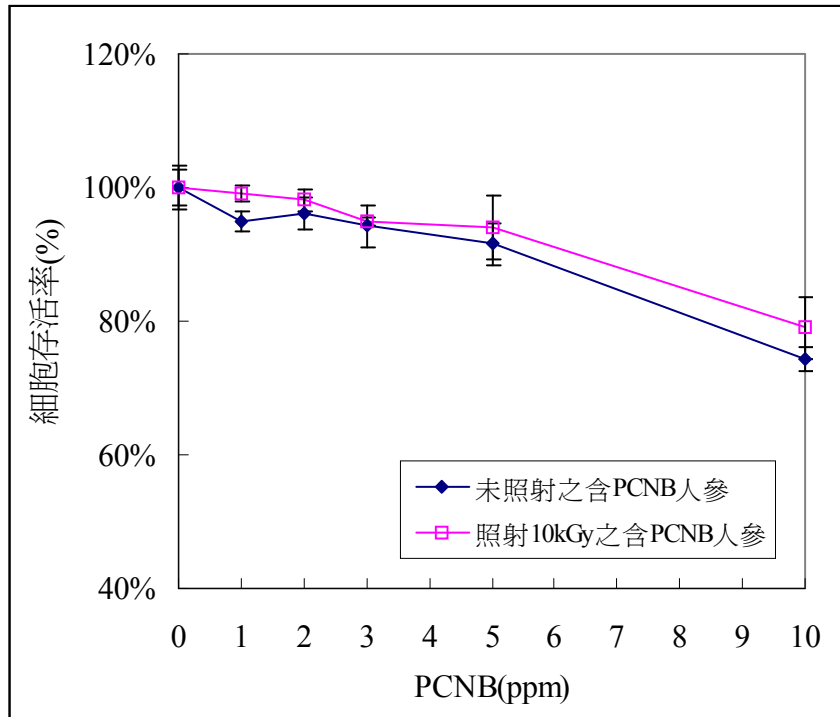
圖四、有機氯農藥殺菌劑 PCNB (100ppm) 經不同劑量加馬線照射後之分解產物之 GC 圖譜



圖五、*S. rolfsii* 菌落直徑比，顯示加馬輻射照射後 PCNB 有機氯農藥抑菌之生物毒性降解。將培養於添加不同濃度 PCNB 之馬鈴薯培養基中；(○)，添加之 PCNB 未經加馬線照射；(●)，所添加之 PCNB 經 10kGy 之加馬線照射；(□)，所添加之 PCNB 經 20kGy 之加馬線照射。



圖六、*S. rolfsii* 菌株於馬鈴薯培養基 (PDA) 中經 72 小時培養後菌落及菌絲之生長。(A) 培養於 PDA 中之菌落生長狀態；(B)，培養於添加 3 ppm PCNB 之 PDA 中之菌落生長狀態；(C)，培養於添加經 10kGy 加馬線照射之 PCNB 的 PDA 中之菌落生長狀態；(D)，培養於添加經 20kGy 加馬線照射之 PCNB 的 PDA 中之菌落生長狀態。PCNB 經加馬照射後對 *S. rolfsii* 菌株之生長抑制毒性降解。



圖七、含 PCNB 有機氣農藥人參加馬照射前、後之 L929 細胞毒性測試

捌、表次

表一、加馬線照射對有機氯農藥之殘存濃度 (ppm)

有機氯農藥	濃度(ppm)					
	照射劑量(kGy)					
	0	5	10	15	20	25
Lindan	0.687 ^a	0.479	0.348	0.258	0.184	0.111
Heptachlor	0.532	0.421	0.319	0.254	0.195	0.142
Aldrin	0.532	0.376	0.279	0.218	0.168	0.123
e-heptachlor	0.534	0.396	0.304	0.250	0.215	0.187
Endosulfan-1	0.519	0.392	0.311	0.251	0.192	0.140
4'4'-DDE	0.544	0.404	0.313	0.249	0.195	0.145
Dieldrin	0.546	0.410	0.321	0.259	0.224	0.179
2'4'-DDD	0.476	0.337	0.250	0.196	0.155	0.119
Endrin	0.381	0.345	0.296	0.252	0.202	0.153
4'4'-DDD	0.502	0.370	0.282	0.227	0.179	0.147
Endosulfan-2	0.515	0.359	0.263	0.198	0.144	0.093
4'4'-DDT	0.520	0.344	0.242	0.178	0.127	0.082

^{a)} 所測數值為三重複之平均值

表二、人參中藥材經不同劑量加馬照射前後之指標成分含量

人參皂甘 (mg/g)	照射劑量 (kGy)			
	0	10	15	20
Rb1	31.37 ± 0.15 ^a	31.01 ± 0.11	30.59 ± 0.63	29.39 ± 0.36
Rc	16.12 ± 0.47	15.91 ± 0.43	15.08 ± 0.27	14.46 ± 0.28
Rd	9.02 ± 0.32	8.77 ± 0.15	8.44 ± 0.25	8.20 ± 0.17
Re	15.98 ± 0.50	15.79 ± 0.21	15.04 ± 0.33	14.53 ± 0.14
Rg1	1.56 ± 0.09	1.56 ± 0.06	1.47 ± 0.03	1.43 ± 0.02

a) 為三重複實驗之平均值與標準偏差