

編號：CCMP92-RD-040

加馬輻射照射對中藥材滅菌及成份 影響評估

周鳳英

國立清華大學

摘要

本研究目的為探討中藥材加馬線照射滅菌最適條件及分析輻射照射後中藥材成分變化，建立中藥材輻射照射滅菌方法。中藥材因基原、加工、保存等方式不同，微生物含量及種類有極大差異。目前國內中藥材無特定包裝條件，多以非密封的方式貯存與流通，在台灣高溫、多濕的環境下，易因其中微生物生長腐蝕而耗損藥材成份、抑低療效，甚或產生不良物質，尤其生服之藥材將更直接影響食用者之衛生安全。

本計畫選擇枳殼、桂枝、紅花、葛根、杜仲及珍珠粉 6 種中藥材進行輻射滅菌研究。尋找最適輻射滅菌劑量，進行照射後不同貯存期之微生物含量測定，對接受最適滅菌劑量處理之中藥材樣品進行照射前、後組成份分析。結果顯示，各樣品間之微生物種類及含量有極大不同，同一樣品因取樣批次不同，其微生物含量亦有顯著差異。其中珍珠粉、紅花及桂枝之藥材樣品含菌數最高，部份樣品之生菌數高達 10^6 CFU/g，含菌量高之紅花及桂枝樣品分別需以 10kGy 及 12 kGy 劑量照射方能達完全滅菌；而珍珠粉因含有一高輻射抗性菌株，因此需 25~27.5 kGy 劑量照射才能達完全無菌。葛根、杜仲、枳殼單位重量菌數約為 10^1 ~ 10^3 CFU/g，只需 4~6 kGy 劑量照射就可達完全滅菌。

上述中藥材以輻射滅菌所需之最高劑量照射後進行貯存試驗，並對受測藥材進行組成份分析。中藥材包裝後照射處理，經 3 個月之室溫貯藏後將樣品直接置於平面培養基上培養觀察，結果顯示經 1~7 天後培養基及中藥材上均無微生物生長。經照射之藥材其外觀及品質無明顯變化，照射前後之指標成分含量或組成份之 HPLC 圖譜亦無明顯差異。本研究成果可提供企業界進行中藥材加

馬線照射方法、行政單位制訂中藥材加馬線滅菌之法規及進口中藥材規格管制之研訂參考，建立消費者之認同，以開發輻射滅菌中藥材市場，提高中藥材之經濟效益。

關鍵詞：中藥材、加馬線滅菌、微生物

CCMP92-RD-040

Effects of gamma irradiation on microbial decontamination and composition of Chinese medicine herbs

F. I. Chou

Nuclear Science and Technology Development Center, National Tsing Hua University

ABSTRACT

This research has the purpose of investigating about the optimal conditions for the sterilization of Chinese medicinal materials by gamma irradiation, as well as the analysis of the changes in the composition of the Chinese medicinal materials after irradiation, in order to establish a method for the sterilization of Chinese medicinal materials by gamma irradiation. Due to the differences in their origin, processing and conservation, Chinese medicinal materials present enormous differences in the concentration and species of microorganisms. At present, no specific packaging requirements for Chinese medicinal material are being applied in our country, and in most of the cases its conservation and distribution are carried out under non-hermetic conditions. In the high temperature and humid environment of Taiwan, this boosts the propagation of the microorganisms can easily erode the medicinal material by deteriorating its composition and reducing its curative effectiveness, or even producing noxious material with direct consequences to the health of the person who ingests it, especially when the material is prescribed for ready ingestion as it comes.

For this project, samples from 6 Chinese medicinal materials have been chosen to proceed with the study about sterilization by gamma irradiation. The study consists of the determination of the optimal sterilizing radiation dose, the measurement of microorganisms concentration after different conservation periods since the completion of the irradiation, and the analysis of composition before and after exposure of the Chinese medicine sample treated with the optimal sterilizing

dose. The results showed an enormous difference among the samples in the concentration and species of microorganisms, different batches of the same materials also presented accentuated differences in the concentration of microorganisms. Samples of materials Carthami Flos, Cinnamomi Ramulus, and Margarita powder presented the highest microorganism concentrations, part of the samples reached a concentration of 10^6 CFU/g, samples Carthami Flos and Cinnamomi Ramulus both with high microorganism concentrations, required radiation doses of 10 kGy and 12 kGy respectively to obtain a complete sterilization; as to the sample Margarita powder, due to the presence of a strain with high radiation resistance, a dose between 25 ~ 27.5 kGy was necessary to obtain complete sterilization. The microorganism concentration per weight unit for the samples Citriimmaturus Fructus, Eucommiae Cortex and Puerariae Radix ranges from 10^1 to 10^3 CFU/g, a radiation dose between 4 ~ 6 kGy was sufficient to obtain the complete sterilization.

Experiment about conservation was performed after the samples had been exposed to the highest dose necessary for sterilization by radiation, and an analysis of composition was made to the tested materials. Samples of Chinese medicinal materials was treated with radiation after their packaging, and after a 3 months conservation period at room temperature, samples were put directly onto the culture medium for culture and observation, the results show that after a period of 1 to 7 days, no microorganism grew in the culture medium or on the medicinal material. Medicinal materials exposed to radiation present no visible alterations in their outward appearance or quality, nor discernible differences in their key component contents or HPLC composition diagrams before and after exposure. The conclusions drawn from this research can serve to the industry as a method for the sterilization of Chinese medicinal materials by gamma irradiation, to the government institutions as a reference for setting up regulations related to the sterilization of Chinese medicine materials by gamma irradiation and the control of the specifications for the import of Chinese medicinal materials, to build up a recognition by the consumer public, in order to develop a market for radiation sterilized Chinese medicinal materials, thus increasing the economic rendering effectiveness of Chinese medicinal materials.

Key words : Chinese medicinal herbs, gamma-ray sterilization, microorganisms

壹、前言

中藥因基原不同，生長環境、農藥使用或包裝、貯存、運輸等人為影響，造成各地中藥材中微生物含量有極大差異。中藥材為華人常使用者，許多中藥材由中國大陸等地輸入台灣，經加工處理後轉銷世界各地。中藥材常因原產地之微生物，或因運輸、貯存環境中之微生物污染、腐敗而降低品質，適當的儲存對藥物的品質保持非常重要。食品輻射照射是許多國家承認之食品加工及保存方法，因加馬射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，不須加熱或添加防腐劑等⁽¹⁻⁵⁾。中國大陸已有廣西中醫院、第四軍醫大學西藥醫院、湖南醫科大學藥劑科、長春市中醫院、湖南醫科大學附二醫院及上海市中藥研究所等單位，進行川烏經加馬線輻射照射前、後生物活性之影響、大黃經加馬線輻射滅菌後主成分之影響、黃蓮上清丸以加馬線滅菌之效果及對藥物活性之影響、鈎藤加馬輻射滅菌前後生物活性比較試驗等研究，顯示其在中藥材及成藥之輻射滅菌上有相當深入的研究與應用⁽⁶⁻⁹⁾。國外已有許多草藥及肉桂、豆蔻等香料與醫療用品、藥物（如抗生素等），及多項食品進行輻射照射滅菌之研究⁽¹⁰⁻¹⁶⁾。國內亦有、蝦粉、雞丁、牛肉粉、豬肉粉及大蒜等食物以輻射滅菌保存之研究⁽¹⁷⁻²¹⁾。波蘭之藥物工業每年生產數千噸的草藥，聯合國工業發展組織（UNIDO）1984 年的規定，未經加工之草藥每克重量所含之好氣菌量不得多於 1×10^4 個，含酵母菌及黴菌量不得多於 100 個，Bacilli 類之腸內桿菌群不得多於 100 個，且不得含有大腸桿菌 (E. coli)、綠膿球菌 (P. aeruginosa)，及金黃色葡萄球菌 (S. aureus) 等病原菌⁽²²⁾。化學方法在微生物除污上已被認定為具危險性及缺乏安定性，選擇以輻射照射之方法取代之⁽²³⁾。對多數之草藥原料及草藥經 10 kGy 照射後可達良好的滅菌效果，且經 10 kGy 照射後，草藥中之 flavonoids、glycosides、anthocyanins、triterpene saponins 等成份及植物中之黏液成分並無明顯改變⁽²⁴⁾。巴西每年有價值 2 千 2 百萬美元之藥用植物出口，並進行多樣植物之輻射滅菌研究，並證實 10kGy 輻射滅菌對多數植物中之 tannins、phenolic 及 β -carotene 等含量不會造成明顯的影響，唯有少數植物經 10 kGy 劑量照射後上述成份出現含量稍降低之現象⁽²⁵⁾。日本許多廠商已將商品化的照射香料、藥草，供應一般食物用⁽²⁶⁾。各國草藥核可照射劑量如下：比利時、中國大陸、加拿大、法國、挪威、波蘭與南斯拉夫之許可劑量為 10 kGy，丹麥與荷蘭為 15kGy、美國為 30 kGy，韓國許可人參照射之劑量為 7kGy。美國食品藥物管理局（FDA）於 1986 年通過兩項食品照射法規，其中指出乾燥或脫水的芳香蔬果植物，如香辛料及蔬菜調味料，可使用 30kGy 之劑量進行處理^(27, 28)。同時 FDA 也認為經低劑量照射之食品是安全的，不需毒性試驗⁽²⁹⁾。我們之前的研究完成花粉及中醫藥委員會公告列入優先管制之 32 種中藥材、市售

常用的五種科學中藥方劑之輻射滅菌研究。結果顯示除甘草、黃芩及枸杞等少數中藥材需以 15 kGy 之輻射劑量滅菌外，以 10 kGy 加馬射線照射，對多數中藥材已有良好的滅菌效果，且對其中的組成份無明顯影響⁽³⁰⁻³⁶⁾。

台灣中藥材之年進出口產值達數十億元，藥材在本省高溫多濕的環境中易受微生物所腐蝕。因而中國大陸進口之中藥材多數經過化學防腐處理，如硫磺燻蒸、硼砂浸泡等，除會影響中藥材之品質外，更會對人體造成毒性。中藥材若能以完善包裝後進行輻射滅菌，除可延長商品時間及較長藥效，並可免除薰蒸或浸泡之防腐藥物的殘留對人體所造成之傷害。

貳、材料與方法

一、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同位素組之三萬居里鈷-60 照射熱室中進行。照射劑量範圍由 1 kGy 至 30 kGy (劑量率為 2 kGy/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 FeSO₄，0.001M NaCl 及含飽和空氣之 0.8N 硫酸水溶液。因輻射能之作用使亞鐵離子 (Fe²⁺) 氧化成鐵離子 (Fe³⁺)，以 304 nm 或 224 nm 光波通過劑量計溶液，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 CuSO₄ 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，可使劑量範圍增至 10⁵ Gy。

二、中藥材取樣與輻射照射

研究所用之枳殼、桂枝、紅花、葛根、杜仲及珍珠粉分別由中藥行及中藥進口商金保安公司取樣。對每一中藥材樣品進行五次取樣，每一取樣點做三重複取樣。每一樣品以無菌方式稱取 15 g 置於樣品瓶中，將樣品瓶攜入鈷-60 照射熱室，置於距離射源特定距離之照射架上 (劑量率為 2 kGy/h 於室溫中照射)，照射架以每分鐘 10 轉旋轉，使照射樣品瓶中之樣品得到均勻的輻射劑量率。樣品經不同照射時間取樣，以得到所需之照射劑量。照射後樣品立刻取出進行微生物含量測試。

三、培養基及磷酸緩衝液之配製

- (一) 平面培養基，plate count agar (PCA ; Difco. Co.)、potato dextrose agar (PDA ; Difco. Co.) 之製備：取 PCA 粉末 23.5g、PDA 粉末 39g 分別加入三角瓶中，以少量蒸餾水攪拌均勻，繼續加入蒸餾水使最後之體積為 1L，置於高壓滅菌鍋中滅菌，待其溫度降至 50-60°C 時，分別倒入直徑 9cm 之無菌培養皿中，每皿約 10-15mL，冷卻備用。另以 violet red bile glucose agar (VRBGA ; Difco. Co.) 平面培養基測定中藥材中的腸內菌(*Enterobacteriace*)含量⁽³⁷⁾，其配製方法為取 41.5g VRBGA 粉末加入三角瓶中，以少量蒸餾水攪拌均勻，繼續加入蒸餾水使最後之體積為 1L，以磁石攪拌均勻後置入沸騰的水浴中加熱數分鐘，待 VRBGA 粉末完全溶解後取出，待其溫度降至 50-60°C 時，分別倒入直徑 9cm 之無菌培養皿中，每皿約 10-15mL，冷卻備用。
- (二) 液態培養基，tryptic soy broth (TSB ; Difco. Co.) 及 plate count broth (PCB ; Difco. Co.) 製備：取 TSB 粉末 30 g, PCB 粉末 17 g，分別加入含有蒸餾水之三角瓶中，最後體積為 1 L，待攪拌均勻，分別分裝入玻璃試管中，每管 9 mL，如上述狀況高壓滅菌，置冰箱冷藏備用。
- (三) 磷酸緩衝液之製備：取 4.54 g KH₂PO₄，5.43 g Na₂HPO₄ · 2H₂O 先溶於少許水中，再將體積加至 1 L (pH 值為 7.2)。加入磁石攪拌均勻分裝至玻璃試管中，每管 9 mL，加蓋後高壓滅菌，冷卻後置於冰箱冷藏備用。

四、微生物之菌數測定及分離

經不同輻射劑量照射處理或未經照射的中藥材樣品以下列二種方式進行微生物含量及殘存計數：

- (一) 表面平板計數法 (surface plate count)：樣品照射後取出即加入磷酸緩衝液，於 7°C 下浸泡 60 分鐘，再置於振盪器中以 75 rpm、7°C 振盪 30 分鐘，使樣品中之微生物懸浮於緩衝液中。浸泡液經適當稀釋後塗抹於 PCA、PDA 及 VRBGA 平面培養基上。將之置放 25°C 培養箱中，第二天取出計數生長較快之菌落，之後連續 1 週取出，計數生長較緩慢之菌落。每一測試濃度均作三重複計數。
- (二) 樣品微生物殘存直接觀察法：將中藥材樣品直接置入無菌之平板培養基表面，置於 25°C 培養箱中培養 1~7 天。以目測及顯微鏡連續觀察並記錄樣品上及周圍之微生物生長狀況，每一照射劑量之樣品均進行五重複測試觀察。

五、加馬線照射後中藥材之貯存測試

將上述枳殼、桂枝、紅花、葛根、杜仲及珍珠粉六種中藥材個別以夾鏈袋分裝封口，依上述研究所得各藥材所需輻射滅菌之最高劑量進行照射，取出後置於室溫中貯存。分別於第1、2、3個月取出，以上述二種方式進行微生物含量測試與觀察，評估了解照射後中藥材之貯存安定性。

六、中藥材照射前後外觀品質探討

以目測及顯微鏡觀察，並照相記錄照射前、後的樣品之外觀形狀、顏色等是否變化。因珍珠粉為均勻的粉末樣品，故取照射前、後的珍珠粉以色差計（color meter）測定樣品之Hunter L、a、b值（L為明度、+a代表紅色、-a代表綠色；+b表示黃色、-b表示藍色），探討照射是否影響珍珠粉之外觀顏色。

七、中藥材照射前後之成份變化探討

輻射照射後對中藥材之成分影響探討，6種中藥材均選取其五個批次樣品中需較高劑量方能達完全滅菌者，將其樣品以夾鏈袋分裝後，進行所需之滅菌劑量照射後，探討其成分變化。其中珍珠粉除顏色測定外並測定其粗蛋白及粗脂肪含量變化。其餘五種中藥材分別將樣品磨碎後混合均勻，秤取1g樣品加入20ml甲醇中，於室溫下($25\pm 5^{\circ}\text{C}$)以超音波震盪方式萃取30min，再以濾紙過濾定容成20ml，再取濾液以 $0.45\mu\text{m}$ 濾膜過濾後，每次取 $10\mu\text{l}$ 注入高效液相層析儀(HPLC)中進行樣品之成分分析。所用分析管柱為矽基質碳18管柱(Hypersil BDS C18 column: $4.6\times250\text{ mm}$)。其中桂枝選擇cinnamic acid、葛根選擇daidzein、枳殼選擇naringin為指標成分，移動相為氯甲烷及0.1%磷酸溶液，以流速 1.0 ml/min 於 30°C 下進行各指標成分之定量分析。而紅花及杜仲因無合適之指標成分可使用，故以其甲醇萃出液之HPLC指紋圖譜作為照射前後之成分變化比對，紅花所用之偵檢波長為UV 254 nm，杜仲則為UV 203 nm。

參、結果

一、中藥材加馬線照射滅菌

枳殼、桂枝、紅花、葛根、杜仲及珍珠粉之加馬線輻射滅菌及微生物含量

測定，係將中藥樣品經不同輻射劑量處理後分別：A.直接置於培養基表面作微生物生長之定性測試，及 B.將樣品浸於緩衝液中振盪，取浸液經適當稀釋後塗抹於培養基表面，於第 1 至 5 天連續觀察微生物相，並計數不同劑量照射後樣品中微生物之殘存率。由初步實驗發現以 PDA 培養之微生物量較 PCA 培養者為少，且中藥樣品以 4 kGy 照射後於 PDA 上多無微生物生長，因此以 PCA 平面培養基測定中藥材之微生物含量。

實驗結果顯示不同中藥材之微生物含量及微生物相有極大不同，而同一種中藥因取樣批次不同微生物含量亦有很大差異。珍珠粉經不同劑量照射後之殘存微生物量的結果列如表 1，五個採樣批次中，外用之珍珠粉樣品所含菌數約 $10^5 \sim 10^6$ CFU/g，經 10 kGy 照射後微生物仍殘存 10^4 CFU/g，需 25-27.5 kGy 照射方能使樣品達完全無菌。內服用的珍珠粉所含菌數較低約為 10^2 CFU/g，只需 5 kGy 就可完全滅菌。圖 1 為外用珍珠粉未經照射及經 10 kGy 照射後將樣品直接置於平面培養基上培養 2 天之微生物相；其中未經照射樣品有大量菌落生長，且含有多種菌株；而經照射後的樣品微生物含量已明顯減少。圖 2 為未經照射及經 10 kGy 照射後之珍珠粉樣品，取其磷酸懸浮液稀釋後塗佈於培養基上培養 2 天後之微生物相，其中未經照射樣品有大量微生物生長（圖 2A），而照射後樣品中殘存菌數減少，且主要殘存菌株為一淡粉紅色菌株（圖 2B）。將此菌純化後培養於 PCB 液體培養基中，初步鏡檢其為一不產孢之短桿菌。進行輻射抗性測試，測得其 90% 致死劑量 (LD_{90}) 為 15 kGy，應為高度抗輻射菌株^(38, 39)。

表 2 為紅花經不同劑量照射後之殘存微生物量，結果可見未經處理的紅花樣品所含菌數約 $10^3 \sim 10^6$ CFU/g，以 8-10 kGy 照射後可達無菌。圖 3 為未經處理及經 8 kGy 照射後之紅花樣品直接置於培養基（圖 3a、b）及取其懸浮液塗抹於培養基上之微生物相（圖 3c、d）。可見圖 3a 中有許多菌落生長於未經照射的紅花樣品邊緣，且其懸浮液所塗抹之培養基上亦有大量白色菌株（圖 3c），而經照射後的紅花樣品無論直接放置或懸浮液培養後的培養基都可見微生物量明顯減少（圖 3d）。

表 3 為桂枝經不同劑量照射後之殘存微生物量，結果可見未經處理的樣品所含菌數約 $10^3 \sim 10^6$ CFU/g，以不同劑量照射後可見菌數隨劑量增加而遞減，原始菌數較低者以 4-8 kGy 照射後可達無菌，而原始菌數為 10^6 CFU/g 的桂枝樣品則需 12 kGy 方能完全滅菌。圖 4a、b、c、d 分別為未經處理及經 2、4、6 kGy 照射後之樣品直接置於培養基培養 2 天之微生物相。可見圖 4a 中有許多黴菌及細菌生長，隨劑量增加樣品中之微生物量漸減，而經 6 kGy 照射之樣品中已不見黴菌殘存，只見少量的細菌生長（圖 4d）。

表4為五個批次取樣的葛根經不同劑量照射後樣品中微生物之殘存量，其微生物量為 $10^1\sim10^3$ CFU/g，所有樣品經4~6 kGy 照射皆可達完全滅菌。圖5所示為未經輻射照射與經4 kGy 照射的葛根樣品，直接置於培養基表面（圖5A）與稀釋10倍之浸液塗抹於培養基平板上（圖5B），培養2天後之微生物相，可見未經處理葛根之浸液塗抹者有大量微生物生長，而直接放置者菌落只生長於樣品表面並未向外擴展；葛根樣品經4 kGy 劑量照射後無論直接放置或浸液培養均無微生物生長。

表5為枳殼經不同劑量照射後微生物之殘存量，未經處理之樣品中微生物量為 $10^1\sim10^2$ CFU/g。枳殼樣品所含原始菌數雖不高，但由微生物相觀之，其所生長之微生物有許多種類，所需輻射滅菌劑量為2~6 kGy。圖6為未經輻射照射之枳殼直接置於培養基上培養2天之微生物相，樣品上所呈現之菌落數並不高，此樣品以4 kGy 照射即可達無菌。

表6為杜仲經不同劑量照射後樣品中微生物之殘存量，其中生杜仲未經處理樣品中之微生物量為 $10^1\sim10^3$ CFU/g；而炒杜仲測得之生菌數則低於10 CFU/g。杜仲樣品隨照射劑量增加，其殘存菌數漸低，生杜仲需4~6 kGy 照射可達無菌，炒杜仲經2 kGy 照射，即可使藥材達完全無菌。圖7分別為炒杜仲及生杜仲未經照射及經4 kGy 照射後樣品直接置於培養基上培養2天的微生物相，其中未經照射的杜仲樣品周圍均有微生物生長，而以4 kGy 照射後樣品即無微生物殘存。

實驗中以VRBGA平面培養基測定中藥材中的腸內菌(*Enterobacteriace*)含量，六種中藥材之五批採樣中只有珍珠粉之1批採樣及桂枝的2批採樣樣品測出腸內菌。結果如表7所示，未經照射之珍珠粉中含有 10^2 CFU/g之腸內菌，經4 kGy 照射可將腸內菌殺滅。桂枝樣品中測出 10^3 CFU/g之腸內菌，以5 kGy 照射亦可將此菌殺滅。

二、中藥材貯存試驗

將6種中藥材分別以夾鏈袋分成小袋包封，各自依其所需滅菌劑量進行照射，而後置於室溫中貯藏，於貯藏第3個月時取出樣品，測其中生菌數含量並與未經照射者比較。結果顯示各中藥材包裝後以滅菌所需劑量照射處理，經3個月之室溫貯藏後，樣品培養後無微生物殘存，且直接置於平面培養基上培養觀察，經1~7天後培養基及中藥材上仍無微生物生長。

三、照射後中藥材之品質測試

各中藥材因產地來源、加工過程或切片方式等不同，造成其外觀形狀或顏

色等變化甚大。實驗中選擇外觀形狀較均質之珍珠粉測試輻射照射對藥材色澤之影響，將珍珠粉裝入直徑 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 3 重複之測量。結果如表 8 所示，照射前珍珠粉測得之平均 Hunter L、a、b 值（L 為明度、+a 代表紅色、-a 代表綠色；+b 表示黃色、-b 表示藍色）分別為 92.32 ± 0.57 、 -0.38 ± 0.13 及 2.62 ± 0.41 ；經 10 kGy 照射後測得之平均 Hunter L、a、b 值分別為 88.84 ± 1.02 、 -0.45 ± 0.05 及 2.65 ± 0.23 ；經 27.5 kGy 照射後測得之 Hunter L、a、b 值分別為 87.01 ± 1.87 、 -0.48 ± 0.06 及 3.09 ± 0.03 ，顯示照射後珍珠粉樣品的 L、a、b 值與未經照射者有少許變化。上述樣品請品評員觀察後發現，經 27.5 kGy 照射後的珍珠粉整體色澤較未經處理者偏黃，而 10 kGy 照射者則與未經照射者無明顯差異。

四、中藥材照射前後成份分析

6 種中藥材均以輻射滅菌所需最高劑量之樣品，進行輻射照射並分析其成分。表 8 為未經照射及經 27.5 kGy 照射後珍珠粉之粗蛋白與粗脂肪含量，照射前後的粗蛋白分別為 2.10 ± 0.12 及 2.15 ± 0.07 ，粗脂肪則分別為 0.14 ± 0.02 及 0.16 ± 0.03 。顯示珍珠粉經 27.5 kGy 照射後其粗蛋白與粗脂肪含量無明顯差異。

表 9 為桂枝、葛根、枳殼照射處理前後之指標成份含量變化，桂枝未經照射及經 12 kGy 照射之指標成分 Cinnamic acid 平均含量分別為 0.85 mg/g 及 0.78 mg/g；葛根未經照射及經 6 kGy 照射之指標成分 Daidzein 平均含量均為 0.87 mg/g；枳殼未經照射及經 6 kGy 照射之指標成分 Naringin 平均含量分別為 38.49 mg/g 及 41.23 mg/g。

紅花及杜仲因無特定之指標成分可定量，故以其甲醇萃取液之 HPLC 分析圖譜比較樣品照射前後之成分變化。圖 8 為紅花樣品輻射照射前後之 HPLC 分析圖譜。比較未經照射與經 10 kGy 照射的圖譜，皆可見到於 39 min 時有最高波峰出現，二個樣品於其他相同的遲滯時間亦有偵測到相似的圖譜與積分面積，顯示輻射照射對紅花樣品之成份無明顯影響。圖 9 為杜仲樣品輻射照射前後之 HPLC 分析圖譜，比較其分析圖譜可見照射前後的杜仲樣品所呈現的分析圖譜相似，樣品於遲滯時間 25min、36min、52min 各有一明顯的高峰，其中 36 min 者其積分面積無明顯不同，但未經照射之杜仲於 25min 者之積分面積較經 6 kGy 照射者為高，而未經照射之杜仲於 52min 者之積分面積較經 6 kGy 照射者為低，此差異是否為樣品取樣上的誤差或為照射後中藥成分的改變需進一步探討。

肆、討論

本計畫測試之6種中藥材中，珍珠粉、紅花及桂枝其單位重量之最高微生物含量可達 10^6 CFU/g，於同一種中藥材之不同批次取樣之微生物含量有明顯差異，除珍珠粉因含有一高抗輻射菌株需27.5 kGy 照射方達完全無菌，其他中藥樣品經8~12 kGy 輻射照射後皆可達完全滅菌效果。而葛根、枳殼、杜仲之生菌數最高為 10^3 CFU/g，僅需4~6 kGy 照射後即無微生物殘存。實驗中同時測定中藥材中的腸內菌含量，部份樣品測出腸內菌含量為 $10^2\sim10^3$ CFU/g，以5 kGy 照射即可將菌殺滅。實驗中所測得部份中藥材之微生物含量雖較低（低於 10^2 CFU/g），但中藥材由產地運輸至消費地常耗相當長之時間，長時間之微生物生長對藥材中成分亦可能造成耗損。若能於產地將中藥材適當包裝後以輻射滅菌，應是中藥材最佳的保存方法。

因單一方法測試中藥材中微生物含量不盡完善，我們的研究以二種方法測試之，二種方法各有優缺點，但可用以相互比對。第一種方式為將中藥材樣品直接置於固體培養基上觀測微生物生長，除以目視計數菌數外，還需以解剖顯微鏡同時觀察，因有些微生物生長於結構較不平整或色澤較不一致之藥材表面，故菌落較不突顯，且於目視時易被忽略，以鏡檢較易見到藥材中之微生物生長，並可觀察微生物於中藥材上生長及藥材受腐蝕之狀況，但微生物含量高時菌落常重疊生長，無法明確計數菌落數。由藥材周圍向培養基上延生之微生物菌落或菌絲，是為判別微生物污染之觀察點，但需注意的是，部分微生物對藥材成份具特別的需求，會選擇生長於藥材上，並不由藥材向鄰近培養基延伸，尤其菌落顏色與藥材相同時更不易目測，此時需於顯微鏡下觀察。以此方法可使對中藥材成份有特殊需求之微生物能有生長表現之機會。而第二種方法為將中藥材浸泡、震盪，經適當稀釋後取浸液塗佈於培養基上，待菌落長成後觀察並計數之。此法菌落之生長分明、易於計數，但對中藥材成份有特殊需求之微生物可能無法長成菌落以供計數。因此以此二種方法同時檢測中藥材之微生物含量是必要的。此外，經照射後藥材之微生物生長常較未經照射處理之藥材緩慢，所以需稍延長觀察時間。藥材中之微生物含量雖是決定輻射照射劑量之重要因素，但其中微生物分佈之均勻度及主要菌株之輻射抗性亦是決定輻射照射劑量之重要因素。本次珍珠粉樣品觀察微生物相時，顯示，其未經照射時此菌含量並不高，但經10 kGy 照射後觀察殘存者僅為此淡粉紅色菌株（圖2），主要菌株之高度抗輻射性是造成輻射劑量提高之主要原因，其菌株特性值得進一步探討。

伍、結論與建議

中藥除基原不同，其採收、加工、炮製、包裝、運輸與貯存環境或防腐劑的添加等，均可能造成各中藥材中微生物含量之差異。藥材中之微生物含量是直接影響中藥材品質者，我們由先前研究計畫與今年度之研究結果皆明顯顯示不同地區（批次）採樣之中藥材其微生物含量差異極大。微生物及害蟲的長期生長腐蝕，將耗損藥材成份、抑低療效，甚或產生不良物質，若直接口含或生服藥材（如內服之珍珠粉）可能直接影響食用者之衛生安全。進口中藥材常因微生物嚴重污染而整批銷毀，而污染情形輕者則難免將就使用，其污染可能原因為藥材攜帶產地之微生物、運輸途中外來之微生物污染、再加上運輸與貯存過程微生物繼續滋生所致。若能在藥材仍新鮮的狀況下，於產銷上游即先進行規格化包裝與輻射滅菌，可避免長途運輸中微生物大量滋生，可以延長商品時間、保持藥材品質。輻射滅菌在低溫下進行，無須添加任何物質，可於藥材包裝後再進行滅菌，可以避免包裝時之二次污染，且鈷六十加馬照射不會誘發放射性物質，故為中藥材滅菌、滅蟲最好方法，有必要研發推廣。

本計畫探討 6 種中藥材加馬線照射滅菌，測試照射劑量與微生物殘存量之相關性，確認最佳照射劑量等條件。減少中藥材中的微生物含量，改善中藥材之衛生條件及防止藥物療效之降低，便於中醫藥委員會對中藥進口及包裝規格之研訂。由本實驗結果建議中藥材樣品完全滅菌之所需照射劑量分別為：葛根、杜仲、枳殼以 6 kGy 劑量照射；紅花以 10 kGy、桂枝以 12 kGy 劑量照射；珍珠粉樣品原始含菌量低於 10^2 CFU/g 之樣品以 5 kGy 劑量照射，若原始菌量高於 10^5 CFU/g（含有高抗輻射菌株）的珍珠粉樣品則建議以 27.5 kGy 劑量照射方可達完全無菌。期提供企業界進行中藥材加馬照射及行政單位制訂加馬線滅菌之照射劑量法規參考依據，開發輻射滅菌中藥材市場，並提高中藥材之經濟效益。

陸、參考文獻

1. Ehlermann DAE : Dosimetry and identification as a tool for official control of food irradiation. *Radia. Phys. Chem.*, 1995;46:693-698.
2. Loaharanu P : Cost/benefit aspects of food irradiation. *Food Technol.*, 1994;48:104-108.
3. Mayermiedbach E : Food irradiation-a means of controlling pathogenic microorganisms in food. *Food Sci. Technol.-Lebensmittel- Wissenschaft & Technologie*, 1993;26:493-497.
4. Takehisa M, Ito H : Experiences of food irradiation in Japan. *Food Rev. Int.*, 1986;2:19.
5. Thakur BR, Singh RK : Food Irradiation-chemistry and applications. *Food Rev. Int.*, 1994;10:437-473.
6. 劉希智，川烏鈷六十 γ 射線輻照前後生物活性的研究，中醫藥信息，1996；13：55。
7. 陳金月，60鈷- γ 射線輻照滅菌對大黃主要成分的影響，時珍國藥研究，1996；154-155。
8. 周學優，鉤藤Co輻照滅菌前後生物活性比較試驗，中成藥，1995；45：45。
9. 李耀維，黃蓮上清丸用 γ 射線輻照滅菌效果及對藥物活性的影響，山西中藥，1994；10：43-44。
10. Abou-Shady, M. R., El-Beih, Fawkia. M. and Tawfik, Zahira. S. 1992. Role of lipids in bacterial radioresistance. 5 th conf. Nucl. Sci. App., 2, 513-523.
11. Aziz, N. H. and Abd El-Aal S. S. 1990. Influence of potassium sorbate and sodium denzoate on gamma irradiated conidia of Aspergillus ochraceus, Penicillium chrysogenum and Fusarium moniliforme. *Isot. Rad. Res.*, 22,113-150.
12. Aziz, N. H., El-Fouly, M. Z., Abu-shady, M. R. and Moussa, L. A. A. 1997. Effect of gamma radiation on the survival of fungal and actinomycetal florae contaminating medicinal plants. *Appl. Radiat. Isot.*, 48, 71-76.

13. Aziz, N. H., Refia, M. K. and Abd El-Aal, S. S. 1990. Occurrence of aflatoxin and aflatoxigenic molds in coffee beans and decontamination by gamma-irradiation. *J. Egypt Vet. Med. Ass.*, 49, 951-961.
14. Byun, M. W., Kim, J. H., Lee, J. W., Park, J. W., Hong, C. S. and Kang, I. J. 2000. Effects of gamma radiation on the conformational and antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *J. Food Prot.*, 63, 940-944.
15. Byun, M. W., Lee, K. H., Kim, D. H., Kim, J. H., Yook, H. S. and Ahn, H. J. 2000. Effects of gamma radiation on sensory qualities, microbiological and chemical properties of salted and fermented squid. *J. Food Prot.*, 63, 934-939.
16. Chung, M. S., Ko, Y. T. and Kim, W. S. 2000. Survival of Pseudomonas fluorescens and Salmonella typhimurium after electron beam and gamma irradiation of refrigerated beef. *J. Food Prot.*, 63, 162-166.
17. 陳如茵，蔡美珠，吳家駒，錢明賽，利用調氣包裝及加馬照射延長截切蔬菜之貯藏期限，*食品科學*，999；26（4）：361-370。
18. 吳家駒，錢明賽，蝦粉、丁香魚與雞丁之照射，*核子科學*，1999；36（2）：122-133。
19. 吳家駒，錢明賽，牛肉粉、豬肉粉與雞肉粉之照射，*核子科學*，1998；35：404-415。
20. 吳家駒，錢明賽，楊瑞森，郭俊源，照射蒜頭推廣工作，*核子科學*，1996；33（1）：52-57。
21. 吳家駒，楊瑞森，生薑之照射處理，*食品科學*，1994；21（6）：485-494。
22. UNIDO. 1984. Guidelines for commercial plantation and manufacture of medicinal and aromatic plants.
23. Owczarczyk, H. B., Migdal, W. and Kedzia, B. 2000. The pharmacological activity of medical herbs after microbiological decontamination by irradiation. *Radia. Phys. Chem.*, 57, 331-335.
24. Kim, M. J., Yook, H. S. and Byun, M. W. 2000. Effects of gamma irradiation on microbial contamination and extraction yields of Korean medicinal herbs. *Radia. Phys. Chem.*, 57, 55-58.
25. Migdal, W., Owczarczyk, B., Kedzia, B., Holderna-Kedzia, E. and Segiet-Kujawa, E. 1998. The effect of ionizing radiation on microbiological

- decontamination of medical herbs and biologically active compounds. *Radia. Phys. Chem.*, 52, 91-94.
26. Takehisa, M. and Ito, H. 1986. Experiences of Food Irradiation in Japan. *Food Rev. Int.*, 2, 19.
27. Cottee, J., Kunstadt, P. and Fraser, F. 1995. Commercialization of Food Irradiation in the USA. *Radia. Phys. Chem.*, 46, 669-672.
28. Ehlermann, D. A. E. 1995. Dosimetry and Identification as a Tool for Official Control of Food Irradiation. *Radia. Phys. Chem.*, 46, 693-698.
29. Mayermieberach, E. 1993. Food Irradiation-A Means of Controlling Pathogenic Microorganisms in Food. *Food Sci. Technol.-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie.*, 26, 493-497.
30. Chou, F. I. 1998. Pollen Gamma-ray Irradiation. *Nucl. Sci. J.*, 35, 165-171.
31. Chou, F. I. 1999. The sterilization of pollen with cobalt-60 gamma radiation-a study of the radiation resistance of strain isolated from pollen. *Plant Pathology Bulletin.*, 7, 23-28.
32. Chou, F. I., Chung, H. P., Chung, R. J., Wei, Y. Y., Chen, C. J. and Chang, C. G. 1999. The sterilization of lycium fruit with cobalt-60 gamma radiation. *Nucl. Sci. J.*, 36, 302-308.
33. Chou, F. I., Chung, H. P., Wen, H. W., Chen, C. T. and Chang, C. G. 2001. The sterilization of Astragali Radix with gamma-ray irradiation. *Nucl. Sci. J.*, 38, 271-278.
34. Chou, F. I., Chung, H. P., Wen, H. W., Wei, Y. Y., Chen, C. T. and Chang, C. G. 2001. Sterilization of Chinese medicinal herbs with cobalt 60 gamma irradiation. *Nucl. Sci. J.*, 38, 279-288.
35. Chou, F. I., Chung, H. P. and Wen, H. W. 2002. Effects of gamma irradiation on the storage quality of dry groats of coix. 89th International Association for Food Protection. P.64. June 30-July 3, San Diego, California U.S.A.
36. Chou, F. I., Chung, H. P. and Wen, H. W. 2002. The sterilization of uncooked Chinese medicinal herbs with cobalt-60 gamma radiation. *Applied Radiation and Isotopes*. (Accepted)

- 37.Ouattara B., Giroux M., Smoragiewicz W., Saucier L. and 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.
- 38.Chou, F. I. and Tan, S. T. 1990. Manganese (II) Induces Cell Division and Increases in Superoxide Dismutase and Catalase Activities in an Aging Deinococcal Culuture. *J. Bacteriol.*, 172, 2029-2035.
- 39.Chou, F. I. and Tan, S. T. 1991. Salt-Mediated Multicell Formation in Deinococcus radiodurans. *J. Bacteriol.*, 173, 3184-3190.

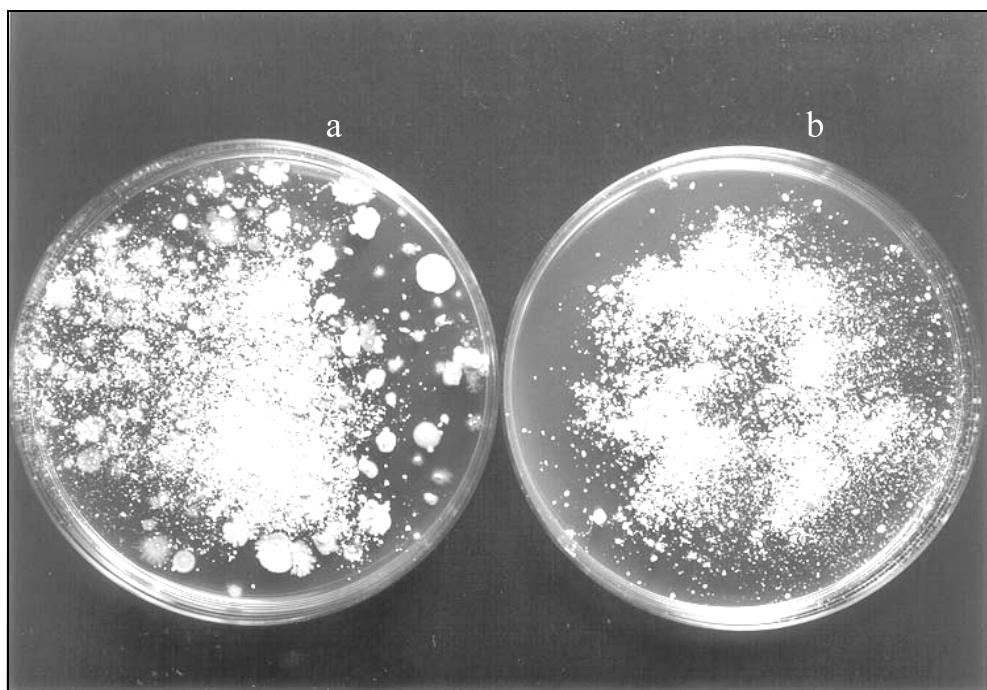


圖 1、珍珠粉輻射滅菌：a 為未經照射、b 為經 10 kGy 照射後，將珍珠粉樣品直接置於 PCA 平面培養基上培養 2 天所呈現之微生物相。

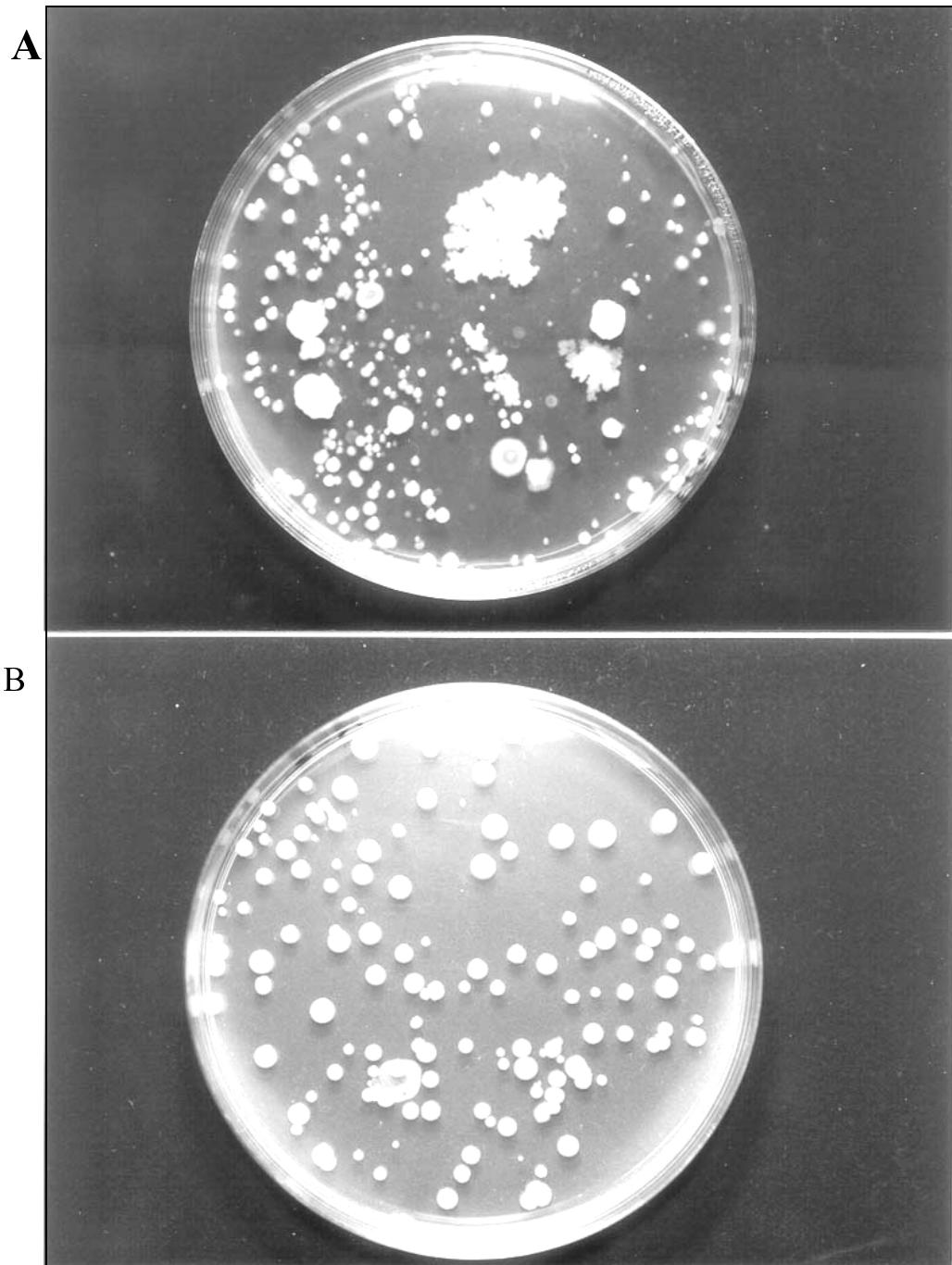


圖 2、珍珠粉輻射照射前後之微生物相：A 為未經照射及 B 經 10 kGy 照射後，將珍珠粉樣品之磷酸懸浮液稀釋 100 倍，塗佈於 PCA 平面培養基上培養 2 天所呈現之微生物相，可見照射後樣品之主要殘存菌株為淡粉紅色菌株。

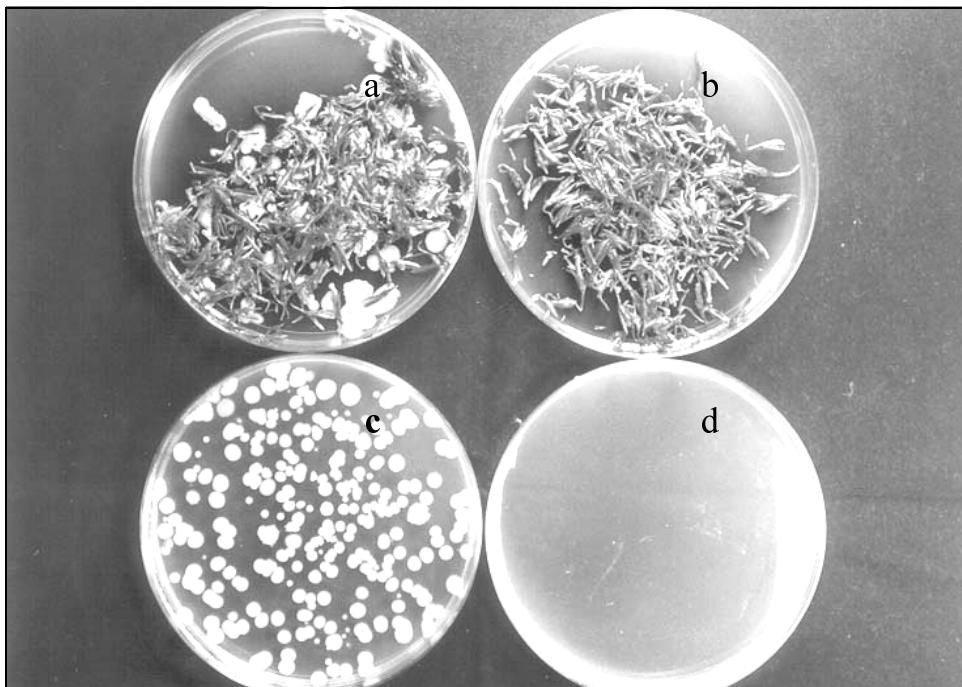


圖 3、紅花樣品輻射滅菌：a、b 為未經照射及經 8 kGy 照射後之紅花樣品直接置於培養基上培養；c、d 為未經照射及經 8 kGy 照射樣品經 100 倍稀釋後之浸液塗抹於培養基上者。無論是樣品直接放置或以浸液塗抹，未經照射者經培養 2 天後，有大量微生物生長，經 8 kGy 照射後已無微生物殘存。

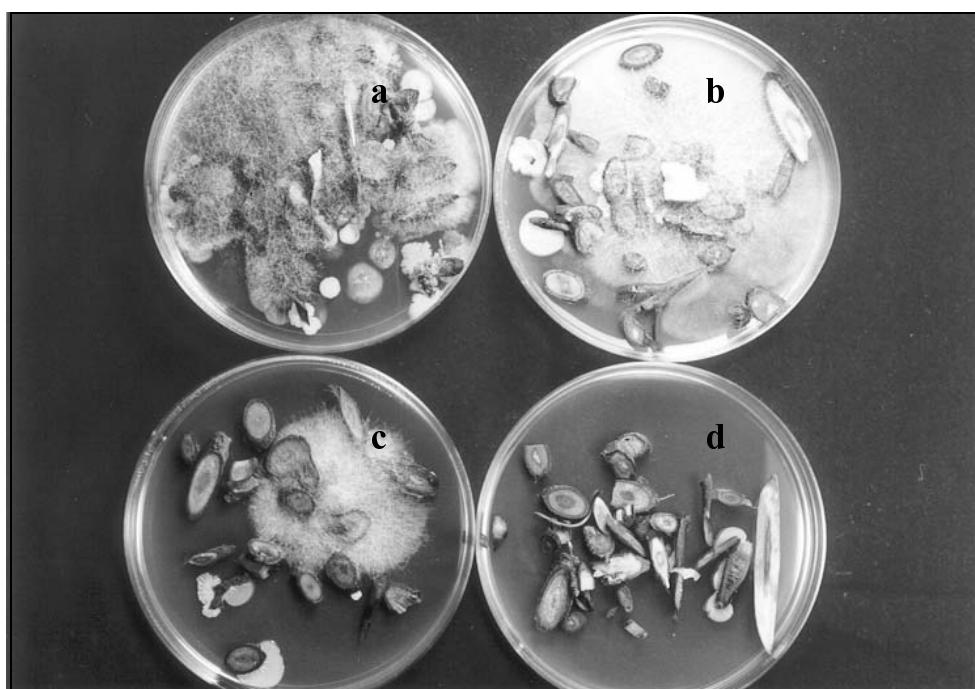


圖 4、桂枝樣品輻射滅菌：a、b、c、d 為桂枝未經照射及經 2、4、6 kGy 照射後，樣品直接置於培養基表面經 2 天培養後之微生物生長狀況。

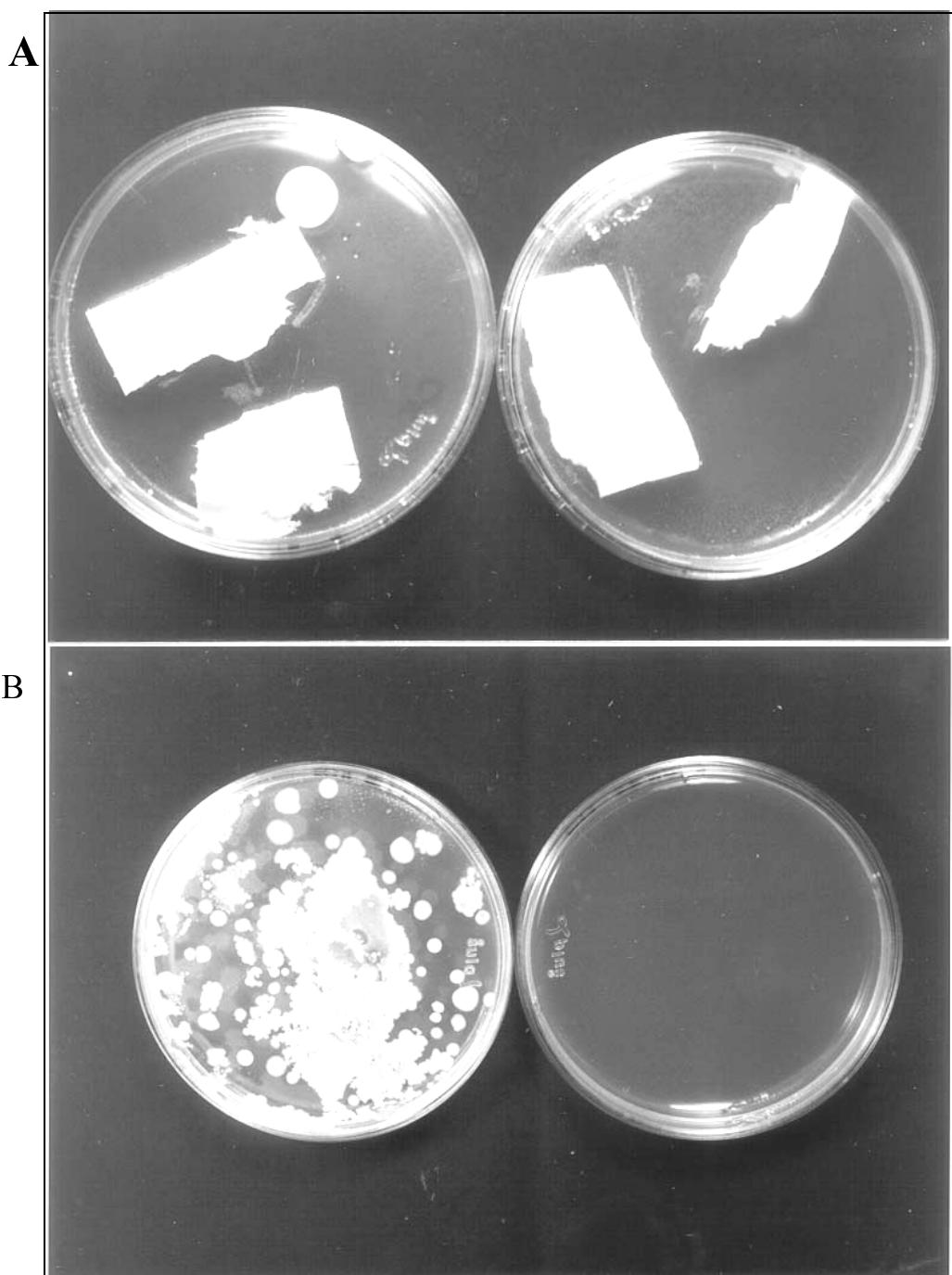


圖 5、葛根樣品輻射滅菌：A 組為未經照射（左）及經 4 kGy 照射（右）後直接置於培養基上培養；B 為未經照射（左）及經 4 kGy 照射（右）取 10 倍稀釋之浸液塗抹於培養基培養。圖中可見樣品經 4 kGy 照射後已無微生物生長。

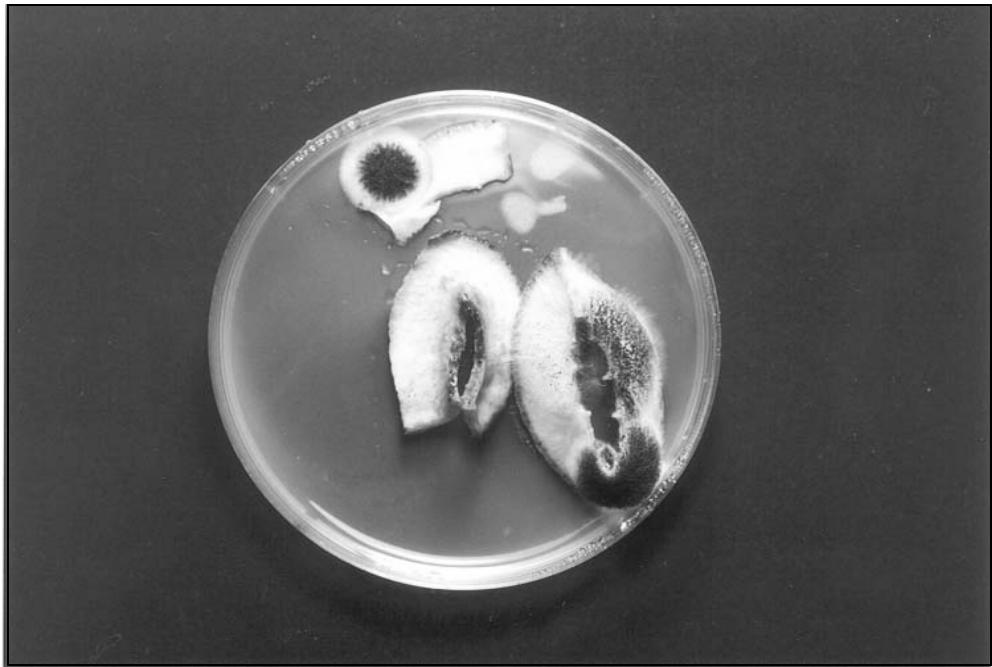


圖 6、未經照射之枳殼樣品直接置於 PCA 培養基上，培養 2 天後
可見黴菌生長。

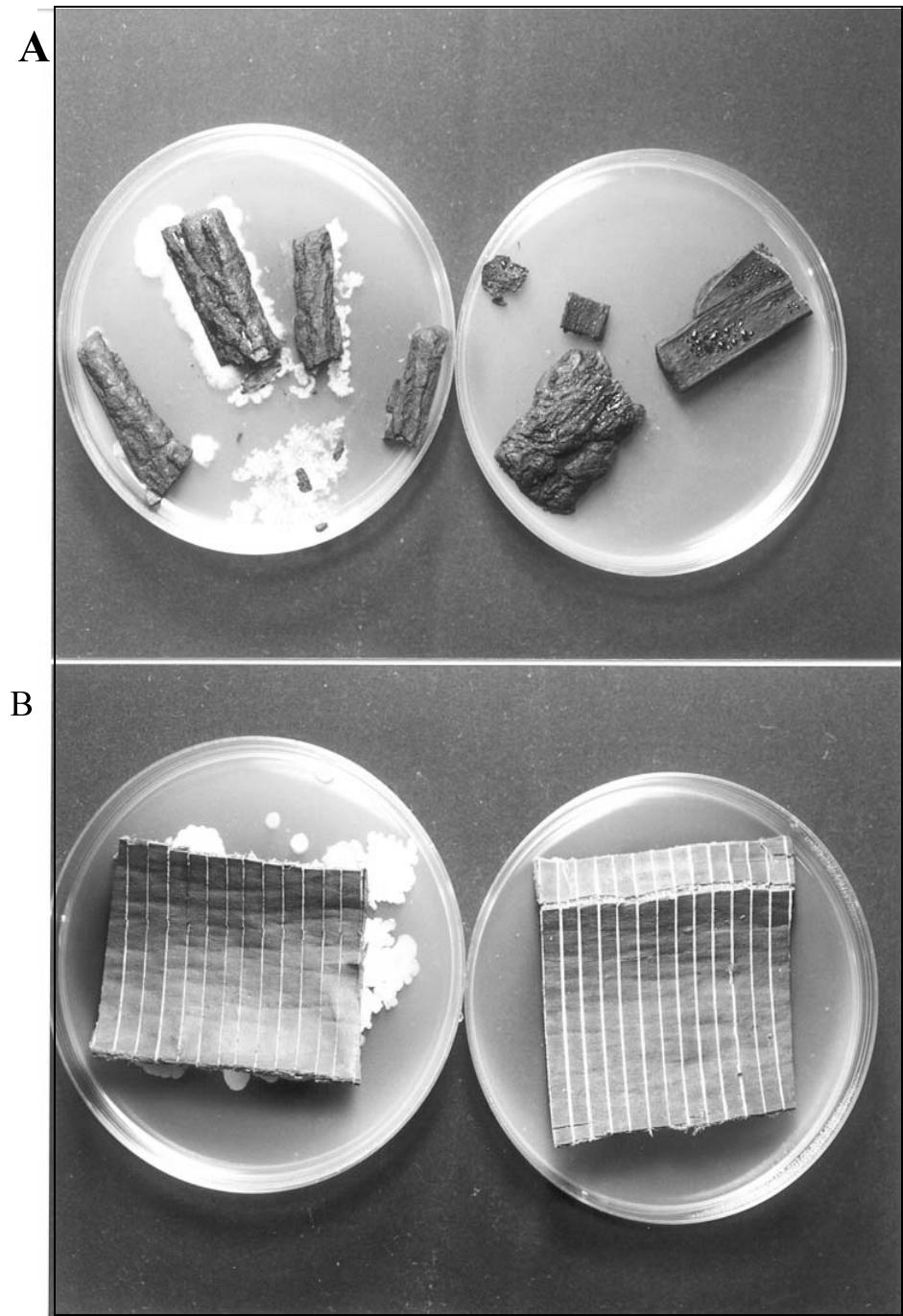
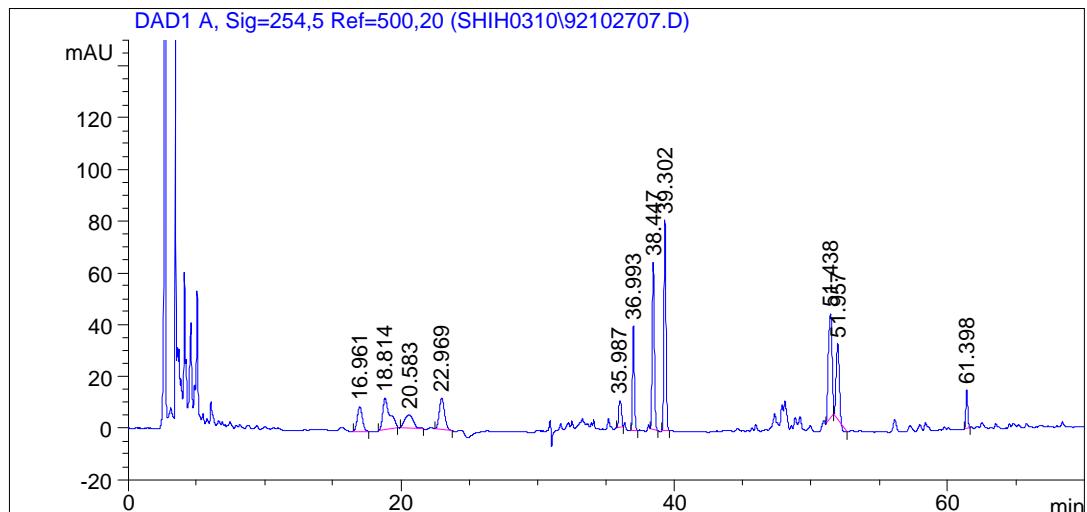


圖 7、杜仲樣品輻射滅菌：A 為炒杜仲樣品；B 為生杜仲樣品：其
左側為未經照射樣品有微生物生長，右側為經 4 kGy 輻射照
射者已無微生物生長。

A



B

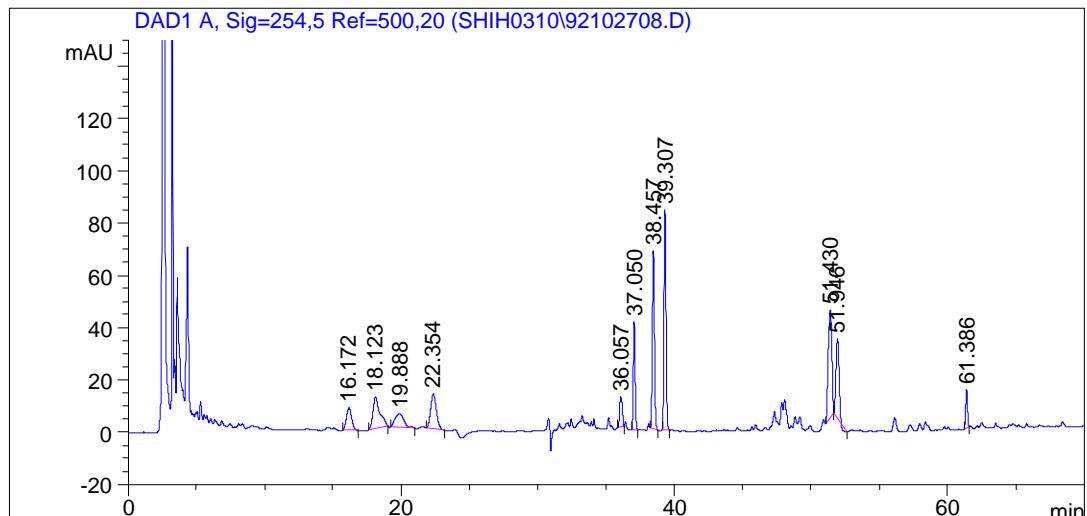


圖 8、輻射照射前後之紅花組成成份 HPLC 分析圖譜。

A.未經照射樣品之組成成份，B.經 10 kGy 照射樣品之組成成份。

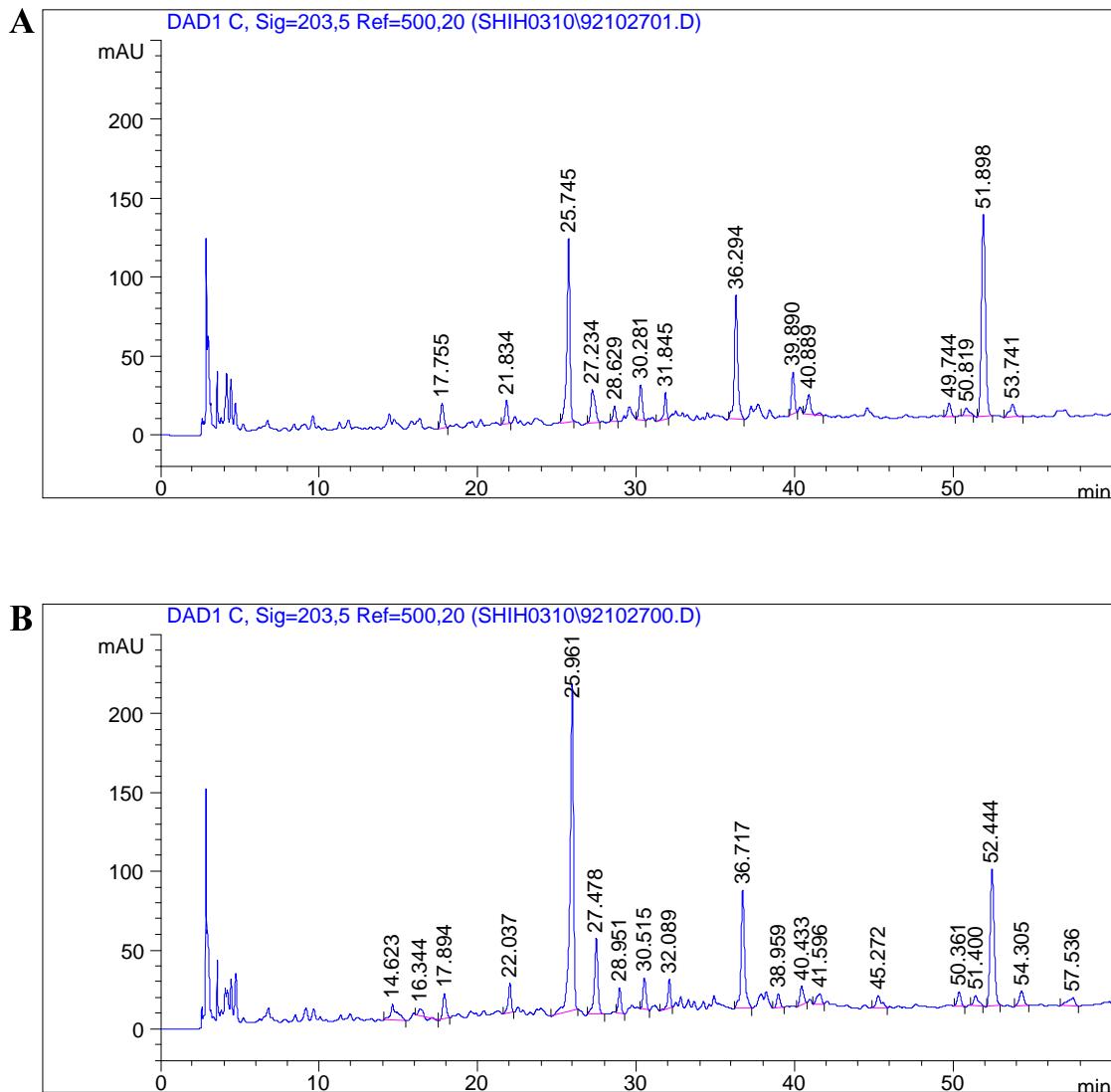


圖 9、輻射照射前後之杜仲組成成份 HPLC 分析圖譜。

A.未經照射樣品之組成成份，B.經 6 kGy 照射樣品之組成成份。

表 1、珍珠粉經加馬線照射後之殘存微生物量 (CFU/g)

編號 ^a	照射劑量 (kGy)						
	0	5	10	15	20	25	27.5
I	2.6×10^6 ^b	3.7×10^5	6.2×10^4	1.3×10^3	8.5×10^2	2.8×10^1	0
II	2.3×10^6	1.2×10^5	1.7×10^4	4.4×10^3	3.5×10^2	0	0
III	8.3×10^5	4.4×10^5	8.3×10^4	8.0×10^3	1.1×10^3	5.2×10^2	0
IV	8.8×10^1	0 ^c	0	— ^c	—	—	—
V	1.2×10^1	0	0	—	—	—	—

^a 編號分別表五個不同地區所採集之樣品^b 三重複測試之平均值^c —表未受測

表 2、紅花經加馬線照射後之殘存微生物量 (CFU/g)

編號 ^a	照射劑量 (kGy)					
	0	2	4	6	8	10
I	1.2×10^6	1.4×10^5	2.2×10^4	1.5×10^3	2.1×10^2	0
II	6.0×10^4	2.4×10^3	1.3×10^2	1.1×10^2	0	— ^c
III	5.3×10^4	1.2×10^4	4.8×10^2	0	—	—
IV	1.2×10^4	8.9×10^3	7.4×10^2	0	—	—
V	2.5×10^3	7.3×10^2	1.6×10^2	3.4×10^1	<10	0

^a 編號分別表五個不同地區所採集之樣品^b 三重複測試之平均值^c —表未受測

表3、桂枝經加馬線照射後之殘存微生物量 (CFU/g)

編號 ^a	照射劑量 (kGy)						
	0	2	4	6	8	10	12
I	1.2×10^6	5.8×10^4	2.6×10^3	1.4×10^2	7.5×10^1	3.7×10^1	0
II	2.8×10^4	2.1×10^3	2.2×10^2	<10	0	— ^c	—
III	7.7×10^3	4.4×10^2	0	—	—	—	—
IV	6.8×10^3	3.3×10^1	0	—	—	—	—
V	1.8×10^3	2.2×10^1	0	—	—	—	—

^a 編號分別表五個不同地區所採集之樣品^b 三重複測試之平均值^c —表未受測

表4、葛根經加馬線照射後之殘存微生物量 (CFU/g)

編號 ^a	照射劑量 (kGy)				
	0	2	4	6	
I	5.8×10^2 ^b	2.5×10^1	<10	0	
II	2.9×10^3	<10	0	— ^c	
III	1.1×10^2	<10	0	—	
IV	2.3×10^1	0	—	—	
V	4.5×10^1	0	—	—	

^a 編號分別表不同地區所採集之樣品^b 三重複測試之平均值^c —表未受測

表 5、枳殼經加馬線照射後之殘存微生物量 (CFU/g)

編號 ^a	照射劑量 (kGy)			
	0	2	4	6
I	5.2×10^2 ^b	1.4×10^2	5.6×10^1	0
II	3.1×10^2	5.7×10^1	0	— ^c
III	2.1×10^2	0	0	—
IV	4.8×10^2	< 10	0	—
V	6.8×10^1	2.2×10^1	1.1×10^1	0

^a 編號分別表不同地區所採集之樣品^b 三重複測試之平均值^c — 表未受測

表 6、杜仲經加馬線照射後之殘存微生物量 (CFU/g)

編號 ^a	照射劑量 (kGy)		
	4	6	
生杜仲 I	3.6×10^3	7.4×10^2	1.2×10^2
生杜仲 II	1.9×10^2	2.3×10^1	0
生杜仲 III	8.1×10^1	6.7×10^1	0
炒杜仲 I	< 10	0	0
炒杜仲 II	0	0	0
炒杜仲 III	0	0	0

^a 編號分別表不同地區所採集之樣品^b 三重複測試之平均值^c — 表未受測

表 7、珍珠粉及桂枝樣品經加馬照射後以 VRBGA 培養基測出之腸內菌含量 (CFU/g)

樣品	照射劑量 (kGy)			
	0	2	4	5
珍珠粉	5.5×10^2	<10	0	0
桂枝 I	4.3×10^3	3.7×10^2	<10	0
桂枝 II	1.7×10^3	2.9×10^1	0	— ^a

^a—表未受測

**表 8、珍珠粉經不同處理後其顏色之 Hunter L. a. b. 值
及粗蛋白、粗脂肪含量**

Treatment	L.	a.	b.	Crude protein (g / 100g)	Crude fat (g / 100g)
0 kGy	92.32 ± 0.57^a	-0.38 ± 0.13	2.62 ± 0.41	2.10 ± 0.12^a	0.14 ± 0.02
10 kGy	88.84 ± 1.02	-0.45 ± 0.05	2.65 ± 0.23	— ^b	—
27.5 kGy	87.01 ± 1.87	-0.48 ± 0.06	3.09 ± 0.24	2.15 ± 0.07	0.16 ± 0.03

^a 數據均為三重複測試之平均值

^b—表未受測

表9、以HPLC分析中藥於照射前、後之指標成份變化

單位重量樣品之含量 (mg/g)			
指標成份	編號	未經照射	12 kGy 照射
	I	0.83	0.75
桂枝	II	0.89	0.82
Cinnamic acid	III	0.85	0.72
	Ave. ^a	0.85	0.78
指標成份	編號	未經照射	6 kGy 照射
	I	0.86	0.86
葛根	II	0.90	0.87
Daidzein	III	0.84	0.88
	Ave.	0.87	0.87
指標成份	編號	未經照射	6 kGy 照射
	I	40.12	41.26
枳殼	II	38.22	40.76
Naringin	III	39.09	41.67
	Ave.	38.49	41.23

^a Ave.表示三重複之平均值