

中藥（材）加馬射線滅菌研究（3/3）

The Studies of Gamma-ray Sterilization of Chinese Medicinal Herbs （3/3）

國立清華大學原科中心同位素組

周 鳳 英

摘 要

中藥材因基原不同，成分品質有極大差異，其中微生物含量是直接影響中藥材品質者。本計畫為中藥材加馬線滅菌研究，結果將提供行政院衛生署中醫藥委員會作為研訂中藥材規格之參考依據。

計畫中選擇6種中藥（材）包括山茱萸、柴胡、甘草、虎杖、紫草與台灣產之山藥進行加馬線滅菌保存測試。輻射滅菌於清華大學原科中心同位素組三萬居里鈷六十照射熱室中進行照射。內容包括受測中藥材加馬線滅菌所需輻射照射劑量訂定，研訂中藥材加馬線滅菌的照射條件，與輻射滅菌後之中藥材品評。

結果顯示，各樣品間之微生物種類及含量有極大不同，同一樣品因批次不同其微生物量亦有顯著差異。其中以甘草之生菌數最高，單位重量菌數為 $10^4 \sim 10^7$ CFU/g，樣品需高於 20kGy 劑量照射方能達完全滅菌效果。山茱萸、柴胡、虎杖、紫草及台灣產之山藥，單位重量菌數約為 $10^1 \sim 10^3$ CFU/g，經 8~10kGy 劑量照射可達完全滅菌。

上述山茱萸、柴胡、甘草、虎杖與紫草中藥材以所需最高輻射滅菌劑

量照射後進行貯存試驗，並對部分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。此外，經照射之藥材其外觀品質與未照射者無明顯差異。甘草照射前後之組成份含量亦無明顯變化。研究成果將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

Nuclear Science and Technology Development Center,
National Tsing Hua University

F. I. Chou

ABSTRACT

Since Chinese Medicinal Herbs (CMHs) originate from many different locations, there is a wide variety in the quality of components from the same species. Among many factors causing variety, the contamination of microbe is the major determination for the quality of CMHs. For improving the quality of CMHs, we aimed to establish a gamma-irradiated decontamination system from our study. This system can provide a reference basis to the Committee on Chinese Medicine and Pharmacy Department of Health, the Executive Yuan in order to set up laws and regulations for governing CMHs.

In this program, we studied the following 6 CMHs: Polygonum Cuspidatum, Lithospermi Radix, Bupleuri Radix, Corin Fructus, Glycyrrhizae Radix, and the Taiwan cultivated Dioscoreae Rhizoma. The irradiation take place at the 30,000 Ci co-

balt-60 hot cell at the National Tsing Hua University, Nuclear Science and Technology Development Center, Isotope Division. We found out the effective gamma irradiation dose, established the proper irradiation conditions and techniques, and did the sensory tests for the 6 medicinal herbs before and after irradiation.

From our study, we found out that different species of CMHs have extreme diversity of the amount and species of microbe. Moreover, even the same species of CMHs also have a wide diversity of the amount and species for microbe. The microbe contenting in *Glycyehizae Radix* ranged from 10407CFU/g, and the irradiated decontamination dose needed higher than 20kGy. The microbe contenting in *Polygonum Cuspidatum*, *Lithospermi Radix*, *Bupleuri Radix*, *Corin Fructus*, *Glycyrrhizae Radix*, and the Taiwan cultivated *Dioscoreae Rhizoma* ranged from 10103CFU/g and the gamma irradiated decontamination dose is 8-10kGy.

After the gamma irradiation and then 3-month storage under room temperature, these 6 CMHs were incubated on the solid agar plates in order to observe the growth of microbes. During 7-day observation, no microbe appeared on any agar plate. Besides sterilization, we also did the sensory tests and components analysis for part of the 6 CMHs and there were no notable differences between before and after gamma irradiation. From this result, we conclude that the gamma irradiation has high efficiency to sterilize microbe for CMHs.

From our study, we can set up a gamma irradiation system for different species of CMHs. This system not only can provide a reference to the industries but also can supply government agencies with a basis for laws and regulations for the gamma-ray sterilization.

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。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、鉤藤加馬輻射滅菌前、後生物活性比較試驗等研究，顯示其在中藥及成藥之輻射滅菌上有相當深入的研究與應用⁽⁶⁻¹⁵⁾。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⁽¹⁶⁻²⁴⁾。世界各國對藥草之滅菌、滅蟲核可照射劑量如下：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 10kGy，丹麥與荷蘭為 15kGy、美國為 30kGy，韓國核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⁽²⁵⁾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。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），及多項牛肉、果泥、菇類食品、及中藥材進行輻射照射滅菌之研究⁽²⁶⁻³³⁾。我們已對部分中藥材及花粉之輻射滅菌及食品微生物之輻射抗性進行探討，輻射照射對人參、枸杞等中藥材與花粉等健康食品具有良好的滅菌效果^(16-17,20)。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添加防腐物質處理，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。中藥材若能於完善包裝後進行輻射滅

菌，將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。

本計畫選擇山茱萸、柴胡、甘草、虎杖、紫草與台灣產之山藥建立中藥材以加馬線滅菌保存方法。期能提供企業界進行中藥材加馬線照射及行政單位制訂中藥材加馬線滅菌之法規、進口中藥材規格管制之研訂參考，並進行照射後藥材之品評，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。

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 1kGy 至 20kGy（劑量率為 5 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 FeSO_4 ，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（ Fe^{2+} ）氧化成鐵離子（ Fe^{3+} ），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 0.01M 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，可使劑量範圍增至 10^5Gy 。

二、中藥（材）取樣與輻射照射

研究所用之山茱萸、柴胡、甘草、虎杖與紫草分別由中藥行及中藥進口商金保安公司取樣。台灣產之山藥主要為生食用，實驗中不同品種之山藥分別自超市購得。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 15g 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，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

1. 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 分別加入之三角瓶中，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 之培養皿中，每皿約 10-15mL，冷卻備用。
2. 液態培養基 tryptic soy broth (TSB; Difco. Co.)、及 plate count broth (PCB; Difco. Co.) 製備：取 TSB 粉末 30g，PCB 粉末 17g，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 9mL，如上述狀況高壓滅菌，置冰箱冷藏備用。
3. 磷酸緩衝液之製備：取 4.54g KH_2PO_4 ，5.43g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 先溶於少許水中，再將體積加至 1L (pH 值為 7.2)。加入磁石攪拌均勻分裝至玻璃試管中，每管 9mL，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處理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：

1. 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 4°C 下浸泡 60 分鐘，再置於振盪器中以 75rpm、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 及 PDA 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，第三、四天再取出，計數生長較緩慢之菌落。每一測試濃度均作三重複計數。

2. 樣品微生物殘存直接觀察法：將中藥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與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

將上述山茱萸、柴胡、甘草、虎杖及紫草五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，以了解照射後中藥材之貯存安定性。

六、中藥材照射前後感官品質探討

1. 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。
2. 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），探討照射是否影響樣品之外觀顏色。
3. 官能品評：選取部份中藥材請品評員就樣品的外觀與氣味等進行品評，了解照射是否影響樣品的感官品質。

七、中藥材照射前後組成份含量測定

本研究中選擇所需照射劑量最高之甘草樣品進行分析，取未經照射與經 15kGy 照射樣品分別混合均勻後分裝，編以代號，委託財團法人製藥工業技術發展中心進行分析。對不同處理之樣品分別進行三重複取樣，每一樣品取 5 克進行分析。樣品萃取係以 50 % 之甲醇溶液於室溫中超音波震盪，取震盪後之萃取液以 80g 離心 5min，再取其上清液定量體積至 100ml，取適量溶液經 0.22 μ m 濾膜過濾後，每次取 10 μ l 注入高效液相層析儀中（HPLC）中進行樣品中之成分分析。所用分析管柱為矽基質逆相碳 18 管柱（reversed phase C18 col-

umn: 4.6×250mm；particle size 5μm），紫外光檢測波長為 200nm。移動相經 0.45μm 濾膜過濾後，以流速 1.0ml/min 於 30℃下進行分析。以甘草之指標成份 glycyrrhizin、licuritin 配成濃度 500μg/ml 為標準品，計測甘草樣品中之指標成份含量。

八、中藥材照射前後元素含量變化探討

計劃書中原擬選擇單一中藥樣品以中子活化分析探討其照射前後之元素含量變化，因計劃執行期間原子爐正進行大型維修，故將實驗改以原子吸收光譜分析之。方法為先將中藥材乾燥後以磨粉機磨成粉末，秤取 1 克置入鐵氟龍高壓瓶中，加入 3 ml 硝酸（14 N）與 0.5ml 雙氧水（30%）對樣品進行二段式微波消化（MLS 1200 Miesfone, Italia），待溶液呈現澄清即達完全消化，將其以蒸餾水稀釋後備用。就其中擬測試之元素含量多寡決定測試方式，含量較高者如鉀、銅、鎂、鐵、鋅、錳等以火焰式原子吸收光譜測之。含量較低者如鉛、鎘、鎳、鉻等以石墨爐式原子吸收光譜（GFAAS spect AA-30, Varian）測之。

參、結 果

一、中藥材加馬線照射滅菌

甘草、山茱萸、柴胡、虎杖、紫草與山藥之加馬線輻射滅菌及微生物含量測定，以表面平板計數法計數不同劑量照射後樣品中微生物之殘存率。結果顯示，同一種中藥樣品因批次不同其微生物含量有很大差異。中藥樣品經不同輻射劑量處理後分別浸於緩衝液中振盪，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。其中以甘草之微生物污染情形最嚴重，如表 1 所示。五個批次採樣之甘草樣品所含菌數約 $10^4 \sim 10^7$ CFU/g，甘草原始菌量較低者以 12 kGy 劑量照射可達到良好滅菌效果；但原始菌量較高者以 20kGy 劑

量照射仍無法完全滅菌。五個批次取樣中一原始菌量為 1.3×10^7 CFU/g 之甘草樣品，照射劑量為 20kGy 時仍有 2.3×10^3 CFU/g。圖 1A 為甘草樣品未經照射及經 4、12、16kGy 輻射劑量處理後浸於緩衝液中，取浸液經 100 倍稀釋後塗抹於培養基表面，培養 1 天後之微生物相。可看出未經照射樣品之菌落數均非常高，隨照射劑量增加，其殘存菌量漸減。圖 B 為不同批次取樣之樣品，如上述圖 A 中樣品處理後之微生物相。比較圖 A 與 B 樣品之輻射滅菌效果，照射劑量為 16kGy 時 A 樣品之培養皿中已無微生物生長，而 B 樣品仍有約 10^2 之菌落數。圖 2 為不同批次之甘草樣品未經照射處理直接置於平面培養基中培養，由圖中顯示 A、B 樣品上及其周圍皆有細菌菌落分布。微生物相較顯著不同的是 B 樣品中之微生物種類較複雜，真菌含量較高，其真菌菌落由樣品上開始生長，菌絲往培養基上伸展，並見到灰色與黑色之孢子。

表 2 為五個批次取樣的柴胡、紫草、山茱萸及虎杖經不同劑量照射後樣品中微生物之殘存量，其微生物量為 $10^2 \sim 10^4$ CFU/g，所需輻射滅菌劑量為 8~10kGy。圖 3 所示為同一批次之未經輻射照射與經 8kGy 照射的柴胡樣品，直接置於培養基表面與浸泡之浸液塗抹於培養基平板上，培養 1 天後之微生物相，可看出 8kGy 劑量照射後之微生物含量有明顯減少。圖 4 經未經照射之柴胡樣品直接置於培養基上培養 3 天後之微生物相，可見不同菌落形態之微生物繁殖。經 3 天之培養後其中之黴菌明顯佈滿於樣品周圍，於第 1 天及第 2 天所呈現之細菌菌落漸被黴菌所覆蓋，僅有部分周圍之細菌菌落仍能辨識。圖 5 為經不同劑量照射處理之紫草取其浸液稀釋後塗抹於培養基上之微生物相，可見有數種型態不同之微生物菌落。隨照射劑量增加，其殘存菌量漸減，至 8kGy 時已無微生物生長。圖 6 為未經輻射照射之山茱萸樣品直接置於培養基表面與浸泡之浸液塗抹於培養基平板上培養所呈現 1 天及 5 天後之微生物相。圖 A 中取懸浮液塗抹者可見許多微生

物菌落生成，而將中藥樣品直接放置於培養皿表面者，於培養 1 天後菌落生成較不明顯。而培養至第五天時可見許多真菌菌株增生往外擴散形成明顯之菌落，且自山茱萸樣品上生長並將樣品包圍，而未放置樣品之培養基上則無菌落生成（圖 6B）。比較圖 A、B 之微生物相，推測此真菌生長速度較慢且生長需山茱萸本身之特殊營養，故單獨取其浸液塗抹者不見此真菌菌株生長。圖 7 所示為不同批次之虎杖經 4 kGy 與未經照射後直接置於固體培養基培養 3 天後之微生物相。由 A、B 圖中可見未經照射之樣品有明顯之微生物菌落生成，而照射後之虎杖則有明顯的滅菌效果；比較 A、B 圖中之微生物相顯示不同批次之樣品間之微生物種類與數目有極大差異。

台灣產之山藥多為生食或直接烹調用，鮮少乾燥後藥用。目前市售之山藥均為帶皮販售，消費者待食用時才去皮。大陸產之山藥中藥材原始菌數為 $10^1 \sim 10^2$ CFU/g。台灣產之新鮮山藥未去皮時將其整條縱切為小段，置入無菌袋中加入磷酸緩衝液，以鐵胃震盪成小碎塊後，取其懸浮液稀釋後塗抹於培養基上培養。四批山藥樣品測得其平均原始菌數為 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g（三重複），若將山藥以無菌操作去除外皮後，取可食部位測得其平均原始菌數為 $10^1 \sim 10^2$ CFU/g。嘗試將包裝後之整條山藥以鈷六十進行照射，經 8 kGy 照射後未去皮之山藥測得之菌數降低為 $10^1 \sim 10^2$ CFU/g；以 10~12 kGy 照射後山藥樣品可達完全滅菌。山藥表皮帶有許多土壤中之微生物或蟲害，若於高溫多濕之不當環境中貯存，極易發生蟲蛀、發霉等品質劣變。台灣產之新鮮山藥若於採收、包裝後即進行加馬輻射滅菌，應可有效抑低微生物含量，並延長商品壽命。

二、中藥材貯存試驗

將五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，分別於貯藏之第 1、2、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。結果顯示山茱

黃、柴胡、虎杖與紫草 4 種中藥材包裝後照射處理，經 3 個月之室溫貯藏，與剛照射後樣品所培養出之微生物含量相同，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。而部分甘草樣品以 16kGy 輻射劑量照射後進行貯藏之樣品中仍有微生物生長，且將樣品直接置於平面培養基表面，經 5 天培養後於培養基上可見菌落生成。其中一黃色菌株於解剖顯微鏡下觀察明顯可見微生物產氣之情形（如圖 8），推測此菌株為甘草樣品中之主要抗輻射菌株。

三、照射後中藥材之感官品質測試

篩選 25 位品評員進行受測中藥材外觀與香氣特性的差異測試。由 25 名品評員之三角測試結果，答對之人數皆未達統計上 $p < 0.05$ 之顯著差異（25 人中需 13 位以上品評員答對）^(17, 34)，顯示 5 種中藥材於照射前、後，無論直接觀察或於顯微鏡下比較其外觀品質皆無明顯差異。請品評員比較甘草及山茱萸於照射前後之氣味亦無變化。

中藥材或為植物之根、莖、葉，或為其果實，產地來源、加工過程或切片方式等不同，造成中藥材之外觀形狀或顏色等變化甚大。實驗中選擇外觀形狀較整齊或整體觀察較均質之虎杖、甘草及山茱萸以色差計（color meter）測定樣品於輻射照射前、後之顏色變化，虎杖及甘草片選定固定範圍直接測量，山茱萸則裝入直徑 3cm 之圓形石英槽中，佈滿底面後測量整個底面之顏色。每一種中藥選 5 個樣品，每一樣品進行 5 重複之測量。照射前虎杖測得之平均 Hunter L、a、b 值分別為 42.70 ± 1.19 、 15.09 ± 0.17 及 22.80 ± 0.55 。甘草測得之 Hunter L、a、b 值分別為 68.13 ± 0.69 、 4.12 ± 0.34 及 28.54 ± 0.87 。山茱萸測得之 Hunter L、a、b 值分別為 17.38 ± 1.06 、 6.78 ± 2.11 及 3.46 ± 0.78 。其中山茱萸形狀較不整齊，每次測量時裝入石英槽中的樣品緊密度較難控制，因此數據之變化較大。照射後虎杖測得之平均 Hunter L、a、b 值分別為 43.50 ± 1.04 、 15.29 ± 0.09 及 23.50 ± 0.36 。甘草測得之 Hunter

L、a、b 值分別為 67.33 ± 0.58 、 4.32 ± 0.54 及 28.14 ± 0.54 。山茱萸測得之 Hunter L、a、b 值分別為 16.83 ± 1.26 、 6.25 ± 1.65 及 3.06 ± 0.48 。分別比較照射前、後樣品之 L、a、b 數值，顯示輻射照射對虎杖、甘草及山茱萸之外觀顏色無顯著性變化。

七、中藥材照射前後組成份含量測定

甘草之市場消費需求高，且所需之輻射滅菌劑量為五種藥材中最高者，故選擇甘草進行照射前、後之成分分析。圖 9A 為甘草之指標成份 glycyrrhizin、liquiritin ($500 \mu\text{g/ml}$) 之 HPLC 圖譜，其遲滯時間 (retention time) 分別為 6.92 及 26.93 分鐘。圖 9B 為未照射之甘草經甲醇 (50%；V/V) 萃取後所得的萃取物之層析圖；圖 9C 為甘草樣品經 15 kGy 輻射照射後同樣以甲醇萃取後所得的萃取物之層析圖。於相同層析條件下比較圖 9A、B、C 後，發現受測甘草藥材無論輻射照射與否，於相同的遲滯時間均可偵測到有波峰出現。比較未經輻射照射與照射後樣品萃取後成份之圖譜 (圖 9B 及 C)，顯示照射後樣品之組成份無明顯改變。將 HPLC 圖譜中指標成份之積分面積換算為甘草樣品單位重量之濃度，結果如表 3 所示。未經照射與照射後之甘草其 liquiritin 平均含量分別為 10.52 及 10.61 mg/g；glycyrrhizin 含量分別為 25.30 與 25.58 mg/g，顯示輻射照射對甘草樣品之成份無明顯影響。

八、中藥材照射前、後之元素含量測定

隨機選取一批次之甘草及虎杖樣品進行其輻射照射前、後之元素含量測定，將樣品以磨粉機磨粉後，以硝酸進行消化，再以 AA 測定其之元素含量。共分析十種元素結果如表 4 所示。虎杖與甘草在 10 種元素含量上有明顯差異，除了 Mg 含量外，虎杖之其餘 9 種元素含量均高於甘草。虎杖未照射樣品之 Pb、Cd、Cu、Cr、Ni、Zn、Fe、Mn、K 與平均含量 ($\mu\text{g/g}$) 分別為 0.378、0.057、9.86、12.98、5.30、36.18、693.4、37.25、6304 及 1264；經 10 kGy 輻射照射後之

Pb、Cd、Cu、Cr、Ni、Zn、Fe、Mn、K 與 Mg 平均含量分別為 0.355、0.059、9.78、13.50、5.27、37.24、737.8、40.27、6224 及 1356。甘草未照射樣品之 Pb、Cd、Cu、Cr、Ni、Zn、Fe、Mn、K 與 Mg 含量 ($\mu\text{g/g}$) 分別為 0.216、0.026、6.78、4.02、1.06、7.53、196.1、11.77、3700 及 2912；經 15kGy 輻射照射後之 Pb、Cd、Cu、Cr、Ni、Zn、Fe、Mn、K 與 Mg 含量分別為 0.210、0.033、6.61、3.06、1.04、8.40、200.0、12.92、3556 及 2914。結果顯示輻射照射對虎杖及甘草樣品之元素含量無顯著影響。

肆、討 論

本計畫測試之 5 種中藥材中，柴胡、紫草、山茱萸及虎杖其單位重量之最高微生物含量可達 10^4CFU/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，但上述中藥材經 8~10kGy 輻射照射後皆可達完全滅菌效果。實驗中所測得部份中藥材之微生物含量雖較低（低於 10^2CFU/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。於產地將中藥材妥當包裝後盡快以輻射滅菌，應是中藥材最佳的保存方法。

因單一測試方法不盡完善，我們的研究以二種方法測試中藥材中微生物含量，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，故菌落較不突顯於目視時易被忽略，而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聚特別的需求，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。本次甘草樣品中高密度之微生物分佈及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。實驗中觀察微生物相時顯示虎杖含有一較其中之其他菌株為抗輻射之菌株，其未經照射時此菌含量並不高，但經 4Gy 照射後觀察殘存者僅為此白色菌株，此菌株之輻射抗性是虎杖藥材照射劑量之決定因子，亦值得進一步探討。

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，我們由前二年度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（如甘草）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，且加馬照射不會誘發任何放射性物質，故為中藥材滅菌、滅蟲最好方法，有必要研發拓展。

本計畫探討 5 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包裝規格之研訂。結果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. Mayermiebach E: Food irradiation-a means of controlling pathogenic micro-organisms 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，川烏銻六十 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. 王莉，康佳膠囊輻照滅菌效果考察，中成藥，1995；17：15-16.
9. 李習文，梁婧，李英，Co-60 輻照滅菌傷復膜最佳輻照劑量選擇實驗，長春中醫學院學報，1995；11：54.
10. 汪洪湖，錢進，陳梅筠，Co-60 輻照滅菌對賴氨匹林穩定性的影響，中國藥學雜誌，1995；30：605-606.
11. 楊愉君，鈷六十 γ 射線輻照對藥理作用的影響，中成藥，1995；17：16-17.
12. 周學優，鈎籐 Co 輻照滅菌前後生物活性比較試驗，中成藥，1995；45：45.
13. 任延軍，李松林，Co- γ 射線輻照玄駒膠囊原粒最佳輻照劑量選擇，基層中藥雜誌，1995；19：31-32.
14. 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.
15. 王暉，劉仁，王麗，蜂王漿輻射技術的研究，中草藥，1992；296-297.
16. 周鳳英，鈷六十輻射除滅花粉中微生物之研究，植物病理學會刊，1999；7：23.
17. 周鳳英，鍾曉萍，衛元耀，陳崇哲，張成國，1999，枸杞鈷六十輻射滅菌，核子科學，1999；36：302-308.
18. 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，1999；26（4）：361-370.
19. 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.
20. 周鳳英，花粉加馬線照射，核子科學，1998；35：165-171.
21. 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.

22. 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.
23. 吳家駒，楊瑞森，生薑之照射處理，食品科學，1994；21（6）：485-494.
24. 楊瑞森，黃春菊，照射出食品保存的生機，核能天地，1993；29（8）：9-20.
25. Cottee J, Kunstadt P, Fraser F: Commercialization of food irradiation in the USA. *Radia. Phys. Chem.*, 1995; 46: 669-672.
26. Byun MW, Kim JH, Lee JW, Park JW, Hong CS, Kang IJ: Effects of gamma radiation on the conformational and antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *J. Food Prot.*, 2000; 63: 940-4.
27. Byun MW, Lee KH, Kim DH, Kim JH, Yook HS, Ahn HJ: Effects of gamma radiation on sensory qualities, microbiological and chemical properties of salted and fermented squid. *J. Food Prot.*, 2000; 63: 934-9.
28. Oufedjikh H, Mahrouz M, Amiot MJ, Lacroix M: Effect of gamma-irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of Citrus clementina hort. Ex. tanaka. *J. Agric. Food Chem.*, 2000; 48: 59-65.
29. Lee JW, Yook HS, Kim SA, Lee KH, Byun MW: Effects of antioxidants and gamma irradiation on the shelf life of beef patties. *J. Food Prot.*, 1999; 62: 619-24.
30. Byun MW, Lee JW, Yook HS, Lee KH, Kim KP: The improvement of color and shelf life of ham by gamma irradiation. *J. Food Prot.*, 1999; 62: 1162-6.
31. Al-Bachir M: Effect of gamma irradiation on storability of apples (*Malus domestica* L.) . *Plant Foods Hum Nutr.*, 1999; 54: 1-11.
32. Aziz NH, El-Fouly MZ, Abu-shady MR, Moussa LAA: Effect of gamma radiation on the survival of fungal and actinomycetal florae contaminating

medicinal plants. *Appl. Radiat. Isot.*, 1997; 48: 71-76.

33. Aziz NH, Refia MK, Abd El-Aal SS: Occurrence of aflatoxin and aflatoxigenic molds in coffee beans and decontamination by gamma-irradiation. *J. Egypt Vet. Med. Ass.*, 1990; 49: 951-961.
34. Meilgaard M, Civille GV, Carr BT: *Sensory Evaluation Techniques*. 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, Boston London, 1991: 60-67, 338.

a (0 kGy)	b (4 kGy)
c (12 kGy)	d (16 kGy)

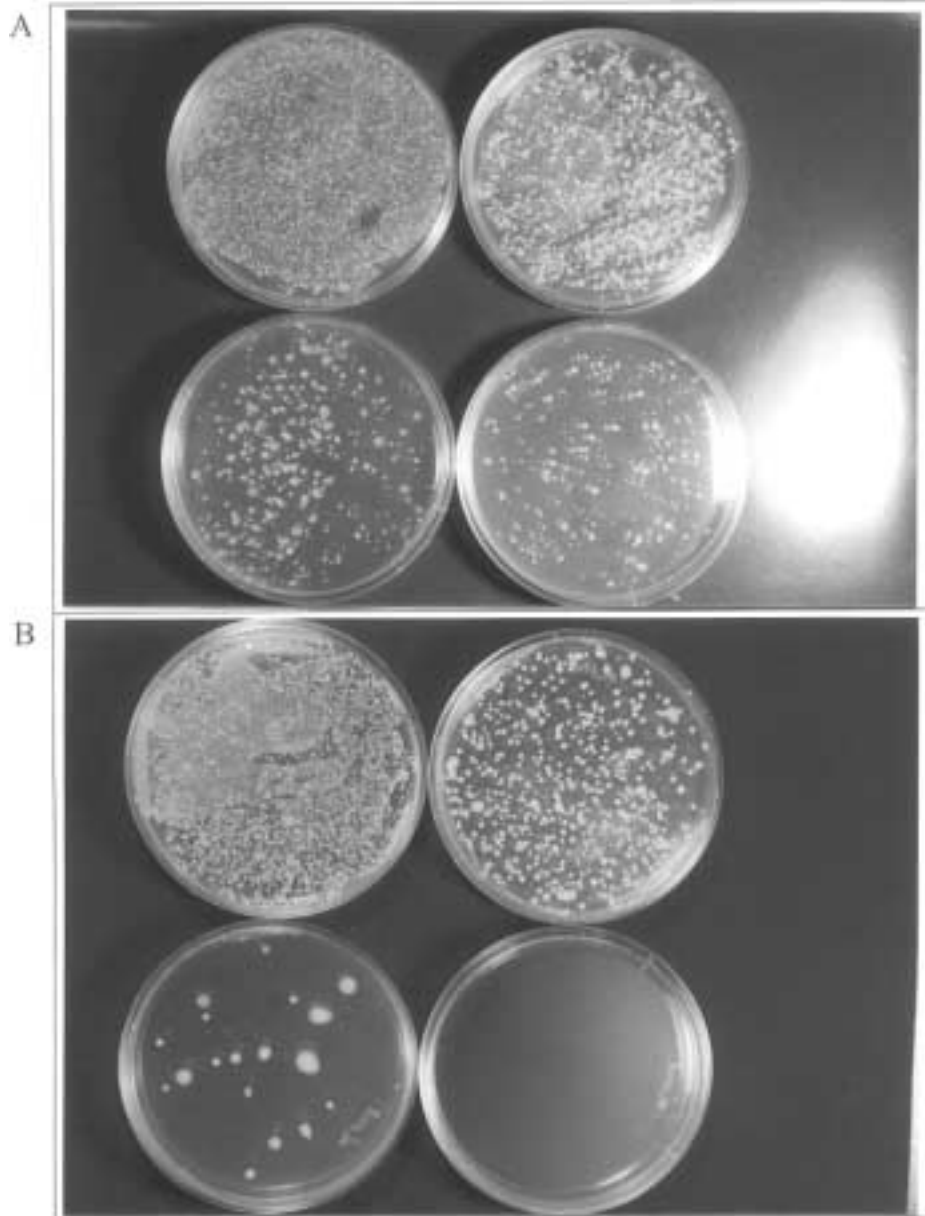


圖 1、A、B 為不同批次取樣之甘草經 0、4、12、16kGy 輻射照射後，將樣品浸液塗佈於培養基上所呈現之微生物相。

A



B



圖 2、不同批次採樣之甘草樣品置於培養基上培養，其主要菌株之生長狀況。

a (0 kGy)	b (8 kGy)
c (0 kGy)	d (8 kGy)



圖 3、 柴胡樣品：a.直接置培養基上及 c.取浸液塗抹於培養基上，經 1 天後觀察有大量微生物生長；b、d 為經 8kGy 照射後如上述處理者，微生物量明顯減少。



圖 4、未經照射之柴胡樣品直接至於培養基表面，經 3 天培養後之微生物生長狀況。

0 kGy	2 kGy
4 kGy	8 kGy

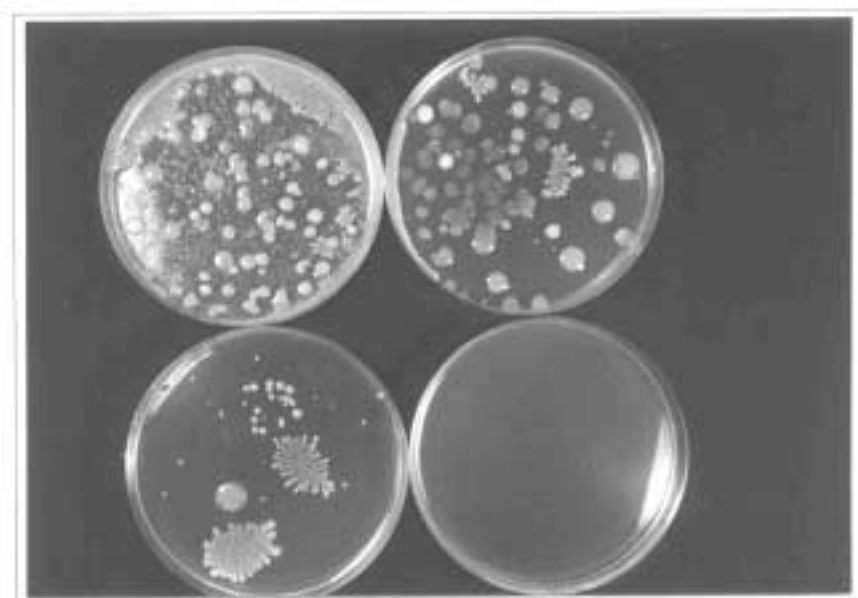


圖 5、紫草樣品經 0、2、4、8kGy 輻射照射後樣品浸液中之微生物相。

A	0 kGy	0 kGy
B	0 kGy	0 kGy

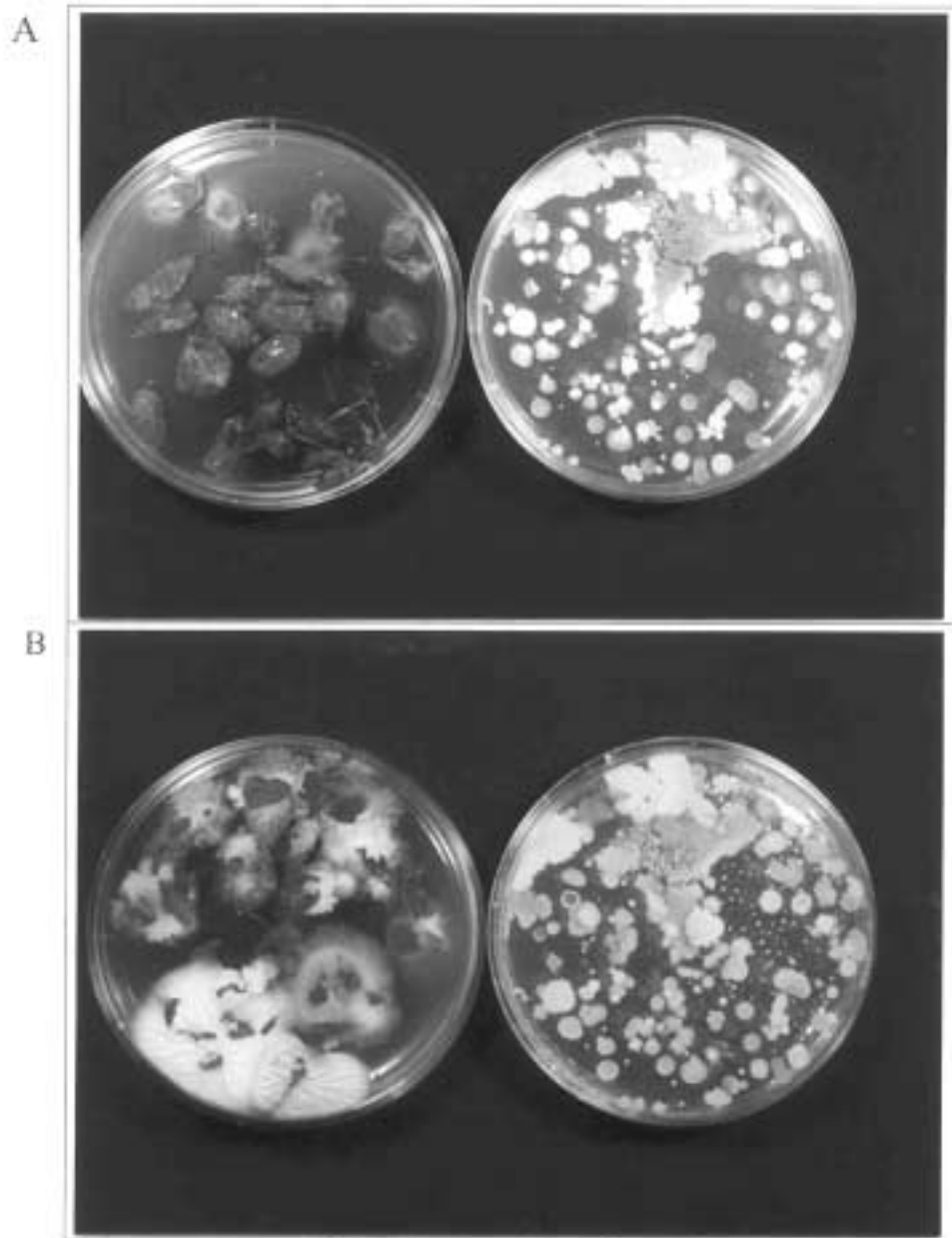


圖 6、未經照射之山茱萸樣品直接置於培養基表面與取樣品浸液塗抹於培養基上經 1 天 (A)、5 天 (B) 培養後之微生物相。

A	0 kGy	4 kGy
B	0 kGy	4 kGy

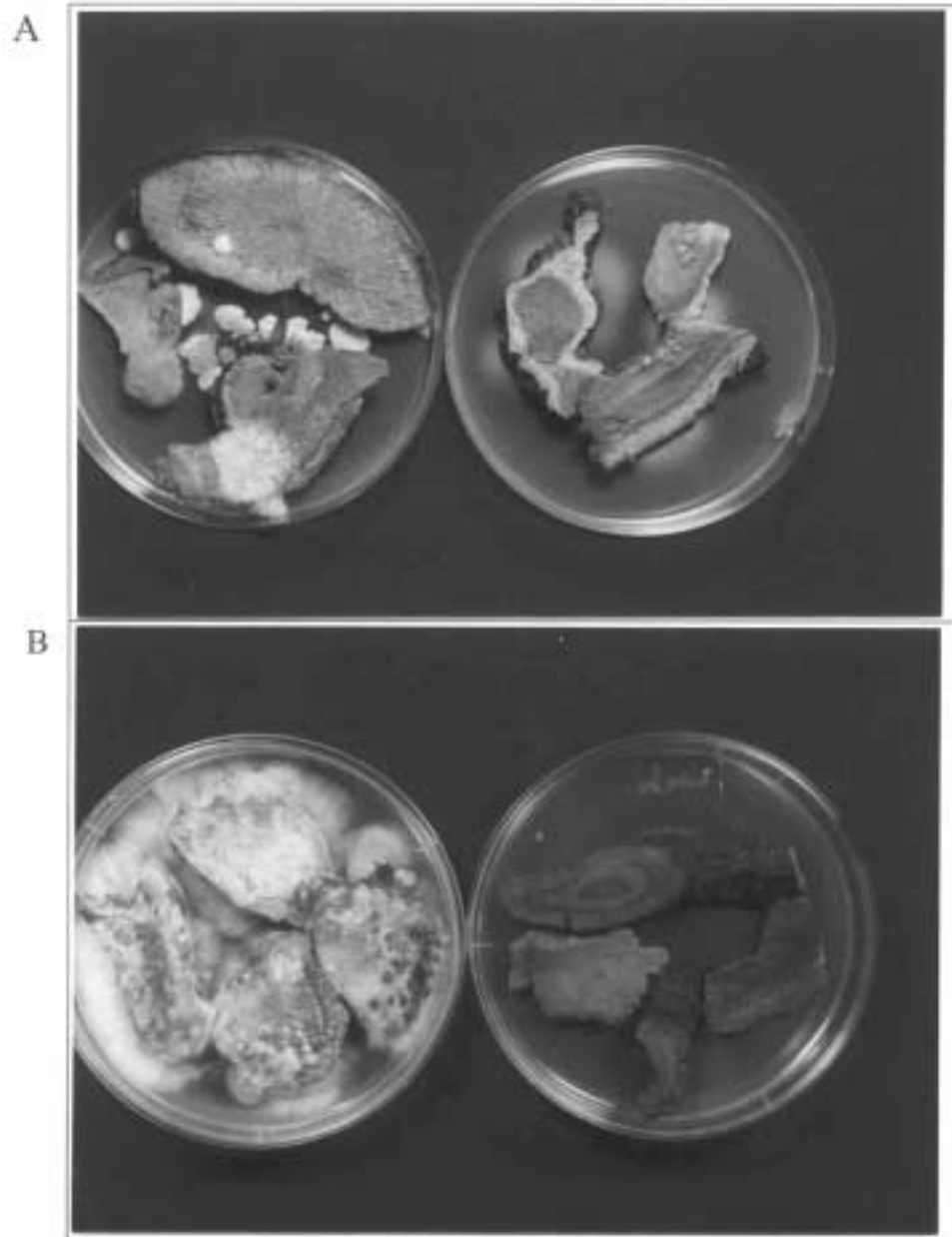


圖 7、A、B 為不同批次採樣之虎杖樣品：右圖為經 4kGy 輻射照射後微生物含量明顯下降，左圖為未經照射樣品之微生物生長狀況。

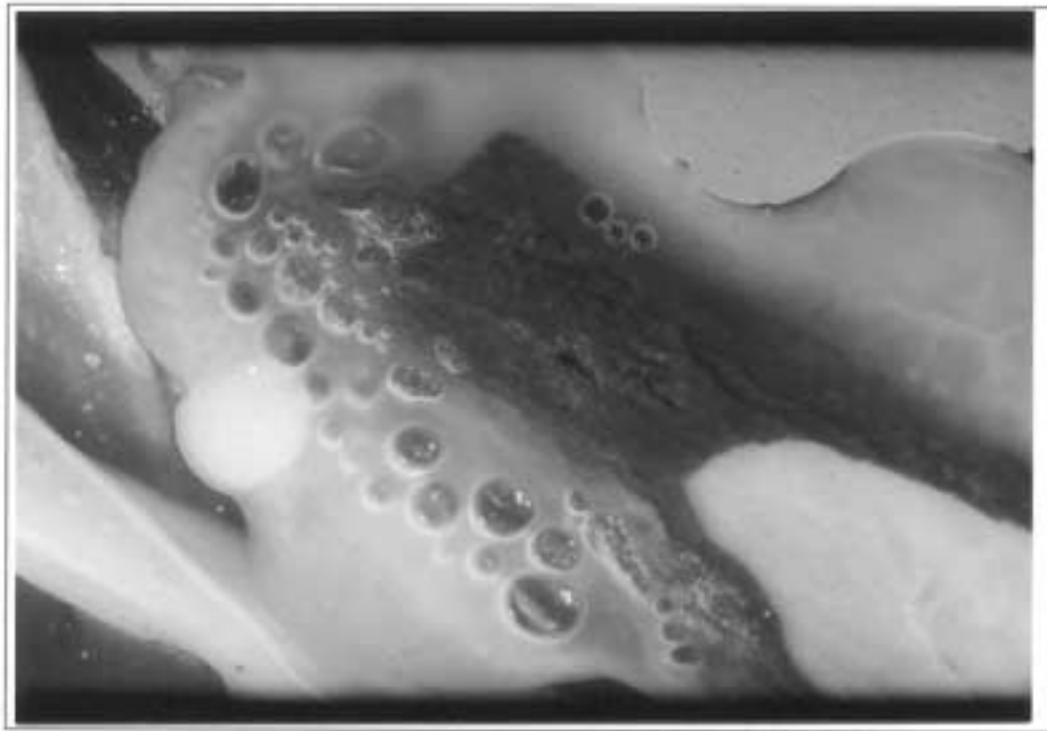
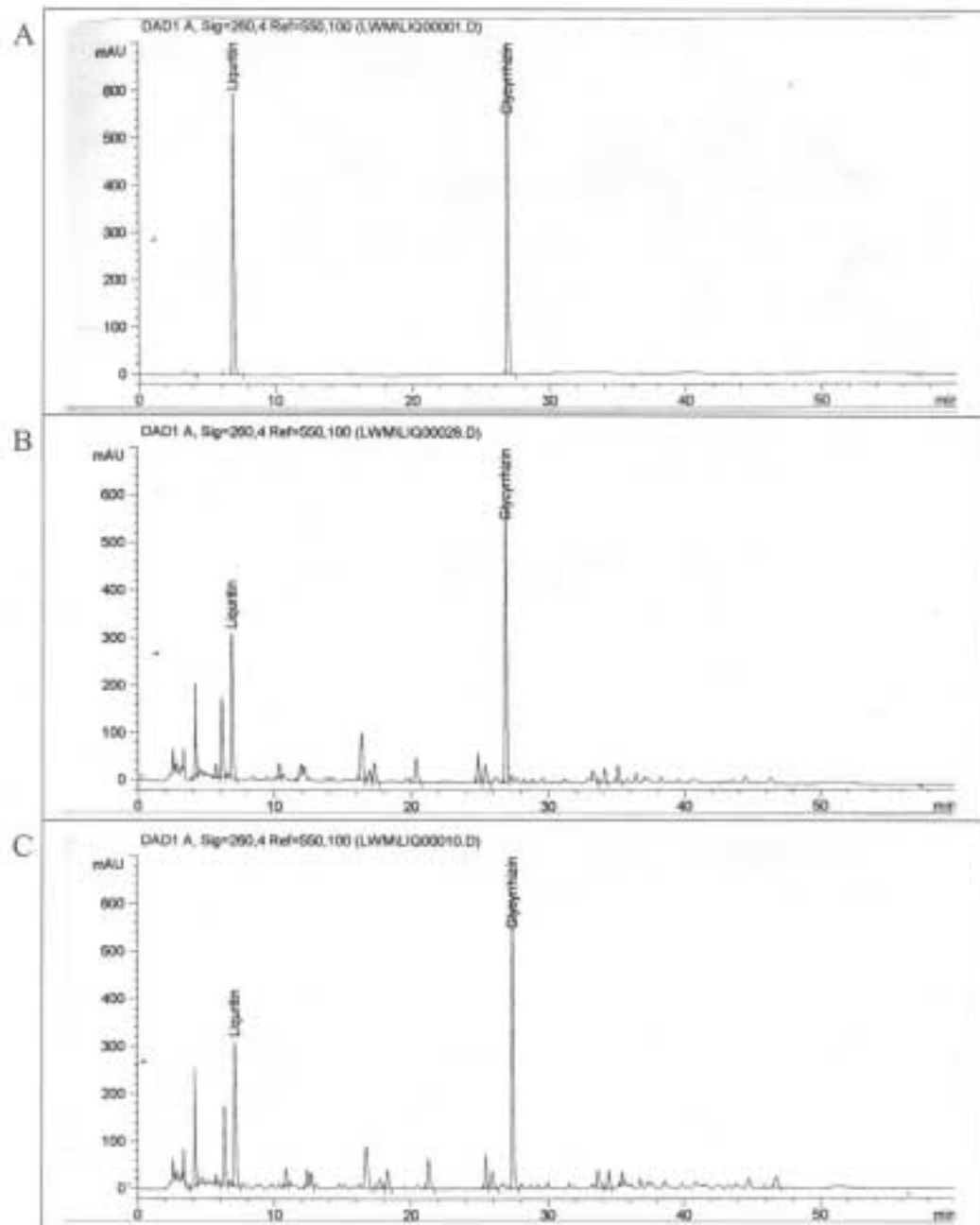


圖 8、以 16kGy 劑量照射後經貯藏之甘草樣品，於解剖顯微鏡下觀察顯示殘存之較抗輻射菌為產氣的菌株。



- A.指標成份 liquiritin、glycyrrhizin，
 B.未經照射樣品之組成成份，
 C.經 15kGy 照射樣品之組成成份。

圖 9、甘草組成分之 HPLC 圖譜。

表 1、甘草經加馬線照射後之殘存微生物量 (CFU/g)

編號	照射劑量 (kGy)						
	0	4	8	10	12	16	20
I ^a	6.2×10 ^{4b}	1.3×10 ³	36	2	0	-	-
II	3.5×10 ⁴	1.7×10 ⁴	780	160	0	-	-
III	3.9×10 ⁵	6.7×10 ⁴	2.4×10 ³	945	156	0	-
IV	4.5×10 ⁶	4.2×10 ⁵	3.4×10 ⁴	6.5×10 ³	2.8×10 ³	950	0
V	1.3×10 ⁷	8.7×10 ⁵	2.1×10 ⁵	8.1×10 ⁴	3.4×10 ⁴	8.5×10 ³	2.3×10 ³

^a 編號 I、II、III、IV、V 表示五個不同地區之採樣

^b 三重複測試之平均值

表 2、中藥材料加馬線照射後之殘存微生物量 (CFU/g)

樣品	編號	照射劑量 (kGy)					
		0	2	4	6	8	10
柴胡	I ^a	1.8×10 ^{4b}	1.1×10 ³	360	45	2	0
	II	3.2×10 ⁴	3.0×10 ³	650	53	14	0
	III	229	189	40	12	0	0
	IV	720	370	30	0	0	0
	V	635	210	42			
紫草	I	3.8×10 ³	638	225	91	6	0
	II	1.5×10 ³	810	30	4	0	0
	III	252	159	57	14	2	0
	IV	228	66	3	0	0	0
	V	192	74	11	0	0	0
山茱萸	I	480	293	67	12	0	0
	II	105	61	22	0	0	0
	III	285	46	3	0	0	0
	IV	17	3	0	0	0	0
	V	180	51	13	0	0	0
虎杖	I	366	258	36	2	0	0
	II	347	40	17	0	0	0
	III	32	19	11	0	0	0
	IV	80	24	13	0	0	0
	V	560	182	45	6	0	0

^a 編號 I、II、III、IV、V 表示五個不同地區之採樣

^b 三重複測試之平均值

表 3、以 HPLC 分析甘草於照射前後之成份變化

指標成份	編號	單位重量樣品之含量 (mg/g)	
		未經照射	15 kGy 照射
Liquiritin	I	10.86	10.59
	II	10.56	10.69
	III	10.13	10.56
	Ave. ^a	10.52	10.61
	S.D. ^b	0.37	0.07
Glycyrrhizin	I	26.72	24.71
	II	25.88	25.62
	III	24.14	25.58
	Ave.	25.58	25.30
	S.D.	1.31	2.04

^a Ave.表示三重複之平均值，^b S.D.為標準偏差

表 4、以 AA 分析虎杖及甘草樣品照射前後各元素之平均含量 (μg/g)

元素名稱	虎杖		甘草	
	0 kGy	10 kGy	0 kGy	15 kGy
Pb	0.378 ^a	0.355	0.216	0.210
Cd	0.057	0.059	0.026	0.033
Cu	9.86	9.78	6.78	6.61
Cr	12.98	13.50	4.02	3.06
Ni	5.30	5.27	1.06	1.04
Zn	36.18	37.24	7.53	8.40
Fe	693.4	737.8	196.1	200.0
Mn	37.25	40.27	11.77	12.92
K	6304	6224	3700	3556
Mg	1264	1356	2912	2914

^a 三重複測試之平均值

