

計畫編號：CCMP95-RD-039

行政院衛生署九十五年度科技研究發展計畫

總計畫：中藥材輻射滅菌劑量之評估研究
子計畫二：中藥材輻射滅菌劑量對指標成分及療效之影響

The effects of gamma irradiation for microbial decontamination
on the marker constituents and their biological activities

研究報告

計畫委託機關：行政院衛生署中醫藥委員會

計畫主持人：張永勳

研究人員：張永勳、何玉鈴、周鳳英、鄭炳昇

賴尚志、陳怡蓓、傅涵嫻、陳怡如

執行期間：95年8月22日至95年12月31日

** 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 **

計畫編號：CCMP95-RD-039

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：

行政院衛生署九十五年度科技研究發展計畫

總計畫：中藥材輻射滅菌劑量之評估研究
子計畫二：中藥材輻射滅菌劑量對指標成分及療效之影響

The effects of gamma irradiation for microbial decontamination
on the marker constituents and their biological activities

研究報告

計畫委託機關：行政院衛生署中醫藥委員會

計畫主持人：張永勳

研究人員：張永勳、何玉鈴、周鳳英、鄭炳昇

賴尚志、陳怡蓓、傅涵嫻、陳怡如

執行期間：95年8月22日至95年12月31日

行政院衛生署中醫藥委員會九十五年度

研究計畫成果報告

**總計畫：中藥材輻射滅菌劑量之評估研究
子計畫二：中藥材輻射滅菌劑量對指標成分
及療效之影響**

**The effects of gamma irradiation for
microbial decontamination on the marker
constituents and their biological activities**

執行機構：中國醫藥大學

計畫主持人：張永勳

研究人員：張永勳、何玉鈴、周鳳英、鄭炳昇
賴尚志、陳怡蓓、傅涵嫻、陳怡如

執行期限：95年8月22日至95年12月31日

**** 本研究報告僅供參考，不代表本會意見 ****

目錄

目錄.....	1
圖次.....	2
表次.....	3
中文摘要.....	4
英文摘要.....	5
壹、前言.....	6
貳、材料與方法.....	12
一、實驗材料與儀器.....	12
二、實驗方法.....	12
參、結果.....	16
肆、討論.....	25
伍、結論.....	27
陸、參考文獻.....	28

圖次

圖一、輻射滅菌後之白芍	15
圖二、輻射滅菌後之黃芩	15
圖三、白芍輻射滅菌後之外觀變化	16
圖四、黃芩輻射滅菌後之外觀變化	16
圖五、Paeoniflorin standard 之 HPLC 層析圖	17
圖六、白芍檢品之 HPLC 層析圖	17
圖七、Paeoniflorin standard 檢量線圖	17
圖八、Baicalin standard 之 HPLC 層析圖	19
圖九、黃芩檢品之 HPLC 層析圖	19
圖十、Baicalin standard 檢量線圖	19
圖十一、Scavenging effect (%) of the α -tocopherol	21
圖十二、白芍 DPPH 自由基清除能力	22
圖十三、黃芩 DPPH 自由基清除能力	23

表次

表一、Paeoniflorin standard 檢量線方程式.....	18
表二、白芍檢品 Paeoniflorin 含量.....	18
表三、白芍檢品單因子變異數分析 (Paeoniflorin 含量)	18
表四、Baicalin standard 檢量線方程式.....	20
表五、黃芩檢品 Baicalin 含量.....	20
表六、黃芩檢品單因子變異數 Scheffe 法分析 (Baicalin 含量)	20
表七、白芍 DPPH 自由基清除率.....	21
表八、黃芩 DPPH 自由基清除率.....	21
表九、白芍單因子變異數 Scheffe 法分析 (DPPH 自由基清除率) ..	22
表十、黃芩單因子變異數 Scheffe 法分析 (DPPH 自由基清除率) ..	22

中藥材輻射滅菌劑量對指標成分及療效之影響

張永勳^{1,2}、何玉鈴³、周鳳英⁴、鄭炳昇⁵

賴尚志¹、陳怡蓀¹、傅涵葵¹、陳怡如¹

¹ 中國醫藥大學 中國醫藥研究所

² 中國醫藥大學 附設醫院中藥局

³ 弘光科技大學 護理系

⁴ 清華大學原科中心

⁵ 高雄市中藥商業同業公會

摘要

中藥材在儲存過程中易吸濕氣，利於微生物及倉儲昆蟲之生長，除破壞藥材之成分外，也可能產生有毒物質。輻射滅菌在歐美已進行多年，國內清華大學及核能研究所近年積極從事中藥輻射滅菌之研究，唯大都偏於有效滅菌之輻射劑量探討。本計畫從總計畫所選定之十種中藥藥材中，第一年選取白芍及黃芩2種藥材，除進行正常有效滅菌之10 kGy劑量照射外，也進行15 kGy, 20 kGy, 30 kGy及40 kGy之加馬射線照射，利用HPLC比較其照射前後有效指標成分含量之變化及其抗氧化活性差異之比較。

芍藥與黃芩經HPLC及單因子變異數Scheffe法分析後，不同劑量輻射照射，白芍中所含之芍藥苷，與未照射輻射相比，經輻射滅菌後之各組P值均 >0.05 代表沒有顯著性的差異；黃芩中所含之黃芩苷與未照射輻射相比，經輻射滅菌後之各組P值均 <0.05 代表具有顯著性的差異，其中以40kGy照射後黃芩苷之含量為最少。芍藥與黃芩其DPPH自由基清除能力評估，以1mg/mL白芍及0.5mg/mL黃芩甲醇抽出物為檢品溶液，經由單因子變異數Scheffe法分析，多重比較，40 kGy輻射滅菌後之白芍， $P=0.038 < 0.05$ ，對DPPH自由基清除率有降低的趨勢，其他輻射劑量沒有顯著性之差異；黃芩 $P > 0.05$ ，所有輻射劑量對DPPH自由基清除能力並無明顯差異。

關鍵字：白芍，黃芩，輻射滅菌，芍藥苷、黃芩苷、抗氧化

The effects of gamma irradiation for microbial decontamination on the marker constituents and their biological activities

Yuan-Shiun Chang^{1,2}, Yu-Ling Ho³, F. I. Chou⁴, Bing-Sheng Zheng⁵
Shang-Chih Lai¹, Yi-Chiann Chen¹, Han-Ying Fu¹, Yi-Ru Chen¹

¹Institute of Chinese Pharmaceutical Science
China Medical University

²Chinese crude Drug Pharmacy, China Medical University Hospital

³Nursing Department, Hungkung University

⁴Nuclear Science and Technology Development Center,
National Tsing Hua University

⁵Kaohsiung Chinese Medicine Association

ABSTRACT

Chinese herbs tend to absorb humidity during preservation, which provides a favorable environment for microorganisms and storehouse insects. Besides damaging the components of these Chinese herbs, toxic materials may be produced. The technique of gamma irradiation on microbial decontamination has been widely used in western countries for several years. In Taiwan, National Tsing Hua University and the Institute of Nuclear Energy Research have performed several researches on the related topic, mostly on the effective dose of gamma irradiation.

This program selected Radix Paeoniae Alba and Radix Scutellariae from ten Chinese herbs from the primary program. The herbs were exposed to the normal effective dose of gamma irradiation, which is 10 kGy. Higher doses such as 15kGy, 20kGy, 30kGy, 40kGy were also tested. The amount of marker component before and after the exposure of gamma irradiation were measured and compared. Their anti-oxidizing activity were also evaluated and compared.

The content of paeoniflorin and baicalin of unirradiated and radiated Radix Paeoniae Alba and Radix Scutellariae were analyzed by HPLC. After Scheffe's statistical analysis, the P value for Radix Paeoniae Alba was > 0.05 , no significant difference were found for the content of paeoniflorin before and after several different doses of gamma radiation. However, the P value for Radix Scutellariae was all < 0.05 . Significant difference were found for the content of baicalin before and after several doses of gamma radiation. For DPPH free radical scavenging activity of different dose radiated Radix Paeoniae Alba and Radix Scutellariae, only Radix Paeoniae Alba at the dose of 40 kGy showed significant DPPH scavenging activity. Radix Scutellariae receiving various dose of gamma irradiation did not show significant difference in the DPPH scavenging activity.

Key ward : Radix Paeoniae Alba, Radix Scutellariae, gamma irradiation, paeoniflorin, baicalin, antioxidization activity

壹、前言

中藥能否安全貯存之重要關鍵為其中的微生物含量，在台灣高溫多濕的環境中，利於中藥材中之微生物生長，將破壞中藥材的成分、降低療效，甚至可能產生有害物質，危害服用者之健康，造成醫療保健上的問題。

中藥滅菌實驗是從 20 世紀 70 年代開始的，主要有 4 種方法：水洗除菌、化學藥劑滅菌、(乾或濕)熱滅菌、輻射滅菌。但不久在各地蓬勃開展的試驗研究中，輻射滅菌脫穎而出。目前大陸用於輻射加工的鈷源裝置有 100 多座，台灣則有台中工業區之中國生化及新竹的核能研究所和清華大學有輻射加工的鈷源裝置。除了中藥滅菌外，還用於輻射滅菌食品滅菌殺蟲和保鮮、醫療器械滅菌、玩具滅菌、輻射化工、材料改性以及寶石改色等項目。大陸天津原子能輻照中心即天津市技術物理研究所鈷源成立於 1986 年。近年來，天津市各中藥廠、部分製藥廠、醫院和許多保健藥品的生產廠家都在物理所的鈷源輻射滅菌。

行政院衛生署中醫藥委員會自民國八十八年起即開始探討中藥輻射滅菌之可行性評估，委託清華大學及核能研究所進行中藥輻射滅菌之研究，並於民國八十八年一月二十二日假桃園龍潭行政院原子能委員會核能研究所舉辦「原子能科技於中醫藥應用研討會」討論中藥輻射滅菌相關之主題。近年來中醫藥委員會為提昇中藥用藥安全，特別提出建構中藥用藥安全五年計畫，重視中藥之安全，提昇中藥之品質⁽¹⁾。

衛生署中醫藥委員會自民國八十八年起，逐年補助清華大學及核能研究所進行中藥輻射滅菌研究。包括：CCMP88-CP-003 中藥

材加馬射線滅菌及微量元素檢驗方法與規格之研究；CCMP89-RD-045 中藥（材）加馬射線滅菌及重金屬含量檢測之品質管制研究(3-2)；CCMP90-RD-111 中藥（材）加馬射線滅菌研究(3-3)；CCMP90-CT-44 輻射照射對六味地黃丸之滅菌效果及主成分影響研究；CCMP92-RD-038 四種常見中藥材輻射滅菌後對其療效指標成分的影響研究；CCMP92-RD-040 加馬輻射照射對中藥材滅菌及成分影響評估；CCMP94-RD-010 加馬輻射照射對中藥材滅菌及成分影響評估等⁽²⁾。

聯合國糧農組織(FAO)、國際原子能機構(IAEA)和世界衛生組織(WHO)多次召開國際輻射食品科學討論會，評價輻照食品安全性。1980年10月，由上述3大組織組成的“輻照食品聯合專家委員會”歸納各國30多年安全性研究結果，確認“為儲存目的，任何食物受到總平均劑量10 kGy以下的輻照（ γ 射線和10 MeV以下電子束），不再需要進行毒物學方面的檢測，也沒有特殊營養和微生物問題”。因此，輻照技術作為和平利用原子能的一項高新技術，已經廣泛地應用於中藥的滅菌過程中。而且本總計畫主持人清華大學周鳳英教授近幾年來研究成果發現，以10 kGy加馬射線照射，對多數中藥材已有良好的滅菌效果，且對其中部份之主成分無明顯影響(3-9)。

輻照產品品種有中藥材、中成藥等各種丸、散、片、膠囊，還有西藥和保健品。輻射滅菌不限定包裝形式，而且可以是原料、半成品、成品，批量沒有任何限制。中藥輻射滅菌已經成為食品和藥品生產中必不可少的。在美國、英國和歐盟國家都允許輻射滅菌中藥，美國已寫入藥典。德國原來在輻射滅菌食品方面比較保守，但是隨著歐盟的成立也承認輻射滅菌食品。目前世界上絕大多數國家

都制定了相應的法規，允許輻照食品，也包括植物藥。

輻射滅菌具有下列優點：

- (1) 滅菌徹底，無污染和殘毒，也不會產生感生放射性。
- (2) 滅菌在常溫下進行，即“冷滅菌”，較不影響中藥成分。
- (3) 產品可以在包裝後滅菌，沒有二次染菌問題，只要包裝不透菌，可以長期保證品質。
- (4) 適合大或小批量連續作業，節約能源，成本低廉。

中藥輻射滅菌除照射劑量需達滅菌效果外，選取適合包材及有效包裝方式是輻射滅菌後中藥材有效保存所必須的，施予之照射劑量需對中藥材之成分及療效不致造成影響。輻射照射對中藥材中之成分及療效是否造成變化需加評估，對中藥從業人員及民眾需進行中藥材滅菌觀念之教育宣導。

輻射照射用於食品之保存已被多數國家承認是一種食品加工及保存方法，因特定劑量之加馬線照射對食品無殘毒，食品可在新鮮狀態或包裝後照射，以延長食品的保存期限，且不須加熱或添加防腐劑等⁽¹⁰⁻¹⁵⁾。中國大陸已有多個醫、藥等相關研究單位，進行中藥材輻射滅菌前、後的生物活性、主成分等比較試驗。如動物類藥材（蛤蚧、水蛭等）經輻射照射滅菌後，有效地殺滅藥材內的活蟲與蟲卵，完好保存長達 11 個月⁽¹⁶⁾；用 HPLC 法測定安息香在 10 kGy 劑量照射前後，其有效成分肉桂酸含量無明顯變化⁽¹⁷⁾；牡丹皮及延胡索等經輻射滅菌前後之有效成分含量不變⁽¹⁸⁾；含有揮發性的生藥以輻射滅菌法比傳統乾燥滅菌法好⁽¹⁹⁾；中成藥滅菌亦能符合規定⁽²⁰⁾，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。國內雖對蝦粉、雞丁、牛肉粉、豬肉粉及大蒜等食物已訂定輻射照射

法規，但對中藥材之輻射滅菌劑量則尚未研訂。已有許多國家對藥草之輻射滅菌進行探討。由聯合國工業發展組織(UNIDO) 1984 年之規定，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⁽²¹⁾。而國內目前於中華民國 94 年 7 月 27 日由行政院衛生署公告「中藥材及中藥製劑含有害物質限量標準及其適用範圍」⁽²²⁾ (草案)，內容指出：

- (1). 中藥碎片劑型之製劑，其微生物限量標準如下：大腸桿菌 (*Escherichia coli*)：不得檢出。
- (2). 沙門氏桿菌 (*Salmonella species*)：不得檢出。
- (3). 綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)：不得檢出。
- (4). 金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)：不得檢出。
- (5). 好氧性微生物總數 (Total plate count)：每克不得超過 100,000 個 (10^5 CFU/g)。
- (6). 酵母菌與黴菌數總數 (Yeast & Mould)：每克不得超過 100 個 (10^2 CFU/g)。

波蘭之藥物工業每年生產數千噸的草藥，因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，故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、anthocyan、triterpene saponins 等成分及植物中之黏液成分並無明顯變化⁽²⁴⁾。韓國草藥 *Paeoniae Radix* 經 10 kGy 照射滅菌後，其有效成分無改變且不產生有毒物質⁽²⁵⁾。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，顯示 10 kGy 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 劑量照射後上述成分出現含量稍降低之現象

(26)。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⁽¹⁴⁾。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 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^(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⁾。國外已有許多草藥及肉桂、豆蔻等香料與醫療用品、化妝品原料、藥物（如抗生素等），及馬鈴薯片等多項食品進行輻射照射滅菌之研究⁽³⁰⁻⁴³⁾。如大豆之重要成分異黃酮素（isoflavones）及卵磷脂（lecithin），在經 5 kGy 加馬射線照射滅菌後並無顯著改變，甚至其抗氧化物質（如 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl）隨照射劑量而增加⁽⁴⁰⁾；冰淇淋經 3 kGy 劑量照射後其風味及成分無明顯變化⁽³⁹⁾；化妝品原料中主要的微生物為黴菌與革藍氏陰性菌，分別使用 1~2 kGy 及 0.1~0.6 kGy 劑量可達滅菌效果⁽³⁸⁾。本計畫之總主持人清華大學周鳳英教授曾進行黃芩、白果、生地、熟地、枸杞、人參、川芎、黨參、山藥、當歸、丹參、桔梗、杏仁、山楂、廣橘皮、麥門冬、浙貝母、茯苓、金銀花、白芷、白朮、貝母、五味子、百合、大黃、柴胡、山茱萸、黃耆、虎杖、紫草、甘草、薏仁、枳殼、桂枝、紅花、葛根、杜仲、珍珠粉、神麴、連翹、酸棗仁、鬱金、霍山石斛、蒼朮、冬蟲夏草、黃精等 46 種中藥材及市售常用的六味地黃丸、加味逍遙散、辛夷散、補中益氣湯、歸脾湯等五種科學中藥方劑之輻射滅菌研究。結果顯示除珍珠粉需 25~27.5 kGy 照射劑量才能達完全滅菌，甘草、黃芩、枸杞、桂枝及冬蟲夏草等少數中藥材需以 15 kGy 之照射劑量滅菌外，以 10 kGy 加馬射線照射，對多數中藥材已有良好的滅菌效

果，且對其中的主成分無明顯影響⁽³⁻⁹⁾。

本計畫除比較正常照射劑量 10 kGy 照射前後藥材之指標成分含量變化外，也進行耐受性試驗，增加 15 kGy, 20 kGy, 30 kGy, 40 kGy 之加馬射線照射劑量，比較其指標成分之含量變化及活性變化差異。本整合型計畫擬分兩年進行，研究成果期提供企業界進行中藥材加馬線滅菌之劑量，及行政單位研訂中藥材加馬線滅菌貯存照射劑量法規之參考。而中藥材輻射滅菌量產之落實執行，除政府立法規定之外，相關從業人員對輻射滅菌之瞭解，是確定其落實執行之主要因素，因此子計畫三將舉行產官學專家會議及中藥輻射滅菌暨實務研討會，將本計畫及子計畫一之研究成果彙整討論後，於研討會中報告並進行政策宣導，以推廣中藥輻射滅菌量產及對全國中藥商推廣輔導為目標，針對全國中藥商及其從業人員進行輔導，提供全國中藥從業人員正確之輻射照射知識，溝通輻射殘留、變質等之疑慮，以推廣中藥材源頭管制及中藥用藥安全之觀念。期使中藥材照射滅菌法規化，確保中藥的衛生安全，解決醫療保健上的問題，以建立消費者之認同，提高中藥之經濟效益。

貳、材料與方法

一、實驗材料與儀器

- (一) HPLC 及抗氧化試驗用之藥材：白芍及黃芩購自台中市欣隆中藥行。
- (二) 試藥：LC 級甲醇、LC 級乙腈、Phosphoric acid、ddwater、DPPH。
- (三) HPLC 標準品：白芍：芍藥苷 (Paeoniflorin)，購自 Sigma。
黃芩：黃芩苷 (Baicalin)，購自 Sigma。
DPPH 自由基清除能力標準品： α -tocopherol，購自 Sigma。
- (四) 儀器：高效液相層析儀：WATERS™ 2695 Separation Module with autosampler 717⁺，偵測器：WATERS™ 996 Photodiode Array Detector，積分儀：WATERS™ 996 Photodiode Array Computer Integrater。

二、實驗方法

- (一) 將買來之白芍及黃芩分別秤取 50g 置於血清瓶中，送至清華大學原科中心請周鳳英教授代為進行加馬射線輻射滅菌，輻射劑量分別為 15 kGy, 20 kGy, 30 kGy 及 40 kGy，每一劑量均照射兩瓶。
- (二) 不同劑量加馬射線照射前後之指標成分變化比較。

(1) 白芍之高效液相層析方法⁽⁴⁴⁻⁵²⁾

A. 對照品：芍藥苷(Paeoniflorin)

1. 標準品儲備溶液

取芍藥苷(Paeoniflorin)對照用標準品約 10 mg，精確稱定，加

甲醇溶液溶成 10 mL (1mg/mL)，經 45 μ m 濾膜過濾後，供作標準品儲備溶液。

2.檢量線

取芍藥苷(Paeoniflorin)標準品儲備溶液稀釋成不同濃度，分別為 0.01、0.0075、0.005、0.0025 及 0.001 mg/mL。以標準品波峰面積比與標準品濃度，作檢量線並求出其線性回歸方程式及相關係數。

3.檢品溶液

取本品粉末約 0.5 g，精確稱定，加甲醇溶液 20 mL，置於超音波震盪器萃取三十分鐘後過濾之，殘留物再以甲醇溶液 20 mL，同上操作重複兩次，合併上清液濃縮定量至 10 mL，再取 1 mL 定容至 20 mL，經 45 μ m 濾膜過濾後，作為檢品溶液。

B.方法

層析管柱：Waters XTerra RP18 5 μ m (4.6 \times 250mm) Part

NO.186000496

移動相：甲醇：水 (30：70)

檢測波長：230 nm

流速：1 mL/min

(2)黃芩之高效液相層析方法^(46,47,53-56)

A.對照品：黃芩苷(Baicalin)

1.標準品儲備溶液

取預置於減壓之矽膠乾燥器內乾燥二十四小時以上之黃芩苷(Baicalin)對照用標準品約 1 mg，精確稱定，置於 10 mL 容量瓶，

加適量之甲醇溶解並定容之 (0.1 mg/mL)，經 45 μ m 濾膜過濾後，供作標準品儲備溶液。

2. 檢量線

取黃芩苷(Baicalin)標準品儲備溶液，釋成不同濃度稀釋成不同濃度分別為 0.1、0.075、0.05、0.025 及 0.01 mg/mL。以標準品波峰面積比與標準品濃度，作檢量線並求出其線性回歸方程式及相關係數。

3. 檢品溶液

取本品粉末約 0.5 g，精確稱定，加甲醇溶液 20 mL，置於超音波震盪器萃取三十分鐘後過濾之，殘留物再以甲醇溶液 20 mL，同上操作重複兩次，合併上清液濃縮定量至 10 mL，再取 1 mL 定容至 50 mL，經 45 μ m 濾膜過濾後，作為檢品溶液。

B. 方法

層析管柱：Waters XTerra RP18 5 μ m (4.6 \times 250mm) Part

NO.186000496

移動相：0.2 %磷酸：乙腈(75：25)

檢測波長：275 nm

流速：1 mL/min

(三)不同劑量之輻射滅菌後之抗氧化活性變化評估

1. 提取及檢品製備

秤取 10 公克粉碎藥材，浸泡於 30 mL 甲醇中，以超音波振盪萃

取三次，合併濾液濃縮到乾，秤取抽出物 100 mg 以甲醇定容至 10 mL，取 4 mg α -tocopherol 以甲醇定容至 10 mL，以供製備成不同濃度之檢品溶液。

2.DPPH 自由基清除能力⁽⁵⁷⁾

↓ 取 5 mL 不同濃度的樣品溶液

↓ 加 1 mL 1 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

↓ 振盪均勻混合 15 秒，於室溫靜置 30 分鐘

↓ 測其 517 nm 波長下的吸光值

Inhibition percentage (%)= [1-(Ab₅₁₇ sample/AB₅₁₇ control)] × 100 %

參、結果

以下之結果均為相同照射劑量之兩樣品，分別進行3重複試驗，最後共6實驗數據進行統計分析。

一、不同劑量加馬射線照射前後之指標成分變化比較。

(一)外觀差異

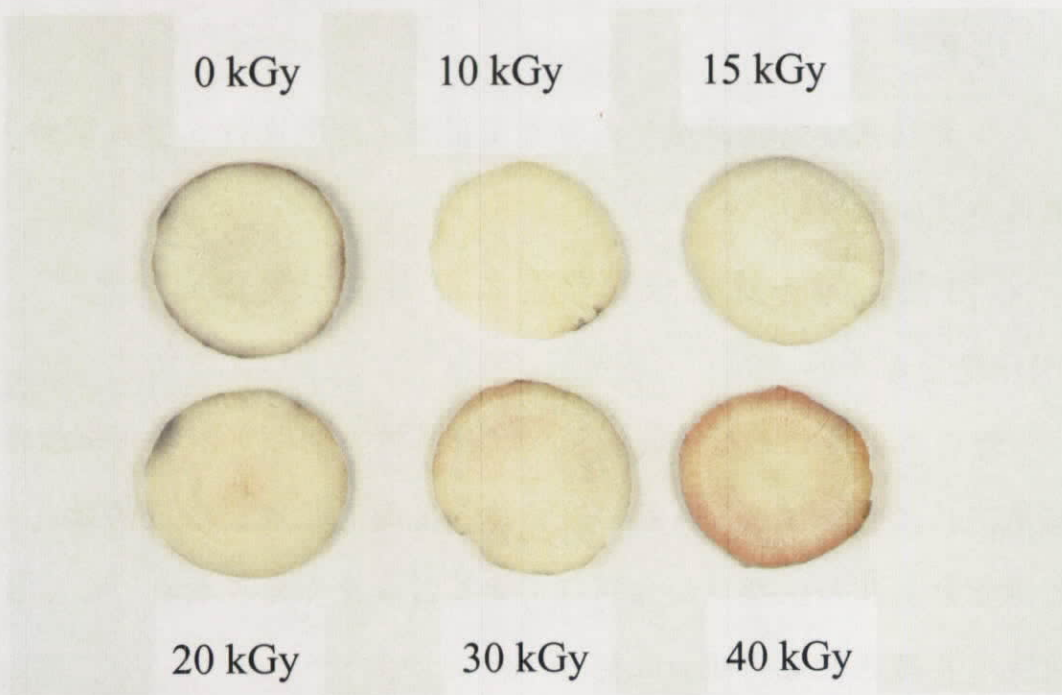
輻射滅菌後之藥材外觀變化，以白芍較為明顯，白芍在未經輻射滅菌前其顏色偏白色，在輻射滅菌後，其顏色呈現出淡淡的紅色，照射劑量愈高其顏色顯現的愈明顯；黃芩因本身即呈現黃色，在輻射滅菌後，其顏色沒有明顯的改變。



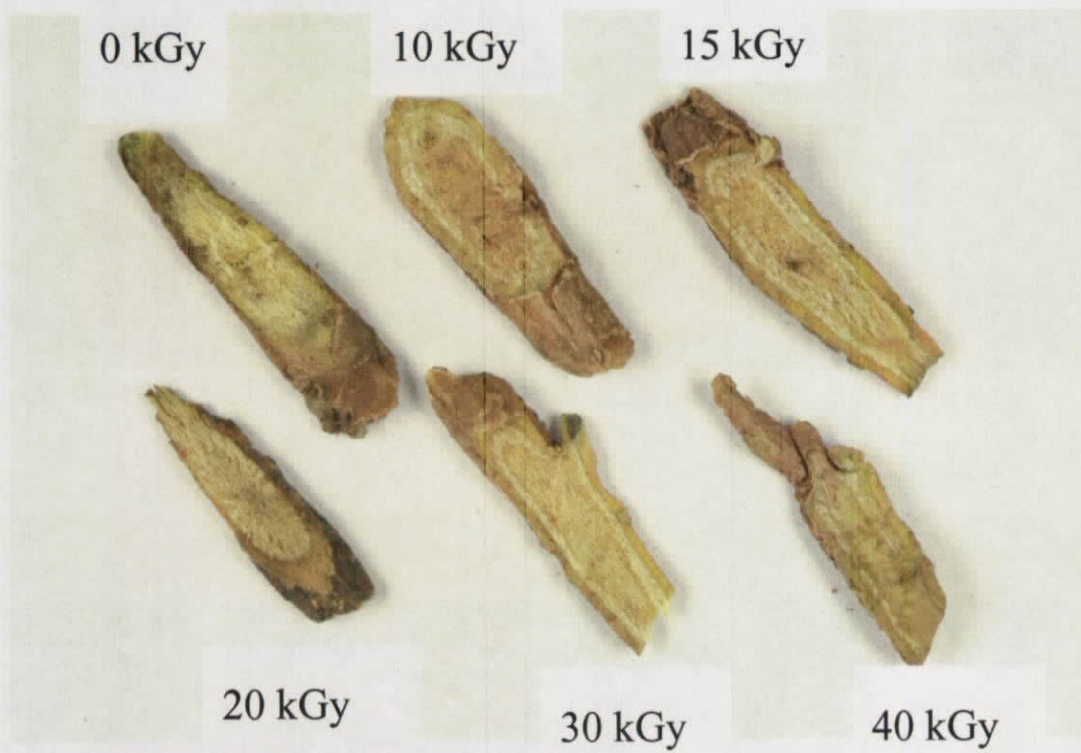
圖一、輻射滅菌後之白芍。由左至右分別為0，10，15，20，30及40 kGy。



圖二、輻射滅菌後之黃芩。由左至右分別為0，10，15，20，30及40 kGy。

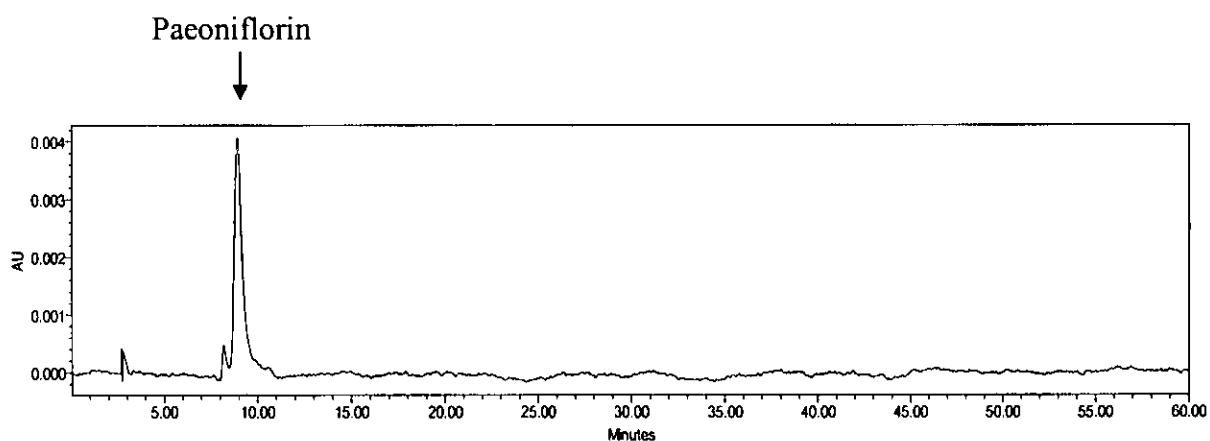


圖三、白芍輻射滅菌後之外觀變化

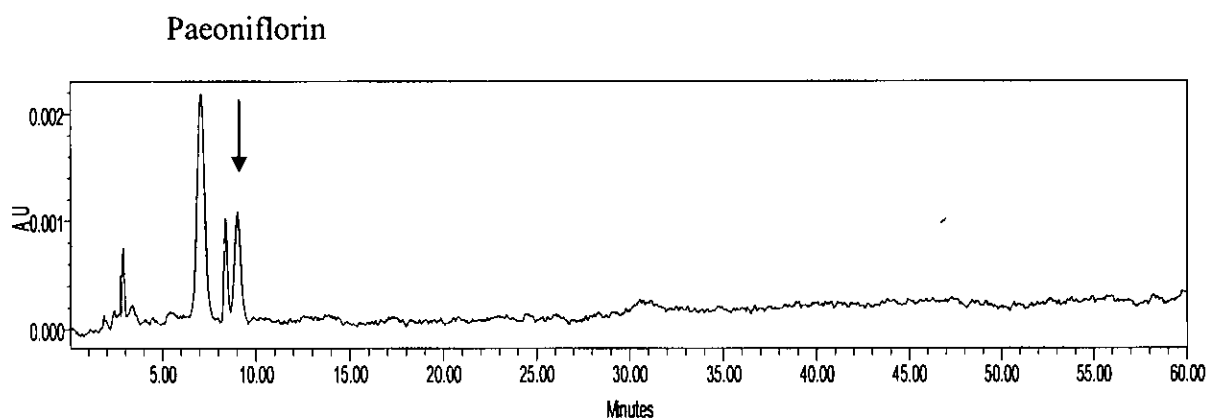


圖四、黃芩輻射滅菌後之外觀變化

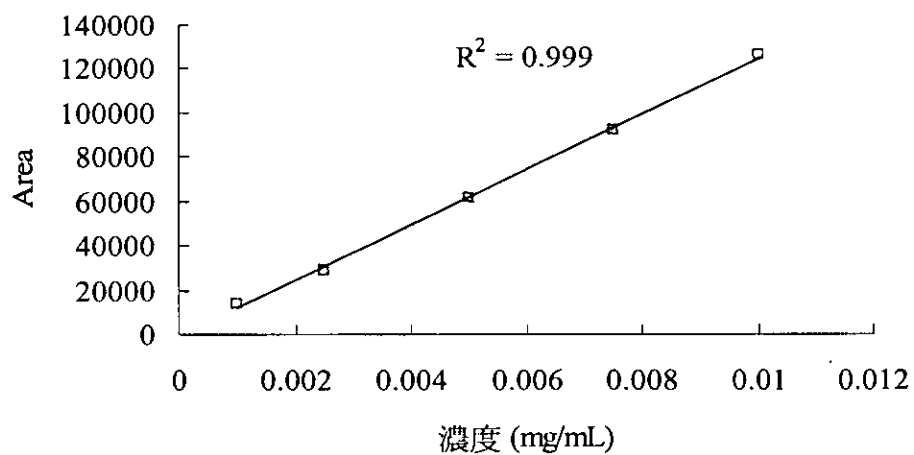
(二) 白芍



圖五、Paeoniflorin standard 之 HPLC 層析圖



圖六、白芍檢品之 HPLC 層析圖



圖七、Paeoniflorin standard 檢量線圖

表一、Paeoniflorin standard 檢量線方程式

Compound (Paeoniflorin)	Y=aX+b Y=peak area, X=conc. (mg/mL)			
	Linear range	Slope (a)	Intercept (b)	R ²
檢量線	0.001~0.01	1×10 ⁷	-1042.6	0.9990

表二、白芍檢品 Paeoniflorin 含量

(n=3)

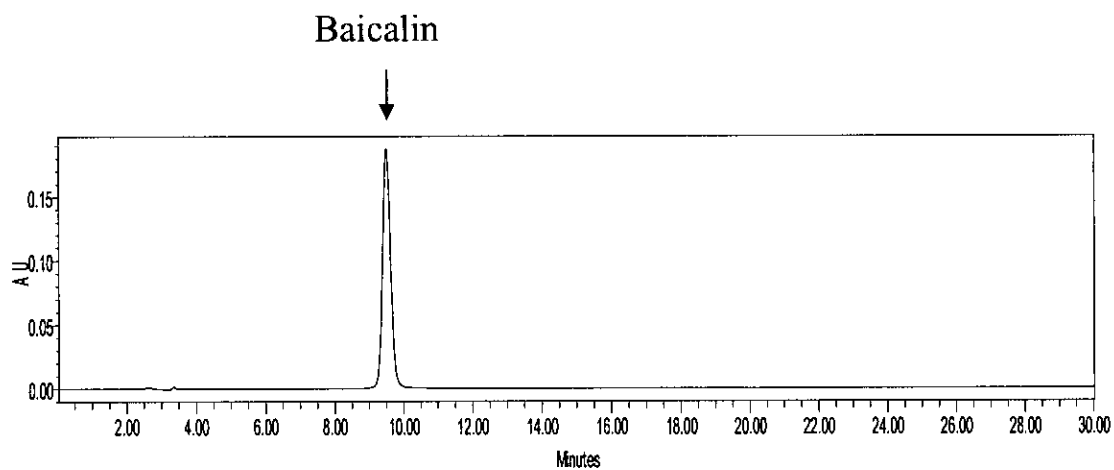
輻射劑量 (kGy)	A Paeoniflorin 含量(mg/g)	RSD(%)	B Paeoniflorin 含 量(mg/g)	RSD(%)	平均 Paeoniflorin 含量(mg/g)
0	0.85	0.21	0.84	0.100	0.845
10	0.87	1.41	0.65	1.00	0.76
15	0.76	1.78	1.29	0.70	1.025
20	0.73	0.69	0.62	1.38	0.675
30	0.66	1.96	0.82	1.91	0.74
40	0.99	0.67	1.14	0.71	1.065

表三、白芍檢品單因子變異數分析 (Paeoniflorin 含量)

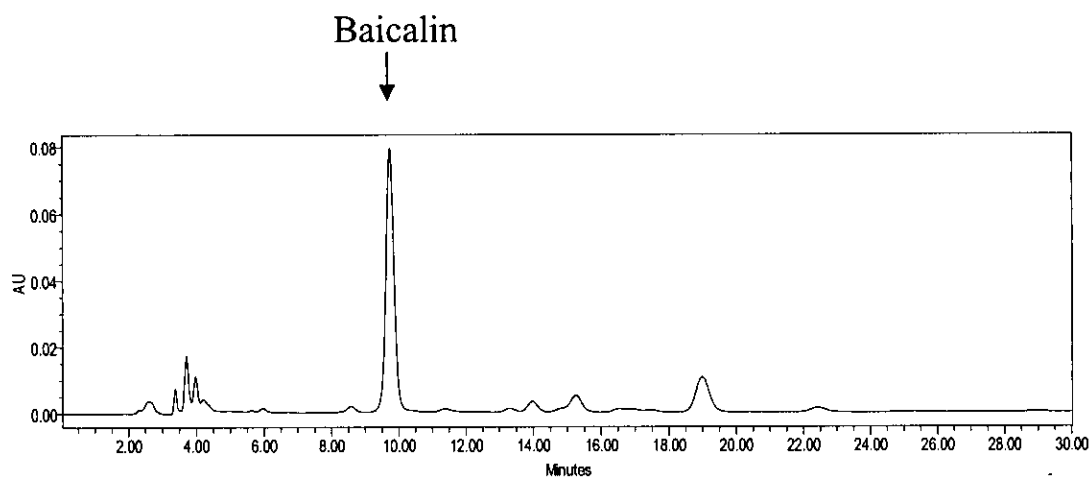
(I) kGy	(J) kGy	平均差異(I-J)	顯著性(P)
0.00	10.00	8.25333E-0.2	0.956
	15.00	-0.18099	0.431
	20.00	0.170233	0.500
	30.00	0.108213	0.872
	40.00	-0.221233	0.218

P>0.05 無顯著性差異, 0.01>P>0.05 有差異, P<0.05 有顯著性差異
利用 A、B 兩檢品, 各 3 次分析共 6 次的結果, 所作之分析

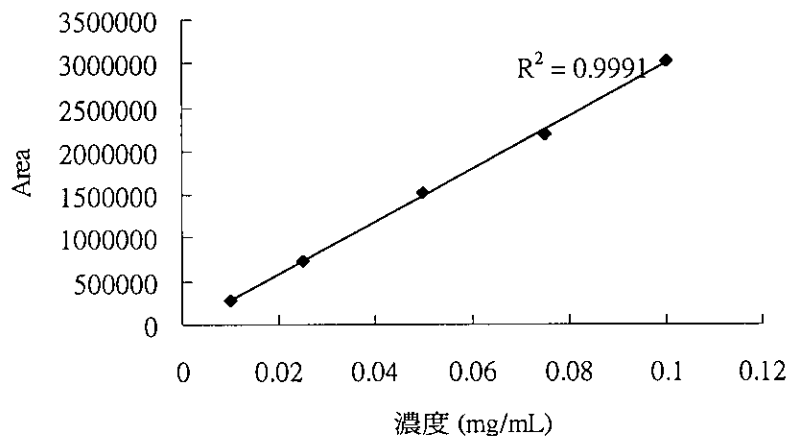
(二) 黃芩



圖八、Baicalin standard 之 HPLC 層析圖



圖九、黃芩檢品之 HPLC 層析圖



圖十、Baicalin standard 檢量線圖

表四、Baicalin standard 檢量線方程式

Compound (Baicalin)	Y=aX+b Y=peak area, X=conc. (mg/mL)			
	Linear range	Slope (a)	Intercept (b)	R ²
檢量線	0.01~0.1	3×10 ⁷	-18983	0.9991

表五、黃芩檢品 Baicalin 含量

(n=3)

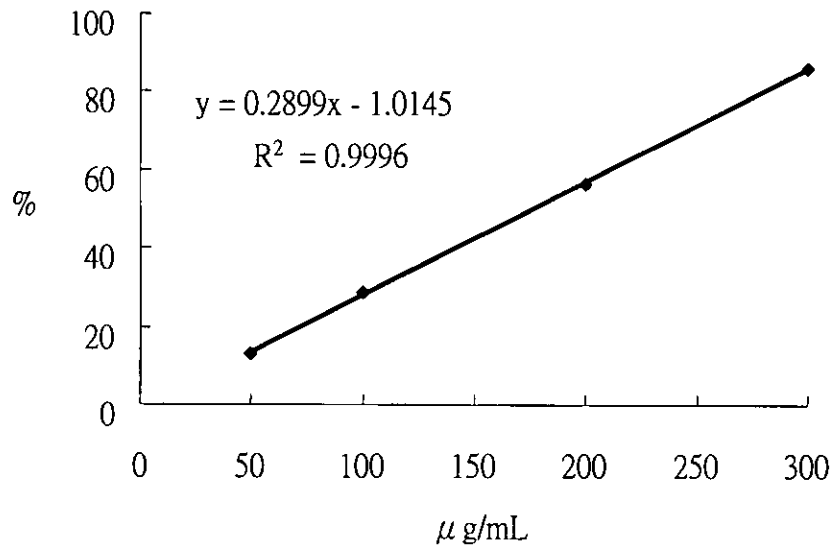
輻射劑量 (kGy)	A Baicalin 含 量(mg/g)	RSD(%)	B Baicalin 含 量(mg/g)	RSD(%)	平均 Baicalin 含 量(mg/g)
0	46.14	1.78	45.06	1.98	45.6
10	36.09	0.23	34.19	0.01	35.14
15	35.28	0.23	35.75	0.59	35.52
20	38.53	1.66	36.37	0.13	37.45
30	39.91	0.61	33.62	0.06	36.765
40	31.36	0.27	35.1	0.37	33.23

表六、黃芩檢品單因子變異數 Scheffe 法分析 (Baicalin 含量)

(I) kGy	(J) kGy	平均差異(I-J)	顯著性(P)
0.00	10.00	10.4057833*	0.000
	15.00	10.0326556*	0.000
	20.00	8.0944389*	0.000
	30.00	8.7778222*	0.000
	40.00	12.3084611*	0.000

P>0.05 無顯著性差異, 0.01>P>0.05 有差異, P<0.05 有顯著性差異
利用 A、B 兩檢品, 各 3 次分析共 6 次的結果, 所作之分析

二、不同劑量之輻射滅菌後之抗氧化活性變化評估
 (一) DPPH 自由基清除能力



圖十一、Scavenging effect (%) of the α -tocopherol

表七、白芍 DPPH 自由基清除率

1 mg/L 白芍		DPPH 自由基清除率		
kGy	A	B	平均	
0	63.9	64.4	64.15	
10	62.4	67.0	64.7	
15	67.3	63.5	65.4	
20	61.2	64.8	63	
30	65.2	64.2	64.7	
40	60.0	57.8	58.9	

表八、黃芩 DPPH 自由基清除率

0.5 mg/mL 黃芩		DPPH 自由基清除率		
kGy	A	B	平均	
0	53.6	64.2	58.9	
10	57.3	58.8	58.05	
15	63.0	51.9	57.45	
20	50.7	52.6	51.65	
30	53.1	54.6	53.85	
40	55.7	50.7	53.2	

表九、白芍單因子變異數 Scheffe 法分析 (DPPH 自由基清除率)

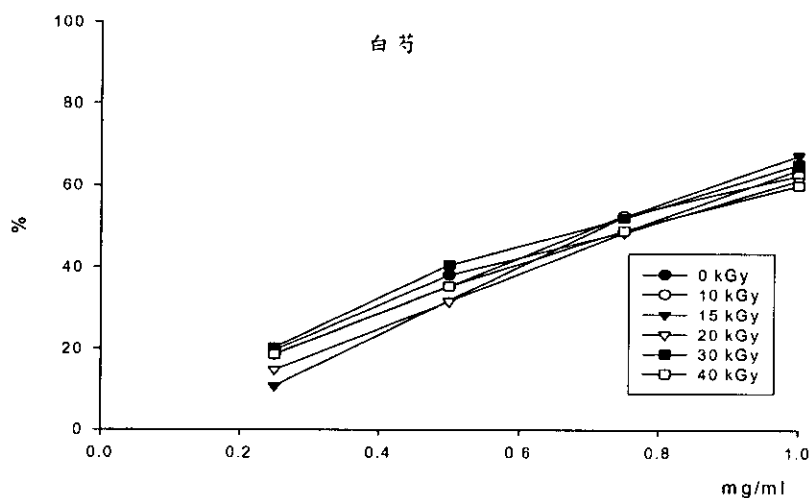
(I) kGy	(J) kGy	平均差異(I-J)	顯著性(P)
0.00	10.00	-0.3100	1.00
	15.00	-1.0450	0.993
	20.00	1.4467	0.969
	30.00	-0.2617	1.00
	40.00	5.6717*	0.038

P>0.05 無顯著性差異，0.01>P>0.05 有差異，P<0.05 有顯著性差異
 利用 A、B 兩檢品，各 3 次分析共 6 次的結果，所作之分析

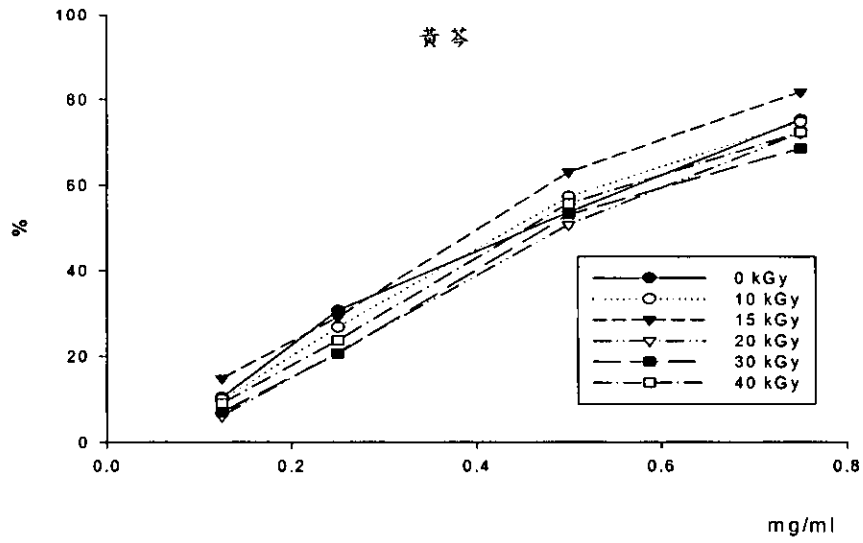
表十、黃芩單因子變異數 Scheffe 法分析 (DPPH 自由基清除率)

(I) kGy	(J) kGy	平均差異(I-J)	顯著性(P)
0.00	10.00	1.1805	0.999
	15.00	1.7810	0.994
	20.00	7.7644	0.190
	30.00	5.4766	0.561
	40.00	6.1494	0.433

P>0.05 無顯著性差異，0.01>P>0.05 有差異，P<0.05 有顯著性差異
 利用 A、B 兩檢品，各 3 次分析共 6 次的結果，所作之分析



圖十二、白芍 DPPH 自由基清除能力



圖十三、黄芩 DPPH 自由基清除能力

肆、討論

台灣地區屬潮濕高溫的氣候，中藥材的保存不易，常有長霉生蟲的問題發生。 ^{60}Co γ 射線輻射滅菌作為一種新的消毒滅菌方法，已被收入美國藥典，台灣藥典對此還沒有記載，但大量研究已證實其對中藥及製劑的滅菌效果，尤其對揮發性、熱敏性中藥材及蜜丸的滅菌，表現出它的優越性。它可用於已包裝密封的中成藥消毒滅菌，是各步驟都完成後的“最終消毒”，可防止了再次污染，但 ^{60}Co γ 射線輻射滅菌會引起個別中成藥的化學成分生物活性的變化，在應用中劑量的選擇非常重要，應以最小的劑量達到最大的滅菌效果，來保證藥物品質。

本年度選定之中藥材白芍及黃芩，經分裝後送至清華大學原科中心照射不同劑量之輻射，同一輻射劑量分別照射 A 及 B 兩瓶。萃取方式均利用甲醇作為溶劑配合超音波震盪器來萃取，經濃縮定容過濾後作為檢品。在利用高效液相層析方法中，白芍中主要指標成分芍藥苷的分離，經參考前人之研究再加以修飾後，選定利用甲醇及水作為流動相，來進行分離，並利用檢量線算出其芍藥苷之含量。結果發現與未照射輻射之樣品比較，輻射照射過之芍藥苷含量變化沒有特定的趨勢，並利用單因子變異數 Scheffe 法分析，結果指出白芍不同輻射照射劑量組間之 P 值均 >0.05 ，就統計上而言，未照射輻射與照射不同輻射劑量之各組間芍藥苷含量變化沒有顯著性的差異。黃芩中的主要指標成分黃芩苷，經參考前人之研究再加以修飾後，選定利用 0.2 % 之磷酸水與乙腈作為流動相進行分離，並利用檢量線算出其黃芩苷之含量。結果發現與未照射輻射之樣品比較，經利用單因子變異數 Scheffe 法分析後，黃芩不同輻射照射劑量組間之 P 值均 <0.05 ，就統計上而言未照射輻射與照射不

同輻射劑量之各組間黃芩苷含量變化有顯著性的差異，其中以照射 40 kGy 的檢品其黃芩苷含量為最低。

在抗氧化活性方面，使用與 HPLC 相同之未經輻射照射及經不同輻射劑量照射的樣品。白芍與黃芩利用甲醇作為溶劑配合超音波震盪器來萃取，經濃縮至乾後作為檢品。未經輻射滅菌之白芍及黃芩均具有相當之抗氧能力，白芍 1 mg/mL 之抗氧化能力相當於 0.225 mg/mL 之 α -tocopherol，黃芩 0.5 mg/mL 之抗氧化能力相當於 0.207 mg/mL 之 α -tocopherol，比較未經輻射照射及經不同輻射劑量照射後之白芍檢品，在 DPPH 自由基清除能力方面沒有發現特定的變化趨勢，經單因子變異數 Scheffe 法分析，結果顯示 40 kGy 輻射滅菌後之白芍， $P=0.038 < 0.05$ ，對 DPPH 自由基清除率有降低的趨勢，其他輻射劑量沒有顯著性之差異。黃芩在 DPPH 自由基清除能力方面，其清除能力並沒有隨著輻射劑量的高低而隨之改變，沒有特定的變化趨勢，但照射過輻射的樣品均較未照射輻射的樣品低，經單因子變異數分析，結果顯示黃芩不同輻射照射劑量組間之 P 值 > 0.05 ，代表未照射輻射與照射不同輻射劑量之各組間之 DPPH 自由基清除能力沒有顯著性的差異。

伍、結論

白芍與黃芩經 10 kGy, 15 kGy, 20 kGy, 30 kGy 及 40 kGy 不同劑量輻射照射後，其所含之芍藥苷及黃芩苷含量 Scheffe 法分析後得知，在芍藥苷含量部分，顯示未照射輻射與各照射劑量間之芍藥苷含量變化沒有顯著性的差異；黃芩苷含量部份，與未照射輻射相比均有顯著性差異，其中以 40 kGy 輻射滅菌後之黃芩苷含量減少最多。

比較不同劑量之輻射滅菌及未經輻射處理藥材甲醇抽出物，對 DPPH 自由基清除能力抗氧化活性變化評估，經由單因子變異數分析 Scheffe 法，多重比較，40 kGy 輻射滅菌後之白芍， $P=0.038 < 0.05$ ，對 DPPH 自由基清除率有降低的趨勢，其他輻射劑量沒有顯著性之差異；黃芩 $P > 0.05$ ，所有輻射劑量對 DPPH 自由基清除能力並無明顯差異。

由以上結果顯示，白芍及黃芩在適當劑量之加馬射線照射下是安全的。

陸、參考文獻

1. 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民國 93 年 12 月出版。
2. 林宜信主編，台灣中醫藥發展策略與成果-行政院衛生署中醫藥委員會成立 10 週年特輯，行政院衛生署中醫藥委員會編印，台北，pp.284-345，2005。
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Chou, F. I., Wen, H. W and Chung, H. P. 2005. The Effect of Gamma Irradiation on Microbial Decontamination and Chemical and Sensory Characteristic of Lycium Fruit. *Radiation Physics and Chemistry.* (accepted).
9. Chou, F. I. 1998. Pollen Gamma-ray Irradiation. *Nucl. Sci. J.*, 35, 165-171.

10. Loaharanu, P. 1994. Cost/Benefit Aspects of Food Irradiation. *Food Technol.*, 48, 104-108.
11. 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.
12. Sommer, N. F. and Fortlage, R. G. 1996. Ionizing radiation for control of post-harvest diseases of fruits and vegetables. *Adv. Food Res.*, 51, 147-193.
13. Stone, C. A., Odin, C., Howard, J. and Mumaw, L. D. 1994. High-School Experiments in Food Irradiation. *Abs. Pap. Am. Chem. Soc.*, 207, 91-NUCL.
14. Takehisa, M. and Ito, H. 1986. Experiences of Food Irradiation in Japan. *Food Rev. Int.*, 2, 19.
15. Thakur, B. R. and Singh, R. K. 1994. Food Irradiation-Chemistry and Applications. *Food Rev. Int.*, 10, 437-473.
16. 孔令杰、鄭麗珍，1996， ^{60}Co - γ 射線輻照養護動物類藥材初探。中藥材，19(8)：404。
17. 胡馨、劉幼君，1998，HPLC法測定安息相在 ^{60}Co - γ 射線輻照前後肉桂酸的含量。中成藥，20(10)：42。
18. 楊德泉、錢淑、章榮，1997， ^{60}Co - γ 射線輻照三種中藥成分的影響研究。基層中藥雜誌，11(4)：36。
19. 泮紅玲，2005，生藥乾燥滅菌法與輻射滅菌法的比較。醫藥導報，24(4)：334。
20. 李繼珊，2002， ^{60}Co 輻照對中成藥滅菌效果的檢測。中國消毒學雜誌，19(1)：36-38。
21. UNIDO. 1984. Guidelines for commercial plantation and manufacture of medicinal and aromatic plants.

22. 行政院衛生署公告，中華民國 94 年 7 月 27 日署授藥字第 0940003835 號。
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. Yu, Y. B., Jeong, I. Y., Park, H. R., Oh, H., Jung, U., Jo, S. K. 2004. Toxicological safety and stability of the components of an irradiated Korean medicinal herb, *Paeoniae Radix*. *Radia. Phys. Chem.*, 71, 117-121.
26. 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.
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. Mayermiebach, E. 1993. Food Irradiation-A Means of Controlling Pathogenic Microorganisms in Food. *Food Sci. Technol. -Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie.*, 26, 493-497.
30. 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.
31. 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.

32. Aziz, N. H., El-Fouly, M. Z., Abu-shady, M. R. and Moussa, L. A. 1997. Effect of gamma radiation on the survival of fungal and actinomycetal florae contaminating medicinal plants. *Appl. Radiat. Isot.*, 48, 71-76.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. El-Far, F., Aziz, N. H. and Hegazy, S. 1992. Inhibition by gamma-irradiation and antimicrobial food additives of aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus* in poultry diet. *Die Nahrung.*, 36, 143-149.
38. Katusin-Razem, B., Mihaljevic, B. and Razem, D. 2003. Microbial decontamination of cosmetic raw materials and personal care products by irradiation. *Radia. Phys. Chem.*, 66, 309-316.
39. Pietranera, M. S. A., Narvaiz, P., Horak, C. and Kairiyama, E. 2003. Irradiated ice creams for immunosuppressed patients. *Radia. Phys. Chem.*, 66, 357-365.

40. Pietranera, M. S. A. and Narvaiz, P. 2002. Physicochemical stability of fluid soybean lecithin gamma irradiated for decontamination purposes. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35, 114-119.
41. Variyar, P. S., Limaye, A. and Sharma A. 2004. Radiation-induced enhancement of antioxidant contents of soybean (*Glycine max* Merrill). *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3385-3388.
42. Wang, J., Du, Y. S. 2005. The effect of gamma-ray irradiation on the drying characteristics and final quality of dried potato slices. *Int. j. food sci. technol.* 40 (1), 75-82.
43. Warke, R. G., Kamat, A. S. and Kamat, M. Y. 1999. Irradiation of chewable tobacco mixes for improvement in microbiological quality. *J. Food Prot.*, 62, 678-81.
44. 徐宇、談紅、萬新，用 RP-HPLC 同時測定逍遙丸中當歸、芍藥的指標成分的含量，*中國藥學雜誌* 2001，36(8)：552-554。
45. 張世勤、胡愛萍、曹鐵城，高效液相色譜法測定加味逍遙丸中芍藥苷含量，*中國中藥雜誌*，1994，19 (9): 549。
46. 行政院衛生署，*中華中藥典*，行政院衛生署中華中藥集編修小組，台北，2004; pp.7-8, 17, 23-24, 52-53, 54, 116-117, 126-127, 148-149, 163-164。
47. 行政院衛生署藥物食品檢驗局，*中藥檢驗方法專輯(九)—中藥濃縮製劑指標成分定量方法*，台北，1996; pp.16-19, 60-62, 63-65, 70-73, 294-295, 343-344。
48. 王禕民、雷玉萍、李瑞蓮，HPLC 法測定歸附口服液中芍藥苷的含量，*中國藥師* 2003，6(8): 495-496。
49. 李月琴、何建華、錢永昌、許勇、冷靜媛，*海峽藥學* 2006，18(2): 61-62。
50. 陳紅、桂立新、鄒渭洪，高效液相色譜法測定婦炎消合劑中芍藥苷的含量，*南華大學學報醫學版* 2006，34(2): 291-292。

51. 劉紅梅、吳琳華、曲福軍、王曄，高效液相色譜法測定排石靈片中芍藥苷的含量，中國醫院藥學雜誌 2003，23(9): 524-525。
52. 孫大鵬，高效液相色譜法測定舒肝丸中芍藥苷含量，現代中藥研究與實踐 2006，20(2): 32-33。
53. 方焱、陳禮明、陳象青、葛志立，高效液相色譜法同時測定家兔血清中頭孢唑啉和黃芩苷含量，中國醫院藥學雜誌 2006，26(5): 549-551。
54. 林素華、葉秋焰，高效液相色譜法測定复方消炎顆粒中黃芩苷的含量，海峽藥學 2006，18(2): 63-65。
55. 夏方亮、景艷萍、傅勇、趙衛，HPLC 法同時測定炎可寧片中鹽酸小檗鹼和黃芩苷的含量，中國藥品標準 2006，7(3): 43-45。
56. 宋衛中、劉蔚、馬開，高效液相色譜法測定雙黃連含片中黃芩苷和漢黃芩素的含量，時珍國醫國藥 2006，17(1): 61-62。
57. Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*, Kyoung Soon Kim, Journal of Ethnopharmacology 85: 69-72 (2003)。