

輻射照射對六味地黃丸之 滅菌效果及主成分影響研究

Study of the effects of gamma-ray irradiation on the sterilization and main components of Lin-Wei-Di-Huang-Wan

國立清華大學原科中心同位素組

周 鳳 英

摘 要

隨著國內中藥廠 GMP 制度之推行以及中藥保險給付之推廣，中藥使用量日漸增加。濃縮科學中藥配方在藥師調劑上提供了快速正確之藥量，並方便患者服用。目前國內有許多 GMP 藥廠大量生產各式濃縮成方與單味製劑等，各製劑之有效性與安全性需加以品質管制。因本省高溫多濕之環境下，方劑中的成分與其中之澱粉等賦形物皆易因微生物生長而變質，對民眾服用藥劑之安全易造成威脅。

六味地黃丸由熟地、山茱萸、山藥、茯苓、澤瀉及丹皮六味藥組成，為甘淡和平，補而不滯之平補之劑，亦是通補開合的代表方，為國內中醫藥局用量最大的成方之一。本研究選擇收集國內市售六種廠牌之六味地黃丸方劑進行測試，評估其微生物含量及經不同劑量照射後之滅菌效果。輻

射照射於清華大學原科中心同位素組之三萬居里鈷六十照射廠進行。經照射後之樣品以直接塗佈及經適當稀釋後取懸浮液塗佈於培養基上，測定微生物含量並觀察微生物相，分離主要菌株並測定其抗輻射性，評估輻射照射後樣品之主要成份變化。輻射照射前及照射後經不同貯存期之方劑樣品進行色澤測定，並以薄層色層分析及高效液相層析法分析其組成份之指紋圖譜變化，探討最適化之輻射照射條件。

研究結果顯示，不同品牌六味地黃丸樣品間之微生物種類及含量有極大不同，單位重量之生菌數範圍為 $10^1 \sim 10^3$ CFU/g，以 4~10 kGy 劑量照射對各廠牌樣品皆可達完全滅菌效果。取所需完全滅菌劑量較高之二種樣品，於照射後進行 2 個月之貯存試驗，結果與剛照射後所測之數值相同，皆未測到存活之微生物；外觀顏色與初開罐時之未照射樣品亦無顯著差異。對受測藥材進行組成份分析，由 TLC 及 HPLC 之分析結果，顯示六味地黃丸組成份含量於照射前後無明顯變化。研究結果將提供衛生署等政府相關單位，做為中藥輻射照射立法規範之參考，將現代科技應用於中藥之製程與品管上，確保民眾安全，加速落實中藥之 GMP 制度。

關鍵詞：中藥、加馬線滅菌、微生物

Nuclear Science and Technology Development Center,
National Tsing Hua University

F. I. Chou

ABSTRACT

The usage of the Chinese medicine is getting more and more popular since our government has popularized the GMP system and the insurance policies for Chinese medicine. Recently, Chinese medical prescriptions (CMP) has provided a very con-

venient way for modern people since it not only can provide a quick and exact drug preparation for pharmacists but also give patients a easy way to take Chinese medicine. However, since we have the high relative humidity and high temperature in Taiwan, the components and the excipients in most CMP will provided a favorable growth condition for microbes. Under this condition, the components of CMP will be contaminated and decomposed, so that the safety of the user should be concerned. Thus, we should provide an efficient and safety control for the quality of CMP.

Liu-Wei-De-Hung-Wan (LWDHW) that belongs to "Tonifying formulas" of traditional CMP is in the top ten popular CMP according to the sale amount. For avoiding the contamination and improving the quality, we used gamma-ray irradiation to sterilize the LWDHW in our study. The irradiation was carried out at the 30,000 Ci cobalt-60 hot cell of the Isotope Division, Nuclear Science and technology Development Center, National Tsing Hua University. After gamma-irradiation, samples was spread on the culture dishes directly or after a series dilution with phosphate buffer. For short time incubation, we observed the growth of microbes and evaluated the efficiency of decontamination for the CMP by comparing the microbe number before and after different doses of irradiation. Also we evaluated the radiation resistance of the predominant microbial strains. Besides the study for microbes, we analyzed the main components of the CMP before and after irradiation. We used the TLC and HPLC method to determine the main components of the LWDHW before and after irradiation.

From our study, we found out that LWDHWs ordered from different manufactures have extreme diversity of the amount and species of microbe. The microbe contenting in LWDHW ranged from $10^1 \sim 10^3$ CFU/g, and the gamma irradiated decontamination dose needed $4 \sim 10$ kGy. After the gamma irradiation and then 2-month storage under room temperature, these LWDHWs 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 the TLC and HPLC analysis of components of the LWDHW 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 LWDHWs. The optimal irradiation condition applied to sterilization of the LWDHW is recommended. This not only provides a reference system to the industries and government, but also improve the GMP system of Chinese medicines manufactures.

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

壹、前 言

國內隨著中藥廠 GMP 制度之推行以及中藥保險給付等情勢之推移，中藥用量日漸增加。目前國內中藥 GMP 藥廠超過 40 餘家，生產各種濃縮成方及單方製劑，使中藥的使用更為方便直接。這些產品之有效性與安全性的確保需藉由中藥原料評估及製劑之品質管制來達成。我們對 40 種中藥材進行加馬射線滅菌研究後，了解各中藥材之微生物含量有極大差異，且目前中藥製劑加工製作時均添加約 10 % 的澱粉等賦形劑，於台灣溫暖多濕的環境中極易造成發霉等微生物污染。微生物的長期生長腐蝕，將耗損藥方中之成份、抑低療效，甚或產生有毒物質。中藥成方多製成粉狀或丸狀，使用時不經煮沸或加熱而直接口服，如此將更直接影響食用者之衛生安全，中藥之微生物污染管制或有效抑低其微生物含量有其必要性。目前國內廠家（中國生化公司等）已進行輻射滅菌之藥材包括：甘草、當歸、冬蟲夏草、洋參、黃耆、枸杞、靈芝、四物湯包、六味地黃丸、人參綜合茶包與粉狀或丸狀中藥成方等已進行輻射滅菌。有些國家甚至要求我國對其輸入之中藥製劑需經輻射滅菌。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、長春市中醫院及上海市中藥研究所等單位，進行川烏經加馬線照射前、後生物活性之影響、大黃經加馬線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，顯示中國大陸在中藥及成藥之輻射滅菌上有相當深入的研究與應用⁽⁶⁻¹⁴⁾。國內亦有、蝦粉、雞丁、牛肉粉、豬肉粉及蒜頭等食品以輻射滅菌保存之研究⁽¹⁵⁻¹⁹⁾。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 10 kGy，丹麥與荷蘭為 15 kGy、美國為 30 kGy，韓國核可人參照射之劑量為 7 kGy。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 30 kGy 之劑量進行處理⁽²⁰⁾。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⁽²¹⁻²⁸⁾。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⁽²⁹⁻³⁴⁾。

我國食品衛生標準規定一般食品類之大腸桿菌應為陰性，食用綠藻之菌含量在 5×10^4 個/g 以下，非滅菌性口服藥微生物上限為 10^2 個/g。本計畫將對六味地黃丸之濃縮製劑進行加馬線滅菌方法研發：六味地黃丸濃縮製劑為中藥局中銷售量極大者⁽³⁵⁻³⁷⁾，且為直接生服之方劑，微生物含量為其食用安全性之重要關鍵。我們過去執行中之研究結果顯示除枸杞、甘草、杏仁等少數中藥材需以 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（生菌數為 0 CFU/g）⁽³³⁾。本計畫將探討六味地黃丸方劑以加馬線照射滅菌之方法，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，減少中藥製劑中的微生物含量，改善其衛生條件及防止藥物療效之降低。並進一步進行照射前後之主成份分析及外觀、顏色等測定分析，探討照射滅菌是否影響藥品品質。期提供企業界進行中藥加馬線滅菌之方法及行政單位制訂加馬線滅菌之照射劑量法規參考依據，開發輻射滅菌中藥市場，提

高中藥之經濟效益。

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 1 kGy 至 20 kGy（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 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、六味地黃丸之取樣與輻射照射

研究中採購六種廠牌之六味地黃丸：科達-濃縮散、莊松榮-濃縮散、明通-濃縮細粒、勝昌-濃縮散、港香蘭-濃縮顆粒、順天堂-濃縮顆粒。為避免涉及各廠牌之商品利益，研究中將上述六廠牌隨機編以甲、乙、丙、丁、戊、己六個代號。對每一廠牌樣品進行三次取樣，每一取樣點做三重複取樣。每一樣品以無菌方式稱取 15 g 置於無菌樣品瓶中，將樣品瓶攜入鈷-60 照射熱室，置於距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 ; Difico. Co.)、potato dextrose agar (PDA ; Difico. 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 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。

3. 磷酸緩衝液之製備：取 4.54 g KH_2PO_4 ，5.43 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 先溶於少許水中，再將體積加至 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 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 及 PDA 培養基上。分別將之置放於 20、25、30°C 培養箱中培養，經確定為 25°C 為最適培養溫度後，之後樣品即置於 25°C 培養箱中培養。於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

進行三重複測試觀察。

五、加馬線照射後六味地黃丸之貯存測試

將上述六味地黃丸樣品分別裝入無菌瓶中密封，依上述研究所得所需輻射滅菌之最高劑量進行照射，照射後樣品置於室溫中貯存。分別於第 1、2 個月取出，以上述二種方式進行微生物含量測試與觀察，以了解照射後之中藥經定期貯存後之微生物含量。樣品同時進行外觀顏色之感官品質測試。

六、六味地黃丸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 代表紅色度、-a 代表綠色度；+ b 表示黃色度、-b 表示藍色度），探討照射是否影響樣品之外觀顏色。

七、六味地黃丸之主成分及指標成分分析

1. 成分萃取（extraction）：分別取未經照射及照射後之中藥樣品各 200g，以甲醇/水（9：1）於室溫下冷浸萃取一週，過濾取出萃取液。為使樣品中之成分完全萃取出，採一般文獻中天然物之分離方法⁽³⁸⁻³⁹⁾，將殘餘樣品繼續以甲醇以水浴法煮沸迴流，每次熱萃 4 小時，共萃取三次。將前後萃取液合併進行下列處理。
2. 成分分配（partition）將上述萃取液以減壓濃縮至體積約 20 ml，再加二次水至體積為 100 ml。以 500 ml 分液漏斗依序以 200 ml 之正己烷、乙酸乙酯、正丁醇等不同溶劑進行萃取，對每一種溶劑萃取 4 次並合併其萃取液，以減壓濃縮後備用，流程如圖（I）所示。

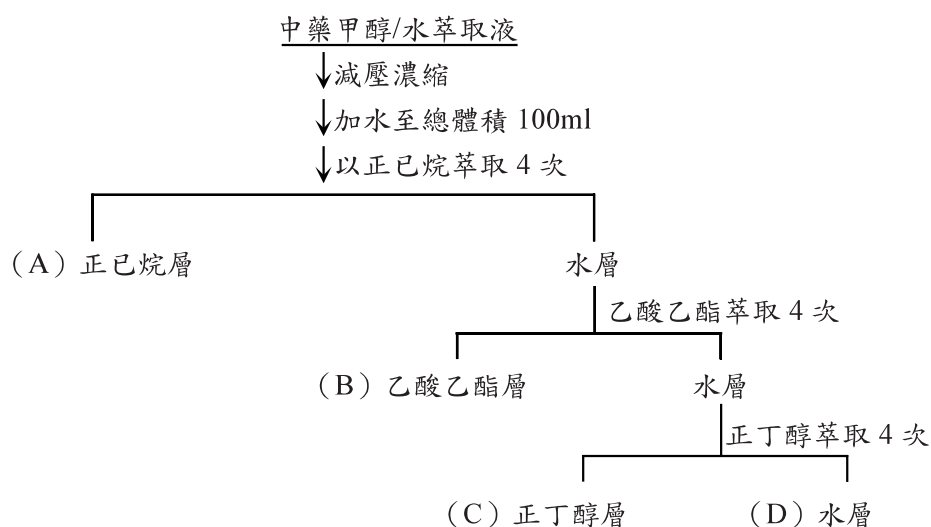


圖 (I)、以不同溶劑進行萃取之流程圖

3. 以 TLC 分析輻射照射對中藥樣品中成分之影響

- (1) 另取上述未經照射之六味地黃丸樣品之 A (正己烷層)、B (乙酸乙酯層)、C (正丁醇層)、D (水層) 萃取液 (編號為 A₂、B₂、C₂、D₂)，分別以毛細管取樣點於矽膠薄片上 (Silica gel 60 F₂₅₄, 0.25mm, Merck)，將 TLC 片置於鈷-60 照射廠中進行 10 kGy 輻射照射。照射後於上述 TLC 薄片上同時點上未經照射 (編號為 A、B、C、D) 之不同溶劑的萃取液及照射後 (編號為 A₁、B₁、C₁、D₁) 樣品之各萃取液，留待分析。
- (2) 配合六味地黃中指標成分 paeonol (丹皮酚)、ursolic acid (熊果酸) 之特性，將上述 TLC 薄片分別以正己烷 (H)、乙酸乙酯 (E)、二氯甲烷 (D)、甲醇 (M) 等混合不同比例之溶劑系統展開。顯示劑採用 10% H₂SO₄ 噴灑後加熱及 1% FeCl₃ 水溶液噴灑二種系統分別呈色，觀察不同極性溶劑所展開之 TLC 圖譜中暗點位置與顏色，探討未經照射萃取、照射後萃取及萃取後再照射的樣品成分間是否有所差異。

4. 照射前、後六味地黃丸樣品中 loganin、paeoniflorin 含量測定

另將未經照射與照射後之六味地黃丸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 80 g 離心 5 min，再取其上清液定量體積至 100 ml，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 column: 4.6 $\times$ 250 mm；particle size 5 μ m），紫外光檢測波長為 238 nm。移動相為 0.1 % H₃PO₄/ACN 經 0.45 μ m 濾膜過濾後，以流速 1.0 ml/ min 進行分析。以六味地黃丸之指標成份 loganin、paeoniflorin 配成濃度 60 μ g/ml 為標準品，計測樣品中之指標成份含量。

參、結 果

一、中藥材加馬線照射滅菌

研究中採購六種廠牌之六味地黃丸：科達-濃縮散、莊松榮-濃縮散、明通-濃縮細粒、勝昌-濃縮散、港香蘭-濃縮顆粒、順天堂-濃縮顆粒，將其隨機編為甲、乙、丙、丁、戊、己六個代號，進行下述測試。

將上述六種未經照射之六味地黃丸樣品直接置於平面培養基上於 25 $^{\circ}$ C 培養 5 天後觀察，結果如圖 1、2 所示。比較不同品牌樣品之微生物相顯示有極大差異，培養基及中藥藥粉上生長許多種類的黴菌及細菌，且部分黴菌菌絲已覆滿整個培養基。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，初步實驗顯示以 PCA、PDA 等不同培養基之測試結果無明顯差別。不同廠牌間之微生物相有明顯差異，但同一種中藥樣品之批次不同其微生物含量無顯著不同。如表 1 所示，六種品牌之六味地黃丸所含菌數範圍約 10¹~10³ CFU/g 間，樣品經 4~10 kGy 輻射劑量照射可達完全滅菌。圖 3 為甲廠牌樣品經 0、4、6、10 kGy 輻射劑量處理後分別浸於緩衝液中振盪，取浸液經

50 倍稀釋後塗抹於培養基表面，於第 3 天觀察之微生物相。圖中可見微生物含量隨照射劑量增加而菌數遞減，至 10 kGy 照射處理之培養基表面已無微生物生長。圖 4 為丙與戊二種廠牌之六味地黃丸之磷酸浸液經 50 倍稀釋後之微生物相，圖 4A 樣品經 6 kGy 照射後已達無菌；圖 4B 樣品之原始菌數較高，需 8 kGy 照射後可達完全滅菌。

二、中藥材貯存試驗

實驗中選擇完全滅菌所需劑量較高之甲及乙廠牌樣品分別以無菌瓶分裝，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 個月時取出樣品，測其中生菌數含量並與未經照射者比較。結果顯示樣品包裝後照射處理，經 2 個月之室溫貯藏，與剛照射後樣品相同，無殘存之微生物生長；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、照射後中藥之外觀顏色測試

不同品牌間的六味地黃丸於外觀上呈現有顆粒大小及顏色深淺之不同，但分別取相同品牌之未經照射及照射後的樣品做比較，無論直接觀察或於顯微鏡下其外觀顏色皆無明顯差異。

實驗中選取完全滅菌所需劑量較高之甲及乙二種廠牌樣品以色差計 (color meter) 測定樣品於輻射照射前、後與貯存二個月後之顏色變化。將樣品粉末倒入直徑 3 cm 之圓形石英槽中，樣品高約 1cm 使其均勻佈滿底面後測量整個底面之顏色。每一種廠牌選 3 個樣品，每一樣品進行 5 重複之測量。結果如表 2 所示，樣品於照射前後之亮度、紅色度及黃色度均無明顯差異；於貯藏二個月後其平均 Hunter L、a、b 值與剛處理時之亦無顯著差異。但甲、乙二廠牌樣品之顏色則有顯著不同，乙樣品 Hunter L、a、b 分別為 42.2、4.5、16.3，與甲樣品之 Hunter L、a、b 分別為 29、4.3、12 間有明顯不同。

七、六味地黃丸照射前後主成份分析試驗

輻射照射對六味地黃丸樣品成分之影響分為二部分探討，一為將

樣品中各成分以不同極性溶劑萃取分離，將樣品中各種化合物成分取出並細分，再以 TLC 配合不同極性溶劑展開，測試照射對樣品中各成分之影響，並以丹皮酚及熊果酸作為標準品進行比較。另一部分則是以二種配醣體化合物 loganin、paeoniflorin 作為指標成分，定量六味地黃丸於照射前、後指標成分之含量變化。

選擇完全滅菌所需劑量較高之甲廠牌的六味地黃丸樣品進行照射前、後之成分分析。分別取樣品經萃取後分為 A（正己烷層）、B（乙酸乙酯層）、C（正丁醇層）、D（水層）四部分。薄層層析中所用樣品包括未經照射樣品之上述各萃取液（編號 A、B、C、D），經 10 kGy 照射處理後萃取者（編號 A₁、B₁、C₁、D₁），及取未經照射樣品之萃取液點於 TLC 薄片之後再以 10 kGy 照射處理者（編號 A₂、B₂、C₂、D₂）。配合萃取液之極性程度同時以 paeonol（丹皮酚）、ursolic acid（熊果酸）作為標準品進行比對。圖 5 為六味地黃丸之正己烷層萃取液分別以正己烷（H）及乙酸乙酯（E）以 6：1 及 1：1 配比為展開劑所展開之 TLC 結果，圖左為將 TLC 片以 10 % H₂SO₄ 噴灑後加熱呈色的情形，圖右為以 1 % FeCl₃ 噴灑呈色之結果。圖中之“P”為 paeonol 標準品，圖右中以 FeCl₃ 呈色者可清楚見到暗點，比較圖 5A 右可見 A、A₁、A₂ 三種樣品均含有 paeonol 之藍色暗點，且相對含量無明顯差異，但左圖中以 10 % H₂SO₄ 加熱則看不見 paeonol 所呈現之暗點。觀察圖 A、B 中 TLC 圖譜所顯示 A、A₁、A₂ 各成分之相對位置（R_f 值）及顏色無明顯的差異，樣品 A、A₁、A₂ 均呈現相同之展開圖譜，顯示輻射照射不影響六味地黃丸之正己烷萃取層的成分。

圖 6 為六味地黃丸之中極性乙酸乙酯層萃取液分別以二氯甲烷（D）及甲醇（M）20：1 及 10：1 配比為展開劑所展開之 TLC 結果，圖左為以 10 % H₂SO₄ 加熱後呈色的情形，圖右為 1 % FeCl₃ 呈色之結果。圖中“u”為 ursolic acid 標準品，以 10 % H₂SO₄ 加熱後

可見清楚的紫紅色暗點，而噴灑 FeCl_3 則看不見暗點。觀察TLC中各成分之相對位置（ R_f 值）及顏色，可見乙酸乙酯層萃取液中所含成分種類很多，其中triterpenoid化合物（如ursolic acid）相當多，此類化合物以 H_2SO_4 噴灑加熱後呈現紫紅色，而植物固醇（sterol）則為暗綠色，其他成分呈現棕色及淡黃色。比較萃取樣品B、 B_1 、 B_2 之展開圖譜極為相似，照射前、後樣品於相同展開位置均可見ursolic acid之紫紅色暗點，顯示輻射照射不影響六味地黃丸此部份之成分。結果亦展現此部份萃取液成分由TLC展開後以 H_2SO_4 噴灑、烘乾顯色之良好條件。

圖7為六味地黃丸之高極性正丁醇萃取液分別以二氯甲烷（D）與甲醇（M）以5：1及1：1配比混合為展開劑所展開之TLC圖譜，圖左為以10% H_2SO_4 加熱後呈色的情形，可見較多之暗點；圖右為以1% FeCl_3 呈色之結果，則除原點外其他位置均無明顯之暗點。觀察TLC中各成分之相對位置，可見正丁醇層萃取液中所含成分於上述二氯甲烷與甲醇以1：1混合為展開劑，再以10% H_2SO_4 噴灑後加熱呈色者結果較好，但各種成分間之區分仍不明確。對樣品C、 C_1 、 C_2 之展開圖譜進行比較，可見其仍十分相似，顯示輻射照射應不影響六味地黃丸此部份之成分。

圖8為六味地黃丸之水層萃取液分別以二氯甲烷（D）與甲醇（M）以5：1及1：1配比混合為展開劑所展開之TLC結果，圖左為以10% H_2SO_4 噴勻加熱後呈色的情形，可見清楚之暗點；圖右為1% FeCl_3 噴勻後呈色之圖譜，則薄片上無法呈現明顯之暗點。觀察TLC中各成分之相對位置，可見水層萃取液中所含成分於此TLC系統中無法清楚分離，但比較圖8B左中樣品D、 D_1 、 D_2 之展開圖譜約略可見其相似性。

因六味地黃丸中高極性之萃取樣品無法於TLC系統中清楚比對，故取樣品經甲醇/水溶液萃取（溶出較多的配醣體）後以HPLC進行

照射前、後樣品之成分分析。圖 9 為以 loganin、paeoniflorin 為指標成份，比較六味地黃丸未經照射及經 10 kGy 照射後之成分變化。圖 9A 為六味地黃丸之指標成份 loganin、paeoniflorin (60µg/ml) 之 HPLC 圖譜，其遲滯時間 (retention time) 分別為 20.9 及 24.6 分鐘。圖 9B 為未照射之六味地黃丸經甲醇/水 (1/1; V/V) 萃取後所得的萃取物之層析圖；圖 9C 為六味地黃丸樣品經 10 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，發現受測樣品無論輻射照射與否，於相同的遲滯時間均可偵測到 loganin、paeoniflorin 之波峰出現。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六味地黃丸其 loganin 平均含量分別為 0.62 ± 0.02 及 0.59 ± 0.02 mg/g；paeoniflorin 含量分別為 1.28 ± 0.06 與 0.25 ± 0.04 mg/g。由指標成分含量與 HPLC 圖譜皆顯示輻射照射對六味地黃丸樣品之成份無明顯影響。

肆、討 論

本計畫測試之六種品牌之六味地黃丸，其單位重量之微生物含量為 $10^2 \sim 10^3$ CFU/g，不同品牌間之微生物相及微生物含量有明顯差異，但經 4~10 kGy 輻射照射後皆可達完全滅菌效果。實驗中所測得部份中藥樣品之微生物含量雖較低 (低於 10^2 CFU/g)，但於台灣溫暖多濕的環境中貯存時，除中藥製劑中之成分外，製劑加工過程時多添加澱粉等賦形劑，極易造成發霉等微生物污染。微生物的長期生長，將耗損藥方中之成份、抑低療效，甚或產生有毒物質，而使用時不經加熱直接口服更可能影響食用者之衛生安全，因此對加工完成之中藥方劑進行輻射滅菌應是最佳的保存方法。

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之微生物含量，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中藥樣品表面，故菌落較不突顯於目視時易被忽略，而鏡檢較易見到樣品中之微生物生長，並可觀察微生物於中藥上生長及樣品受腐蝕之狀況，但微生物含量高時菌落常重疊生長，無法明確計數菌落數，尤其菌落顏色與中藥樣品相同時更不易目測，此時需於顯微鏡下觀察。由樣品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，部分微生物對中藥成份具特別的需求，會選擇生長於中藥樣品上，並不由樣品向鄰近培養基延伸。以此方法可使對中藥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樣品浸泡、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樣品之微生物含量是必要的。

實驗中比較將六味地黃丸樣品直接置於平面培養基者與取樣品浸液塗佈於培養基上之二種方式，可見後者的培養基中多為細菌菌株生長，較少有黴菌菌落（圖 3、4），而直接放置者則有明顯大量之黴菌菌絲（圖 1、2）。圖 10 中為於解剖顯微鏡觀察直接放置於培養基之六味地黃丸樣品，於 3 天後可見圖 10A 中生長著細菌與黴菌菌落，其中細菌菌株由藥粉往培養基上生長，而黴菌則長於藥粉樣品上。將 A 圖方框範圍局部放大後如圖 9B 可見藥材中佈有許多白色菌絲。同時與圖 4 做比較，圖 4 為樣品經浸泡後，取浸液塗佈於培養基表面所呈現之微生物相，圖中顯示多為細菌菌落未見有黴菌菌株生長。因此推測六位地黃丸樣品中黴菌之生長對中藥較有選擇性。研究中所用之六種廠牌之六味地黃丸成分均為熟地黃、山茱萸、山藥、澤瀉、牡丹皮、茯苓等生藥製成浸膏，再與澱粉賦形劑混合

製作成濃縮細粒或濃縮散。雖各廠牌間之成分配比稍有不同，且依研究結果各廠牌單位重量六味地黃丸濃縮製劑之微生物含量亦有顯著差異，但無法推論所得數據與不同廠牌成分差異間的相關性。此外，經照射後樣品之微生物生長常較未經照射處理者緩慢，所以需稍延長觀察時間。

伍、結論與建議

中藥方劑之生產製造過程中除中藥材原料不同，其加工環境、炮製、浸煮、乾燥方式與貯存環境或賦形劑的添加等差異，均可能造成各中藥方劑中微生物含量之差異。中藥中之微生物含量是直接影響中藥品質者，我們由前三年度研究結果顯示部分中藥材所含菌數高達 10^7 CFU/g⁽³³⁾，且不同地區（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。若直接口含中藥材或生服中藥方劑可能影響食用者之衛生安全。在中藥方劑若能於加工包裝後即進行輻射滅菌，可避免貯存、販售中微生物大量滋生，可以延長商品時間、保持藥材品質。因限於計畫之執行期限僅約 3 個月，故照射後貯存期間之微生物含量測試僅以 2 個月為限，由研究結果顯示完全滅菌後之六味地黃丸濃縮製劑經 2 個月的室溫貯存後並無存活之微生物，推測若包裝完整應不會在有微生物滋生。輻射滅菌在低溫下進行，無須添加任何物質。加馬照射不會誘發任何放射性物質，且以 TLC 及 HPLC 分析六味地黃丸未照射與經 10 kGy 照射後之樣品，顯示其各成分均無明顯改變，是為中藥材與中藥方劑滅菌、滅蟲最好方法。研究中以 paeonol、ursolic acid 作為 TLC 分析比對之標準品，以配醣體化合物 loganin、paeoniflorin 作為 HPLC 分析之指標成分，其中 paeonol、loganin、paeoniflorin 均為財團法人製藥工業技術發展中心所提供之六味地黃丸中的指標成分，亦其療效成分，於本研究中照射處理後對其含量並無明顯影響。而其他療效成分限於本次計畫執行經費、時間與人力，將於未來的研究中進行之。

本計畫探討六味地黃丸加馬線照射滅菌，測試照射劑量與微生物殘存量之相關性，確認最佳照射劑量條件。以減少中藥樣品的微生物含量，改善中藥之衛生條件及防止藥物療效之降低。結果期提供企業界進行中藥材與中藥方劑輻射照射及行政單位制訂加馬線滅菌的照射劑量法規之參考依據，開發輻射滅菌中藥市場，並提高中藥之經濟效益。

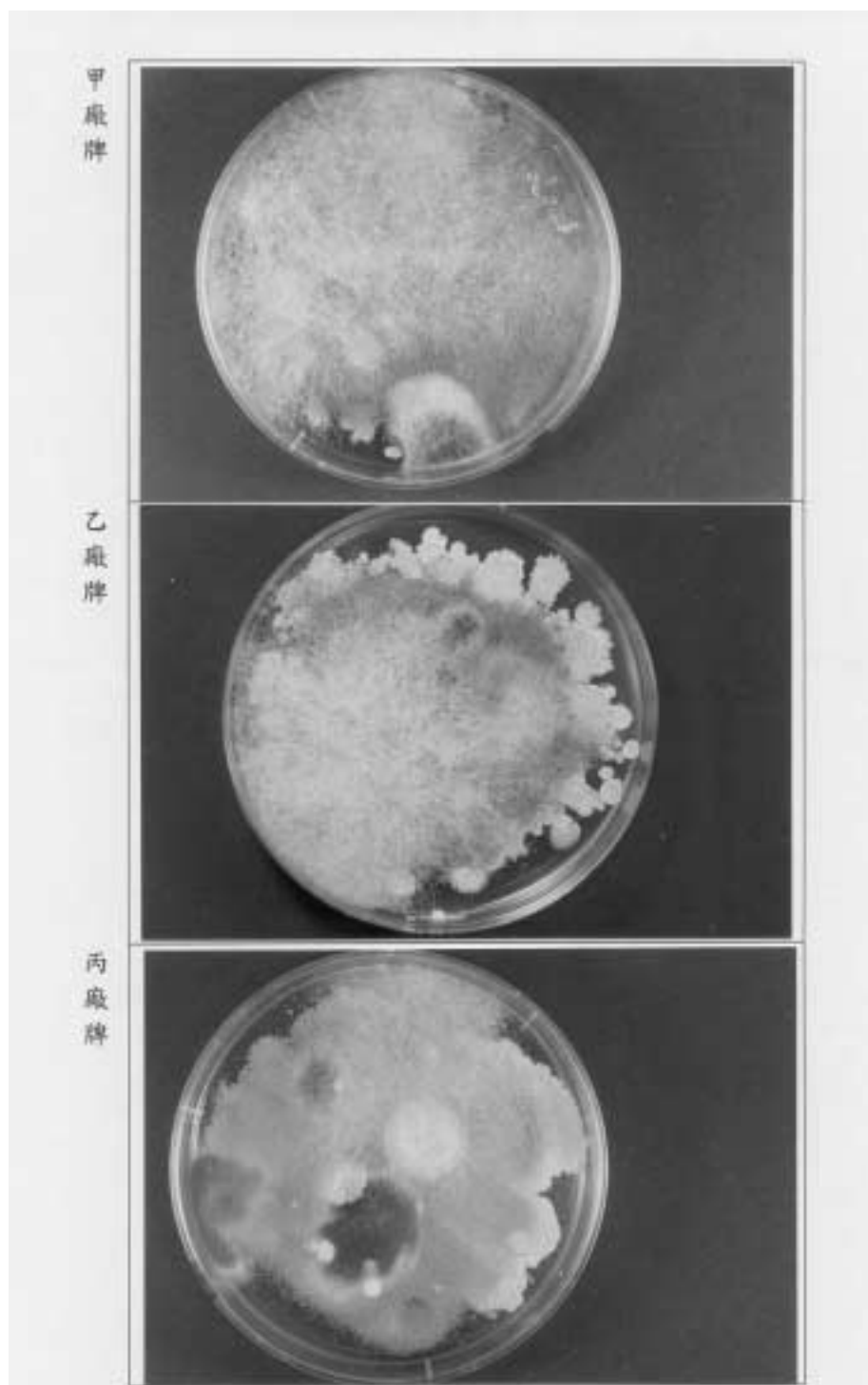
陸、參考文獻

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. Mayermiesbach 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. 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

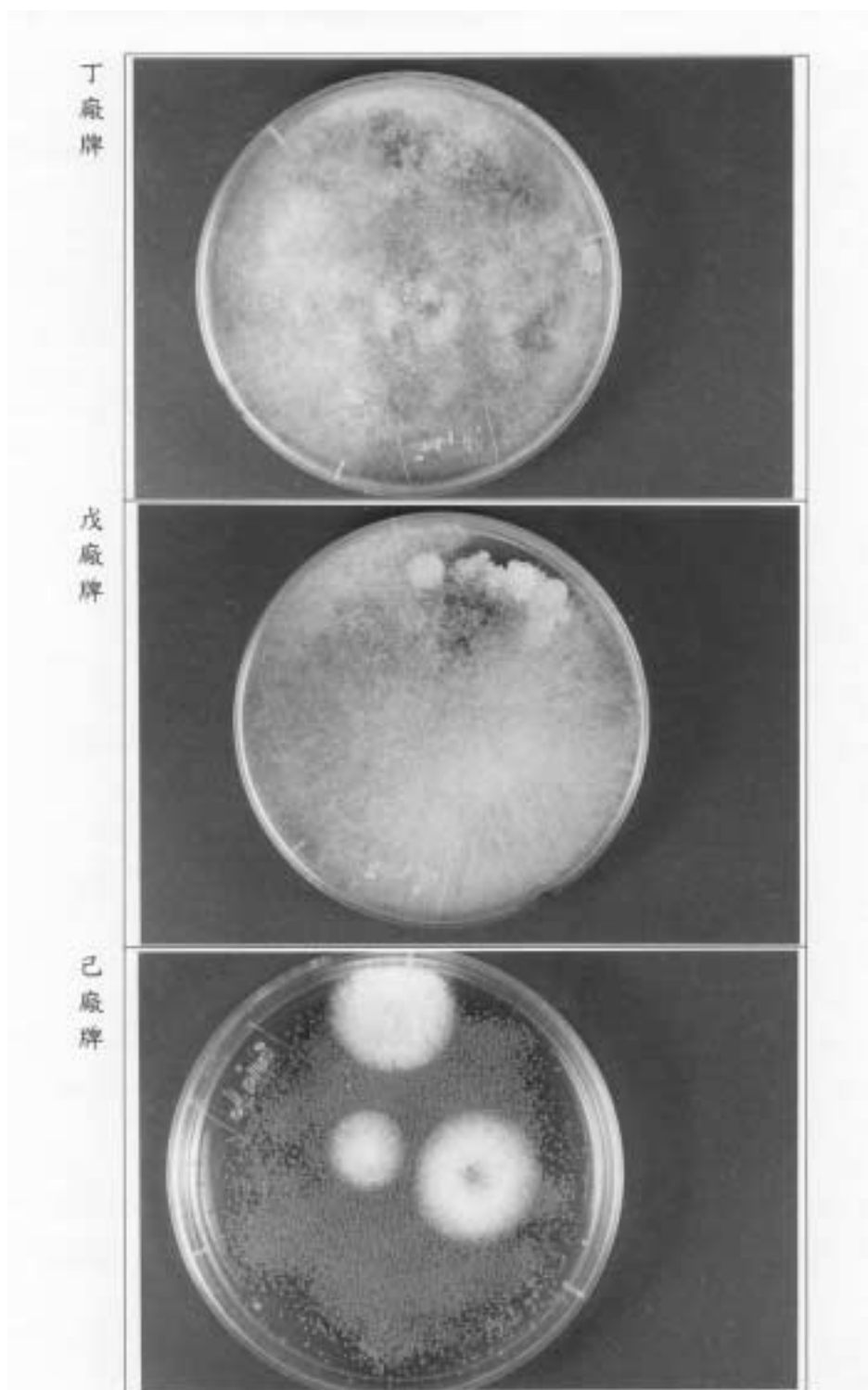
- 國藥學雜誌，1995; 30: 605-606.
11. 周學優，鈞籐 Co 輻照滅菌前後生物活性比較試驗，中成藥，1995; 45: 45.
 12. 任延軍，李松林，Co- γ 射線輻照玄駒膠囊原粒最佳輻照劑量選擇，基層中藥雜誌，1995; 19: 31-32.
 13. 李耀維，黃蓮上清丸用 γ 射線輻照滅菌效果及對藥物活性的影響，山西中藥，1994; 10: 43-44.
 14. 王暉，劉仁，王麗，蜂王漿輻射技術的研究，中草藥，1992; 296-297.
 15. 陳如茵，蔡美珠，吳家駒，錢明賽，利用調氣包裝及加馬照射延長截切蔬菜之貯藏期限，食品科學，1999; 26(4): 361-370.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 吳家駒，楊瑞森，生薑之照射處理，食品科學，1994; 21(6): 485-494.
 20. Cottee J, Kunstadt P, Fraser F: Commercialization of food irradiation in the USA. *Radia. Phys. Chem.*, 1995; 46: 669-672.
 21. Warke RG, Kamat AS, Kamat MY. 1999. Irradiation of chewable tobacco mixes for improvement in microbiological quality. *J. Food Prot.*, 1999; 62(6): 678-81.
 22. 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.
 23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Al-Bachir M:Effect of gamma irradiation on storability of apples (*Malus domestica* L.) . *Plant Foods Hum Nutr.*, 1999; 54: 1-11.
27. Aziz NH, El-Fouly MZ, Abu-shady MR, Moussa LAA:Effect of gamma radiation on the survival of fungal and actinomycetal flora contaminating medicinal plants. *Appl. Radiat. Isot.*, 1997; 48: 71-76.
28. 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.
29. 周鳳英，花粉加馬線照射，核子科學，1998; 35: 165-171.
30. 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: 23-28.
31. 周鳳英，鍾曉萍，衛元耀，陳崇哲，張成國，枸杞鈷六十輻射滅菌，核子科學，1999; 36: 302-308.
32. 周鳳英，鍾曉萍，溫曉薇，陳崇哲，張成國，黃耆之輻射滅菌，核子科學，2001; 38(4): 271-278.
33. 周鳳英，鍾曉萍，溫曉薇，衛元耀，陳崇哲，張成國，中藥材之加馬線滅菌，核子科學，2001; 38(4): 279-288.
34. Chou FI, Chung HP, Wen HW:The sterilization of uncooked Chinese medicinal herbs with cobalt-60 gamma radiation. *J. Food Prot.*, 2001 (Accepted) .

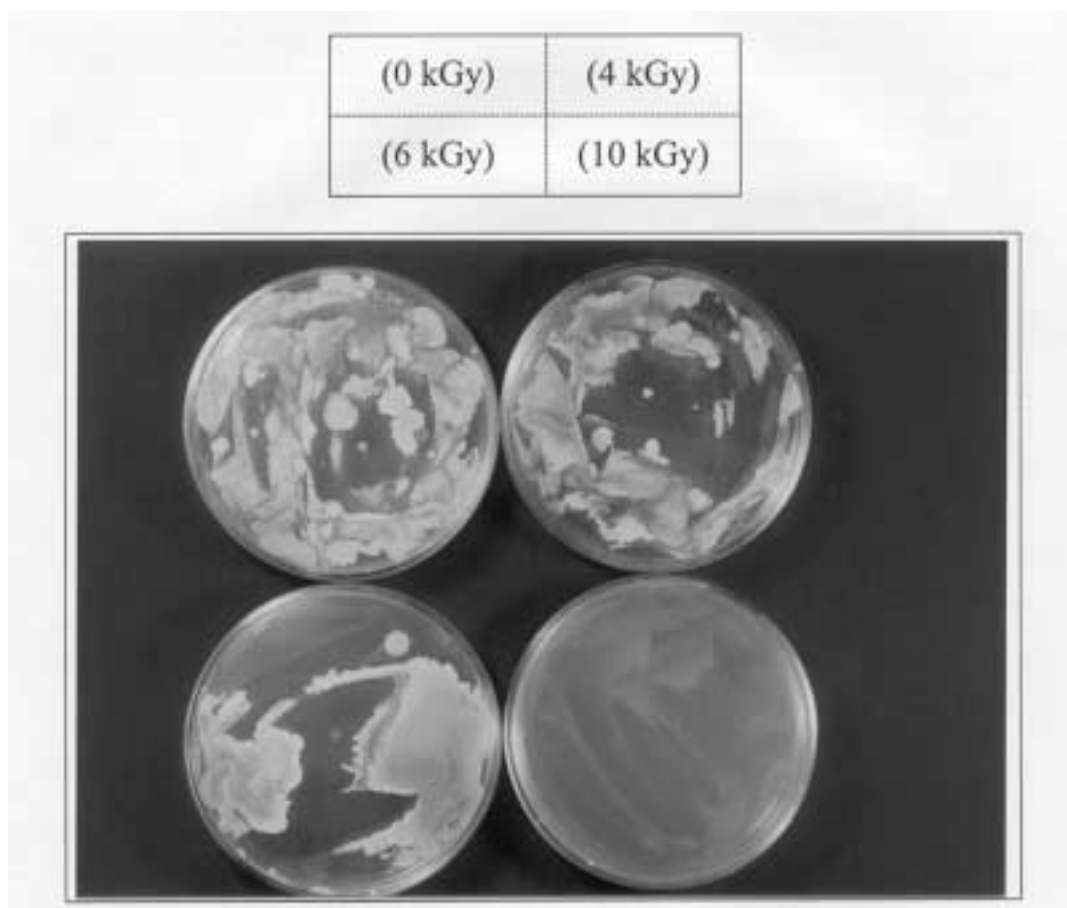
35. 陳忠川，六味地黃丸之藥理及臨床應用，明通醫藥，1994; 216: 13-15.
36. 楊雪媚，六味地黃丸（湯）研究進展，明通醫藥，1996; 36: 6-10.
37. 趙正睿，趙孝憲，辨-六味地黃丸、八味地黃丸異同及應用，藥學雜誌，1998; 14(1): 95-101.
38. Kwon HC, Baek NI, Choi SU, Lee KR: New cytotoxic butanolides from *Lindera obtusiloba* blume. Chem. Pharm. Bull., 2000; 48(5): 614-616.
39. Yoshikawa K, Matsumoto K, Mine C, Bando S, Arihara S: Five lanostane triterpenoids and three saponins from the fruit body of *Laetiporus versisporus*. Chem. Pharm. Bull., 2000; 48(10): 1418-1421.



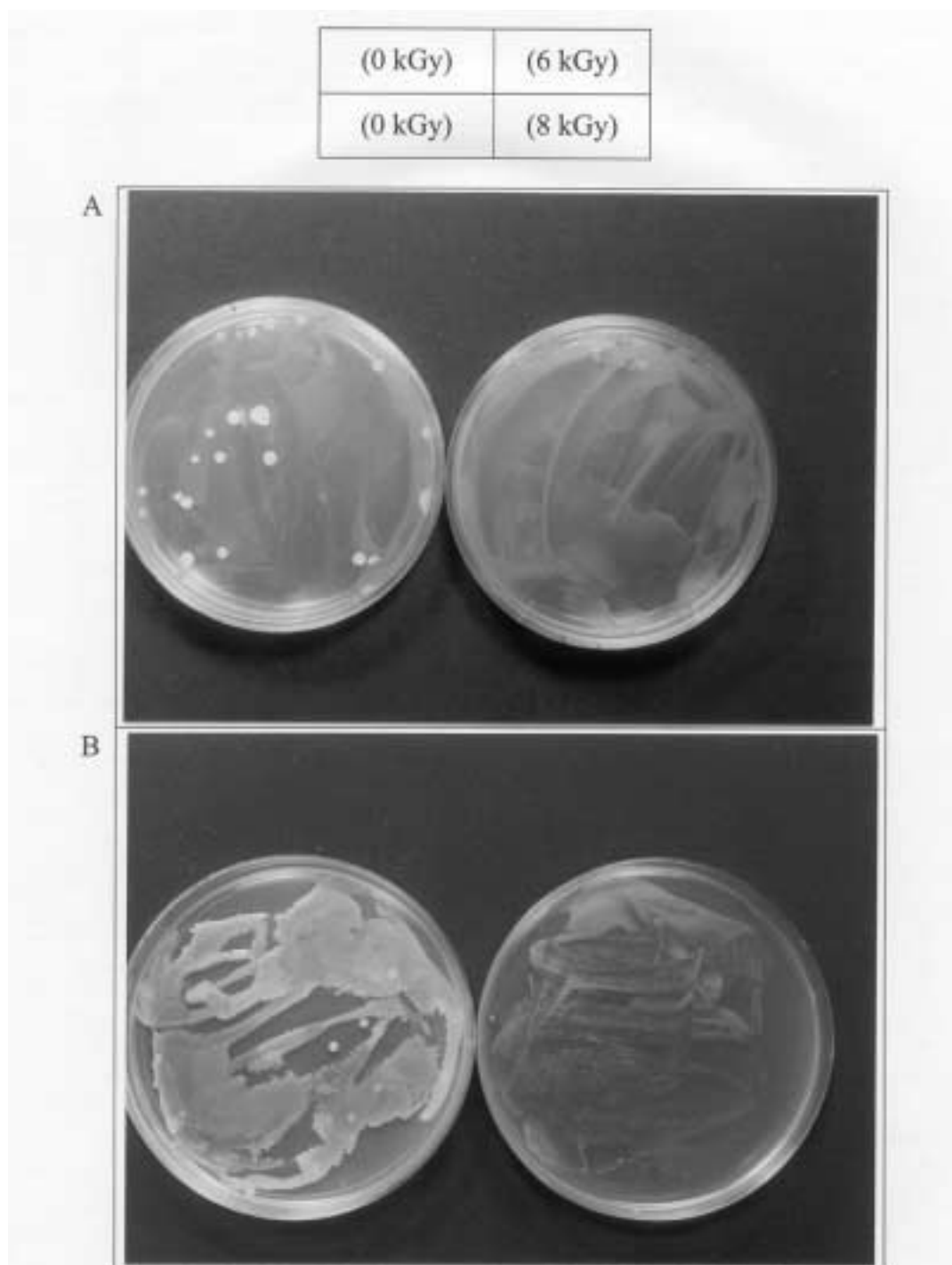
圖一、未經照射之六味地黃丸直接置於培養基上培養 5 天後之微生物相丁廠牌



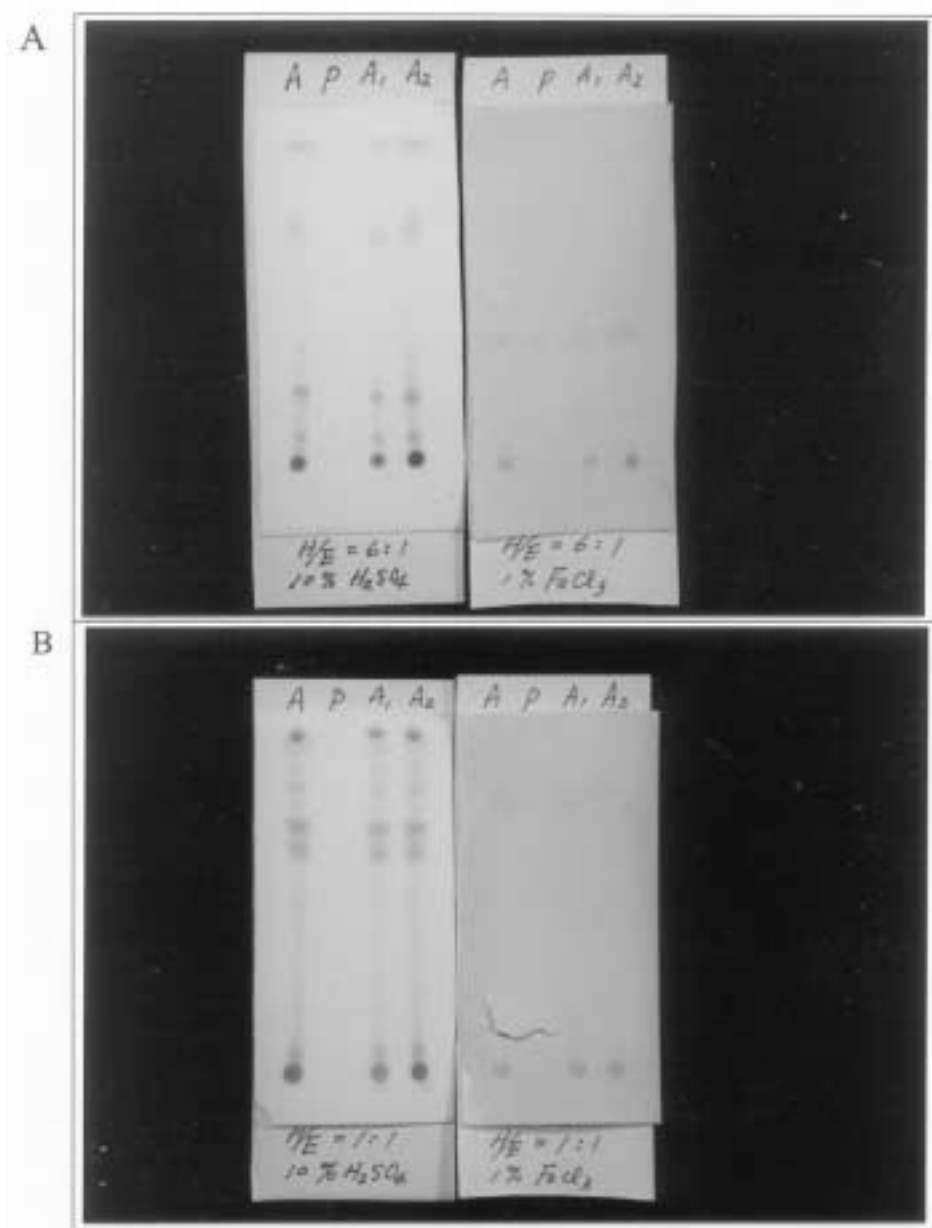
圖二、未經照射之六味地黃丸直接置於培養基上培養 5 天後之微生物相



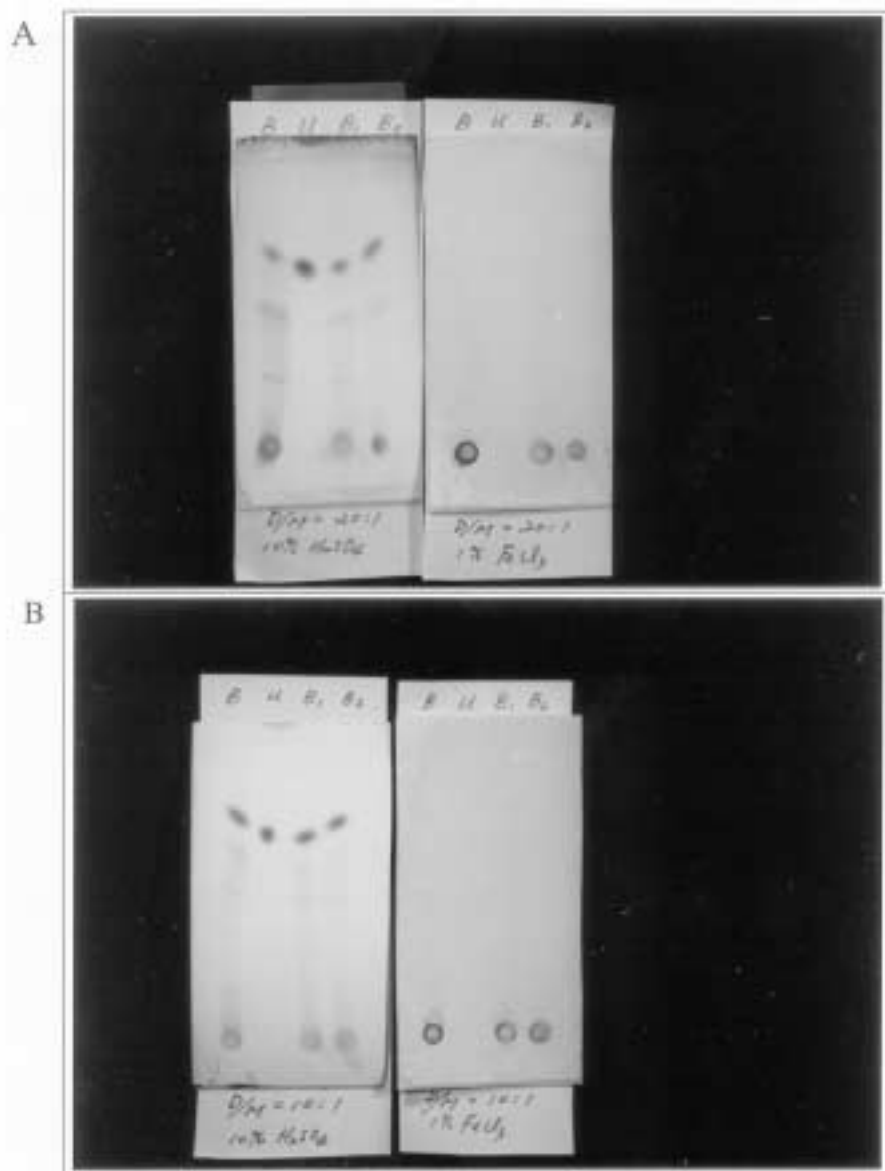
圖三、甲廠牌六味地黃丸樣品：未經照射及經 4、6、10 kGy 照射後，取稀釋 50 倍浸液塗抹於培養基上，經 3 天後觀察之微生物相。



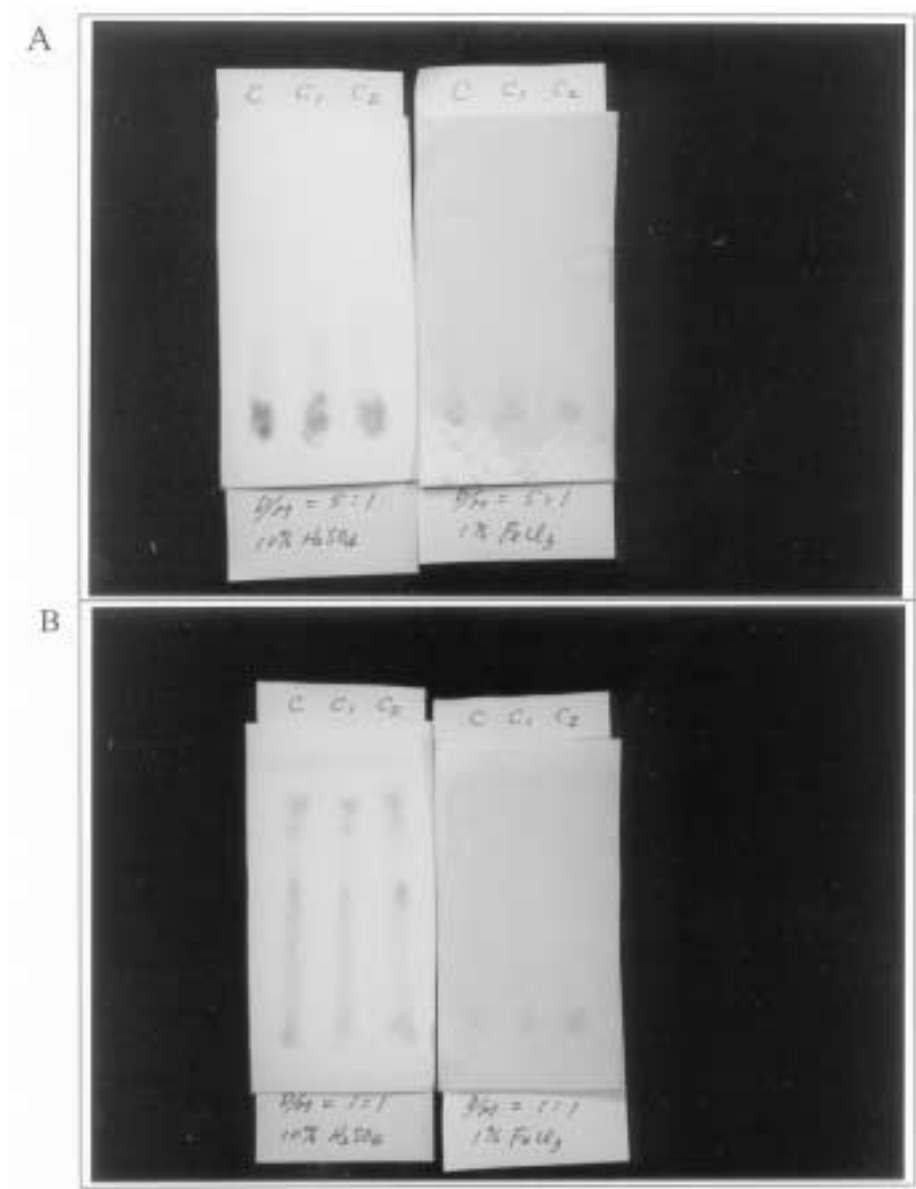
圖四、A 與 B 為不同品牌之六味地黃丸未經照射與經輻射照射完全滅菌後，將樣品浸液經 50 倍稀釋後塗佈於培養基上所呈現之微生物相。



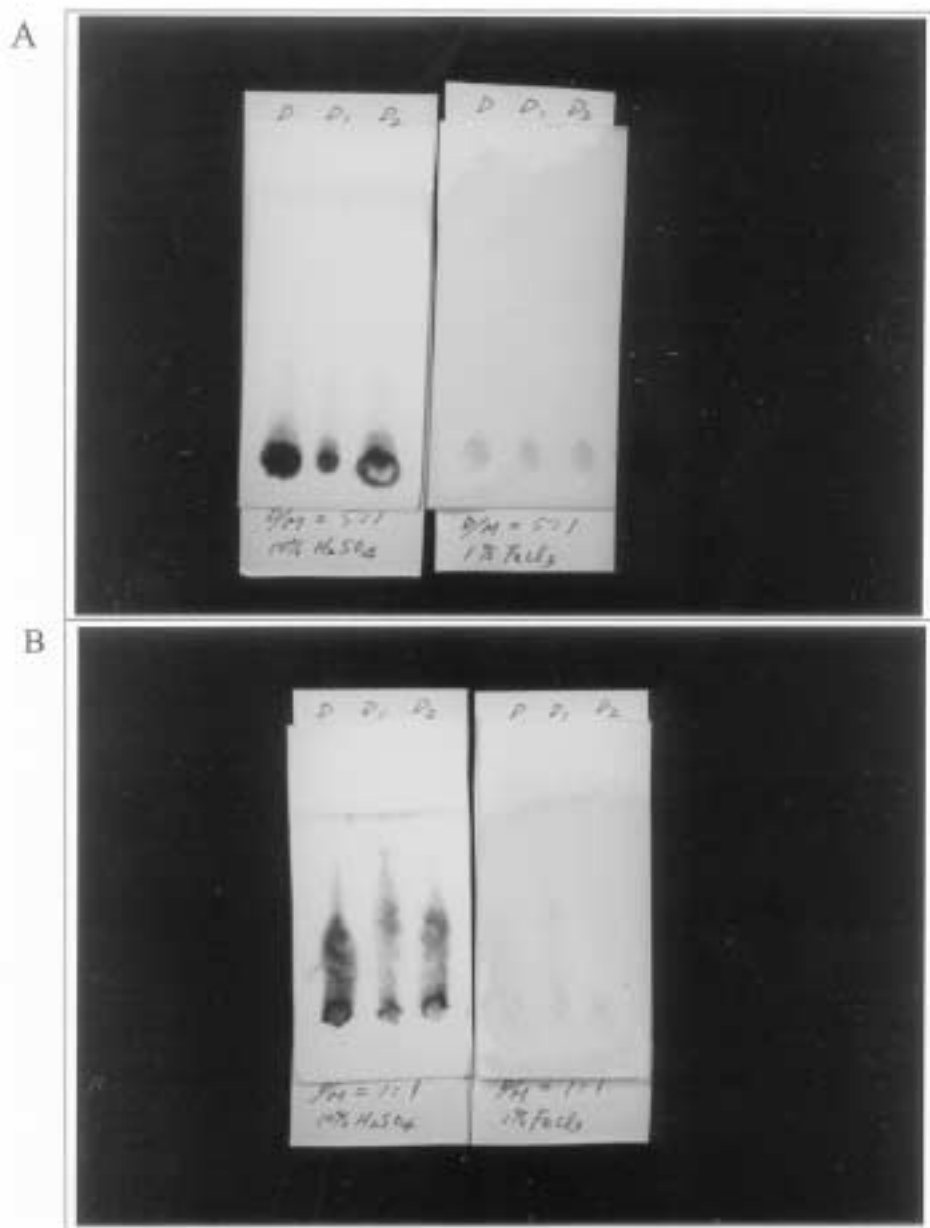
圖五、六味地黃丸未經照射即萃取、經 10 kGy 照射後萃取、萃取後再以 10 kGy 照射之正己烷層萃取液 (A、A₁、A₂) 及 paeonol (P) 標準品於 TLC 展開之圖譜。圖 A. 以正己烷 (H) 及乙酸乙酯 (E) 以 6:1 混合為展開劑 (H/E = 6/1)；圖 B. 以正己烷及乙酸乙酯以 6:1 混合為展開劑 (H/E = 1/1)。圖左為以 10% H₂SO₄ 噴勻 TLC 片加熱後呈色的情形，圖右為 1% FeCl₃ 呈色之結果。



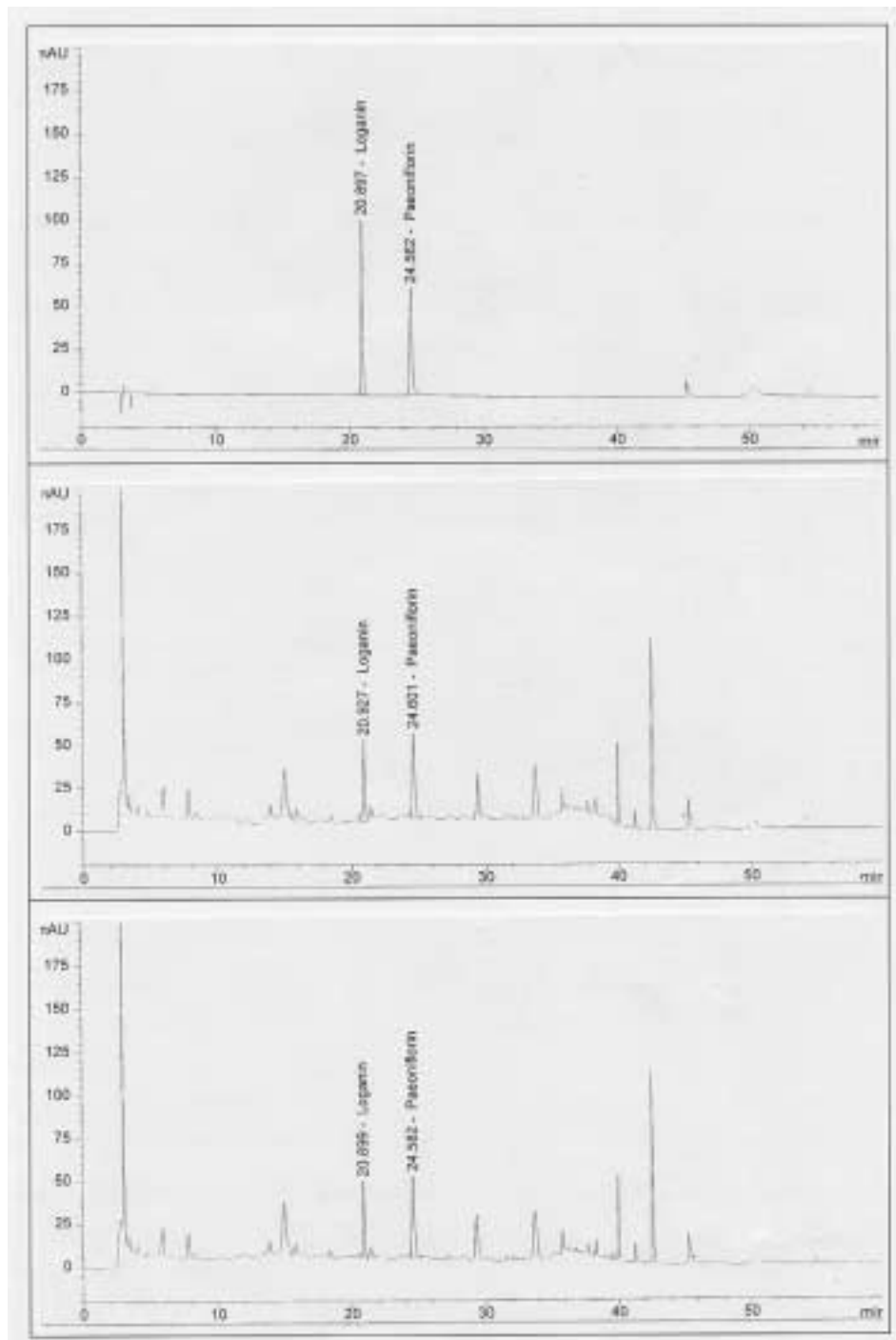
圖六、六味地黃丸未經照射即萃取、經 10 kGy 照射後萃取、萃取後再以 10 kGy 照射之乙酸乙酯層萃取液 (B、B₁、B₂) 及 ursolic acid (u) 標準品於 TLC 展開之圖譜。圖 A.二氯甲烷 (D) 與甲醇 (M) 以 20:1 混合為展開劑 (D/M = 20/1)；圖 B.二氯甲烷與甲醇以 10:1 混合為展開劑 (D/M = 10/1)。圖左為以 10% H₂SO₄ 噴勻 TLC 片加熱後呈色的情形，圖右為 1% FeCl₃ 呈色之結果。



圖七、六味地黃丸未經照射即萃取、經 10 kGy 照射後萃取、萃取後再以 10 kGy 照射之正丁醇層萃取液 (C、C₁、C₂) 於 TLC 展開之圖譜。圖 A.二氯甲烷 (D) 與甲醇 (M) 以 5 : 1 混合為展開劑 (D/M = 5/1) ; 圖 B.二氯甲烷與甲醇以 1 : 1 混合為展開劑 (D/M = 1/1) 。圖左為以 10% H₂SO₄ 噴勻 TLC 片加熱後呈色的情形，圖右為 1% FeCl₃ 呈色之結果。

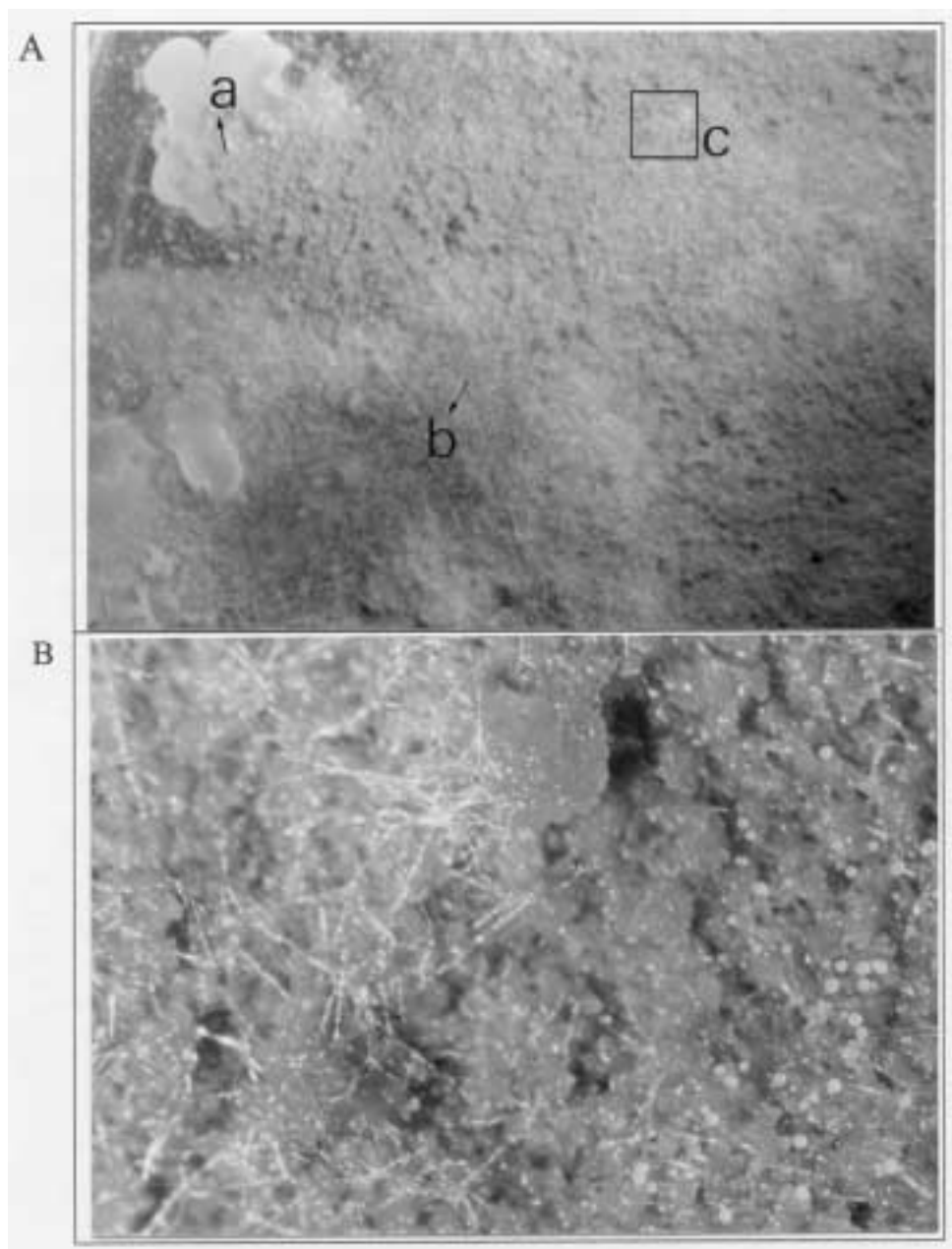


圖八、六味地黃丸未經照射即萃取、經 10 kGy 照射後萃取、萃取後再以 10 kGy 照射之水層萃取液 (D、D₁、D₂) 於 TLC 展開之圖譜。圖 A.二氯甲烷 (D) 與甲醇 (M) 以 5 : 1 混合為展開劑 (D/M = 5/1) ; 圖 B.二氯甲烷與甲醇以 1 : 1 混合為展開劑 (D/M = 1/1) 。圖左為以 10% H₂SO₄ 噴勻 TLC 片加熱後呈色的情形，圖右為 1 % FeCl₃ 呈色之結果。



圖九、六味地黃丸組成分之 HPLC 圖譜。

A.指標成份 loganin、paeoniflorin，B.未經照射樣品之組成成份，C.經 10 kGy 照射樣品之組成成份。



圖十、A.以六味地黃丸直接置於平面培養基上培養後之微生物相，可見細菌菌株（箭頭a）與黴菌菌株（箭頭b）。B.將圖A中方框c處放大12倍，可見大量之黴菌菌絲生長於中藥樣品上。

表一、不同廠牌之六味地黃丸經加馬線照射後之殘存微生物量 (CFU/g) ^a

廠牌 編號	照射劑量 (kGy)					
	0	2	4	6	8	10
甲	1.2×10^3	2.5×10^2	1.7×10^2	52	6	0
乙	6.5×10^2	1.9×10^2	74	16	0	0
丙	2.1×10^2	11	3	0	0	0
丁	1.5×10^2	10	0	0	0	0
戊	2.4×10^2	18	4	1	0	0
己	90	43	25	4	0	0

^a 三重複測試之平均值

表二、六味地黃丸照射處理前、後及貯存 2 個月後其亮度、紅色度、黃色度值之變化

樣品	貯存時間 (月)	未經照射			照射後		
		亮度	紅色度	黃色度	亮度	紅色度	黃色度
甲	0	29.48±1.21	4.33±0.54	12.10±0.66	28.64±0.14	4.13±0.03	11.74±0.11
	2	28.37±0.42	4.35±0.24	11.94±0.27	29.33±0.11	3.85±0.12	11.91±0.03
乙	0	42.26±0.17	4.56±0.46	16.31±0.03	41.71±0.16	4.51±0.19	16.11±0.31
	2	42.09±0.23	4.31±0.54	16.28±0.11	41.44±0.31	4.46±0.16	15.93±0.28

表三、以 HPLC 分析六味地黃丸於照射前、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	10kGy 照射
Loganin	I	0.62	0.56
	II	0.60	0.60
	III	0.64	0.60
	Ave. ^a	0.62	0.59
	S.D. ^b	0.02	0.02
Paeoniflorin	I	1.26	1.21
	II	1.24	1.29
	III	1.34	1.25
	Ave.	1.28	1.25
	S.D.	0.06	0.04

^a Ave.表示 I、II、III 三重複之平均值，b S.D.為標準偏差