

中國醫藥大學藥學院
中國藥學暨中藥資源學系博士論文

編號：ICPS-D76

指導教授：張永勳 教授
共同指導教授：周鳳英 教授

I. 中藥材何首烏之輻射滅菌劑量研究

**Studies on the Gamma Radiation Antiseptic Dose of
Polygoni Multiflori Radix**

II. 台灣蒲公英及其誤用品之分子鑑定研究

**Studies on Molecular Identification of *Taraxacum
formosanum* and Distinguishing from Its Adulterants**

研究生：江瑩真

Chiang, Ying-Chen

中華民國 一 百 年 七 月

中國醫藥大學藥學院
中國藥學暨中藥資源學系博士學位論文考試

- I. 中藥材何首烏之輻射滅菌劑量研究
II. 台灣蒲公英及其誤用品之分子鑑定研究
I. Studies on the Gamma Radiation Antiseptic Dose of
Polygoni Multiflori Radix
II. Studies on Molecular Identification of *Taraxacum*
formosanum and Distinguishing from Its Adulterants

本論文係 江瑩真 同學於中國醫藥大學藥學院中國藥學暨中藥資源學系完成之博士論文，經考試委員審查及口試合格，特此證明。

論文口試委員審定書

論文口試委員會指導教授

張永勳

委員

鄭可大

周國英

郭悅雄

郭乾麟

主任

郭乾麟

中華民國 100 年 7 月 20 日

目 錄

目錄.....	I
圖目錄.....	VII
表目錄.....	X
縮寫表.....	XII
中文摘要.....	XV
英文摘要.....	XVII
壹、中藥材何首烏之輻射滅菌劑量研究.....	1
第一章 緒論	1
第二章 總論	6
第一節 何首烏之文獻考察	6
一、何首烏之本草考察	6
二、何首烏之植物學考察	9
三、何首烏之化學成分考察.....	15
第二節 輻射滅菌之文獻考察	17
一、輻射的介紹	17
二、中藥輻射滅菌的原理和安全評價	20
三、中藥材的輻射滅菌應用.....	24

四、中藥材及中成藥 ^{60}Co γ 射線輻射滅菌方面的研究.....	40
五、中草藥輻射滅菌申請合法化必備之條件.....	45
第三章 材料與方法	47
第一節 何首烏藥材之滅菌輻射劑量實驗.....	47
一、實驗材料與儀器	47
二、實驗方法.....	48
第二節 何首烏藥材輻射滅菌前後之抗氧化實驗.....	51
一、化學試劑	51
二、實驗儀器	51
三、實驗方法	52
第三節 加馬射線不同劑量照射前後之指標成分變化比較.....	56
一、實驗材料與儀器	56
二、實驗方法	56
第四章 實驗結果	58
第一節 何首烏輻射滅菌前後測定結果.....	58
一、外觀差異	58
二、何首烏輻射滅菌前後微生物之菌數測定結果.....	58
第二節 何首烏藥材之抗氧化實驗.....	60
一、抗氧化活性結果	60

二、抗氧化成分之結果	64
三、不同劑量加馬射線照射前後之指標成分變化比較.....	65
第五章 討論	66
第六章 結論	71
第七章 參考文獻	73



貳、台灣蒲公英及其誤用品之分子鑑定研究.....	84
第一章 緒論	84
第二章 總論	90
第一節 蒲公英之文獻考察	90
一、蒲公英之本草考察	90
二、臺灣蒲公英及其誤混用之植物學考察	95
第二節 分子鑑定之文獻考察	102
一、以分子雜交技術為核心的分子鑑定技術	102
二、以聚合酶連鎖反應技術為核心的分子鑑定技術	102
三、以 DNA 序列比對為核心的分子鑑定.....	103
四、運用基因晶片技術在中草藥分子鑑定研究.....	104
第三章 材料與方法	108
第一節 材料與儀器.....	108
一、實驗材料	108
二、儀器與化學品	108
第二節 實驗方法.....	110
一、台灣蒲公英 ITS 之序列鑑定.....	110
二、恆溫圈環式核酸擴增法鑑定	114
第四章 實驗結果	117

第一節 蒲公英與易混用藥材及市售品之植物形態比較.....	117
一、 蒲公英及其易混用藥材之植物型態比較.....	117
二、 市售品之植物型態比較.....	120
第二節 台灣蒲公英之分子鑑定及其易誤、混用藥材的鑑別..	122
一、 分光光度計測定值估算 DNA 的濃度.....	122
二、 台灣蒲公英及其易誤、混用藥材之 ITS 序列比對.....	122
三、 利用聚合酶連鎖反應鑑別台灣蒲公英正品藥材.....	123
四、 利用聚合酶連鎖反應鑑別市售台灣蒲公英藥材.....	128
第三節 建立恆溫圈環式核酸擴增法(LAMP)快速鑑定台灣蒲 公英藥材.....	129
一、 恆溫圈環式核酸擴增法之引子設計與反應性測試 ...	129
二、 LAMP 引子的專一性測試.....	131
三、 LAMP 引子的靈敏性測試.....	132
四 恆溫圈環式核酸擴增法與 PCR 方法鑑別市售台灣蒲 公英藥材.....	134
第五章 討論	136
第六章 結論	139
第七章 參考文獻	141
附錄一 博士班期間發表之期刊論文.....	151

附錄二	博士班期間參與之壁報論文.....	153
附錄三	發表之期刊論 2 篇.....	157



圖目錄

圖 1-1	游離輻射分類.....	17
圖 1-2	電磁輻射分類.....	18
圖 1-3	何首烏藥材之飲片.....	47
圖 1-4	輻射照射前後之何首烏中藥材照片.....	58
圖 1-5	加馬輻射劑量還原力之試驗比較.....	63
圖 1-6	不同劑量加馬射線照射前後之指標成分 THSG 之含量結果	65
圖 2-1	臺灣蒲公英植物形態圖.....	96
圖 2-2	臺灣蒲公英植物外觀圖.....	96
圖 2-3	西洋蒲公英植物形態圖.....	96
圖 2-4	西洋蒲公英植物及瘦果外觀.....	96
圖 2-5	刀傷草植物形態圖.....	97
圖 2-6	刀傷草花的外觀.....	97
圖 2-7	刀傷草植物外觀.....	97
圖 2-8	黃鶴菜植物形態圖.....	99
圖 2-9	黃鶴菜植物外觀.....	99
圖 2-10	兔兒菜植物形態圖.....	100
圖 2-11	兔兒菜植物外觀.....	100

圖 2-12	紫背草植物外觀.....	101
圖 2-13	LAMP Primer 在特定基因序列上的結合位置.....	106
圖 2-14	LAMP primers design.....	114
圖 2-15	台灣蒲公英植物外觀.....	117
圖 2-16	台灣蒲公英瘦果外觀.....	117
圖 2-17	西洋蒲公英植物外觀.....	118
圖 2-18	西洋蒲公英瘦果外觀.....	118
圖 2-19	兔兒菜植物外觀.....	118
圖 2-20	兔兒菜花外觀.....	118
圖 2-21	黃鵪菜植物外觀.....	118
圖 2-22	黃鵪菜乾燥植物外觀.....	118
圖 2-23	刀傷草乾燥植物外觀.....	119
圖 2-24	刀傷草瘦果外觀.....	119
圖 2-25	紫背草乾燥植物外觀.....	119
圖 2-26	紫背草瘦果外觀.....	119
圖 2-27	十家蒲公英藥材乾品.....	121
圖 2-28	台灣蒲公英引子設計.....	123
圖 2-29	台灣蒲公英引子 PCR 之電泳圖.....	125
圖 2-30	PCR ITS2 建構質體經 <i>EcoRI</i> 水解後之產物電泳圖.....	126

圖 2-31	以 F3-TF 及 B3-TF 引子對不同濃度之台灣蒲公英模版 DNA 進行 PCR 反應的結果.....	127
圖 2-32	十家市售台灣蒲公英樣品之 PCR 結果.....	128
圖 2-33	台灣蒲公英 LAMP 反應產物之檢測.....	130
圖 2-34	台灣蒲公英 LAMP 反應產物之測試.....	131
圖 2-35	台灣蒲公英 LAMP 反應的靈敏性測試.....	132
圖 2-36	以 LAMP 外引子 F3 及 B3 對不同濃度之台灣蒲公英模版 DNA 進行 PCR 反應的結果.....	133
圖 2-37	LAMP 方法鑑定市售蒲公英藥材之真偽.....	134
圖 2-38	PCR 方法鑑定市售蒲公英藥材之真偽.....	135



表目錄

表 1-1	輻射劑量單位表.....	20
表 1-2	射質因素表.....	20
表 1-3	輻照食品的健全性評價及管理上的國際動態.....	24
表 1-4	我國食品輻射照射處理標準.....	26
表 1-5	各國核可草藥照射國家.....	28
表 1-6	美國照射食品合法化項目.....	29
表 1-7	美國 FDA 核可之藥物照射項目.....	30
表 1-8	歐洲核可之藥物照射項目.....	31
表 1-9	中國大陸核可之中藥照射項目及劑量.....	32
表 1-10	台灣規範中藥載菌量要求-中藥碎片劑型之製劑.....	35
表 1-11	台灣規範中藥載菌量要求-中藥濃縮製劑加味逍遙散等 10 個處方含微生物限量.....	35
表 1-12	各國藥典、法規微生物限量標準.....	36
表 1-13	歐洲藥典之草藥微生物限量標準 (cfu/g 或 mL).....	37
表 1-14	英國藥典 (1998)對口服製劑的微生物限量標準(cfu 或 mL)..	37
表 1-15	日本藥典對部份藥品的微生物限量(cfu/或 mL).....	38
表 1-16	各種滅菌法的優劣點表.....	39

表 1-17	何首烏輻射滅菌前後微生物之菌數.....	59
表 1-18	加馬輻射劑量對 TEAC 值比較.....	61
表 1-19	加馬輻射劑量對 DPPH 自由基清除作用 IC ₅₀ 值比較.....	62
表 1-20	總多酚類、總類黃酮及總黃酮醇之含量分析結果.....	64
表 2-1	LAMP primers.....	114
表 2-2	蒲公英市售品收集店家.....	120
表 2-3	DNA 估算的濃度.....	122
表 2-4	LAMP 引子序列表.....	129



縮寫表

縮寫	全文
ABS	absorbance
ABTS	2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulphonic acid
BHT	Butylate hydroxyltoluene
DMACA	p-dimethylaminocinnamaldehyde
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
FRAP	ferric reducing antioxidant power
GSH	glutathione
IC ₅₀	concentration with 50% inhibition
NADPH	nicotinamide adenine diphosphate
PCA	plate count agar
PDA	potato dextrose agar
TCA	trichloroacetic acid
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
THSG	2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside
VRBGA	violet red bile glucose agar

AFLP	Amplified fragment length polymorphisms
AP-PCR	Arbitrarily-primed polymerase chains reaction
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
CMC	Chemistry, Manufacture and Control
DALP	Direct amplification of length polymorphism
DAMD	Directed amplification of minisatellite-region DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid
ETS	external transcription spacer
FDA	Food and Drug Administration
GMP	Good Manufacturing Practices
IGS	internal genetic spacer
ISSR	inter-Simplesequence repeats
ITS	internal transcribed spacer
LAMP	Loop Mediated Isothermal Amplification
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	polymerase chain reaction
PCR-RFLP	Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism

SCAR	Specific sequence characterized amplified region
SRB	Strategy Review Board
WHO	World Health Organization
SSR	Self-sustained sequence replication



中藥材何首烏之輻射滅菌劑量研究

江瑩真

中國醫藥大學 中國藥學暨中藥資源學系

摘 要

本研究目的為探討何首烏中藥材輻射照射滅菌最適條件及分析輻射照射後中藥材抗氧化活性、抗氧化成分及指標成分變化情形，找出達到最佳輻射滅菌效果的最小吸收劑量，建立何首烏中藥材輻射照射滅菌的最適劑量。

何首烏中藥材分別以 2 kGy、4 kGy、6 kGy、8 kGy 和 10 kGy 照射之實驗結果顯示，輻射照射 2 kGy 即可消滅腸內菌，4 kGy 能抑制真菌及酵母菌的生長，在 6 kGy 的輻射照射後黴菌和真菌即完全滅菌；菌數方面，隨著輻射劑量的增加而減少，8 kGy 照射可達到徹底滅菌的效果。

在抗氧化活性實驗及指標成分比較之實驗方面，何首烏藥材分別照射 5 kGy、10 kGy 和 15 kGy 的結果顯示，以照射 5 kGy 有最好的抗氧化活性及最低對 DPPH 自由基清除率達 50% 時的樣品濃度（即 IC_{50} 值）。抗氧化成分實驗結果顯示，所含總多酚類、總類黃酮以照射 5 kGy 為最高，照射 15 kGy 最低，而總黃酮醇之含量並無明顯差異。因此，8 kGy 的輻射照射，可以完全滅菌，可作為何首烏中藥材滅菌最適合之劑量，來延長藥材的架儲期，確保何首烏中藥材的品質。

台灣蒲公英及其誤用品之分子鑑定研究

摘要

藥用植物的基原鑑定是品管的重要環節，本研究藉由比對 GenBank 資料庫上台灣蒲公英與其易混用藥材間的 ITS2 基因序列，找出其中差異較大的區域，作為分子鑑定引子設計的依據。以設計好的一對引子進行台灣蒲公英與其易混用藥材的聚合酶連鎖反應，可擴增到 250 bp 大小的 ITS2 片段反應產物，將產物定序並分析比對 DNA 序列，成功的鑑別出台灣蒲公英與其易混用的 5 種藥材。

此外，運用 DNA 分子標誌，針對台灣蒲公英與其混用藥材之 ITS2 基因組，以引子開拓者 V3 軟體設計一組高特異性的恆溫圈環式核酸擴增法鑑定(LAMP)之引子，並找出其最佳化反應條件、分析方法的靈敏度和特異性檢測，評估台灣蒲公英正品及混用藥材的 LAMP 檢測效果。

本研究設計之 LAMP 引子可專一地於 65°C 的溫度，45 分鐘內放大含台灣蒲公英模板 DNA 的反應溶液，且於核酸濃度 1 pg 下即可進行 LAMP 之反應，其敏感性遠勝過傳統 PCR 法，成功地建立 LAMP 做為台灣蒲公英中藥材基因體鑑別的檢驗系統。

Studies on the Gamma Radiation Antiseptic Dose of Polygoni Multiflori Radix

Ying-Chen Chiang

School of Chinese Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine Resources

China Medical University

Abstract

Gamma radiation is a physical process commonly used for the eradication of microorganisms distributed in food ingredients, medicinal plants and other bioresearches. The aim of this study was to investigate the effect of radiation dosage on the microbial load, chemical compounds and antioxidative characteristics of Polygoni Multiflori Radix (POMU). Ten commercial POMUs were purchased from different herbal markets and treated with 2 kGy, 4 kGy, 6 kGy, 8 kGy and 10 kGy gamma radiation doses to evaluate the microbial burdens of irradiated and unirradiated POMUs.

Our results confirmed that 2 kGy was sufficient for the inactivation of enterobacteria; at 4 kGy, mold and yeast counts were obviously reduced; and at 6 kGy, neither yeasts nor fungi were observed any longer.

The antioxidative effects and major antioxidant components of 0 kGy, 5 kGy, 10 kGy and 15 kGy irradiated POMU samples were also examined. Our results confirmed that 5 kGy irradiated POMU had both the highest

antioxidative activity and lowest value in IC₅₀ of DPPH radical-scavenging activity. The content of total phenols had no statistically significant changes. Therefore gamma irradiation at 8 kGy could be a potential method for decontaminate the microbial load of POMU to prolong shelf life and to improve hygienic quality.



Studies on Molecular Identification of *Taraxacum formosanum* and Distinguishing from Its Adulterants

Abstract

Original identification of medicinal plants is important for quality control. In this study, the internal transcribed spacer 2 (ITS2) nuclear ribosomal DNA served as a DNA barcode and was amplified by allele-specific sequence-primed PCR; this approach was exploited to differentiate *Taraxacum formosanum* from five related adulterants. Using a set of designed PCR primers, a highly specific 250 bp PCR product of *Taraxacum formosanum* was successfully amplified by PCR. However, no product was amplified from any of the adulterants. This indicates that our allele specific primers have high specificity and can accurately discriminate *Taraxacum formosanum* from other 5 adulterant plants.

We also established a rapid, sensitive and specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for authenticating *Taraxacum formosanum*. A set of four specific LAMP primers was designed based on the nucleotide sequence of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) nuclear ribosomal DNA (nrDNA) of *TF*. LAMP amplicons were successfully amplified and detected when genomic of *TF* was added in the LAMP reaction under

isothermal condition (65°C) within 45 min. This specific LAMP primers have high specificity and can accurately discriminate *Taraxacum formosanum* from other adulterant plants; 1 pg of genomic DNA was determined to be the minimum concentration limit of the LAMP assay.



壹、中藥材何首烏之輻射滅菌劑量研究

第一章 緒論

台灣中藥材多產自中國大陸，輸入臺灣後，經加工或其他處理再轉銷國內、日本、韓國、東南亞、歐美各地⁽¹⁾。藥材一般含有大量的細菌，真菌和導致有機體損壞的物質⁽²⁾，常見的細菌是有氧孢子形成菌，例如桿菌和沙門氏菌等種類⁽³⁻⁵⁾，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⁽⁶⁾。

滅菌主要使用的方法有三種：蒸氣滅菌、藥物燻蒸（氧化乙烯和丙烯氧化物）和輻射滅菌⁽⁷⁾，然而，蒸汽滅菌過程會破壞葉類藥材，應用於根莖類藥材時常無法達到滅菌效果⁽⁷⁻¹⁰⁾；至於燻蒸氧化乙烯氣體的滅菌方法業已在歐盟和許多其他國家被禁用⁽¹¹⁾。因為氧化乙烯後的禁用，3 到 10 kGy 劑量之輻射滅菌陸續被證明能夠達到藥材滅菌的品質標準^(2, 12-14)。

輻射滅菌具有下列優點：

- (1) 輻射滅菌徹底，無污染和殘毒，也不會產生放射性殘留。
- (2) 輻射滅菌在常溫下進行，即「冷滅菌」，較不影響中藥成分。
- (3) 產品可以在包裝後輻射滅菌，沒有二次染菌問題，只要包裝不透菌，

可以長期保證品質。

(4) 適合量化連續作業，節約能源，成本低廉⁽⁶⁾。

鑑於中國大陸在中藥材品質控制上，一直未建立有效制度，故有蟲蛀、發霉等問題，而世界各國對藥材安全衛生的要求，日益提升，故問題值得關切。世界許多先進國家已合法使用輻射照射來處理藥草(herb)，臺灣目前在食品照射合法化上已有多項公告，但至今尚無中藥草照射合法之公告項目⁽¹⁾。

由於國內大眾生活品質與醫療品質的日益提昇，臺灣在中西醫治療人口比例上，約有五分之一的病患選擇中醫為其治病方法，政府對中醫診所及科學中藥已有健保給付，人們對中草藥的品質亦有更高的要求，加上近年來健康食品市場的蓬勃發展，其市場規模不論在國內、國外都已超出藥品市場很多，故中草藥的開發及品質的提昇，能即時滿足並供應國內外市場為目前相當重要的任務，輻射滅菌若能合法化則對中草藥品質的提升與開發將有其必要性及迫切性⁽¹⁾。

行政院衛生署中醫藥委員會八十八年度起即開始探討中藥輻射滅菌之可行性評估，委託清華大學、原子能委員會核能研究所等進行中藥輻射滅菌相關的研究，並於 1999 年 1 月 22 日假桃園龍潭原子能委員會核能研究所舉辦「原子能科技於中醫藥研討會」，討論中藥輻射滅菌相關之主題；國立清華大學周鳳英教授、原子能委員會核能研究陳家杰博士、中台醫護技

術學院姚俊旭教授、財團法人製藥工業技術發展中心吳孝芸博士、國立宜蘭大學馮臨惠教授等亦先後進行劑輻射滅菌劑量、輻射滅菌對中藥材貯存條件、療效指標成分、品質及包裝材料性質之影響進行研究。

歷年來，國立清華大學周鳳英教授已完成 48 種常用中藥材及 5 種中藥方劑輻射滅菌劑量之評估^(15,16)；姚俊旭教授評估 48 種藥材之無菌劑量研究^(17,18)；陳家杰博士評估 4 種中藥材研究⁽¹⁹⁾；吳孝芸博士評估 3 種中藥材之適當包裝方式⁽²⁰⁾ 等，行政院衛生署中醫藥委員會將歷年來進行中藥材輻射滅菌及品質之評估成果，舉辦產官學專家會議及多場次的宣導，希望藉此取得共識，研訂我國中藥材輻射滅菌法規，確保中藥的衛生安全，使中藥材輻射滅菌有法規可供遵循，解決微生物污染之問題，得以提高中藥之品質，確保民眾使用中藥的安全。

輻射照射已是國內外許多國家通行的草藥等食品處理法，輻射滅菌是歐美日中各國正式的藥物滅菌方法，且都已編入藥典中，並與蒸氣高壓滅菌法、毒氣滅菌法等並列⁽¹⁻²¹⁾，美英等國已有抗生素、眼藥膏等藥品利用輻射滅菌法消毒；中國大陸 20 世紀 70 年代中期由國家科委組織科研、教學、生產和檢驗等部門進行 ^{60}Co 輻射滅菌中藥的實驗研究，也於 1997 年發佈「 60 鈷輻照中藥滅菌劑量標準」(內部試行)的通知⁽²²⁾，對中藥成品及原料進行品管的照射殺蟲滅菌處理，而國內西藥方面已有多家使用輻射滅菌法來消毒抗生素、眼藥膏等，可知輻射滅菌在國內外的使用相當普遍。

大陸目前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、新竹的核能研究所和清華大學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⁽⁶⁾。

大量的研究報導顯示，⁶⁰Co- γ 射線輻射滅菌是安全、可靠、高效滅菌的一種有效方法，但對具體品種達到滅菌效果的吸收劑量還需要進一步進行實驗研究；本實驗選取中國大陸亦尚未核可的中藥材何首烏項目，進行不同劑量照射，探討其輻射達到滅菌效果的吸收劑量及輻射前後對抗氧化效果及成分的分析，找出達到最佳輻射滅菌效果的最小吸收劑量，建立何首烏中藥材輻射照射滅菌的最適劑量。

何首烏中藥材分別以2 kGy、4 kGy、6 kGy、8 kGy和10 kGy照射之實驗結果顯示，輻射照射2 kGy即可消滅腸內菌，4 kGy能抑制真菌及酵母菌的生長，6 kGy黴菌和真菌即完全滅菌，8 kGy照射可達到徹底滅菌的效果。

在抗氧化活性及成分實驗及指標成分比較之實驗方面，何首烏藥材分別照射5 kGy、10 kGy和15 kGy的結果顯示，以照射5 kGy有最好的抗氧化活性及最低劑量對DPPH自由基清除率達50%時的樣品濃度（即IC₅₀值）。抗氧化成分實驗結果顯示，所含總多酚類、總類黃酮以照射5 kGy為最高，照射15 kGy最低，而總黃酮醇之含量並無明顯差異。在利用高效液相層析方法中，以2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG)作為指標成分

比較，輻射照射過之含量變化隨著輻射劑量增加其含量降低。



第二章 總論

第一節 何首烏之文獻考察

一、何首烏之本草考察

何首烏 *Polygoni Multiflori Radix* (Fleeceflower Root)，為蓼科植物何首烏 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的乾燥塊根⁽²³⁾。始載於《日華子》，如《證類本草》引《日華子》：「味甘。久服令人有子。治腹藏宿疾，一切冷氣及腸風。此藥有雌雄。雄者苗葉黃白，雌者赤黃色。凡修合藥須雌雄相合吃，有驗。其藥本草無名，因何首烏見藤夜交，便即採食有功，因以採人為名耳⁽²⁴⁾。」

「何首烏」作為本品正名始載於《開寶本草》，如《證類本草》引《開寶本草》曰：「何首烏，味苦、澀，微溫，無毒。主瘰癧，消癰腫，療頭面風瘡，五痔，止心痛，益血氣，黑髭鬚，悅顏色。久服長筋骨，益精髓，延年不老⁽²⁴⁾。」其後本草大多即沿用《開寶本草》記載，以「何首烏」為正名，如宋，蘇頌《本草圖經》⁽²⁵⁾、唐慎微《證類本草》⁽²⁴⁾、寇宗奭《本草衍義》⁽²⁶⁾；元，忽思慧《飲膳正要》⁽²⁷⁾；明，蘭茂《滇南本草》⁽²⁸⁾、劉文泰《本草品匯精要》⁽²⁹⁾、陳嘉謨《本草蒙筌》⁽³⁰⁾、李時珍《本草綱目》⁽³¹⁾、杜文燮《藥鑑》⁽³²⁾、繆希雍《炮炙大法》⁽³³⁾、李中梓《雷公炮製藥性解》⁽³⁴⁾、李中梓《本草征要》⁽³⁵⁾、盧之頤《本草乘雅半偈》⁽³⁶⁾、陳士鐸《本草新編》

(37)；清，稻宣義《炮炙全書》⁽³⁸⁾、汪昂《本草易讀》⁽³⁹⁾、汪昂《本草備要》⁽⁴⁰⁾、張璐《本經逢原》⁽⁴¹⁾、葉桂《本草經解》⁽⁴²⁾、陳念祖《神農本草經讀》⁽⁴³⁾、姚瀾《本草分經》⁽⁴⁴⁾、楊時泰《本草述鈞元》⁽⁴⁵⁾、蔣居祉《本草擇要綱目》⁽⁴⁶⁾、嚴西亭《得配本草》⁽⁴⁷⁾、凌奐《本草害利》⁽⁴⁸⁾、陳其瑞《本草撮要》⁽⁴⁹⁾、張秉成《本草便讀》⁽⁵⁰⁾、周岩《本草思辨錄》⁽⁵¹⁾等皆以「何首烏」為正名。

此外，宋，佚名《增廣太平和劑圖經本草藥性總論》⁽⁵²⁾；清，沈金鰲《要藥分劑》⁽⁵³⁾等也以「何首烏」為正名記載本品。

古代著作記載的本品異名尚有「野苗」、「交藤」、「夜合」、「地精」、「首烏」《何首烏傳》⁽³¹⁾，「陳知白」《開寶本草》⁽²⁴⁾，「桃柳藤」《日華子》⁽²⁴⁾，「紅內消」《外科精要》⁽³¹⁾，「赤葛」、「九真藤」《門門方》⁽³¹⁾，「馬肝石」、「瘡帚」、「山奴」、「山哥」、「山伯」、「山翁」、「山精」《本草綱目》⁽³¹⁾。

《開寶本草》⁽²⁴⁾：主瘰，消癰腫，療頭面風瘡，治五痔，止心痛，益血氣，悅顏色，久服長筋骨，益精髓，延年不老；亦治婦人產後及帶下諸疾。」

《本草綱目》⁽³¹⁾：此物氣溫味苦澀，苦補腎，溫補肝，澀能收斂精氣，所以能養血益肝，固精益腎，健筋骨，烏髮，為滋補良藥。不寒不燥，功在地黃、天門冬諸藥之上。

《本草衍義》⁽²⁶⁾：何首烏……與蘿蔔相惡，令人髭髮早白。

《中華本草》⁽⁵⁴⁾：

〔原植物〕多年生纏繞藤本。根細長，末端成肥大的塊根，外表紅褐色至暗褐色；莖基部略呈木質，中空。葉互生，具長柄，托葉鞘膜質，褐色，葉片狹卵形或心形，長4-8 cm，寬2.5-5 cm，先端漸尖，基部心型或箭形，全緣或微帶波狀，上面深綠色，下面淺綠色，兩面均光滑無毛。圓錐花序。小花梗具節，基部具膜質苞片；花小，花被綠白色，5裂，大小不等；雄蕊8，雌蕊1；瘦果橢圓形，有3棱，黑色，光亮。花期8-10月，果期9-11月。

生於草坡、路旁、山坡石隙及灌木叢中。分布於華中、中南及河北、山西、陝西、甘肅、台灣、四川、貴州、雲南等地。

〔採收加工〕在秋季落葉後或早春萌發前採挖。除去藤莖，將根挖出，洗淨泥土，大的切成2 cm左右的厚片，小的不切，曬乾或烘乾即成。

〔藥材鑑別〕性狀鑑別：塊根紡錘形或團塊狀，一般略彎曲；長5-15 cm，直徑4-10 cm；表面紅棕色或紅褐色，凹凸不平；質堅硬，不易折斷，斷面淡黃棕色或淡紅棕色，粉性，皮部有類圓形的異形維管束作環狀排列，形成「雲錦花紋」，中央木部較大，有的成木心。氣微，味苦而甘澀。

〔功能與主治〕養血滋陰，潤腸通便，截瘧，祛風，解毒。主治血虛頭昏目眩、心悸、失眠，肝腎陰虛之腰膝痠軟、髮鬚早白、耳鳴、遺精、腸燥便秘，久瘧體虛，風疹搔癢，瘡癰，痔瘡。

二、何首烏之植物學考察

1998 版的《中國植物誌》⁽⁵⁵⁾將何首烏定為何首烏屬，而一般文獻大多將其定為蓼屬，中華中藥典及中華人民共和國藥典何首烏的基原仍為 *Polygonum multiflorum* Thunb.^(21,23)

蓼科 Polygonaceae⁽⁵⁶⁾

蓼科全世界約 50 屬 1150 種，主產於北溫帶。大陸原產及引種的約有 13 屬 235 種 37 變種，全國均有分布。

草本，有時亞灌木或稍木質藤本，經常於節部膨大，葉互生、對生或輪生，單葉，全緣；托葉常膜質，鞘狀或葉狀，包莖或貫莖；花小，通常兩性，有時單性，排成穗狀、總狀或頭狀等各式聚繖花序；花被片 3-5，整齊複瓦狀排列成一輪或二輪，或 6 片重複瓦狀排列，分離或合生，宿存；雄蕊多為 6-9，與花被片對生，花盤環狀分裂成圓形；子房上位，具 2-4 (多為 3) 心皮，1 室，兩側壓扁或三棱形，花柱 2-4，分離或基部合生，柱頭增大或頭狀或裂為絲狀或流蘇狀，胚珠 1，直生於基部。瘦果雙凸鏡形，三棱形或近圓形，全部或部分包藏於宿存的花萼內。

《中國植物誌》⁽⁵⁵⁾將何首烏定為何首烏屬，而一般文獻大多將其定為蓼屬廣義蓼屬，包括何首烏(*Polygonum multiflorum* Thunb.)、虎杖、蕎麥等等；1998 版的《中國植物誌》將何首烏、虎杖、蕎麥獨立成屬，即何首烏

屬、虎杖屬和蕎麥屬。根據 1998 版《中國植物誌》採用的系統，以花被片的排列分為 2 個亞科，蓼亞科 Polygonideae (花被片不排成 2 輪)和酸模亞科 Rumicoideae (花被片排成 2 輪)。蓼亞科含 13 屬，如：蓼屬 *Polygonum* L.，何首烏屬 *Fallopia* Adans.，虎杖屬 *Reynoutria* Houtt.，金錢草屬 *Antenoron* Rafin.，參麥屬 *Fagopyrum* Mill.等。酸模亞科含 3 屬，如大黃屬 *Rheum* L.，酸模屬 *Rumex* L.等。

常見的屬檢索表⁽⁵⁶⁾

1.花被片 5

2.花被片果時不增大

3.瘦果具 3 稜，明顯比宿存花被長..... 蕎麥 *Fagopyrum* Mill.

3.瘦果具 3 稜或雙凸鏡狀，比宿存花被短..... 蓼屬 *Polygonum* L.

2.花被片果時增大

4.花柱 2 果時伸長，硬化，頂端鈎狀..... 金錢草屬 *Antenoron* Rafin.

4.花柱 3，

5.莖纏繞，花兩性，柱頭頭狀..... 何首烏屬 *Fallopia* Adans.

5.莖直立，花單性，柱頭流蘇狀..... 虎杖屬 *Reynoutria* Houtt.

1.花被片 6

6.瘦果具翅，柱頭頭狀或近頭狀..... 大黃屬 *Rheum* L.

6.瘦果無翅，柱頭畫筆狀..... 酸模屬 *Rumex* L.

首烏屬⁽⁵⁷⁾ *Fallopia* Adanson

一年生草本，很少半灌木。莖纏繞。單葉，互生，具葉柄；葉片卵形或心形，邊緣全緣；托葉鞘管狀，先端偏斜或截形。花序總狀的或圓錐狀。花兩性，花被宿存，5深裂；外部3花被片更大，龍骨狀的或具翅。雄蕊8。花柱極短；柱頭頭狀 瘦果三棱，卵圓形。

分種檢索表⁽⁵⁵⁾

1. 一年生草本；花序總狀。

2. 花被片外面3片背部具龍骨狀突起或狹翅，果時稍增大.....

..... 1. 卷莖蓼 *F. convolvulus* (L.)

2. 花被片外面3片背部具翅，果時增大。

3. 花被片的翅邊緣具齒，瘦果密被小顆粒，微有光澤.....

..... 2. 齒翅蓼 *F. dentato-alata* (F. Schm.) Holub

3. 花被片的翅邊緣全緣，瘦果密被小顆粒平滑，有光澤。

4. 花梗中下部具關節，花排列緊密... 3a 篙蓼 *F. dumetorum* (L.) Holub

4. 花梗中下部具關節，花排列稀疏.....

3b 疏花篙蓼 *F. dumetorum* (L.) Holub var. *pauciflora* (Maxim) A.J.Li

1. 多年生草本或半灌木；花序圓錐狀。

5. 半灌木；葉通常簇生..... 4 木藤蓼 *F. aubertii* (L. Henry) Holub

5. 多年生草本；葉單生。

6.花被片外面3片背部具翅，果時增大。

7.葉下面無小突起.....

.....5a 何首烏 *F. multiflora* (Thunb.) Harald. var. *multiflora*

7.葉下面沿葉脈具小突起.....

5b 毛脉蓼 *F. multiflora* (Thunb.) Harald. var. *ciliinerve* (Nakai) A. J. Li

6.花被片背部具無翅，果時不增大。

8.莖無毛，疏生小突起；葉卵狀三角形；邊緣具淺波狀齒或近全緣，

花被片長3-4 mm.....6.齒葉蓼 *F. denticulate* (Huang) A. J. Li

8.莖密被褐色短柔毛及稀疏的倒生長硬毛；葉寬心形，葉邊全緣；花

被片長1.5-2 mm。

9.葉下面密被褐色長柔毛.....

.....7a.牛皮消蓼 *F. cynanchoides* (Hemsl.) Harald. var. *cynanahoides*

9.葉下面沿葉脈被短糙伏毛或無毛.....

7b.光葉牛皮消蓼 *F. cynanchoides* (Hemsl.) Harald. var. *glabriuscula*

(A. J. Li) A. J. Li

何首烏 *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald⁽⁵⁵⁾

Fallopia multiflora (Thunb.) Harald in Symb. Bot. Upsl. 22(2): 77. 1978. -

Polygonum muliiflorum Thunb. Fl. Jap. 169. 1784; Forb. et Hemsl. in Journ.

Linn. Soc. Bot. 26: 342.1891; Stew. in Contr. Gray Herb. 88: 96. 1930: Kung in

Fl. Ill. N. Chine 5: 57. Pl. 24. 1936; 秦嶺植物志 1(2): 156. 1974; 湖北植物志 1: 246. 1976. - *P. hypoleucum* Ohwi in Acta Phytotax. Geobot. 7: 130. 1938. - *P. multiflorum* Thunb var. *hypoleucum*(Ohwi) Liu et al. in Fl. Taiwan 2: 274. 1976. syn. nov. - *P. multiflorum* Thunb. var. *angulatum* S. Y. Liu in Acta Bot. Yunnan. 13(4): 390. 1991. syn. nov. - *Pleuropterus cordatus* Turcz. in Bull. Soc. Nat. Mosc. 21: 587. 1848.

何首烏(原變種) *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald⁽⁵⁵⁾

多年生草本，塊根肥厚，長橢圓形，黑褐色。莖纏繞，長 2-4 m，多分枝，具縱稜，無毛，微粗糙，下部木質化。葉卵形或長卵形，長 3-97 cm，寬 2-5 cm，頂端漸尖，基部心形或近心形，兩面粗糙，邊緣全緣，葉柄長 1.5-3 cm；托葉鞘膜質，偏斜，無毛，長 3-5 cm。花序圓錐狀，頂生或腋生，長 10-20 mm，分枝開展，具細縱稜，沿稜密被小突起；苞片三角狀卵形，具小突起，頂端尖，每苞片具 2-4 花；花梗細弱，長 2-3 cm，下部具關節，果時延長；花被 5 深裂，白色或淡綠色，花被片橢圓形，大小不相等，外面三片較大背部具翅，果時增大，花被果時外形近圓形，直徑 6-7 cm；雄蕊 8，花絲下部較寬；花柱 3，極短，柱頭頭狀。瘦果卵形，具 3 稜，長 2.5-3 cm，黑褐色，有光澤，包與宿存花被內。花期 8-9 月，果期 9-10 月。

產陝西南部、甘肅南部、華東、華中、華南、四川、雲南及貴州。生山谷灌處，山坡林下，溝邊石隙，海拔 200-3000 m，日本也有。

塊根入藥，安神、養血、活絡。

產於台灣的台灣何首烏 *Polygonum mutliflora* Thunb. var. *hypoleucum* (Ohwi) Liu et al. 的台灣標本，其花被果實增大，直徑 5-6 cm；葉片長圓狀卵形等，這些特徵與產於大陸的何首烏 *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald. 十分相似，故合併⁽⁵⁵⁾。



三、何首烏之化學成分考察⁽⁵⁸⁻⁶⁵⁾

(一)、蒽醌類成分：蒽醌衍生物約 1.1%。

含有大黃酚(chrysophanol)、大黃酚蒽酮(chrysophanol anthrone)、大黃酸(rhein)、大黃素(emadin)、大黃素甲醚(physcion)、大黃素-1,6-二甲醚(emadin-1,6-dimethylether)、大黃素-8-甲醚(questin)、 ω -羥基大黃素(citreorosein)、 ω -羥基大黃素-8-甲醚(questinol)、2-乙酰基大黃素(2-acetylemadin)、大黃素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(emadin-8-*O*- β -D-glucopyranoside)、大黃素甲醚-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(physcion-8-*O*- β -D-glucopyranoside)、大黃酚-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(chrysophanol-8-*O*- β -D-glucopyranoside)、2-甲氧基-6-乙酰基-7-甲基胡桃醌(2-methoxy-6-acetyl-7-methyljuglone)、大黃素甲醚-8-*O*- β -D-葡糖苷、大黃素-8-*O*- β -D-葡糖苷、決明蒽酮-8-*O*- β -D-葡糖苷。其中大黃酚、大黃素最多，其次為大黃酸、大黃素甲醚等。

(二)、黃酮類成分：

含首蓿素(tricin)、槲皮素-3-*O*-半乳糖苷(quercetin-3-*O*-galactoside)、槲皮素-3-*O*-阿拉伯糖苷(quercetin-3-*O*-arabinoside)。

(三)、酰胺類成分：

含穆坪馬兜鈴酰胺(N-trans-feruloyltyramine)、N-反式阿魏酰基-3-甲基多巴胺(N-trans-feruloyl-3-methyldopamine)。

(四)、葡萄糖苷類成分：

含 2,3,5,4'-四羥基二苯乙烯-2-*O*- β -D 葡萄糖苷(2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-*O*- β -D-glucoside 含量 1.2%，為主要水溶性成分)、2,3,5,4'-四羥基-二苯乙烯-2,3-二-*O*- β -D 葡萄糖甙，即何首烏丙素(polygonimitin C)、1,3-二羥基-6,7-二甲基酮-1-*O*- β -D-葡萄糖甙，即何首烏乙素(polygonimitin B)、2,3,4,6-四羥基乙酰苯酮-3-*O*- β -D-葡萄糖甙(2,3,4,6-Tetrahydroxyacetophenone--3-*O*- β -D-glucoside)、2,3,5,4'-四羥基二苯乙烯-2-*O*-(2'-*O*-乙醯基)- β -D-葡萄糖苷、6-甲氧基-2-乙醯基-3-甲基-1,4-萘醌-8-*O*- β -D-葡萄糖苷。

(五)、其他成分：

含 β -谷甾醇(β -sitosterol)、胡蘿蔔苷、沒食子酸及微量元素 Zn、Mn、Cu、Fe、Mg、Si、Ni、V、Al、Co、Sr、Cr、Ti、Ba、Ca、Pb、K、Na。含鐵量是補血藥中最高者，含鋅量高於 48 種補血藥中含鋅量的平均值。此外，含兒茶精、表兒茶精、3-*O*-沒食子醯兒茶精、3-*O*-沒食子表兒茶精、3-*O*-沒食子醯原矢車菊苷元 B₁(3-*O*-galloyl procyanidine-B₁)及 3,3'-*O*-雙沒食子醯原矢車菊苷元-B₂(3,3'-*O*-digalloyl procyanidine-B₂)，並含遊離氨基酸類化合物。含卵磷脂(Lecithin)約 3.7%，粗脂肪 3.14%，總氮 1.05%，澱粉 45.15%，鞣質、礦物質等。

第二節 輻射滅菌之文獻考察

一、輻射的介紹

輻射，是一種能量，以電磁波如加馬(γ)射線等及高速粒子(如電子等)的形態傳送；依能量的高低或游離物質的能力，分成非游離輻射和游離輻射兩大類：

非游離輻射係指能量低無法產生游離的輻射，例如太陽光、燈光、紅外線、微波、無線電波和雷達波等。

游離輻射係指能量高，能使物質產生游離作用的輻射。

游離輻射又區分為二：(1)電磁波輻射，(2)粒子輻射。

一般所謂的輻射或放射線，都是指游離輻射而言⁽⁶⁶⁾。

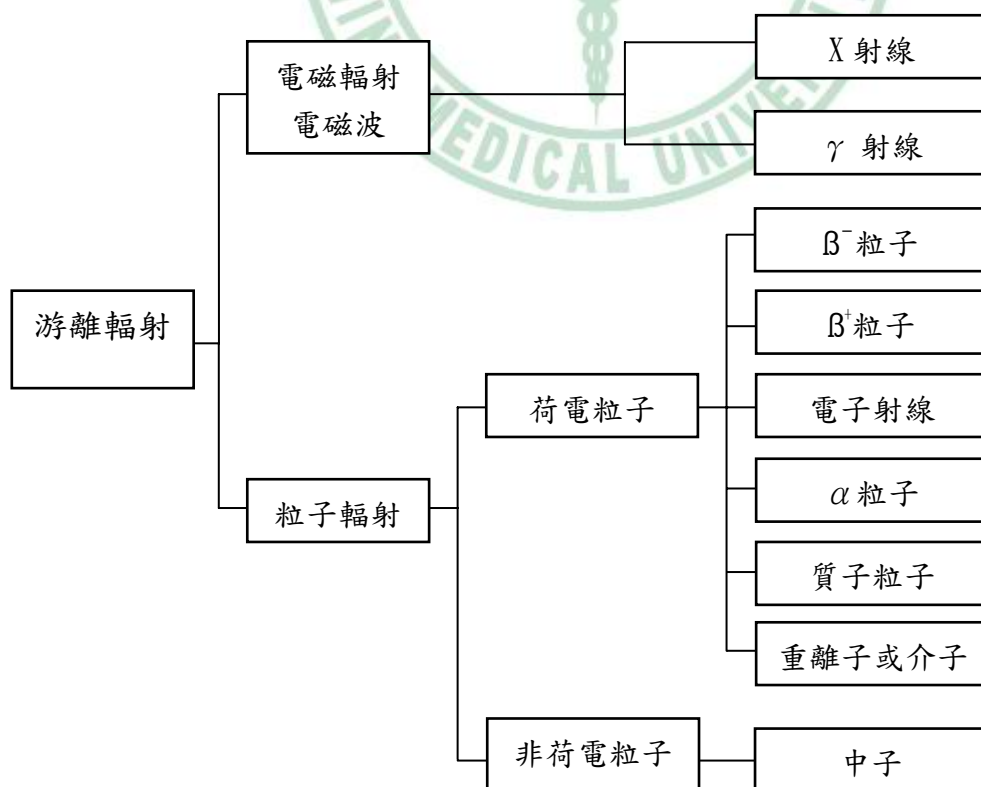


圖 1-1 游離輻射分類⁽⁶⁷⁾

電磁輻射依據波長、波數，或是頻率分成好幾類：

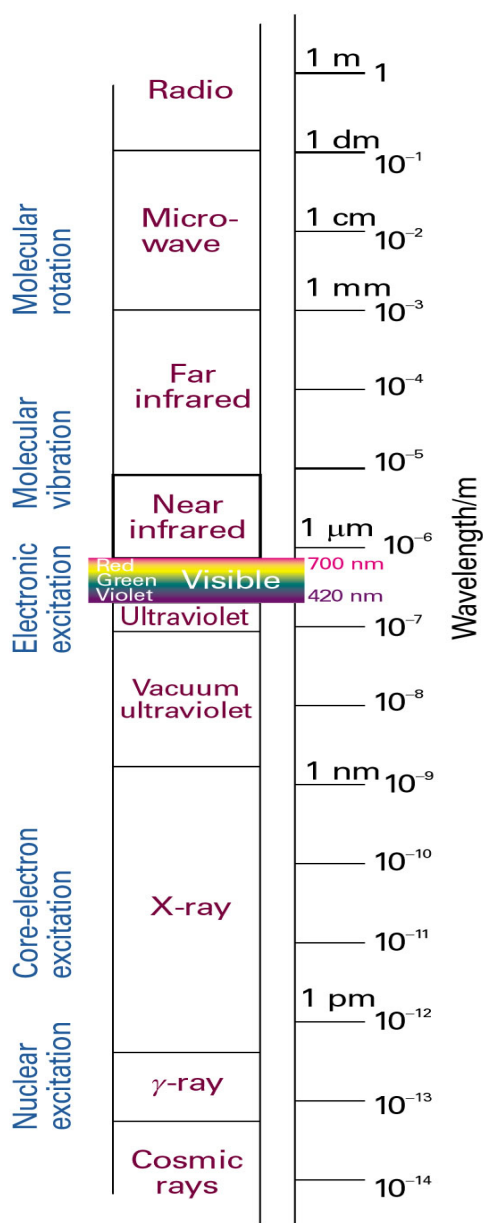


圖 1-2 電磁輻射分類⁽⁶⁸⁾

輻射能廣泛應用在醫學和工業方面。例如使用 X 光射線於內科和牙科方面來診斷骨折和蛀牙已超過五十年的歷史；應用於癌症治療，使用調整過焦點的輻射線來殺死癌細胞並可避免對鄰近的健康細胞造成太大傷害；亦可經由注射放射性同位素進入體內及應用電腦輻射偵檢造影器，來診斷無法以 X 光直接清晰透視的內臟組織。醫學器材也應用輻射來消毒，例如

針筒消毒，由於一般高溫的消毒會把藥膏和繃帶的品質破壞，而輻射本身不具高熱，因此輻射消毒滅菌，有廣泛應用之趨勢。

放射照相術在工業上的應用技術可用於檢視金屬鑄件或焊接部位的間隙及缺陷，這些隙縫或缺陷通常很難使用其他方法偵測出來，亦可用於度量極微小的厚度，如金屬薄片；此外，放射照相術亦可用於檢視建築物或雕像的結構缺陷。

輻射其他之應用，如藝術品鑑定及食物保存方面，利用輻射照射保存食物既不會降低食物原有的天然養分，並且也不會含有放射性。考古學家亦可利用碳-14 的放射衰變計算出史前時期古物的正確時間⁽⁶⁹⁾。

有關輻射劑量的單位如下：

1. 輻射強度的單位：Becquerel (貝克 Bq) 或 Curie (居里 Ci) 表示，一秒鐘衰變一個原子核時的輻射強度稱為 1 貝克。 $3.7 \times 10^{10} \text{ Bq} = 1 \text{ 居里}$ 。
2. 物質吸收的輻射劑量單位：物質一公斤吸收 1 焦耳能量的輻射線時稱為 1 葛雷。 $100 \text{ 雷得} = 1 \text{ 葛雷}$ 。Gray (葛雷) 或 rad (雷得) (表 1-1)
3. 對生物體的影響測定的輻射等效劑量單位：Sievert (西弗) 或 rem (倫目)
西弗是考慮對生物體的影響測定的輻射等效劑量單位。當人體是輻射的吸收對象時，等效劑量是倫目， $100 \text{ 倫目} = 1 \text{ 西弗}$ 。
計算式：雷得 \times 射質因素(表 1-2)=倫目。

表 1-1 輻射劑量單位表

單位	說明
貝克·居里	輻射強度，1 居里=370 億貝克 (3.7×10^{10})
葛雷·雷得	吸收劑量，物質吸收的輻射能量，1 葛雷=100 雷得 雷得×射質因素=侖目。
西弗·侖目	對生物體影響的輻射等效劑量，1 西弗=100 侖目

表 1-2 射質因素表

種類	性質	射質因素
α 射線	氦原子核的流動，帶正電	20
β 射線	電子的流動，帶負電	1
X、 γ 射線	光的一種，穿透能力強的電磁波	1
中子射線	中子的流動，不帶電	10
質子射線	質子的流動，帶正電	

二、中藥輻射滅菌的原理和安全評價^(70,71)

(一)、中藥 \square 射線輻射滅菌的原理

1. 電離輻射：能直接或間接通過初級或次級過程而使物質產生電離效應。

輻射源主要是電子加速器產生的高能電子束，放射性同位素 ^{60}Co 或

^{137}Cs 放射出的 \square 射線，電子束能量在 0.5-6 MeV，不會使被照射物產

生放射性；中藥輻射滅菌大多數採用 ^{60}Co - γ 射線，因此不會產生放射性物質與放射線殘留，為目前最安全的滅菌消毒法。

2. ^{60}Co - γ 射線輻射滅菌的生物學過程：高能射線照射物質後會引起物質中的微生物、昆蟲等發生一系列物理、化學和生物效應，來達到殺蟲、滅菌的效果。其相互作用過程大致分為5個階段：物理階段、物理化學階段、化學階段、生物化學階段、生物學階段。利用輻射的生物學效應，破壞生物體的DNA，微生物、害蟲等因生理活動遭到改變而死亡，就可以達到抑制發芽、延緩生理過程、滅菌、殺蟲和防黴等目的。
3. 輻射照射劑量與效應的關係：輻射滅菌劑量由中藥所含的細菌種類、初始染菌數、微生物的輻射敏感性以及輻照環境條件決定。實際應用中常用將存活的微生物降低到十分之一時所需要的劑量，即 LD_{90} 值。如果需要輻射照射的中藥產品初始染菌數為 N_0 ，照射後要求達到的細菌數為 N ，則所需要的輻照劑量 $D = K D_{10} \lg N_0 / N$ ， K 值由經驗得出。

(二)、中藥輻射滅菌的安全性評價

中藥輻射滅菌一般使用密封型 ^{60}Co - γ 輻射裝置，對被照射的物質，只會引起瞬間的游離反應，進而由正負離子作用產生自由基，自由基再和生物化學物質反應，而破壞細胞內生物之生命化學物質，達到殺蟲滅菌目的。被照射物不接觸放射性核素，不會沾上放射性物質。研究證明，要使組成食品的基本元素，碳、氧、氮、磷、硫等發生核反應需一定的

臨界能，最低的鈹-9為1.67 MeV，最高的碳-12為18.8 MeV⁽⁷⁰⁾。而⁶⁰Co- γ 射線的能量為1.33、1.17 MeV，不同於高能量放射線（高於12 MeV）會引起核反應，故不會使被照射物產生具放射線性質的功用，所以被照射物不會因被照射而變成帶有輻射線⁽⁷¹⁾。

中藥輻照滅菌已經成為食品和藥品生產過程中必不可少的程序。中華人民共和國藥典2005年版中增加輻照滅菌的內容。在美國、英國和歐盟國家都允許輻照中藥，美國已寫入藥典。德國原來在輻照食品方面比較保守，但是隨著歐盟的成立也只好承認輻照食品。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。

聯合國糧農組織(FAO)、國際原子能機構(IAEA)和世界衛生組織(WHO)多次召開國際輻照食品科學討論會，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，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。」

大陸 20 世紀 70 年代中期由國家科學委員會組成科研、教學、生產和檢驗等部門進行 ⁶⁰Co 輻照滅菌中藥的實驗研究。1997 年衛生部為加強中藥品質管理工作，發佈了《⁶⁰Co 輻照滅菌標準⁽²²⁾》。標準內容包含：
1.適用範圍 2.標準制定依據 3.輻照裝置應具備的條件 4.待輻照中藥應

具備的條件 5.輻照滅菌劑量 6.注意事項；標準之適用範圍包含中藥固體製劑和中藥原料粉，中藥輻照滅菌時的最大吸收劑量應不大於下列數值：散劑：3 kGy；片劑：3 kGy；丸劑：5 kGy；中藥原料粉：6 kGy。允許輻照藥材品種共有艾葉等 198 項，允許低劑量（3kGy）輻照藥材品種共有紫菀等 5 項，不允許輻照藥材品種為秦艽和龍膽 2 項；允許輻照中成藥品種共有安宮牛黃丸等 70 項。含有紫菀、錦燈籠、乳香、天竺黃和補骨脂一種以上（含一種）藥材的中藥輻照滅菌時，最大吸收劑量不得超過 3 kGy，含龍膽苦甙的藥材如秦艽、龍膽及其制品不得輻照滅菌。

國外照射廠對草藥的照射，已是例行工作之一，美、澳及歐洲各國也時常從大陸、東亞進口藥材後，直接在該國照射廠進行照射。IAEA，FAO 及 WHO 等組織收集了全世界之研究數據後，在 1980 年宣布 10 kGy 以下的照射殺蟲滅菌，所有食物不會產生毒性，無安全顧慮，不需進行動物安全實驗。IAEA，FAO 及 WHO 等組織在 1997 年開了一個食物照射檢討會(Geneva，15-20 September 1997)，對照射劑量至 75 kGy 結論依舊是安全的，此次會議結論指出食物照射在安全上沒有劑量上限。

輻照食品的健全性評價及管理上的國際動態列表如下：

表1-3 輻照食品的健全性評價及管理上的國際動態

西元	會議名稱	目的	地點
1961	輻照食品的健全性及食品照射管理國際會議	提出了進行輻照食品健全性評價的必要性	布魯塞爾
1964	FAO/IAEA/WHO 輻照食品管理技術標準聯合專家委員會	討論輻照食品健全性評價方法、食品添加物的處理	羅馬
1969	FAO/IAEA/WHO 輻照食品健全性聯合專家委員會 (JECFI)	指出若是同一食品就沒有品種差異和地域差異	日內瓦
1970	國際食品照射計畫 (IFIP) 啟動	討論健全性試驗研究的方法, 提供委託與信息	卡兒斯魯厄
1976	FAO/IAEA/WHO 輻照食品健全性聯合專家委員會 (JECFI)	指出食品照射是物理加工技術, 與類似食品的健全性相同, 是放化知識的合理應用	日內瓦
1980	FAO/IAEA/WHO 輻照食品健全性聯合專家委員會 (JECFI)	指出10 kGy 以下的輻照食品的健全性沒有問題	日內瓦
1981	國際食品照射計畫完成		
1983	FAO/WHO 食品管理委員會	制定《國際輻照食品一般標準》和《國際食品照射實施規範》	
1984	國際食品照射諮詢小組成立 (ICGFI)	促進食品照射的應用和輻照食品貿易	
1988	召開有關輻照食品的接受、貿易、管理的國際會議		日內瓦
1989	國際食品標準委員會食品標識部門會議	對輻照食品的標識問題做了結論-輻照食品用語來表示	渥太華
1994	WHO 再次對輻照食品的健全性進行評價	輻照食品的安全性與營養適應性	
1997	WHO 對高劑量輻照食品的結論	10 kGy 以上的輻照食品的健全性沒有問題	

三、中藥材的輻射滅菌應用⁽⁷²⁾

大陸中藥滅菌實驗是從20世紀70年代開始的，主要實驗包括水洗除

菌、化學藥劑滅菌、熱滅菌(乾或濕)、輻射滅菌等4種方法。在實驗研究中，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。如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研究所輻射滅菌。產品包括中藥材、中成藥等各種丸、散、片、膠囊及西藥和保健品。輻射滅菌不限定包裝形式，可以為原料、半成品或成品，數量也沒有限制。

在食品輻射滅菌的營養衛生評價上，經過各國學者對食品中的主要營養成分如蛋白質、酶、碳水化合物、脂肪和維生素等，進行輻射滅菌前後的變化情況研究，證實對食品中主要的營養成分之影響程度與其他加工方法沒有明顯的區別。

中國大陸於1996年公布輻照食品衛生管理辦法，採用10 kGy為一般限定之照射劑量，針對其國家輻照食品衛生標準中未列入的食品品種(新研製的輻照食品品種)，規定研製10 kGy以下的輻照食品新品種時，研製單位應當向衛生行政部門提供：感官性狀、營養及微生物等指標之衛生安全性評價資料。若研製10 kGy以上的輻照食品新品種，研製單位應向衛生部直接提出申請，並提供感官性狀、營養、微生物、毒理及輻射降解產物等指標之衛生安全性評價資料。

行政院衛生署在1999年9月29日重新訂定食品輻射照射處理標準⁽¹⁾，

擴大了食品照射在臺灣的利用，目前依法照射的食品有大蒜、食米、乾燥蔬菜、香辛料等項目，可廣銷國內外。我國食品及藥品之照射處理標準如表 1-4。

表 1-4 我國食品輻射照射處理標準

限用照射食品品目	限用輻射射源	最高輻射線能量(百萬電子伏)	最高照射劑量千(格雷)	照射目的
馬鈴薯、甘藷、分蔥、洋蔥、大蒜、生薑	電子	10	0.15	抑制發芽
	X 射線或 y 射線	5		
木瓜、芒果	電子	10	1.5	延長儲存期限；防治蟲害
	X 射線或 y 射線	5		
草莓	電子	10	2.4	延長儲存期限
	X 射線或 y 射線	5		
豆類	電子	10	1	防治蟲害
	X 射線或 y 射線	5		
其他生鮮蔬菜	電子	10	1	延長儲存期限；防治蟲害
	X 射線或 y 射線	5		
穀類及其碾製品	電子	10	1	防治蟲害
	X 射線或 y 射線	5		
生鮮冷凍禽肉及機械去骨禽肉	電子	10	5	延長儲存期限；去除病原菌之污染
	X 射線或 y 射線	5		
生鮮冷藏畜肉	電子	10	4.5	延長儲存期限；控制旋毛蟲之污染
	X 射線或 y 射線	5		
生鮮冷凍畜肉	電子	10	7	延長儲存期限；控制旋毛蟲之污染
	X 射線或 y 射線	5		
乾燥或脫水的調味用植物(包括香草、種子、香辛料、茶、蔬菜調味料)	電子	10	30	防治蟲害及殺菌
	X 射線或 y 射線	5		
花粉	電子	10	8	延長儲存期限
	X 射線或 y 射線	5		
動物性調味料	電子	10	10	延長儲存期限
	X 射線或 y 射線	5		

目前國內外應用輻射滅菌之相關資料，列表如下：

1. 各國核可草藥照射國家如表 1-5⁽¹⁾。
2. 美國照射食品合法化項目如表1-6⁽¹⁾。
3. 美國FDA核可之藥物照射項目如表1-7⁽¹⁾。
4. 歐洲核可之藥物照射項目如表1-8⁽¹⁾。
5. 中國大陸核可之中藥照射項目及劑量如表1-9⁽²²⁾。
6. 台灣規範中藥載菌量要求-中藥碎片劑型之製劑微生物如表1-10⁽⁷³⁾。
7. 台灣規範中藥載菌量要求-中藥濃縮製劑加味道遙散等10個處方微生物
限量如表1-11⁽⁷⁴⁾。
8. 各國藥典、法規微生物限量標準如表1-12⁽¹⁾。
9. 歐洲藥典之草藥微生物限量標準(cfu/g 或 mL)如表 1-13⁽¹⁾。
- 10.英國藥典(1998)對口服製劑的微生物限量標準(cfu 或 mL)如表 1-14⁽¹⁾。
- 11.日本藥典對部分藥品的微生物限量(cfu 或 mL)如表 1-15⁽¹⁾。
- 12.各種滅菌法的優劣點如表 1-16⁽¹⁾。

表 1-5 各國核可草藥照射國家

國家	劑量 (kGy)	目的
比利時	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
中國大陸	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
加拿大	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
丹麥	15	Decontamination(殺蟲滅菌)
埃及	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
迦納	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
法國	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
義大利	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
墨西哥	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
荷蘭	15	Decontamination(殺蟲滅菌)
挪威	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
巴基斯坦	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
波蘭	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
南非	4.5	Decontamination(殺蟲滅菌)
美國	30	Decontamination(殺蟲滅菌)
南斯拉夫	10	Decontamination(殺蟲滅菌)
韓國	7	人參照射之劑量

表 1-6 美國照射食品合法化項目

食品種類	照射目的	允許劑量
香辛料草藥和 乾燥蔬菜調味品	微生物除污	30kGy
太空人專用肉類食品	滅菌	至少 44 kGy
乾燥和脫水酵素原料	微生物除污	10 kGy
所有食品	滅除昆蟲	1 kGy
新鮮食品	延遲成長或成熟 期	1 kGy
禽肉	控制病源菌	3 kGy
紅肉 (牛肉、羊肉、 豬肉)	控制腐敗和病源 菌	4.5 kGy (生鮮) 7 kGy (冷凍)
豬肉	控制寄生蟲	1 kGy (至少 0.3 kGy)
新鮮蛋	控制沙門氏菌	3 kGy
發芽用種子	控制病源菌	8 kGy

表 1-7 美國 FDA 核可之藥物照射項目

-
1. Antibiotics
 2. Botanicals
 3. Chloretetracycline ophthalmic ointment 1%
 4. Eye drops
 5. Eye ointments
 6. Injectables
 7. Pigments
 8. Steroids
 9. Sutilains ointment USP
 10. Talc
 11. Tetracycline ophthalmic ointment 1%
 12. Veterinary products
-



表 1-8 歐洲核可之藥物照射項目

歐洲核可之藥物照射項目	核可國家
1. Atropine sulphate eye ointment 6%	英國
2. Chloramphenicol eye ointment	英國
3. Chloramphenicol ear ointment	英國
4. Chloramphenicol ointment 1%	挪威
5. Chloramphenicol burn dressing	英國
6. Chlortetracycline eye ointment 1%	英國
7. Contact lens saline aerosol	英國
8. Corticosteroid ophthalmic ointment Debrisan	英國
9. Neomycin ophthalmic ointment	英國
10. Sulphacetamide sodium eye ointment 6%	英國
11. Tetracycline eye ointment 1%	英國
12. Tetracycline ophthalmic oily suspension 1%	英國
13. Tetracycline powder for i.m. injection	英國
14. Tetracycline powder for i.v. injection	英國
15. Tetracycline topical ointment 3%	英國
16. Veterinary products	英國

表 1-9 中國大陸核可之中藥照射項目及劑量

中藥輻照滅菌時的最大吸收劑量應不大於下列數值：

散 劑：3 kGy 片劑：3 kGy 丸劑：5 kGy

中藥原料粉：6 kGy。

允許輻照藥材品種共 198 種

艾葉	草烏	黨參	花椒	劉寄奴	青黛
安息香	側柏葉	地楓皮	化桔紅	蘆薈	青木香
巴戟天	柴胡	地骨皮	滑石	馬兜鈴	青箱子
八角茴香	蟾酥	地黃	槐花	麻黃	拳參
白扁豆	陳皮	地龍	黃柏	馬錢子	人工牛黃
白附子	沉香	地榆	黃精	麥冬	人參
白芥子	赤芍	丁香	黃耆	芒硝	肉豆蔻
白頭翁	赤小豆	冬虫夏草	黃芩	毛薑	肉桂
白芷	川貝母	豆蔻	火麻仁	密蒙花	三七
白朮	川棟子	獨活	急性子	綿葶藶	砂仁
百部	川烏	杜仲	架豆	綿馬貫眾	山豆根
柏子仁	穿山甲	鵝不食草	降香	沒藥	山柰
板藍根	穿心蓮	莢朮	桔梗	木鱉子	山楂
斑蝥	川芎	兒茶	金銀花	木香	麝香
半夏	椿花	番瀉葉	升麻	五味子	益母草
北豆根	椿皮	防風	石菖蒲	吳茱萸	淫羊藿
北沙參	磁石	防己	石膏	西青果	玉竹
檳榔	大黃	蜂蜜	使君子	西洋參	遠志

冰片	大青葉	茯苓	水牛角	細辛	雲木香
薄荷	代赭石	佛手	水蛭	仙鶴草	樟腦
蒼耳子	丹皮	甘草	蘇合香	香附	浙貝母
蒼朮	丹參	乾薑	蘇木	小茴香	珍珠
草豆蔻	當歸	甘遂	酸棗仁	辛夷	知母
甘松	荊芥	南瓜子	檀香	雄黃	枳殼
藁本	救必應	牛蒡子	天門冬	徐長卿	枳實
葛根	決明子	南星	天麻	玄參	梔子
枸杞子	菊花	牛膝	土茯苓	血竭	朱砂
鈎藤	苦地丁	礞砂	菟絲子	鴨跖草	紫草
瓜蒌子	苦參	平貝母	王不留行	延胡索	紫石英
廣藿香	苦杏仁	茜草	威靈仙	洋金花	自然銅
桂爾通	款冬花	千年健	五倍子	野菊花	
紅花	萊菔子	牽牛子	蜈蚣	伊貝母	
厚朴	葶苈子	羌活	五靈脂	薏苡仁	
槲寄生	羚羊角	秦皮			

允許低劑量（3 kGy）輻照藥材品種共 5 種

紫菀	乳香	補骨脂	錦燈籠	天竺黃
----	----	-----	-----	-----

不允許輻照藥材品種共 2 種

秦艽	龍膽
----	----

允許輻照中成藥品種共 70 種

安宮牛黃丸	藿膽丸	喉症丸	偏癱復原丸
安胃片	活胃散	七釐散	香砂平胃丸
鼻咽靈片	九分散	清肺抑火丸	香砂枳朮丸
鼻炎丸	康氏牛黃清心丸	清熱安宮丸	消栓再造丸
檳榔四消丸	咳丸	清眩丸	小兒至寶錠
冰硼散	潰瘍散	山藥丸	小兒齊應丸
大活絡丹	理中丸	上清丸	小活絡片
大山楂丸	羚翹解毒丸	沈陽紅藥	哮喘丸
二陳丸	六味地黃丸	十香止痛丸	熊去氧膽酸片
二妙丸	六一散	戊己丸	一捻金
複方丹參片	六應丸	舒胸片	益元散
附桂理中丸	綠雪	天王補心丹	銀色人丹
婦女痛經丸	麻仁潤腸丸	通宣理肺丸	鎮腦寧膠囊
附子理中丸	麻仁滋脾丸	胃乃安	梔子金花丸
肝得治	木香檳榔丸	胃氣止痛丸	朱砂安神丸
肝復康密丸	牛黃解毒片	烏雞白鳳丸	壯腰健腎丸
感冒退熱沖劑	牛黃解毒丸	烏鬚黑發丸	磁朱丸
冠心蘇合丸	牛黃清心丸		

表 1-10 台灣規範中藥載菌量要求-中藥碎片劑型之製劑

微生物限量標準如下:

微生物限量標準	
大腸桿菌 (Escherichia coli)	10 ² (cfu /g)
沙門氏桿菌 (Salmonella species)	不得檢出
好氧性微生物總數 (Total viable aerobic count)	10 ⁷ (cfu/g)
酵母菌與黴菌總數 (Yeast & Mould)	10 ⁴ (cfu /g)

表 1-11 台灣規範中藥載菌量要求-中藥濃縮製劑加味道遙散等 10 個處方

含微生物限量

物質名稱	限量	適用範圍
總生菌數	10 ⁵ cfu/g	加味道遙散、疏經活血湯、葛根湯、 辛夷清肺湯、川芎茶調散、獨活寄生 湯、麻杏甘石湯、小青龍湯、六味地 黃丸、龍膽瀉肝湯
沙門氏菌	不得檢出	
大腸桿菌	不得檢出	

表 1-12 各國藥典、法規微生物限量標準

標準	品目	不得檢出菌種	菌數限量
歐洲藥典	草藥經加熱處理後服用	大腸桿菌	好氧性微生物 $\leq 1.0 \times 10^7$ cfu /g 真菌 $\leq 10^5$ cfu /g
	不經加熱處理後服用之草藥	大腸桿菌 沙門氏菌	好氧性微生物 $\leq 1.0 \times 10^5$ cfu /g 真菌 ≤ 10 cfu /g
澳洲	經加熱處理後服用	大腸桿菌 沙門氏菌 金黃色葡萄球菌	好氧性微生物 $\leq 1.0 \times 10^5$ cfu /g 真菌 $\leq 10^2$ cfu /g
	不經加熱處理後服用	大腸桿菌 沙門氏菌	好氧性微生物 $\leq 1.0 \times 10^4$ cfu /g 真菌 $\leq 10^2$ cfu /g
WHO 中藥品管	草藥經加熱處理後服用	大腸桿菌 沙門氏菌	好氧性微生物 $\leq 1.0 \times 10^7$ cfu /g 真菌 $\leq 10^4$ cfu /g
	草藥內服	大腸桿菌 沙門氏菌	好氧性微生物 $\leq 1.0 \times 10^5$ cfu /g 真菌 $\leq 10^3$ cfu /g
日本藥局方	草藥經加熱處理後服用	沙門氏菌	好氧性微生物 $\leq 1.0 \times 10^7$ cfu /g 真菌 $\leq 10^4$ cfu /g
	草藥與製品	沙門氏菌	好氧性微生物 $\leq 1.0 \times 10^5$ cfu /g 真菌 $\leq 10^3$ cfu /g

表 1-13 歐洲藥典之草藥微生物限量標準 (cfu/g 或 mL)

微生物	一類		二類	
	WHO	歐洲藥典	WHO	歐洲藥典
需氧菌數	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵
黴菌和酵母菌	10 ⁴	10 ⁵	10 ³	10 ⁴
大腸桿菌	10 ²	10 ²	10	不得檢出
其他腸道細菌	10 ⁴		10 ³	10 ³
沙門桿菌	不得檢出		不得檢出	不得檢出

註：「一類」：指用前加沸水處理的草藥，「二類」：指用前不加沸水處理的草藥。

表 1-14 英國藥典 (1998)對口服製劑的微生物限量標準(cfu 或 mL)

口服製劑	活菌數(1g 或 1mL)	大腸菌(1g 或 1mL)	沙門菌(10g 或 10mL)	腸桿菌科和某 革蘭氏陽性菌
青氧化鋁懸浮液	10 ²			—
複合一鎂加鋁口 服懸浮液	10 ²			—
鎂加鋁口服懸浮 液	10 ²	—		—
標準番瀉葉乾浸 出液	10 ⁴		—	
萍婆(顆粒)	10 ²	—		

「—」：不得檢出

表 1-15 日本藥典對部份藥品的微生物限量(cfu/或 mL)

製劑	細菌	真菌	大腸桿菌	沙門氏菌	金黃色葡萄球菌	綠膿桿菌
無水乳糖	10 ²	5×10	—	—		
乳糖	10 ²	5×10	—	—		
吐根糖漿	10 ³	10 ²	—	—	—	—
纖維素粉	10 ³	10 ²	—	—	—	—
結晶纖維素	10 ³	10 ²	—	—	—	—
硬脂酸鎂	10 ³	5×10	—	—	—	

「—」：不得檢出

行政院原子能委員會核能研究所曾對人參粉末及靈芝茶甘草等進行載菌量測試，發現含菌量每克超過百萬微生物，情況相當嚴重。GMP 中藥廠，因來源品質等等問題無法控制，生產之藥粉等中藥載菌量常有上萬隻微生物，頗值得注意。

行政院原子能委員會核能研究所在藥物、健康食品已開發一些藥物照射項目，且已有例行照射，一些廠商中藥出口時，為了品質上能達到國外廠商之要求，已有照射經驗，而且外銷美日歐亞等各國，成效都很好。在中草藥及健康食品方面，一方面要確保及提昇國內中藥的品質以保障國人的健康，一方面要因應國際相關中草藥健康食品市場的需求，對中草藥無菌品質的要求相當殷切，但至今中草藥最好的滅菌法即輻射滅菌法卻尚未

合法化，對中草藥相關業者有很大的影響，為加速中草藥界內外銷及中藥界用藥的需求,實有加速立法的需要。

各種滅菌法的優劣點如表 1-16 所示，由下表可看出輻射滅菌法為最適宜對中藥進行殺蟲滅菌的方法。

表 1-16 各種滅菌法的優劣點表

滅菌法結果條件	輻射滅菌	蒸氣高溫滅菌	乾熱滅菌	毒氣滅菌
產生高溫	否	是	是	是
穿透力	無死角	佳	佳	差
殘毒或致癌	無	無	無	有
添加物	無	水或水蒸氣	無	冷媒
包裝限定	無	有	有	有
加壓	無	要	無	要
滅菌後檢測或隔離	不需要	無菌檢驗	無菌檢驗	無菌檢驗加毒氣消散

相關⁶⁰Co-γ射線輻射滅菌與其他滅菌方法比較之研究，如張啟明等分別用乾熱、流通蒸汽、臭氧、⁶⁰Co-γ輻射10 kGy 4種滅菌方法探討六味地黃6種生藥粉滅菌的效果以及滅菌過程中丹皮酚和熊果酸成分含量的影響，對六味地黃方劑中6種生藥粉進行滅菌處理，⁶⁰Co-γ射線輻射滅菌、流通蒸汽

滅菌和臭氧滅菌效果較佳；用水蒸氣蒸餾-UV法測定滅菌前後牡丹皮粉中丹皮酚含量，⁶⁰Co-γ射線輻射滅菌和臭氧滅菌對丹皮酚影響較小，流通蒸汽滅菌對丹皮酚影響最大，乾熱滅菌效果不太穩定；用薄層掃描法測定滅菌前後山茱萸粉中熊果酸含量，4種滅菌方法對熊果酸的影響均較小⁽⁷⁵⁾。

四、中藥材及中成藥⁶⁰Co-γ射線輻射滅菌方面的研究：

自20世紀50年代以來，國際上進行了大量⁶⁰Co-γ射線輻射滅菌試驗，目前許多國家已經規定輻射滅菌的藥品種類和劑量，在歐、美國家均已行之有年，但如何合理降低輻射劑量，並確保藥材能維持其應有療效，則需分析藥材於接受輻射劑量時主要成分或療效成分的變化。相關的研究舉例如下：

1. 中藥材⁶⁰Co-γ射線輻射滅菌的研究：

姚俊旭教授評估48種藥材之無菌劑量研究，實驗結果發現大部分的中藥生材經過3千戈里之照射後即可達到滅菌之效果。滅菌前乾燥處理與否，對中藥生材菌量檢測結果，並無明顯差異性發現。滅菌前後之化學成分分析實驗評估，部分產生成分變化^(17,18)。

陳家杰博士選擇四種中藥材為實驗樣本研究評估，選擇劑量10 kGy、20 kGy、30 kGy，並對指標成份進行HPLC分析，實驗結果顯示冬蟲夏草指標成份變化不顯著；白芍、甘草指標成份影響小於批量變化；西洋參隨

劑量增加稍有減少⁽¹⁹⁾。

周鳳英教授評估 48 種常用中藥材輻射滅菌劑量，實驗結果顯示，受測之中藥材所需滅菌劑量以珍珠粉 5 / 27.5 kGy 最高，甘草 20 kGy 次之，依序有黃芩、枸杞 16 kGy，冬蟲夏草 14 kGy，桂枝、神麩、酸棗仁、蒼朮、石斛 12 kGy，杏仁、人參、柴胡、紫草、紅花、薏仁、黃耆、西洋參 10 kGy，丹參、廣橘皮、山楂、金銀花、麥門冬、桔梗、白果、黨參、生地黃、川芎、茯苓、虎杖、山茱萸、連翹、石斛 8 kGy，白芷、百合、川貝母、五味子、當歸、浙貝母、白朮、山藥、熟地黃、杜仲、葛根、枳殼、鬱金、黃精 6 kGy，大黃 4 kGy。成份實驗結果顯示，珍珠粉之粗蛋白粗脂肪無明顯差異、紅花、桂枝、葛根、枳殼、蒼朮、冬蟲夏草成份變化不顯著^(15,16)。

胡馨等用 HPLC 法測定安息香在 10 kGy 劑量輻射照射前後，其有效成分肉桂酸含量無明顯變化⁽⁷⁶⁾。

楊德泉等用 ⁶⁰Co- γ 射線對牡丹皮、延胡索等經 48h 輻射照射前後，薄層分析顯示其有效成分的含量基本不變⁽⁷⁷⁾。

雷曦等以 1.5kGy、6kGy 不同的劑量對當歸、黨參進行輻射照射，將輻射照射前後和放置半年後對比，當歸中的阿魏酸、黨參中的多糖沒有顯著影響；從輻射照射前後和放置半年後的薄層層析圖中，在相同的位置有相同的斑點，說明輻射照射對藥材成分無影響⁽⁷⁸⁾。

范鐵林等用 4 kGy、6 kGy、10 kGy ⁶⁰Co- γ 射線對牡丹皮、辛夷、陳皮、

青黛、苦參、砂仁、厚朴、洋金花、益母草、黃芩等10種藥材進行輻射照射，通過檢測，結果表明輻射照射後藥材含菌量大幅度下降，雜菌存活率隨劑量的增加而遞減。其中陳皮、青黛、苦參、厚朴、益母草、黃芩經4 kGy的輻射照射，辛夷、砂仁、洋金花經 6 kGy的輻射照射以後含菌量可降低到國家藥品衛生標準範圍內（細菌數量小於 $10^4/g$ ，黴菌數量小於 $10^3/g$ ），10 kGy的輻照可基本達到徹底滅菌的效果。對輻射照射前後成分的含量測定顯示，經10 kGy的輻射照射後，10種藥材中，除陳皮中的橙皮苷略有降低（5.2%）外，其餘9種藥材中有效成分的含量基本不變。但經過4、6 kGy輻射照射後的陳皮中橙皮苷非常接近，說明在4 kGy、6 kGy劑量下不影響陳皮中橙皮苷的含量⁽⁷⁹⁾。

陳瑞珍以0、1、2、3、4、6、8、10 kGy 8個吸收劑量，對黨參進行輻射照射實驗，觀察不同計量下的效果，結果顯示，2 kGy以上劑量即可抑制貯藏黨參的蟲害，但能有效抑制黴菌生長的劑量在4 kGy以上，根據實驗結果，適宜的輻射殺蟲劑量為2-3 kGy，滅菌劑量為4-8 kGy⁽⁸⁰⁾。

劉美輝等對活血止痛膠囊中土鼈蟲粉在滅菌前其微生物限度未達標，而當輻射照射劑量在8 kGy和10 kGy時，細菌數 <10 、黴菌數 <10 、大腸桿菌、沙門菌、活蟎均未檢出。土鼈蟲粉在滅菌前後游離氨基酸和水解氨基酸含量幾乎沒有變化；揮發油成分在滅菌前和輻射照射為4 kGy、6 kGy、8 kGy時無明顯差異，但色譜圖中土鼈蟲揮發油成分在10 kGy時出現了幾種新物

質，說明土蠶蟲粉用輻射照射滅菌在6 kGy -8 kGy即能達到滅菌效果，而游離氨基酸含量、揮發油成分沒有明顯變化和差異⁽⁸¹⁾。

李奉勤等分別用1、2、3、4、5 KGy劑量對三黃片中大黃粉進行輻射照射，經檢測主要成分大黃素、大黃酚的含量結果，沒有明顯的變化；輻射劑量在2 kGy的照射下即可以達到消毒要求。用1、3、5、7、9 kGy劑量 ⁶⁰Co- γ 射線對5種蟲類藥進行輻照滅菌，當照射到3 kGy時可達到滅菌指標要求，而蜈蚣的含氮量、全蠟醇溶性浸出物、土蠶蟲水溶性浸出物、水蛭含量均沒有明顯變化^(82,83)。

2. 中成藥⁶⁰Co- γ 射線輻射滅菌的研究：

周鳳英教授評估5種中藥方劑輻射滅菌劑量，實驗結果顯示，中藥方劑所需滅菌劑量以加味逍遙散14 kGy最高，補中益氣湯、歸脾湯、辛夷散12 kGy次之，六味地黃丸則為10 kGy^(15,16)。

王贊英等對胎寶膠囊輻射照射滅菌的效果評估，分別用2、4、6、10 kGy ⁶⁰Co- γ 輻射射線滅菌後，胎寶膠囊中的含菌量大幅度下降，4 kGy的輻射照射可使胎寶膠囊中的細菌、黴菌含量降到符合藥品衛生標準。從輻射照射後貯藏期雜菌的檢查結果可以看出，經4 kGy以上劑量輻射照射的膠囊中雜菌呈逐漸死亡趨勢。輻射照射劑量越大，達到完全死亡的時間越短，表示在輻射照射時，有些雜菌雖未被立即殺死，但其新陳代謝遭到破壞，生命力已受到抑制，導致生長能力底下，逐漸死亡⁽⁸⁴⁾。

張良等採用高效液相法測定了熊膽滴眼劑在12.5 kGy劑量的⁶⁰Co-γ射線輻射照射前後主要有效成分牛磺熊去氧膽酸的含量，無明顯變化⁽⁸⁵⁾。

桂卉等以8.0kGy劑量⁶⁰Co-γ射線對接骨七厘片進行輻射照射，結果達到滅菌效果，用HPLC法測定血竭素的含量，輻射照射劑量在16kGy以內，血竭素的含量變化無顯著性差異；當輻射照射劑量達20kGy時，血竭素含量與照射前相比，有顯著性差異⁽⁸⁶⁾。

李奉勤等通過對5批冠心膠囊（每批分別按4 kGy、6 kGy、8 kGy、10 kGy、12 kGy 5個不同劑量）的⁶⁰Co-γ射線輻射照射，當劑量6 kGy衛生學指標即可符合要求，輻照劑量在12 kGy以內輻射照射前後主要成分芍藥苷的含量無顯著性差異⁽⁸⁷⁾。

李奉勤等以6 kGy輻射照射消毒後留樣2年之內不同時間的冠心膠囊，採用高效液相色譜法進行檢測，冠心膠囊中芍藥苷含量與剛照射後比較，有下降的趨勢。輻射照射對冠心膠囊中芍藥苷含量無顯著影響。對黴菌和細菌的檢測結果，細菌都在 $10^2/g$ 以下；黴菌都小於 $10^1/g$ 。符合規定，表示在留樣2年之內細菌和黴菌穩定⁽⁸⁸⁾。

五、 中草藥輻射滅菌申請合法化必備之條件⁽¹⁾

國外照射合法化之相關申請作業

美國對輻射照射合法申請作業方面，主要由兩方面進行，其一為政府相關單位，如美國 FDA 相關單位，在 1980 年中 FDA 曾主動委託計畫收集相關資料進行合法化之作業；其二由相關的組織團體依法提出申請，如工會、商會等，1999 年 8 月 23 日一個工會組織即對 FDA 提出豬肉照射合法化的申請。

在照射合法化方面，安全為最重要的考慮條件。目前美國 FDA 對藥草等所核可的照射劑量為 30 kGy，由 FDA 對安全審核的嚴格性可知，30 kGy 的照射並沒有安全問題，美國近年來更把太空人食用的肉類食品滅菌照射訂為至少 44 kGy，可見美國 FDA 對食品照射安全的肯定。1980 年 IAEA、WHO 及 FAO 等單位宣佈 10 kGy 照射為安全且不需任何測試即可食用，當時訂定 10 kGy 的原因乃因高於 10 kGy 照射的資料不夠，無法做更高的安全劑量宣布，1997 年後又開一次會議，證明食品照射在劑量上沒有安全上限，可安心服用。對中草藥方面，國外因沒有中醫藥項目，皆將藥草歸於食品項下，食品為可長期大量食用者；相對於藥品因食用量小，且食用期短，可知更無安全上顧慮，加上抗生素等藥品早就有輻射滅菌的應用，可知藥草照射更沒有安全顧慮。

國外如美國、英國等在西藥方面已可合法照射，如抗生素、眼藥膏等。

國內亦已有一些西藥如抗生素、眼藥膏等正進行例行照射。

世界各國已有藥草照射的例行工作，美國在辛香料藥草上之照射每年超過65百萬磅，而美國在草藥上合法照射劑量為30 kGy，太空人食用的肉類食品滅菌照射訂為至少44 kGy，為全世界最高。FDA對原料藥照射之政策，並未管制，只要求核備，以保證其藥效和毒性安全，故藥草、原料藥照射在國外應已是一可行的方法。

國內現況，除氰胺公司、葡萄王、綠州公司等進行例行照射外，一些GMP中藥廠為外銷科學中藥，亦有照射經驗，衛生署對綠州公司回文稱照射滅菌為製程之一部分，故只需自我負責其安全及藥性之穩定性即可，而國內健康食品等中藥產品，因微生物污染嚴重，有照射殺蟲與滅菌之必要。

輻射照射之優點相當多，鈷六十加馬射線不會活化被照射物，可完全穿透任何包裝之藥材進行最終產品照射滅菌，沒有殘毒，不會增加溫度，不影響藥性，為目前最現代化的滅菌殺蟲方法。

第三章 材料與方法

第一節 何首烏藥材之滅菌輻射劑量實驗

一、實驗材料與儀器

(一)、實驗材料：

輻射照射滅菌之 10 家藥材購自台灣 8 家中藥進口商、1 家中藥房及 1 家 GMP 中藥廠提供。檢視其飲片(如圖 1-3)，切斷面呈棕紅-棕黑色，表面皺縮不平，畸形維管束與中央的維管束均明顯，周邊有如雲朵紋理環繞，味微苦而澀，形成層易形成裂縫，孔洞較多，質脆易斷，斷面呈角質狀。鑑定時參考「中藥炮製學」⁽⁸⁹⁾，購入之藥材符合其性狀描述，相似度 90% 以上，故鑑定其為何首烏藥材。



圖 1-3 何首烏藥材之飲片

(二)、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數組之三萬居里鈷-60 照射熱室中進行^(90,91)，照射劑量分別為 2、4、6、8、10 kGy。輻射劑量測定以硫酸亞鐵水溶液劑量計(Frick's dosimeter)進行。其成份包括 0.001 M FeSO₄，0.001 M NaCl 及含飽和空氣之 0.8 N 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 光譜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 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 10^5 Gy ⁽⁹²⁾。

二、實驗方法

(一)、輻射照射：

每一何首烏樣品以無菌操作剪為小塊，混合均勻後以無菌方式各稱取 15 g 置於樣品瓶中，將樣品瓶攜入清華大學原子科學技術發展中心鈷-60 照射廠分別進行 2、4、6、8、10 kGy 照射（劑量率為 2 kGy/h 於室溫中照射），照射溫度為室溫（ $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ）；每一何首烏樣品置於距離射源特定距離之照射架上，照射架每分鐘旋轉 10 轉，使照射樣品瓶中之何首烏樣品輻射劑量率均勻。樣品經不同照射時間取樣，以得到所需之照射劑量(2 kGy、4 kGy、6 kGy、8 kGy、10 kGy)。照射後樣品立刻取出進行微生物含量測試⁽⁹³⁾。

(二)、培養基及磷酸緩衝液之配製

1、PCA 平面培養基(plate count agar PCA；Difco. Co.)之製備：

取 PCA 粉末 23.5 g 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(121°C 、15 分鐘)，

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 10-15 mL，冷卻備用。

2、PDA 平面培養基(potato dextrose agar ; Difico. Co.)之製備：

取 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(121°C、15 分鐘)，待其溫度降至 50-60°C 時，分別倒入直徑 9 cm 之無菌培養皿中，每皿約 10-15 mL，冷卻備用。

3、VRBGA 平面培養基(violet red bile glucose agar ; Difico. Co.) 之製備：

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攪拌至沸騰且呈暗紅色透明，沸騰時間不超過 2 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 9 cm 之無菌培養皿中，每皿約 10-15 mL，冷卻備用。

4、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，高壓滅菌之;另亦分裝 9 mL 磷酸緩衝液至玻璃試管中，加蓋後高壓滅菌，滅菌後之磷酸緩衝液及每管 9 mL 磷酸緩衝液之玻璃試管，冷卻後皆置於冰箱冷藏備用，使用前取出回溫。

(三)、微生物之菌數測定

表面平板計數法(surface plate count)：

取出經不同劑量照射後之樣品，無菌操作將其中之 15g 何首烏放入已經滅菌之三角錐瓶內(滅菌前置放磁石攪拌棒)，再加入磷酸緩衝液 50mL，置於振盪器中(75 rpm、7°C)振盪 60 分鐘，使樣品中之微生物懸浮於緩衝液中。再以磁石攪拌棒攪拌 5 分鐘。

取上述浸泡之磷酸緩衝液將其稀釋為 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 之濃度後，各塗抹 0.1mL 於 PCA、PDA 及 VRBGA 平面培養基上。將 PCA、PDA 置放於 25°C 培養箱中，24 小時後取出計數生長較快之菌落，再置回 25°C 培養箱中，4-7 日取出，計數生長較緩慢之菌落。而 VRBGA 置於 37°C 培養箱中培養。每一測試濃度均作三重複計數。

PCA 平面培養基用於測定總好氣菌 (CNS10890)⁽⁹⁴⁾

PDA 平面培養基用於測定真菌及酵母菌(CNS12925)

VRBGA 平面培養基用於測定總腸內菌

以三種不同培養基培養，使何首烏中藥材中各類細菌、真菌及酵母菌皆有生長表現之機會。

第二節 何首烏藥材輻射滅菌前後之抗氧化實驗

一、化學試劑：

Butylate hydroxyltoluene (BHT), glutathione reduced form (GSH), potassium peroxodisulfate ($K_2S_2O_8$), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Tris (hydroxymethyl) aminomethane, potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), trichloroacetic acid (TCA), ferric chloride ($FeCl_3$), catechin, aluminum chloride hexahydrate ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$), rutin, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulphonic acid (ABTS), sodium bicarbonate (Na_2CO_3), *p*-dimethyl-aminocinnamaldehyde (DMACA), α -tocopherol 皆購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)。Folin-Ciocalteu solution 及 95% ethanol 則購自 Merck Co. (Santa Ana, CA, USA)。

二、實驗儀器：

1. 減壓濃縮機 (Rotavapor R200 Series, Buchi)
2. 冷凍乾燥機 (FreeZone 6, Labconco)
3. 離心機 (HermLe Z300)
4. 酵素免疫分析儀 (VERSAmax microplate reader, Molecular Devices)
5. 微量天平 (TB-214, Denver instrument)
6. 去離子水製造機 (Milli-Q, Millipore)
7. 酸鹼值測定計 (Microcomputer pH/mV/TEMP meter 6171)

8. 恆溫水浴槽 (Zeta ZC-4000, KS)
9. 震盪混合器 (Vortex-genie 2, Scientific industries)
10. Pipetment (Tipor-V, Orange scientific)
11. 96槽ELISA微量盤 (Greiner bio-one)
12. Pipet tips (Extra gene)

三、實驗方法：

(一)、檢品萃取及製備:

購自高雄市中藥進口商之何首烏中藥材，於清華大學原子科學技術發展中心分別照射 5、10、15 kGy 輻射劑量，與未照射之中藥材經粉碎後各稱取 10 公克浸泡於 30 mL 甲醇中，以超音波振盪萃取三次，合併濾液濃縮到乾，經冷凍乾燥後稱取抽出物 100 mg 以甲醇定容至 10 mL，以供製備成不同濃度之檢品溶液。

(二)輻射滅菌前後之抗氧化活性之研究：

1. Trolox 當量的總抗氧化能力測定(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

ABTS 以去離子水溶解使成濃度 7 mM，加入 2.45 mM 之 potassium peroxodisulfate。將此溶液於室溫下置於暗室反應 16 小時，使其生成

穩定之藍綠色 $ABTS^+$ · 自由基。然後再以乙醇稀釋使在分光光度計 734 nm 下，其吸光值為 0.75 ± 0.05 的 $ABTS^+$ · 離子溶液。加入不同濃度的 trolox 2 μ L 於 20 μ L 乙醇溶液中，再混合 180 μ L $ABTS^+$ · 離子溶液，在一分鐘內由分光光度計 734 nm 下測其吸光值，做成 trolox 之檢量線。樣品、THSG 標準品及對照組（乙醇或二次水）檢測同上，測得後再由 trolox 的檢量線換算其相當的濃度(mM)⁽⁹⁵⁾。TEAC 值表示 1000 ppm 的樣品相當 trolox 標準溶液抗氧化力之濃度值(mM)。

2. DPPH 自由基清除效應

在 96 槽的微量平盤中加入 20 μ L 不同濃度的試驗樣品、THSG 標準品之溶液與正對照組(GSH、BHT)，之後再加入 80 μ L 的 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)，隨即迅速加入 100 μ L DPPH 乙醇溶液(500 μ M)，使最後體積成為 200 μ L。均勻混合後於室溫下避光靜置 30 分鐘，之後以分光光度計，波長 517 nm 下，測其吸光值。當 DPPH 自由基被清除越多時，其吸光值會下降的愈多，利用相對於空白對照組的吸光值下降百分比，可判斷各試驗樣品清除 DPPH 自由基能力之強弱，亦即表示試驗樣品供氫能力之強弱⁽⁹⁶⁾。清除力計算公式如下：

$$\left[1 - \left(\frac{ABS_{\text{sample}}}{ABS_{\text{control}}} \right) \right] \times 100\%$$

3. 還原力測定

取 200 μL 適當濃度的試驗品、THSG 標準品溶液(以不同濃度的 BHT 溶液做正對照組)，加入 200 μL 200 mM 磷酸緩衝液 (pH 6.6) 與 1 mL 1% 赤血鹽 (potassium ferricyanide)。之後於 50°C 水浴反應 20 分鐘，急速冷卻後，加入 1 mL 10% trichloroacetic acid 溶液 (以 95% 乙醇製備)。於 6000 rpm 離心 10 分鐘。取上清液 100 μL 加入 100 μL 蒸餾水及 20 μL 0.1% ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 溶液混合均勻後，置放 10 分鐘，測定 700 nm 之吸光值。吸光值愈高，則表示樣品還原力愈強⁽⁹⁹⁾。其計算公式如下：

$$\text{ABS}_{\text{sample}} - \text{ABS}_{\text{control}} (\Delta 700\text{nm})$$

(三) 輻射滅菌前後之抗氧化成分之研究：

1. 總多酚類(polyphenols)含量測定

以 catechin 為標準品，做成檢量線。取 20 μL 樣品溶液，加入 200 μL 之蒸餾水，混合均勻，再加入 40 μL 的 Folin-Ciocalteu 試劑，靜置 5 分鐘，再加入 40 μL 之 20% 碳酸鈉(sodium carbonate)溶液，再以 680 nm 測其吸光值並計算總多酚類含量⁽⁹⁸⁾。總多酚類含量以 μg catechin equivalent/mg dry weight 表示。

2. 總類黃酮(flavonoids)含量測定

以 rutin 為標準品，做成檢量線。取 100 μL 樣品溶液，加入 100 μL 2% 之 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 甲醇溶液，混合均勻，靜置 10 分鐘，再以 430 nm 測其吸光值並計算總類黃酮含量⁽⁹⁹⁾。總類黃酮含量以 μg rutin equivalent/mg dry weight 表示。

3. 總黃酮醇(flavonols)含量測定

以 catechin 為標準品，做成檢量線。取 40 μL 樣品溶液，加入 200 μL 0.1% 之 *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) 溶液，混合均勻，靜置 10 分鐘，再以 640 nm 測其吸光值並計算總黃酮醇含量⁽¹⁰⁰⁾。總黃酮醇含量以 μg catechin equivalent/mg dry weight 表示。

第三節 加馬射線不同劑量照射前後之指標成分變化比較

一、實驗材料與儀器

(一)、HPLC 試驗用之藥材：購自高雄市中藥進口商。

(二)、試藥：LC 級甲醇、LC 級乙腈、d.d. water。

(三)、HPLC 標準品：2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside

(THSG)購自中國藥品生物製品檢定所。

(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

Integrator。

二、實驗方法

(一)、購自高雄市中藥進口商之何首烏中藥材，於清華大學原子科學技術發展中心進行加馬射線輻射滅菌，輻射劑量分別為 5 kGy、10 kGy 及 15 kGy。

(二)、不同劑量加馬射線照射前後之指標成分變化比較。

1. 標準品儲備溶液

取對照品 THSG 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 THSG 標準品儲備溶液稀釋成不同濃度，以標準品波峰面積比與標準品濃度，作檢量線。

3. 檢品溶液

輻射劑量分別為 5 kGy、10 kGy 及 15 kGy 何首烏中藥材經粉碎後各稱取 10 公克浸泡於 30 mL 甲醇中，以超音波振盪萃取三次，合併濾液濃縮到乾，經冷凍乾燥後稱取抽出物 100 mg 以甲醇定容至 10 mL。

4. 方法

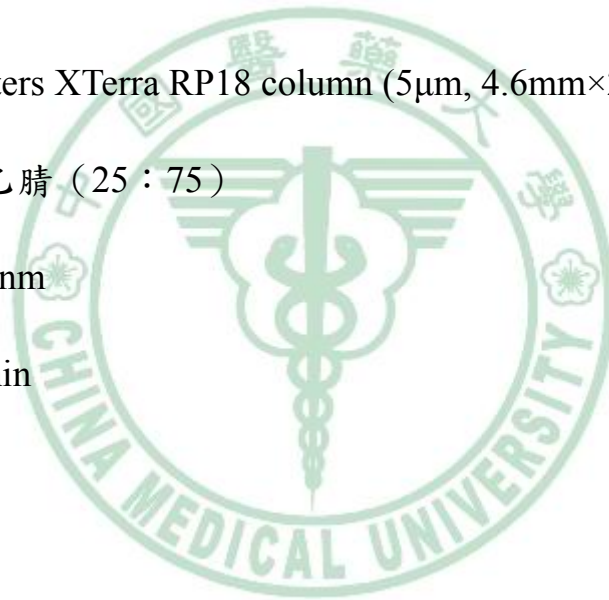
層析管柱：Waters XTerra RP18 column (5 μ m, 4.6mm \times 250mm)

移動相：水：乙腈 (25：75)

檢測波長：320nm

流速：0.6 ml/min

時間：30 分鐘



第四章 實驗結果

第一節 何首烏輻射滅菌前後測定結果

一、外觀差異

何首烏藥材因本身經炮製過程呈現顏色較深的黑褐色，在輻射照射劑量5 kGy、10 kGy、15 kGy滅菌後，其外觀顏色沒有明顯的改變。



圖1-4 輻射照射前後之何首烏中藥材照片。

二、何首烏輻射滅菌前後微生物之菌數測定結果

十家不同來源的何首烏中藥材，經0 kGy，2 kGy，4 kGy，6 kGy，8 kGy 和10 kGy輻射滅菌後立即以spread plate method 測定微生物之菌數結果如表1-17。十家何首烏中藥材所測量之總菌數介於 5.0×10^1 到 2.9×10^3 cfu/g，真菌和黴菌介於 2.5×10^1 和 6.2×10^2 cfu/g。總菌數含量皆高於真菌和黴菌數；十家何首烏中藥材僅一家含有腸內菌，含量為 1.0×10^1 cfu/g。不同來源的十家何首烏藥材，經2 kGy輻射照射後就能達到腸內菌滅菌的效果，照射4 kGy後黴菌和真菌數量明顯降低，在6 kGy的輻射照射後黴菌和真菌即完全滅菌，菌數隨著輻射劑量的增加而減少，8 kGy 照射可達到徹底滅菌的效果。

表 1-17 何首烏輻射滅菌前後微生物之菌數.

Sample No.		Irradiation dose (kGy)				
		0	2	4	6	8
1	T ^a	$(1.2 \pm 0.4) \times 10^3$	$(1.3 \pm 0.4) \times 10^2$	$(5.0 \pm 0.6) \times 10^1$	ND ^b	ND
	M ^c	$(6.2 \pm 0.7) \times 10^2$	$(4.0 \pm 0.6) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND
	E/Pa ^d	ND	ND	ND	ND	ND
2	T	$(2.1 \pm 0.3) \times 10^2$	$(2.0 \pm 0.4) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.5) \times 10^1$	ND	ND
	M	$(1.7 \pm 0.4) \times 10^2$	ND	ND	ND	ND
	E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
3	T	$(5.1 \pm 0.9) \times 10^2$	$(7.0 \pm 1.4) \times 10^1$	ND	ND	ND
	M	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^2$	$(2.0 \pm 0.4) \times 10^1$	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^1$	ND	ND
	E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
4	T	$(2.9 \pm 0.3) \times 10^3$	$(3.5 \pm 0.5) \times 10^2$	$(6.9 \pm 1.1) \times 10^1$	ND	ND
	M	$(4.5 \pm 0.4) \times 10^1$	$(1.9 \pm 0.3) \times 10^1$	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^1$	ND	ND
	E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
5	T	$(6.5 \pm 1.2) \times 10^1$	$(4.0 \pm 0.7) \times 10^1$	$(2.5 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND
	M	$(5.0 \pm 0.8) \times 10^1$	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^1$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND
	E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
6	T	$(3.0 \pm 0.4) \times 10^2$	$(7.5 \pm 0.5) \times 10^1$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^1$	ND	ND
	M	$(5.0 \pm 0.9) \times 10^1$	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^1$	ND	ND	ND
	E/Pa	$(1.0 \pm 0.4) \times 10^1$	ND	ND	ND	ND
7	T	$(5.0 \pm 0.5) \times 10^1$	ND	ND	ND	ND
	M	$(2.5 \pm 0.4) \times 10^1$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^1$	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^1$	ND	ND
	E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
8	T	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^2$	$(5.0 \pm 0.5) \times 10^1$	ND	ND	ND
	M	$(5.0 \pm 1.3) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND	ND
	E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
9	T	$(5.0 \pm 0.7) \times 10^1$	$(3.0 \pm 0.4) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND
	M	$(5.0 \pm 0.3) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND	ND
	E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
10	T	$(2.6 \pm 0.4) \times 10^2$	$(5.0 \pm 0.6) \times 10^1$	$(3.0 \pm 0.3) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^1$	ND
	M	$(5.0 \pm 0.5) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND	ND
	E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND

^aT: Total aerobic microbes; ^bND: No microbe detected on plates; ^cM: Molds;

^dE: *Enterobacteriaceae*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*

第二節 何首烏藥材之抗氧化實驗

一、抗氧化活性結果

(一) Trolox 當量的總抗氧化能力測定(TEAC)：

此實驗主要是藉由清除一相當安定的陽離子自由基 $ABTS^+ \cdot$ ，來探討抗氧化物之抗氧化能力。自由基 $ABTS^+ \cdot$ 呈藍綠色，可在 734 nm 波長下被吸收，所以，可以儀器檢測 734 nm 波長下吸光值的降低，來評估自由基 $ABTS^+ \cdot$ 被清除的程度。吸光值越低表示樣品清除 $ABTS^+ \cdot$ 自由基能力越強。而 trolox 為一水溶性的維生素 E 類似物，已知具有強效抗氧化力⁽¹⁰⁵⁾。本實驗藉由 trolox 的檢量線，可將樣品之吸光值換算成相當 trolox 濃度(mM) 的抗氧化能力，即以 TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) 值表示，而 TEAC 值愈高表示清除 $ABTS^+ \cdot$ 自由基能力越強。TEAC 值被定義為 1,000 ppm 的樣品相當 trolox 標準溶液抗氧化力之濃度值(μ M)。結果如表 1-18。

TEAC 值由高而低依序為 5 kGy(63.62 ± 0.84) > 10 kGy(59.77 ± 1.03) > 15 kGy(55.92 ± 0.80) > 0 kGy(52.08 ± 0.79)

表 1-18 加馬輻射劑量對 TEAC 值比較

Samples and positive control	TEAC (μ M Trolox/mg \pm SD) *
0 kGy	52.08 \pm 0.79
5 kGy	63.62 \pm 0.84
10 kGy	59.77 \pm 1.03
15 kGy	55.92 \pm 0.80
THSG	1, 871.53 \pm 15.38
BHT	1, 869.41 \pm 34.63
GSH	1, 827.68 \pm 76.84

* All values are expressed as mean \pm S.D. of triplicate tests ($n = 3$). Values represented mean \pm S.D. of three parallel measurements ($p < 0.05$) when analyzed by ANOVA

(二) DPPH 自由基清除效應：

DPPH 為一種相當穩定的自由基，其為紫藍色，在 517 nm 波長下有強的吸收光，當 DPPH 與具有供氫能力之抗氧化劑反應時，其顏色會消失，因此，在 517 nm 的吸光值就會降低，而吸光值降的越低，表示抗氧化劑(AH)的供氫能力越強，也就是指該抗氧化劑清除自由基的能力越強。其反應式如下：



由其數據計算出樣品對 DPPH 自由基清除率達 50%時的樣品濃度（即所謂的 IC₅₀ 值），製成表 1-19，IC₅₀ 值越小表示清除 DPPH 自由基能力越強。

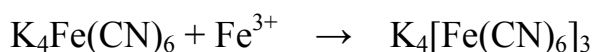
表 1-19 加馬輻射劑量對 DPPH 自由基清除作用之 IC₅₀ (μg/mL) 值比較

The dosage of gamma radiation	IC ₅₀ (μg/mL) *
0 kGy	513.04 ± 0.01
5 kGy	514.28 ± 0.01
10 kGy	526.79 ± 0.01
15 kGy	546.03 ± 0.02
THSG	37.51 ± 0.31
BHT	41.06 ± 0.76

* Values represented mean ± S.D. of three parallel measurements ($P < 0.05$).

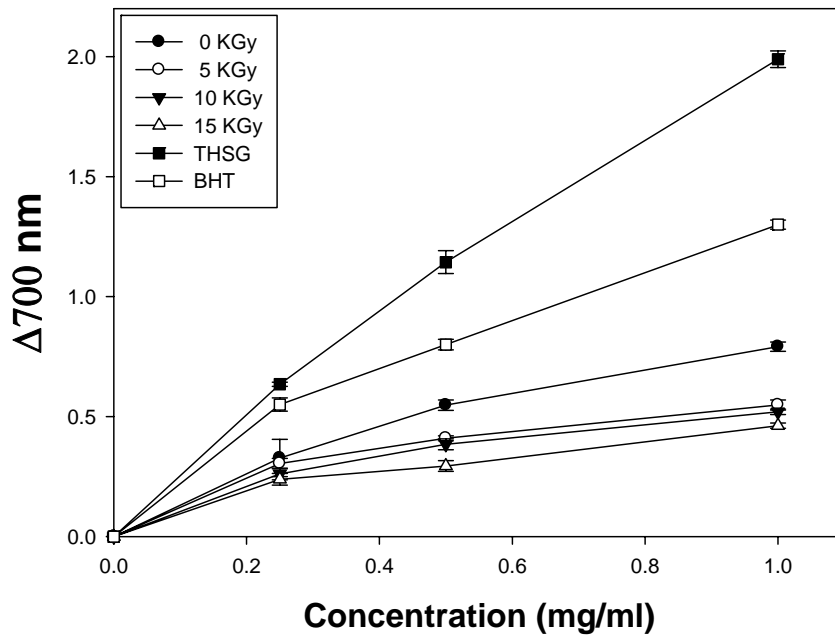
(三) 還原力測定：

此實驗主要以測定普魯士藍(prussian blue, $K_4[Fe(CN)_6]_3$)的產生量為指標，是利用赤血鹽(potassium ferricyanide, PFC, $K_3Fe(CN)_6$)提供 Fe^{3+} ，當樣品與 Fe^{3+} 反應，即將其還原成 Fe^{2+} 黃血鹽($K_4Fe(CN)_6$)，黃血鹽再與 $FeCl_3$ 所提供的 Fe^{3+} 反應形成亞鐵氰化鐵，即普魯士藍，此物質可在 700 nm 波長下測其吸光值，吸光值越高代表還原力越強。相關反應式如下：



實驗結果顯示於圖 1-5，橫軸代表樣品之濃度，縱軸則為樣品於 700 nm 下的吸光值。

圖 1-5 加馬輻射劑量還原力之試驗比較



以 BHT and THSG 作為對照組，圖中每個數值以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示， $n=3$ ，每條曲線皆經 one-way ANOVA 分析，其 p 值皆小於 0.05。

二、抗氧化成分之結果

加馬輻射劑量乙醇萃取物，其所含總多酚類、總類黃酮及總黃酮醇之含量分析，結果如表 1-20 所示。

表 1-20 總多酚類、總類黃酮及總黃酮醇之含量分析結果^a

Dose of gamma radiation	Total polyphenols (g CE/mg) ^b	Total flavonoids (g RE/mg) ^c	Total flavonols (g CE/mg) ^b
0 kGy	27.84 ± 0.06	6.99 ± 0.02	5.74 ± 0.27
5 kGy	28.21 ± 0.02	7.14 ± 0.04	5.78 ± 0.06
10 kGy	27.77 ± 0.01	7.01 ± 0.03	5.79 ± 0.03
15 kGy	26.82 ± 0.01	5.12 ± 0.02 [*]	5.71 ± 0.07

^a Values represented mean ± S.D. of three parallel measurements.

^b Data expressed in g (+)-catechin equivalent / mg dry weight (g CE/mg).

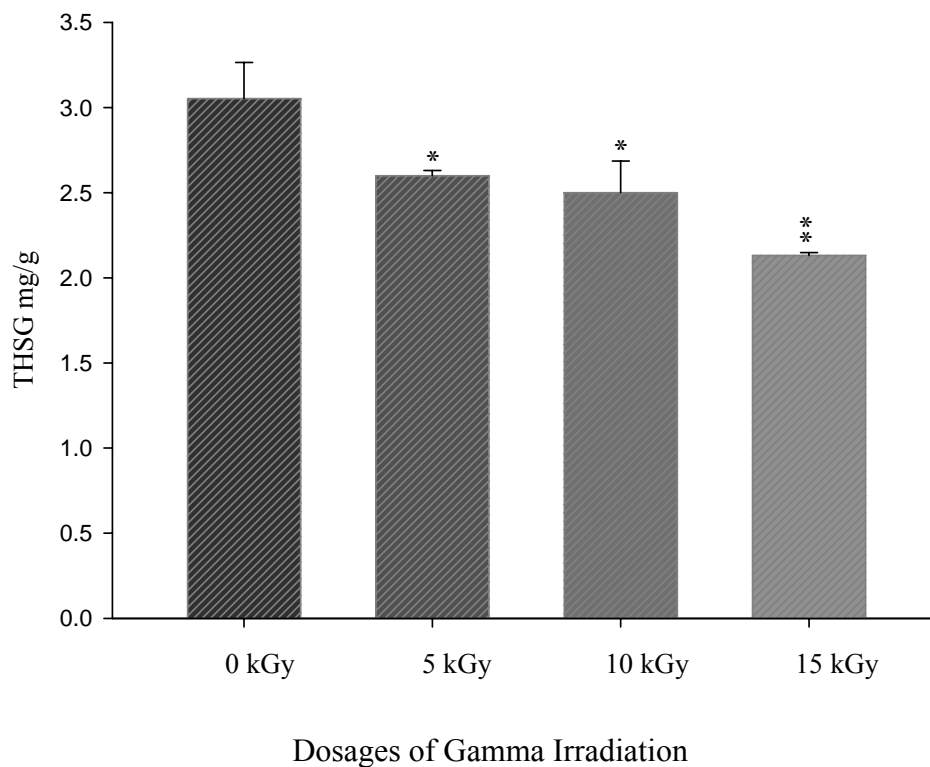
^c Data expressed in g rutin equivalent / mg dry weight (g RE/mg).

^{*} values significantly differing from others at 5%

三、不同劑量加馬射線照射前後之指標成分變化比較

經參考前人之研究再加以修飾後，選定利用乙腈及水作為流動相，來進行分離，並利用檢量線算出其 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG) 之含量。結果發現與未照射輻射之樣品比較，輻射照射過之 THSG 含量變化為隨著輻射劑量愈高其的含量愈低，並利用單因子變異數 Scheffe 法分析，結果指出何首烏藥材不同輻射照射劑量組間之 P 值，就統計上而言，未照射輻射與照射 5kGy、10 kGy 及 15 kGy 輻射劑量之各組間 THSG 含量變化有顯著性的差異，其中以 15 kGy THSG 含量為最低。

圖 1-6 不同劑量加馬射線照射前後之指標成分 THSG 之含量結果



第五章 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。⁶⁰Co γ 射線輻射滅菌作為一種新的消毒滅菌方法，已被收入美國及大陸等藥典，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。輻射滅菌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⁶⁰Co 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。

行政院衛生署中醫藥委員會由88年度起陸續委託清華大學等機構進行輻射滅菌相關的研究計畫^(102,103)，包括國立清華大學周鳳英教授88年度「中藥（材）加馬射線及微量元素檢測方法與規格研訂之研究」、89年度「中藥（材）加馬射線滅菌研究及重金屬檢測之品質管制」、90年度「中藥（材）加馬射線滅菌研究」、「輻射照射對六味地黃丸之滅菌效果及主成分影響研究」、92年度「加馬輻射照射對中藥材滅菌及成分影響評估」、94年度「加馬輻射照射對中藥材滅菌及成分影響評估」、「加馬線分解中藥材人參中殘留有機氯農藥之照射平台建立及其安全性評估」、96年度「加馬線分解常用中藥材殘留有機氯農藥之照射平台建立」、97年度「中藥材有無經輻射照射

之檢測方法研究」、「輻射照射抑制火麻仁發芽之研究(2-2)」、「以加馬線分解常用中藥材殘留有機氯農藥之照射平台建立(2-2)」、99 度「利用輻射滅菌技術處理中藥材之劑量限量標準及其量產之可行性評估」；中台醫護技術學院姚俊旭教授 90、91 年度「鈷六十加馬射線在中藥材貯存條件之研究與評估」；原子能委員會核能研究所陳家杰博士 92 年度「常用中藥材輻射滅菌後對其療效指標成分的影響研究」；製藥工業技術發展中心吳孝芸博士「包裝與存放對赤芍、白芍及延胡索之品質影響的研究」；國立宜蘭大學馮臨惠 96 年度「中藥材輻射滅菌對包裝材料功能性質影響研究」等研究計畫。

95 年度國立清華大學周鳳英教授除進行「中藥材輻射滅菌量產研究及其產官學專家研討」計畫外，亦與中國醫藥大學張永勳教授及高雄市中藥商業同業公會鄭炳昇理事長共同執行「總計畫：中藥材輻射滅菌劑量之評估研究」，包含「子計畫一：中藥材輻射滅菌劑量及包材評估研究(2-1)」、「子計畫二：中藥材輻射滅菌劑量對指標成分及療效之影響(2-1)」及「子計畫三：中藥從業人員中藥材輻射滅菌教育講習(2-1)」，將歷年來進行中藥材輻射滅菌及品質之評估成果，舉辦產官學專家會議及多場次的宣導，希望藉此取得共識，研訂我國中藥材輻射滅菌法規，確保中藥的衛生安全，使中藥材輻射滅菌有法規可供遵循，解決微生物污染之問題，得以提高中藥之品質，確保民眾使用中藥的安全。

歷年來清華大學周鳳英教授中藥材輻射滅菌之評估計畫，檢測中藥材

及中藥方劑之含菌量及所需滅菌劑量，共完中藥材及中藥方劑之品項有珍珠粉、甘草、黃芩、枸杞、冬蟲夏草、桂枝、神麴、酸棗仁、蒼朮、石斛、杏仁、人參、柴胡、紫草、紅花、薏仁、黃耆、丹參、廣橘皮、山楂、金銀花、麥門冬、桔梗、白果、黨參、生地黃、川芎、茯苓、虎杖、山茱萸、連翹、石斛、白芷、百合、川貝母、五味子、當歸、浙貝母、白朮、山藥、熟地黃、杜仲、葛根、枳殼、鬱金、黃精、大黃、西洋參等 48 種中藥材之評估；中藥方劑則有加味逍遙散、補中益氣湯、歸脾湯、辛夷散及六味地黃丸 5 種之評估。

本研究選取何首烏中藥材，於清華大學原子科學技術發展中心同位數組進行不同劑量之輻射照射，探討其輻射照射滅菌最適條件及分析輻射照射後中藥材抗氧化活性、抗氧化成分及指標成分變化情形，找出達到最佳輻射滅菌效果的最小吸收劑量，建立何首烏中藥材輻射照射滅菌的最適劑量。

何首烏中藥材分別以 2 kGy、4 kGy、6 kGy、8 kGy 和 10 kGy 照射之實驗結果顯示，輻射照射 2 kGy 即可消滅腸內菌，4 kGy 照射劑量時，真菌及酵母菌數量明顯降低，能抑制其生長，在 6 kGy 的輻射照射後黴菌和真菌即完全滅菌；菌數方面，隨著輻射劑量的增加而減少。因為滅菌的輻射照射劑量比消滅昆蟲類的劑量更高⁽⁹⁴⁾，因此達到滅菌效果的 8 kGy 劑量時，昆蟲類也同時被消滅。由實驗證實，4 kGy - 6 kGy 的輻射照射劑量，能抑制微

生物的生長，8 kGy 照射可達到徹底滅菌的效果。

抗氧化劑是能減緩或防止氧化作用的分子。依 Halliwell 的定義為：在相對可氧化物質（醣類、脂質或核酸等）最低的濃度下，能有效地延緩或阻止其發生氧化反應的物質，皆稱為抗氧化劑⁽¹⁰⁵⁾。天然物的抗氧化力評估方法很多，大致可分為抗脂質過氧化能力、清除自由基能力、還原力及螯合力等四類，其中常被用於代表總抗氧化能力者，以還原力中的 FRAP 法及清除 ABTS 自由基的 TEAC 法最被接受。

DPPH 法於 1958 年 Blois 首次將 DPPH 法應用於抗氧化劑的篩選研究，近年來該方法在抗氧化劑研究中受到普遍重視，它克服了傳統方法的一些缺陷，具有快速、簡便、靈敏、易檢測和直接可行的優點，被廣泛用於抗氧化劑的研究，DPPH 在有機溶劑中是一種穩定的自由基，其結構中含有 3 個苯環，1 個氮原子上有 1 個單電子，其溶液呈深紫色，在 517 nm 有強吸收。有自由基清除劑存在時，DPPH· 的單電子被配對而使其顏色變淺，在最大吸收波長處的吸光度變小，而且這種顏色變淺的程度與配對電子數成化學劑量關係，從而用於評價實驗樣品的抗氧化能力。該反應必須在避光條件下進行，另外反應體系的 pH 值應調至 7.4 左右，最好在緩衝液體系中進行⁽¹⁰⁶⁾。

酚類被認為是抗氧化活性測量之主要的成分，其測量結果基於許多不同清除自由基的抗氧化能力因素，如芳香環上羥基的數量及其相對的位置

等⁽¹⁰⁷⁾。而本論文針對何首烏中藥材萃取物進行抗氧化活性（選用 TEAC 結果代表總抗氧化活性）及其所含多酚結構成分關係之評估，在抗氧化活性及抗氧化成分比較之實驗方面，何首烏藥材分別照射 5 kGy、10 kGy 和 15 kGy 的結果顯示，以照射 5 kGy 有最好的抗氧化活性及最低對 DPPH 自由基清除率達 50% 時的樣品濃度（即 IC₅₀ 值）。

抗氧化成分實驗結果顯示，所含總多酚類、總類黃酮以照射 5 kGy 為最高，照射 15 kGy 最低，而總黃酮醇之含量照射 5 kGy、10 kGy 和 15 kGy 的結果並無明顯差異。因此，8 kGy 的輻射照射可以達到滅菌效果，可作為何首烏中藥材滅菌最適合之劑量，來延長藥材的架儲期，確保何首烏中藥材的品質。



第六章 結 論

本論文為首次針對何首烏中藥材，以 2kGy、4kGy、6kGy、8kGy、10 kGy 輻射照射之實驗，探討其輻射滅菌的劑量；並以差異較大的 5 kGy、10 kGy、15 kGy 之輻射照射，探討輻射滅菌劑量對抗氧化效果及成分的變化，找出達到最佳輻射滅菌效果的最小吸收劑量。

研究的新發現包括：

1. 輻射滅菌效果方面：

輻射照射 2 kGy 即可消滅腸內菌。

4 kGy 能抑制真菌及酵母菌的生長。

6 kGy 黴菌和真菌即完全滅菌。

8 kGy 照射可達到徹底滅菌的效果。

2. 抗氧化活性方面：

以照射 5 kGy 有最好的抗氧化活性及最低劑量對 DPPH 自由基清除率達 50% 時的樣品濃度（即 IC_{50} 值）。

3. 抗氧化成分方面：

總多酚類、總類黃酮以照射 5 kGy 為最高，照射 15 kGy 最低

總黃酮醇之含量並無明顯差異。

4. 指標成分比較方面：

以 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG) 作為指標成

分，輻射照射後之含量變化隨著輻射劑量愈高其含量降低。

上述之研究成果皆為本論文之新發現，而整體研究則以何首烏中藥材「輻射滅菌劑量」作為主軸，探討經不同劑量之輻射滅菌前後的抗氧化活性、抗氧化成分與指標成分之變化情形，希望能建立何首烏中藥材輻射滅菌劑量，延長藥材的架儲期，確保何首烏中藥材的品質。



參考文獻

1. 林宜信等：台灣中醫藥整合與前瞻，行政院衛生署中醫藥委員會，2003；pp244-252。
2. Farkas J. Irradiation of dry food ingredients. Florida. *CRC Press Inc.* 1988; p2.
3. McKee LH. Microbial contamination of spices and herbs: a review. *Lebensm Wiss Technol.* 1995; 28: 1-11.
4. Kneifel W, Berger E. Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *J Food Prot.* 1993; 57: 893-901.
5. Pafumi J. Assessment of the microbiological quality of spices and herbs. *J Food Prot.* 1986; 49(12): 958-963.
6. 張永勳等：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(2-2)，中醫藥年報第27期第5冊，行政院衛生署中醫藥委員會，2009；p364。
7. Eiss I. Growing impact of irradiation on global production of and trade in spices. Irradiation for food safety and quality. In: Proceedings of FAO/IAEA/WHO. International Conference on ensuring the Safety and Quality of Food through radiation Processing. 2001; pp178-191.
8. Ehrenberg L, Hussain S. Genetic toxicity of some important epoxides. *Mutat Res.* 1981; 86: 1.
9. Kligerman AD, Erexson GL, Phelp ME, Wilmer JL. Sister-chromatid

- exchange induction of peripheral blood lymphocytes of rats exposed to ethylene oxide by inhalation. *Mutat Res.* 1983; 120: 37-44.
10. Pfeiffer EH, Dunkelberg H. Mutagenicity of ethylene oxide and propylene oxide and of the glycols and halohydrins formed from them during the fumigation of foodstuffs. *Food & Cosmetics Toxicology.* 1980; 18(2): 115-118.
 11. Intergovernmental Negotiating Committee. Operation of the interim prior informed consent procedure for banned or severely restricted chemicals in international trade. Proceedings of the Rotterdam convention on the prior informed consent procedure for certain hazardous chemicals and pesticides in international trade. Rotterdam: United Nations Environment Program. 2001; 12.
 12. Farkas J, Andrassy E. Increased sensitivity of surviving bacterial spores in irradiated spices, in *Fundamental and Applied Aspects of Bacterial Spores*, Ed by Dring GJ, Ellar DJ and Gould GW, London: *Academic press.* 1985; 397-407.
 13. Farkas J. Irradiation as a method for decontaminating food: a review. *Int J Food Microbiol.* 1998; 44(3): 189-204.
 14. Ito H, Kamakura G, Sekita H, Kamiyoga S. Distribution of microorganisms in herb medicines and their decontamination by gamma-irradiation. *Shokuuhin-shosha.* 1999; 34(1-2): 16-22.
 15. 周鳳英： γ 射線在中藥滅菌之研究，中藥用藥安全及輻射滅菌研討會，

- 行政院衛生署中醫藥委員會，2006；pp58-59。
16. 周鳳英：中藥材有無經輻射照射之檢測方法研究，中醫藥年報第 28 期第 4 冊，行政院衛生署中醫藥委員會，2010；p321。
 17. 姚俊旭：鈷六十加馬射線在中藥材儲存條件之研究與評估，中醫藥年報第 20 期第 2 冊，行政院衛生署中醫藥委員會，2002；p73。
 18. 姚俊旭：鈷六十加馬射線在中藥材儲存條件之研究與評估(II)，中醫藥年報第 21 期第 3 冊，行政院衛生署中醫藥委員會，2002；p390。
 19. 陳家杰：四種常用中藥材輻射滅菌後對其療效指標成分的影響研究，中醫藥年報第 22 期第 6 冊，行政院衛生署中醫藥委員會，2003；pp25-35。
 20. 吳孝芸：包裝與存放對赤芍、白芍及延胡索之品質影響的研究，中醫藥年報第 22 期第 6 冊，行政院衛生署中醫藥委員會，2003；pp41-64。
 21. 國家藥典委員會：中華人民共和國藥典一部，中國醫藥科技出版社，2010；pp126-127。
 22. 大陸衛生部文件，衛藥發[1997]第 38 號，「 ^{60}Co 輻照中藥滅菌劑量標準」(內部試行)，衛生部辦公廳，1997 年 5 月 21 日印發。
 23. 行政院衛生署中華藥典中藥集編修小組：中華中藥典第一版，臺北，2004；p80。
 24. 宋，唐慎微：證類本草，人民衛生出版社，北京，1957；p262。
 25. 宋，蘇頌：本草圖經，安徽科學技術出版社，合肥，1994；p314。

26. 宋，寇宗奭：本草衍義，商務印書館，上海，1937；p71。
27. 元，忽思慧：飲膳正要，人民衛生出版社，中國，1985；p69。
28. 明，蘭茂：滇南本草，雲南科技出版社，昆明，2004；p59。
29. 明，劉文泰：本草品彙精要(上)，南天書局，台北，1983；p394。
30. 明，陳嘉謨：本草蒙荃，人民衛生出版社，北京，1988；p68。
31. 明，李時珍：本草綱目，人民衛生出版社，北京，1982；p1288。
32. 明，杜文燮：藥鑑，香港印書館，香港，1976；p119。
33. 明，繆希雍：「炮炙大法」釋義，山西科學技術出版社，太原，2009；
P112。
34. 明，李中梓：雷公炮製藥性解，中國醫學大成(二)，岳麓書社，長沙，
1990；p140。
35. 明，李中梓：本草征要，李中梓醫學全書，中國中醫藥出版社，北京，
1999；p124。
36. 明，盧之頤：本草乘雅半偈，人民衛生出版社，北京，1986；p588。
37. 清，陳士鐸：本草新編，中國中醫藥出版社，北京，2008；p91。
38. 日，稻宣義：炮炙全書，中醫古籍出版社，北京，1981；p76。
39. 清，汪昂：本草易讀，人民衛生出版社，北京，1987；p229。
40. 清，汪昂：本草備要，中國中醫藥出版社，北京，1998；p 56。
41. 清，張璐：本經逢原，中國中醫藥出版社，北京，2007；p115。

42. 清，葉桂：本草經解，上海科學技術出版社，上海，1958；p7。
43. 清，陳念祖，神農本草經讀，人民衛生出版，北京，1959；p47。
44. 清，姚瀾：本草分經，上海科學技術出版社，上海，1989；p116。
45. 清，楊時泰：「本草述鈞元」釋義，山西科學技術出版社，太原，2009；p 442。
46. 清，蔣居祉：本草擇要綱目，珍本醫書集成，本草類，上海科學技術出版社，上海，1985；p76。
47. 清，嚴西亭：得配本草，中國中醫藥出版社，北京，1997；p125。
48. 清，凌奐：本草害利，中醫古籍出版社，北京，1982；p61。
49. 清，陳其瑞：本草撮要，珍本醫書集成，本草類，上海科學技術出版社，上海，1985；p11。
50. 清，張秉成：本草便讀，上海衛生出版社，上海，1957；p31。
51. 清，周岩：本草思辨錄，人民衛生出版，北京，1960；p71。
52. 宋，佚名：增廣太平和劑圖經本草藥性總論，增廣太平惠民和劑局方，海南出版社，海口，2002；p 453。
53. 清，沈金鰲：要藥分劑，上海科學技術出版社，上海，1959；p102。
54. 國家中醫藥管理局中華本草編委會：中華本草，上海科學技術出版社，1999，卷 2；pp 671-674。
55. 周榮漢、段今廩：植物化學分類學，上海科學技術出版社，2005；pp

582-583。

56. 中國科學院中國植物志編輯委員會：中國植物志，科學出版社，1998；
25(1)：pp102-103。
57. Flora of China 第五卷，<http://www.flora.ac.cn/cncontent.aspx?TaxonID=112640>
58. 鄭虎占等：中藥現代研究與應用第三卷，學苑出版社，1998；
pp2312-2313。
59. 李建北、林茂：何首烏化學成分的研究，中草藥，1993；24(3)：115-118。
60. 周立新、林茂：何首烏乙酸乙酯不溶部分化學成分的研究，藥學學報，
1994；29(2)：107-110。
61. 陳萬生、楊根金：制首烏中兩個新化合物，藥學學報，2000；35(4)：
273-276。
62. 李家實：中藥鑑定學，上海科學技術出版社，1996；pp62-63。
63. 康廷國：中藥鑑定學，中國中醫藥出版社，2003；p 77。
64. 蕭培根：當代藥用植物典-第 2 冊，香港賽馬會中藥研究院有限公司，
2006；p 241。
65. 楊秀偉、顧哲明、馬超美、H Masao、N Tsuneo：何首烏中一個新的吲
哚衍生物，中草藥，1998；29(1)：5-11。
66. 科學教育館，[http，//vm，nthu，edu，tw/science/shows/nuclear/rad/index](http://vm.nthu.edu.tw/science/shows/nuclear/rad/index)，

html.

67. <http://www2.nsysu.edu.tw/COHP/institute/files/97-2.pdf>
68. Atkin's Physical Chemistry, 8e : 984. www.cyut.edu.tw/lms_history/982/sysdata/30/11130/doc/.../452161.doc
69. 輻射的應用，核能天地，1992：9 月號。 http://www.aec.gov.tw/www/knowledge/index_02_1-2.php。
70. 徐濤、陳範欣：中藥輻射滅菌的原理和安全評價，中草藥，2005；36(5)：792-793。
71. 陳家杰：中藥材輻射滅菌之應用，核研季刊，1999；31：pp57-60。
72. 李韋華譯：輻照食品的安全性及其國際利用動向同位素與輻射技術，2003；pp19-23
73. 行政院衛生署令，發文日期：2006 年 10 月 26 日 發文字號：署授藥字第 0950003236 號，附件：中藥製劑含有害物質限量標準及其適用範圍表
74. 行政院衛生署公告「中藥濃縮製劑加味逍遙散等 10 個處方含微生物限量」發文日期：2008 年 9 月 15 日 發文字號：署授藥字第 0970003102 號。
75. 張啟明、何穎、盧鵬偉等：不同滅菌方法滅菌效果及對目標成分影響考察，河南大學學報(醫學版)，2005；24(1)：29-31。
76. 胡磬、劉幼軍：HPLC 法測定安息香在 ^{60}Co - γ 射線輻照前後肉桂酸的含

- 量，中成藥，1998；20(10)：42。
77. 楊德泉、錢淑、章榮： ^{60}Co - γ 射線輻照三種中藥對成分的影響研究，
基層中藥雜誌，1997；11(4)：36。
78. 雷曦、申鴻： ^{60}Co - γ 射線輻照貯藏中藥材對其主要成分的影響，中國藥
房，2002；13(2)：119-120。
79. 范鐵林、李耀維、劉振國等：輻射滅菌對 10 種中藥有效成分含量的影
響，山西農業大學學報，1999；19(4)：337-339。
80. 陳瑞珍，黨參的輻射貯藏，福建中醫藥，2006；37(6)：55。
81. 劉美輝、金順福、濮存海：土蠶蟲 ^{60}Co 輻照滅菌效果，中藥材，2004；
27(11)：808-809。
82. 李奉勤、馬振嗣、史冬霞等：不同劑量 ^{60}Co - γ 射線輻照對三黃片中
大黃粉含量及消毒效果的影響，中國消毒學雜誌，2006；23(4)：317-318。
83. 李奉勤、史冬霞、馬振嗣等：探討 ^{60}Co - γ 射線輻照對蜈蚣等 5 種蟲類
藥材滅菌效果的影響，時珍國醫國藥，2006；17(12)：607-608。
84. 王贊英、賈志林：胎寶膠囊輻照滅菌效果的考察，新疆中醫藥，1998；
16(4)：38。
85. 張良、王玉萍、萬春豔等： ^{60}Co 輻照對熊膽滴眼劑的影響，中國林副
特產，2000；(1)：17。
86. 桂卉、蕭錦仁、羅傑英：不同劑量 ^{60}Co 輻射對接骨七厘片滅菌效果的

- 考察，湖南中醫學院學報，2002；22(3)：25-26。
87. 李奉勤、史冬霞、範文成等：考察不同劑量 ^{60}Co - γ 射線輻照對冠心膠囊滅菌效果和含量的影響，中國實驗方劑學雜誌，2006；12(3)：5-6。
88. 李奉勤、史冬霞、葉曉紅：冠心膠囊輻照滅菌後的穩定性考察，時珍國醫國藥，2007；18(8)：1893。
89. 張賢哲、蔡貴花：中藥炮製學，中國醫藥學院，2003；p187。
90. 周鳳英：中藥材輻射滅菌劑量及包材評估研究(2-1)，中醫藥年報第 27 期第 5 冊，2009；p93。
91. Wen HW, Wang YT, Chung HP. Efficacy of gamma irradiation for protection against postharvest insect damage and microbial contamination of the adlay. *Postharvest Biol Technol.* 2008; 50 (2-3): 208-15.
92. Janovsky I. Response of three types of aqueous chemical dosimeters to gamma and electron radiations in the dose range 0.1-10 kGy. *Int J Radiat Appl Instrum.* 1986; 37(1): 61-3.
93. Wen HW, Chung HP, Chou FI, Lin IH, Hsieh PC. Effect of gamma irradiation on microbial decontamination, and chemical and sensory characteristic of Lycium Fruit. *Radiat Phys Chem.* 2006; 75: 593-603.
94. 周鳳英：中藥材輻射滅菌劑量及包材評估研究(2-2)，中醫藥年報第27期第5冊，2009；p 138。
95. Chang TN, Huang GJ, Ho YL, Huang SS, Chang HY, Chang YS.

- Antioxidant and antiproliferative activities of *Crossostephium chinensis* (L.) Makino. *Am J Chin Med.* 2009; 37: 797-814.
96. Huang DJ, Chen HJ, Lin CD, Lin YH. Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) constituents. *Bot Bull Acad Sin.* 2005; 46: 99-106.
97. Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem.* 1995; 43: 27-32.
98. Huang DJ, Lin CD, Chen HJ, Lin YH. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) constituents. *Bot Bull Acad Sin.* 2004; 45: 179-86.
99. Chang HC, Huang GJ, Agrawal DC, Kuo CL, WuCR, Tsay HS. Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as Gusuibu. *Bot Stud.* 2007; 48: 397-406.
100. Jagetia GC, Baliga MS. Evaluation of the radioprotective action of geriforte in mice exposed to different doses of γ -irradiation. *Am J Chin Med.* 2004; 32(4): 551-67.
101. Mathew S, Abraham TE. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chem.* 2006; 94: 520-528.
102. 林宜信等：台灣中醫藥現代化及國際化研究思路，行政院衛生署中醫藥委員會，2006；pp150-172，227。

103. 行政院衛生署中醫藥委員會，研究發展區 / 委託研究計畫 <http://www.ccmp.gov.tw/public/public.asp?selno=1309&relno=1309&level=C>。
104. Younes MWF, Shehata NF, Mahmoud YA. Histopathological effects of gamma irradiation of the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saund.) female gonads. *J Appl Sci Res.* 2009; 5(3): 305-10.
105. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1987; 1: 358-364.
106. 謝伯舟：臺灣產佛來明豆屬植物之藥效研究，中國醫藥大學藥學院中國藥學暨中藥資源學系博士論文，2011。
107. Rahman A, Rahman MM, Mominul IS, Mashiar R, Sheik MMI, Rahman MM, *et al.* Free radical scavenging activity and phenolic content of *Cassia sophera* L. *Afr J Biotechnol.* 2008; 7(10): 1591-3.

貳、台灣蒲公英及其誤用品之分子鑑定研究

第一章 緒論

近年來西藥研發已面臨重大瓶頸，使得傳統中草藥替代療法（Alternative medicine）的風潮，成為備受注目的研究重點。1996 及 1997 年世界衛生組織（World Health Organization, WHO）公布「草藥評估準則（Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines）」及「適當的使用草藥準則（Guideline for Appropriate Use of Herbal Medicine）」，主要目的是供會員國參考，建立中草藥適當的法規、品質管制、安全性及藥效的評估標準，進而協助會員國將草藥的發展列入國家政策與執行計畫之考量。

由於中草藥藥材主要來自動、植及礦物等天然物，其品質之優劣因其產地、栽種、採收時期及貯存條件而異，導致藥材的變異性大，無標準化之規格。因此 WHO 於 1998 年又公布「藥用植物原料品質管控方法（Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials）」與「藥品的基本檢驗：藥物物質、藥用植物原料和劑型（Basic Tests for Drugs: Pharmaceutical Substances, Medicinal Plant Materials and Dosage Forms）」，為因應全球醫藥產業大力投注於草藥療效研發的趨勢，歐盟、美國相繼成立中草藥的管理單位，制訂藥品研發、試驗、進出口的相關法規。美國食品藥物管理局(FDA) 亦於 2000 年公布「植物性藥品審查準則草案（The Draft of Guidance for Industry

Botanical Drug Products)」，使得傳統的藥用植物得以發展為藥品，促成中草藥有機會研發為新藥的利基⁽¹⁾。

行政院衛生署 1982 年公布藥品優良製造標準 (GMP) 後，西藥製藥廠及濃縮中藥製藥廠需取得 GMP 之核准與認可，繼於 1991 年 6 月 27 日公告，自 1991 年 7 月 1 日起中藥傳統劑型藥品製造亦需依「優良藥品製造標準」注意事項加以實施⁽¹⁾；行政院經濟部於 2000 年 5 月召開第四次生物技術產業策略 (SRB) 會議中，提出「中草藥產業技術發展五年計畫」，積極推動中草藥產業技術發展；行政院衛生署亦於 2000 年 5 月 2 日公告全面實施中藥 GMP 製造規範，要求傳統中藥廠於 2005 年 3 月 1 日起均須符合 GMP 製造規範，訂定藥品 CMC (Chemistry, Manufacture and Control) 規範，以提升台灣中草藥國際化之競爭力⁽²⁾；目前有百餘家 GMP 中藥廠已全面實施，達到中草藥產品品質符合安全有效、均一及再現性的目標。

台灣發展中草藥的最大優勢為具備優良的中草藥製造技術，然而由於受限於栽種面積及昂貴工資等因素，大約 90% 中藥材皆需仰賴中國進口，貨源與價錢受制之外，品質上亦難以掌控，成為重要的瓶頸。大陸的許多藥材因大量採集使得某些物種瀕於滅絕，而採用偽劣品替代；人工種植的藥材則為追求量產，導致品種退化及品系混雜，使得藥材的藥用成分含量大幅降低，又因各產地栽培方法及採收時期不同，藥材的變異性大，各批次產品品質無法穩定再現，甚至農藥及重金屬殘留及產銷脫節等問題也日

益嚴重。目前台灣市售中草藥也由於藥材來源混淆、同名異物及同物異名的情形，經常發生誤用、混用或以偽劣藥材替代等問題，嚴重影響療效及用藥之安全性。因此如何有效鑑定並管控藥材，以提升台灣中草藥品質及確保國人健康，為當前刻不容緩的重要課題⁽¹⁾。

中藥材種類繁多，來源複雜，各地藥材品種使用習慣不盡相同，因地域、時代等因素常有同名異物、同物異名現象，加上後人未詳查，可能將錯誤的用藥習慣延續傳承導致發生混亂使用的現象。市場上時有以假亂真、以劣品冒充的情況。商品市場除正品外，尚有代用品、偽品和混淆品，品質差異很大^(3,4)。為了確保中藥產品的安全有效，保障中藥材成分的一致性，建立一種準確、迅速、簡便的品質鑑定與規格化的方法確為重要任務之一。

正確的用藥，是藥物確具療效之首要因素；五官鑑別為早期中藥鑑別之方式，但藥材的外觀性狀易受多種因素的影響而變化。顯微鑑別是利用顯微鏡觀察藥材的內部組織構造、細胞形狀及其內含物的特徵，是目前用以鑑定藥材真偽最常用方法之一⁽¹⁾。由於傳統顯微鑑定之操作技術及判讀組織異同之難度較高，且全草用藥之植物藥材必須採取多處不同部位檢驗，若經研磨成藥粉，植物樣品的組織形態被破壞，鏡檢結果判讀不易。也可利用分析儀器，如層析圖譜之鑑別（薄層層析圖譜、氣相層析圖譜、高效液相層析圖譜等）、光譜鑑別（紫外光、紅外光、螢光、原子吸收、核磁

共振、質譜、X-射線繞射等)⁽⁵⁾ 來獲得各類不同之訊息資料，作為藥材定性與定量規格化之方法。以美國食品藥物管理局於植物藥產品之指引 (Guidance for Industry Botanical Drug Products) 為例⁽⁶⁾，規定對於其原料之鑑別須檢附分光光度圖譜 (如UV、IR、FT-IR、MS) 及層析指紋圖譜 (如TLC、2D-TLC、HPLC、GC)；世界衛生組織亦接受此技術，以確保植物性藥品原料及成品之品質⁽⁷⁾。然而因為中藥活性成分含量受到其生長條件、採收時間、儲藏等諸多因素的影響，差異頗大，而分析儀器之數據資料，對化學成分相似的近緣物種也不易區分。

中草藥分子鑑定 (Authentication by molecular biology methods) 是運用植物藥材DNA分子遺傳標記技術 (DNA genetic marker technology)，可直接分析中草藥原植物的基因型而非表現型 (如型態及化學成分)，不受材料來源、環境因素及樣品形態 (原品、飲片或粉末) 影響，少數樣品即可進行實驗做鑑定^(8,9)。具有重複性好、靈敏度高的優點，為中草藥品種鑑定強大的工具。由測定植物藥材之基因片段的核苷酸序列，選擇一對合適的基因片段進行序列測定與分析，並比較序列間的差異來確定正品與代用品、偽品或混淆品各類群間有鑑別意義的特異性位點，從而達到鑑定的目的。因此，發展分子鑑定及檢驗方法，可使中草藥之基原鑑定更加完備⁽¹⁾。

恆溫圈環式核酸擴增法 (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP)⁽¹⁰⁾ 為 Notomi 等於 2000 年開發的一種有別於 PCR 的恆溫核酸擴增方

法，其特點是針對目標基因中的 6 個特異區域設計 4 種特異引子(Primer)，在恆溫條件下(60 - 65℃)利用一種具有鏈置換活性(Chain displacement activity)的 DNA 聚合酶(*Bst* DNA polymerase)，保溫幾十分鐘，即可完成核酸擴增(Amplification)反應。並不需要反覆對模版(Template) DNA 進行熱變性(Denaturation)及長時間的溫度迴圈。LAMP 是一種特別的 DNA 擴增方法，具有簡單、快速、特異性強的特點，為大多以 PCR 技術為基礎的中草藥分子鑑定技術，提供了一種強而有力的新方法。

本研究針對臺灣市售易混用及誤用的中藥材，進行分子鑑定之相關研究。由於歷代本草對於藥材植物型態描述不夠詳盡，各地區用藥和使用習慣不同，以及藥材長期栽種造成品系混淆等問題，使得正品藥材不易取得，因此選用市場需求量大、全草藥用且曬乾後形態不易判別之台灣蒲公英 (*Taraxacum formosanum* Kitamura) 正品植物，並與其混、誤用植物等 (adulterants) 進行鑑定。根據「臺灣植物誌」⁽¹¹⁾、「中藥檢驗方法專輯(十二)-易混淆及誤用藥材之鑑別(I)」⁽¹²⁾及「台灣市售中藥材真偽及代用品圖集」⁽¹³⁾等資料，針對台灣蒲公英及可能之替代植物種類：西洋蒲公英 (*Taraxacum officinale* Weber)、刀傷草 (*Ixeridium laevigatum* (Bl.) Sch.)、黃鵪菜 (*Youngia japonica* L.)、兔兒菜 (*Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai)、紫背草 (*Emilia sonchifolia*) 等植物，收集及比對其學名、植物形態特性。於 NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information 美國國立生物技術研究中心

基因組資料庫) 資料庫搜尋中草藥已登錄之基因序列，多重比對，再依據分子鑑定方法操作選用 ITS 2 序列為分子標誌，設計專一性引子，加入所抽取藥材之 Genomic DNA，進行標的核酸序列之 PCR 擴增反應。並於標準檢測方法建立完成後，即針對市售藥材進行檢體之核酸擴增分析試驗，以確認該分子鑑定方法的有效性。

同時，本研究也應用 LAMP 方法，針對 ITS 2 序列設計台灣蒲公英正品藥材之高特異性 LAMP 引子對，藉由 LAMP 引子的反應性測試，反應時間、特異性及靈敏度試驗，建立一套可快速且靈敏鑑定台灣蒲公英中藥材及其混、誤用藥材之基因組鑑別的方法；而該方法之建立，除了提供發展中草藥之分子基原鑑定的模式研究外，未來亦可做為藥材基原之品質管制的替代方法之一，落實中草藥之基原鑑定及品質管制。

第二章 總論

第一節 蒲公英之文獻考察

一、蒲公英之本草考察

《備急千金藥方》⁽¹⁴⁾卷二十五：「蒲黃散，治從高墜下，有瘀血方。蒲黃（八兩）附子（一兩）上二味，為末，酒服方寸匕，日三，不知增之，以意消息。又方：以鳧公英草摘取根莖白汁塗之，多塗為佳，瘥止。」

《新修本草》⁽¹⁵⁾卷十一：「蒲公英，味甘，平，無毒。主婦人乳癰腫，水煮汁飲之，及封之，立消。一名構耨草。葉似苦苣，花黃，斷有白汁，人皆啖之。」（新附）

《千金翼方》⁽¹⁶⁾卷第三：蒲公英，味甘，平，無毒。主婦人乳癰腫，水煮汁飲之，及封之，立消。一名構耨草。

《本草圖經》⁽¹⁷⁾卷九：蒲公英，舊不著所出州土，今處處平澤田園中皆有之。春初生苗，葉如苦苣，有細刺；中心抽一莖，莖端出一花，色黃如金錢；斷其莖有白汁出，人亦啖之。俗呼為蒲公英，語訛為什公罌是也。水煮汁以療婦人乳癰，又搗以傅瘡，皆佳。又治惡刺及狐尿刺，摘取根莖白汁塗之，惟多塗立瘥止。此方出孫思邈《千金方》。

《類證本草》⁽¹⁸⁾卷十一：蒲公英。蒲公英，味甘，平，無毒。主婦人乳癰腫，水煮汁飲之及封之，立消。一名構耨草。唐本注云：葉似苦苣，花黃，斷有白汁，人皆啖之。（唐本先附）臣禹錫等謹按蜀本圖經云：花如

菊而大。莖、葉斷之俱有白汁，堪生食。生平澤田園中，四月、五月採之。

《本草衍義》⁽¹⁹⁾卷十二：「蒲公英，今地丁也，四時常有花，花罷飛絮，絮中有子，落處即生。所以庭院間亦有者，蓋因風而來也。」

《滇南本草》⁽²⁰⁾卷三：「蒲公英，又名婆婆丁。味苦、平，性微寒。」

《本草品匯精要》⁽²¹⁾卷十五：「蒲公英，無毒，植生。蒲公英主婦人乳癰腫，水煮汁飲之及封之，立消（《名醫》所錄）。」

《藥性歌括四百味》⁽²²⁾：「蒲公英，苦，潰堅消腫，結核能除，食毒堪用。」

《本草蒙筌》⁽²³⁾卷三：「蒲公英。蒲公英（即黃花地丁草），味苦，氣平。無毒。一云構耨草，俗呼孛孛丁。潰癰腫，消結核屢著奇功；解食毒，散滯氣每臻神效。」

《本草綱目》⁽²⁴⁾卷二十七：「蒲公英《唐本草》。俗呼蒲公英，又呼黃花地丁。淮人謂之白鼓釘，蜀人謂之耳癩草，關中謂之狗乳草。」

《炮製大法，草部》⁽²⁵⁾：蒲公英（自採鮮者，入湯藥煎，入丸末，敷瘡毒搗爛用）。

《雷公炮製藥性解》⁽²⁶⁾卷四：「蒲公英，味苦甘，性寒無毒，入脾胃二經。化熱毒，消惡瘡結核，解食毒，散滯氣。」

《野菜譜》⁽²⁷⁾：白鼓丁，一名蒲公英，四時皆有，極寒，天小而可用，採之熟食。

《本草擇要綱目，平性藥品》⁽²⁸⁾：「蒲公英〔氣味〕甘平無毒。入足少陰腎經君藥。〔主治〕婦人乳癰水腫。散滯氣，化熱毒。擦牙烏鬚髮。壯筋骨。亦可入陽明太陰經。」

《本草新編》⁽²⁹⁾卷四：「蒲公英，味苦，氣平，無毒。入陽明、太陰。潰堅腫，消結核，解食毒，散滯氣。」

《炮製全書》⁽³⁰⁾卷二：「蒲公英，苦、甘，寒，三四月採，陰乾。」

《本草易讀》⁽³¹⁾卷六：「蒲公英，波波丁。甘，平，無毒。足少陰藥也。」

《本草備要，草部》⁽³²⁾：「蒲公英，一名黃花地丁。瀉熱，解毒，甘平。」

《本經逢原》⁽³³⁾卷三：「蒲公英，俗名奶汁草，苗高尺餘者良。」

《生草藥性備要》⁽³⁴⁾上卷：「蒲公英，味甜，性寒。治乳癰，消疽惡毒瘡，滋陰、黑髮。一名殘飛墜。一名黃花地丁。」

《本草從新》⁽³⁵⁾卷十一：「蒲公英，一名黃花地丁，瀉熱解毒。苦甘寒。」

《要藥分劑》⁽³⁶⁾卷六：「蒲公英，味甘，性平，無毒。」

《得佩本草》⁽³⁷⁾卷五：「蒲公英，解食毒，散滯氣，化熱毒，消疔腫。」

《本草求真·上編》⁽³⁸⁾：蒲公英（柔滑）消胃熱，涼肝血，療乳癰、乳岩。

《本草分經，原例》⁽³⁹⁾：「蒲公英。苦甘寒，入腎陽明經，瀉熱化毒，專治乳癰疔毒，亦為通淋妙品。」

《本草述鈞元》⁽⁴⁰⁾卷九：「蒲公英。一名構耨草，即黃花地丁。」

《植物名實圖考》⁽⁴¹⁾：「蒲公英。蒲公英，唐本草始著錄，即蒲公英也。」

《草木便方今釋》⁽⁴²⁾：「蒲公英，甘平化毒，療疽乳癰消腫速。能通五淋拔毒刺，外科要藥腫毒伏。」

《本草撮要》⁽⁴³⁾卷一：「蒲公英，味甘平苦寒。入足陽明厥陰少陰經。功專化熱毒。解食毒。治腫核通淋。」

《本草便讀，菜部》⁽⁴⁴⁾：「蒲公英，蒲公英走陽明散熱疏邪。兼能解毒。」

《中藥志》⁽⁴⁵⁾：「蒲公英 本品為較常用中藥。商品主要為菊科植物蒲公英屬多種植物的全草。」

《中藥材手冊》⁽⁴⁶⁾：「蒲公英（《綱目》列入菜部柔滑類）。」

《全國中草藥匯編》⁽⁴⁷⁾：「蒲公英 別名：黃花地丁、婆婆丁。」

《中藥大辭典》⁽⁴⁸⁾：「蒲公英《唐本草》〔異名〕鳧公英《千金方》，蒲公英。」

《中醫大辭典·中藥分冊》⁽⁴⁹⁾：「蒲公英出《新修本草》。」

《中國醫學百科全書·中醫學》⁽⁵⁰⁾：「蒲公英 始載於《新修本草》。原名蒲公英……。」

《全國中藥炮製規範》⁽⁵¹⁾：「蒲公英 [處方用名] 蒲公英。春至秋季花初開時採挖，除去雜質，洗淨，乾燥。藥材以葉多、色灰綠、根長者為佳。」

《中國藥材學》⁽⁵²⁾：「蒲公英〔別名〕黃花地丁，婆婆丁，奶汁草。」

《中國中醫藥學主題詞表》⁽⁵³⁾：「蒲公英 *Taraxacum mongolicum* 屬菊

科和清熱解毒藥。」

《普通高等教育中醫藥類規劃教材·中藥學》⁽⁵⁴⁾：「蒲公英《新修本草》為菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. Mazz. 及其多種同屬植物的帶根全草。」

《中華本草》⁽⁵⁵⁾：「蒲公英《本草圖經》〔異名〕鳧公英《千金方》。」

《本經逢原》，殘飛墜《生草藥性備要》，黃狗頭《植物名實圖考》，卜地蜈蚣、鬼燈籠《草木便方》，黃花草、古古丁《江蘇植藥志》。



二、臺灣蒲公英及其誤混用之植物學考察

臺灣蒲公英 (*Taraxacum formosanum* Kitanlura) 可能之替代藥材包括⁽¹²⁾：蒲公英屬的西洋蒲公英 (*Taraxacum officinale* Weber)、小苦蕒屬的刀傷草 (*Ixeridium laevigatum* (Bl.) Sch.)、黃鵪菜屬的黃鵪菜 (*Youngia japonica* L.)、苦蕒菜屬的兔兒菜 (*Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai)、紫背草屬的紫背草 (*Emilia sonchifolia*) 等；臺灣蒲公英及西洋蒲公英最主要之形態差異在於總苞部位，西洋蒲公英最外層總苞向下反轉，臺灣蒲公英則無此現象。其他可能之替代藥材與蒲公英的形態於葉形、株形、花穗、花色或頭狀花朵單重瓣皆有不同程度之差異。多年生草本，花莖莖狀、中空。葉基生，葉緣倒齒狀、羽狀裂片或全裂，稀為全緣。舌狀頭花大而明顯，單一。總苞橢圓形或鐘形，兩層。花冠黃色，稀為白色；瘦果卵形或紡錘形，具明顯而長的喙。冠毛白色，明顯，宿存⁽¹⁾。

(一) 蒲公英屬(*Taraxacum*)臺灣有兩種⁽⁵⁶⁾。

種檢索表

1. 總苞片尖端具突出之附屬物，外層總苞片平貼.....1. 臺灣蒲公英

T. formosanum

1. 總苞片尖端不具突出之附屬物，外層總苞片明顯反捲.....2. 西洋蒲公英

T. officinale

1. 臺灣蒲公英 *Taraxacum formosanum* Kitam. ^(11,56)

幼葉兩面被毛，成熟後變無毛；葉倒披針形至線披針形，8-20 X 1-4 cm，先端鈍，基部漸尖成為有翅的葉柄；羽狀分裂，裂片三角形。頭花直徑 3.5-4.5 cm。瘦果褐色，長橢圓形，喙長 7-9 mm。

零星分佈於台中以北的濱海地區。



圖 2-1 臺灣蒲公英植物型態圖⁽¹¹⁾ 2-2 臺灣蒲公英植物外觀圖⁽⁵⁶⁾

2. 西洋蒲公英 *Taraxacum officinale* Weber ⁽⁵⁶⁾

葉下表面中肋被毛；葉倒披針形，6-40 X 0.7-5 cm，葉緣倒鋸齒羽裂或裂片，裂片程度變化極大。花莖 5-50 cm 高。總苞片初平展，漸反捲。

原產歐洲，廣泛歸化於世界各地。臺灣分佈於低至高海拔（0-3,000 m）開闊地，台北市安全島草坪常見。



圖 2-3 西洋蒲公英植物型態圖⁽⁵⁶⁾

圖 2-4 西洋蒲公英植物及瘦果外觀⁽⁵⁶⁾

(二) 小苦蕒屬 (*Ixeridium*)⁽⁵⁶⁾

多年生直立草本；具主根莖或短匍匐莖。葉多基生，少或無莖生葉。

頭花舌狀，頂生，繖房狀排列；總苞圓柱形或鐘形，總苞片兩層，外層副萼狀；頭花具 5-12 朵舌狀花，黃色，白或略帶紫色。瘦果紡錘形，具長喙；冠毛黃褐色。

種檢索表

1. 總苞內層苞片 8-10 枚，稀為 5 枚；頭花具 8-11 朵舌狀花；冠毛長 2.5-3 mm..... 1. 刀傷草 *Ixeridium laevigatum*

1. 總苞內層苞片 5 枚，偶為 7 枚；頭花具 5-7 朵舌狀花；冠毛長 4-5 mm..... 2. *I. transnokoense*

1. 刀傷草 *Ixeridium laevigatum* (Blume) J. H. Pak & Kawano

多年生草本，植株變化極大，高可達 90 cm。基生葉革質，橢圓形至倒披針形，葉尖鈍，近全緣或不規則牙齒狀至羽狀分裂，5-25(-50) X 0.8-5 cm；莖生葉 1-3 枚，披針形。

廣泛分佈於低、中海拔之海岸、河床、路旁開闊地。



圖 2-5 刀傷草植物型態圖⁽⁵⁶⁾



圖 2-6 刀傷草花的外觀⁽⁵⁶⁾



圖 2-7 刀傷草植物外觀⁽⁵⁶⁾

(三) 黃鵪菜屬(*Youngia*)⁽⁵⁶⁾

一、二年生至多年生草本。莖分枝，葉基生及莖生。總苞圓柱狀或鐘狀，兩層，外層副萼狀。花冠黃色。瘦果長橢圓形至線形，稍扁平，具 10-20 條稜無喙或具短喙；冠毛白色，單層。

臺灣有 1 種下的 3 亞種。

亞種檢索表

1. 頭花盛開時直徑大於 1.5 cm；總苞長 6-8 mm.....subsp. *longiflora*
1. 頭花盛開時直徑小於 1.5 cm；總苞長 4-6 mm。
 2. 葉全緣至琴狀羽裂；瘦果褐色，小於 2 mm..... subsp. *japonica*
 2. 葉倒向羽裂；瘦果紅褐色至深紫色，2-2.5 mm 長..... subsp. *formosana*

1. 黃鵪菜 *Youngia japonica* (L.) DC.

a. subsp. *japonica*

二年生草本，全株被疏的細柔毛，基部分枝，高 20-50 cm，花莖有時可抽長至 100 cm。基生葉蓮座狀，倒披針形，琴狀羽分裂。頭花排列為繖房狀；頭花直徑 7-8 mm。瘦果橢圓形，約 1.8 mm 長，褐色，尖端漸縮，具 11-13 道縱稜。冠毛白色，宿存。

分佈於低、中海拔之開闊地，常見雜草。



圖 2-8 黃鶴菜植物型態圖⁽⁵⁶⁾ 圖 2-9 黃鶴菜植物外觀⁽⁵⁶⁾

(四) 苦蕒菜屬 (*Ixerus* Cass.)⁽⁵⁶⁾

一年生或多年生草本，稀為二年生。根莖匍匐或具主根。葉多基生。頭花舌狀，頂生，排列為繖房狀；總苞圓柱狀，總苞片兩層，外層副萼狀；頭花具 15-41 朵舌狀花，黃色，白或略帶紫色。瘦果紡錘形，具長喙；冠毛白色。

臺灣有 6 種。

種檢索表

1. 具長匍匐莖或根莖，節上長根；花莖葶狀，少葉或無葉。
 2. 葉掌狀 3 或 5 裂；外層總苞片長度約為內層苞片的 2/5 至 1/2..... 4. *I. repens*
 2. 葉卵圓形或線披針形，葉全緣或倒鋸齒至羽狀全裂；外層苞片副萼狀，長度約為內層苞片的 1/5 至 1/3。
 3. 葉卵圓形，具長柄..... 5. *I. stolonifera*
 3. 葉線狀披針形，葉基部向下延伸漸窄..... 2. *I. debilis*

1. 莖直立、斜升，或具短走莖，莖上不長節；莖上具多數莖生葉。
4. 莖生葉葉基箭形；頭花成熟時下垂；瘦果具深溝..... 3. *I. polycephala*
4. 莖生葉葉基非箭形；頭花成熟時直立；瘦果具淺溝。
5. 莖生葉葉基耳狀；外層總苞片等長同形..... 1. *I. chinensis*
5. 葉全為基生；外層總苞片長度不一致..... 6. *I. tamagawaensis*

1. 兔兒菜 *Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai

多年生草本，莖直立，基部分枝，高 15-40 cm。下部的莖生葉倒披針形 2-4 枚，8-25 X 0.5-2 cm；中段葉披針形，5-9 cm 長，全緣或、鋸齒緣至羽狀分裂；上部葉鱗片狀，1-3 mm 長。頭花多數排列為鬆散的繖房狀；總苞兩層，外層鱗片狀，內層 8 枚。頭花具 20-25 朵舌狀花，花冠黃色，9-12 mm。瘦果橫切面具 10 道縱稜，4-6 mm 長，具細長喙，喙約 3 mm 長。冠毛白色。

臺灣普遍生長於全島低至中海拔的開闊處。



圖 2-10 兔兒菜植物型態圖⁽⁵⁶⁾



圖 2-11 兔兒菜植物外觀⁽⁵⁶⁾

(五) 紫背草屬(*Emilia*)⁽⁵⁶⁾

一年生或多年生草本，無毛或背毛。葉互生，基生為主，葉緣羽裂，具長葉柄，抱莖或葉基耳狀。筒狀頭花單一或成繖房狀排列，具長總梗；總苞長筒形，總苞片單層，等長，不具副萼；小花花冠紅或黃色，兩性，可稔，花冠5裂。瘦果5稜。冠毛柔細，白色。

臺灣有2種。

種檢索表

1. 葉緣牙齒狀；總苞闊圓柱形（長寬比 2：1），總苞片長約為小花花冠長之 3/4；花冠磚紅色（已烘乾之標本常呈淺的暗橘色或褐色）。1. *E. fosbergii*
1. 葉琴狀羽裂；總苞窄筒形（長為寬的 2-3 倍），小花花冠與總苞等長或僅稍為突出總苞；花冠紫紅色或粉紅色.....2. *E. sonchifolia* var. *javanica*
2. 紫背草 *Emilia sonchifolia* (L.) DC. var. *javanica* (Burm. f.) Mattfeld

一年生草本，多於上部花莖分枝，莖高 20-60 cm，無毛或被疏毛。葉琴狀羽裂，葉下表面紫色。頭花 2-5 朵，頂生，繖房狀排列。小花花冠紫紅色或粉紅色，花冠裂片 1.1-1.5 mm 長。

廣泛分佈於低海拔。



圖 2-12 紫背草植物外觀(攝於中國醫藥大學校園)

第二節 分子鑑定之文獻考察

中草藥分子鑑定(Authentication by molecular biology methods)是運用 DNA 分子遺傳標記技術(DNA genetic marker technology)，直接分析中草藥原植物的基因型而非表現型(如型態及化學成分)，不受材料來源、環境因素、樣品形態(原品、粉末或片狀)影響，樣品少數即可進行實驗^(8,9)。具有重複性好、靈敏度高的優點，為中草藥品種鑑定上強大的工具。其他方法如外觀鑑定法、顯微鑑定法，化學分析皆與藥材的種植環境、採集、儲存和炮製有關。由此可知，DNA 分子鑑定技術為中草藥品種鑑定的最佳方法，其準確度在其他方法之上。運用分子遺傳標記做為中草藥分子鑑定的方法主要有以下幾種：

一、以分子雜交(Hybridization)技術為核心的分子鑑定技術：限制性內切酶片段長度多型性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)⁽⁵⁷⁾ 是最早檢測到 DNA 水準的分子標記技術，日本於 90 年代開始使用此方法於藥用植物分類與中藥材的鑑定⁽⁵⁸⁻⁶²⁾。但是由於 RFLP 存在試驗技術繁瑣，使用放射性物質，合適的分子雜交 DNA 難以篩選，DNA 模版品質要求高、用量大等缺點，限制了其在中藥鑑定領域的發展與應用，近年來相關的研究報導較少。

二、以聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR) 技術為核心的分子

鑑定技術：此類技術廣泛運用於中藥親緣關係、系統分類、品種鑑定的研究。目前應用的方法主要有以下種類，隨機擴增多型性 (Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)⁽⁶³⁾、隨機引子聚合酶連鎖反應 (Arbitrarily-primed polymerase chains reaction, AP-PCR)、聚合酶連鎖反應與擴增片段長度多型性聯用 (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)⁽⁶⁴⁾、擴增片段長度多型性 (Amplified fragment length polymorphisms, AFLP)⁽⁶⁵⁾、直接擴增長度多型性 (Direct amplification of length polymorphism, DALP)⁽⁶⁶⁾、特定序列特異擴增區技術 (Specific sequence characterized amplified region, SCAR)⁽⁶⁷⁾、突變特異性擴增系統 (Amplification Refractory Mutation System, ARMS)⁽⁶⁸⁾、簡單序列重複 (Short sequence repeat, SSR)⁽⁶⁹⁾、簡單序列重複區間 (inter-Simplesequence repeats, ISSR)⁽⁷⁰⁾。

三、以 DNA 序列比對為核心的分子鑑定：此方法藉由測定目標基因片段的核苷酸序列，並比較序列間的差異來確定各類群間有鑑別意義的特異性位點，從而達到鑑定的目的。目前進行 DNA 測序的基因主要有用於植物類藥材的葉綠體基因體 *rbcL* (large subunit of rubulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)、*trnK*、*matK* 與核基因體核糖體基因 18S rDNA、ITS、5S rDNA 基因，以及用於動物類藥材鑑定的線粒體基因組

cyt-b、12s rDNA 基因等。

進行鑑定時針對，要解決的中藥材是科間、屬間、種間還是種內居群間的差異問題，選擇合適的基因片段，進行序列測定與分析。研究植物遺傳變異、親源關係及群落演化等現象，亦常利用細胞核核糖體基因 (ribosomal DNA, rDNA)，包括 18S、5.8S 及 28S 基因密碼區及 internal transcribed spacer (ITS)、external transcription spacer (ETS) 及 internal genetic spacer (IGS) 等間隔區之基因標誌，一般而言，18S、5.8S 及 28S rDNA 由於變異性低，適用於科別之標誌，而 ITS 及 ETS 由於具有協同演化的特性 (concerted evolution)，而且序列長度約為 500bp，適用於屬及種間之鑑別，IGS 序列則適用於種間、種內、品系間之鑑別。

四、運用基因晶片技術在中草藥分子鑑定研究：利用這一技術的前提是應用分子生物學技術找出待鑑定中藥的特定寡核苷酸序列，並將其集成在晶片上。然後提取樣本 DNA 進行擴增，螢光標記後與晶片雜交。若樣本中存在與之互補的序列即可檢測出來⁽⁷¹⁾。

由於中藥在加工、儲存過程中，DNA 會發生不同程度的降解，影響模板品質，因此在用 RAPD、RFLP 等方法進行指紋鑑定時往往難以作出穩定的 DNA 指紋圖譜。要進行 PCR 實驗時，亦需要有良好的實驗設備，對操作者亦需長時間的訓練。對於 PCR 本身的實驗步驟繁雜，其靈敏度受到模

板 DNA 的限制，且 DNA 來源需純化步驟，否則將影響實驗結果。

除了傳統 PCR 是一般最為人所知的核酸擴增技術外，尚其他的核酸擴增技術法被陸續開發及應用，諸如依賴性核酸序列擴增法(Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、自主序列複製系統(Self-sustained sequence replication, SSR)。以上這些由傳統 PCR 方法所衍生發展出的應用方法，皆有專一、快速擴增少量核酸的優點，但是這些方法皆需特殊且精確度高的溫度控制循環儀器或相關循環溫控設備，或易有偽陽性，所要求的核酸濃度及純度較高及增幅的效率不高等缺點。

恆溫圈環式核酸擴增法(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是日人 Notami 等於 2000 年研發提出的一種核酸擴增技術⁽¹¹⁾。該方法有操作簡單、僅需可以進行恆溫反應的水浴槽(water bath tank)或加熱器等即可進行檢測⁽⁷²⁾，極為適合田間快速篩檢、小規模簡易實驗室或田野分子流行病學之調查及較大規模流行病的檢疫工作。其技術原理乃是利用兩對特殊設計的引子(Primers)包含 outer primer (F3, B3)、inner primer (FIP, BIP)兩種和具有鏈置換活性(Strand displacement activity)的 DNA 聚合酶如 *Bst* DNA polymerase，使反應過程中在模板(template)股兩端引子結合處，循環產生環狀單鏈結構，因此確保 primers 可以在等溫條件下，可成功與模板 DNA 結合進行鏈置換核酸擴增。比較傳統 PCR 方式而言，LAMP 核酸擴增技術並不需要反覆對模板 DNA 進行熱變性(denaturation)，而節省反覆升降溫的費

時程式，而且催化核酸擴增的聚合酶 *Bst* DNA polymerase，其最適作用溫度是在 60-65°C 之間，配合引子之 T_m 值控制在 60-65°C，因而省去了 Annealing 的步驟。在此恆溫操作條件下，其被擴增的核酸分子會產生 stem-loop 的結構，而該結構 self-priming 的發生會使 DNA 片段長度呈對數展延，過程中不間斷釋出起始或中間反應的 DNA 片段，而造成標的核酸的快速放大。LAMP 反應的時間極短，約在 20-60 分鐘即可產生足量的核酸以供檢測。而終止反應的同時，可以以下方法簡測：副產物(焦磷酸鎂 Magnesium Pyrophosphate 沉澱)的濁度鑑定⁽⁷³⁾、電泳的進行，或藉由螢光染劑 SYBR Green I 的添加而顯色變化，其螢光強度檢測可以即時定量 PCR (Real-Time PCR) 進行，或直接以肉眼判斷檢體的陰、陽性，即可對不同來源之基因體鑑別。

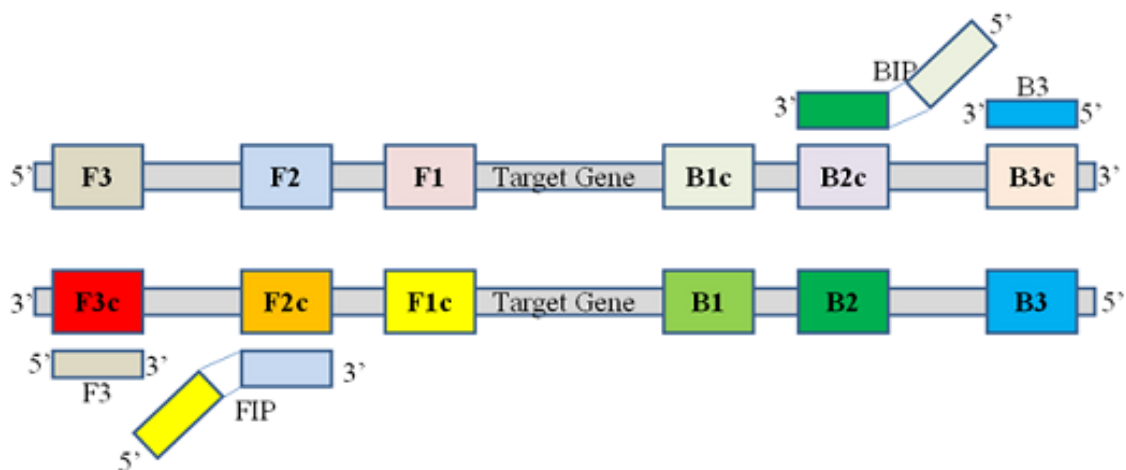


圖 2-13 LAMP Primer 在特定基因序列上的結合位置。

LAMP 技術自開發以來已廣泛應用於病毒與細菌的檢測、動物胚胎性

別鑑定及轉基因食品鑑定等方面應用廣泛⁽⁷⁴⁻⁸⁰⁾。另外，亦有成功應用 LAMP 技術於藥用植物之分子鑑定上的研究，如日人 Sasaki 等利用 LAMP 技術快速鑑定 *Panax ginseng* 及 *Panax japonicus*、*Curcuma longa* 及 *Curcuma aromatica*、*Lophophora williamsii* 及 *Lophophora diffusa* 與瓜類 *Cucumis melo* 之不同保存 shelf-life 品種的鑑定⁽⁸¹⁾等。

綜合以上的研究，顯見 LAMP 技術已廣泛應用於各領域的研究。應用這些已建構成成熟的分子技術或分子標記，未來可以開發出其他更具快速、穩定、低成本及高精確度的中藥材基因體鑑定方法，普遍使用於產業界，以確實做好中藥品質管制，同時保障用藥安全。



第三章 材料與方法

第一節 材料與儀器

一、實驗材料

台灣蒲公英(*Taraxacum formosanum* Kitanlura)、西洋蒲公英(*Taraxacum officinale* Weber)、兔兒菜(*Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai)、黃鵪菜(*Youngia japonica* L.)、刀傷草(*Ixeridium laevigata* (Bl.) Sch.)、紫背草(*Emilia sonchifolia*)其實驗部位皆為葉片，主要收集地如下：

(一)、台灣蒲公英由台中市藥用植物協會理事長林進文提供及採自台中市中國醫藥大學藥園。

(二)、西洋蒲公英、兔兒菜、黃鵪菜、刀傷草、紫背草採自台中市中國醫藥大學藥園及育德路。

市售鮮品及藥材購自台灣北、中、南中藥店及青草藥店。

二、儀器與化學品

(一)、主要化學試劑

1. Agarrose I (AMRESCO)
2. NaCl (AMRESCO)
3. Agar, Bacteriological (AMRESCO)
4. tryptone (GERBU)

5. DNA Contaminate Removal Solution (TaKaRa)
6. Promega pGEM-T Vector Systems (including pGEM-T Vector , T4 DNA ligase , and 2X buffer)
7. Taq DNA polymerase (Protech)
8. 1kb DNA ladder marker
9. Plasmid DNA extraction kit (Geneaid)
10. Pro-*Taq* DNA polymerase (PRO TECH)
11. 限制酶(Restriction Enzyme) *Eco*R I (TaKaRa)
12. 10mM dNTP Mixer (New England Biolabs)
13. *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs)
14. 10 mM dNTP (Biovan)
15. SYBR Green (Invitrogen)
16. Yeast Extract (BioVan)
17. TEA Buffer : Tris (GERBU), EDTA (GERBU), Acetic Acid (SHOWA)
18. Bromophenol blue
19. Ethidium Bromide (EtBr)
20. DNA Loading Buffer (TaKaRa)
21. Rnase A (10 mg/mL)
22. 液態氮
23. 二次水

(二)、儀器設備

1. 超音波震盪器：Power Sonic 410
2. PCR 儀器(BIO-RAD DNA Engine Peltier Thermal Cycller)
3. NanoVue (GE Health, USA)
4. 電泳槽 Advance Mupid-2plus

第二節 實驗方法

一、台灣蒲公英 Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) 之序列鑑定

(一)、植物之基因體 DNA 的萃取

植物 Genomic DNA 的抽取根據 Geneaid's genomic extraction mini kit (Geneaid) 手冊之操作步驟進行，步驟如下：

Step 1：Tissue Dissociation

↓研鉢和研棒先洗淨晾乾後包上錫箔紙滅菌

↓以少許二次水將研鉢和研棒清洗

↓以少許 DNA Contaminate Removal Solution 將研鉢和研棒清洗，再以專用試紙擦淨

↓將樣品之葉片剪碎，各置於研鉢中，加入液態氮研磨至粉末狀

↓各取 20 mg(最多 25 mg)裝入 eppendorf 中，寫上名稱排列號碼(各做 2 管)

Step 2:Lysis

↓加 400 μL GP1 buffer 和 5 μL RNase A (10 mg/ml) 至 eppendorf 中

vortex

↓放入乾浴 65°C 10 分鐘。每 5 分鐘拿起搖晃均勻，同時將後面步驟所需的 elution buffer(每個 Sample 50 μL)裝於 eppendorf 中預熱

↓加 100 μL GP2 buffer，vortex，放置冰上 3 分鐘

↓將混合物倒入 Filter Column(Filter Column + collection tube)，離心 13000 rpm 1 分鐘

↓將下清液以 200 μL pipet 吸入新的 eppendorf 中(約 350-400 μL)，Filter Column 丟棄

↓加 1.5 倍的 GP3 buffer(525~600 μL)，迅速 vortex 5 秒鐘

↓加 700 μL 的混合物至 GD Column，離心 13000 rpm 2 分鐘

↓再將下面液體吸上來一次，離心 13000 rpm 2 分鐘

↓倒掉下面液體，加入剩餘混合物，重複以上兩個步驟

↓將所有液體倒乾淨後加 400 μL W1 buffer 至 GD Column

↓離心 13000 rpm 0.5 分鐘後倒掉下面液體

↓加 600 μL Wash buffer 至 GD Column

↓離心 13000 rpm 0.5 分鐘後倒掉下面液體

↓離心 13000 rpm 3 分鐘

以下三個步驟在濾液仍有色素時做

↓加 400 μL 乙醇(96-100%)至 GD Column

↓離心 13000 rpm 30 秒後倒掉下面液體

↓離心 13000 rpm 3 分鐘

↓將 GD Column 放置新的 eppendorf 中

↓加 50 μL 之前所預熱好的 elution buffer

↓靜置 3 分鐘

↓離心 13000 rpm 2 分鐘

↓再將下面液體吸上來一次，靜置 3 分鐘

↓離心 13000 rpm 2 分鐘

↓所得即為台灣蒲公英與誤用品之 Genomic DNA

將管柱沖出之 Genomic DNA，經 SpinVac 乾燥後，於 -20°C 的冰櫃中保存。

以分光光度計測定於波長 260 nm 之吸光值估算 DNA 的濃度。

(二)、ITS 基因片段的增幅

1. PCR 反應將 ITS 基因片段擴增：

取 50 ng 的藥材 Genomic DNA，進行 PCR 反應將 ITS 基因片段擴增出。PCR 反應總體積 50 μL 反應液包含 1 μL template DNA、10 μM 引子各 1 μL ，引子序列如下：

F3-TF (5'-GCGTCGCCCCCATCATAG-3')

B3-TF (3'-AATCCTACTACGAAGCTGG-5')

再加入 1 μ L 的 10 mM dNTP、5 μ L 的 PCR buffer、40 μ L 的 ddH₂O 及 1 μ L *Taq* DNA polymerase。反應溫度由循環溫控儀 (Thermocycler) 控制，流程為起始變性溫度 95°C 5 分鐘，一個循環後，變性溫度 95°C 1 分鐘，鏈合溫度 58°C 1 分鐘；延展溫度 72°C 1 分鐘，循環 30 個週期；最後展延溫度 72°C 10 分鐘，結束循環後溫度降回 4°C。之後取 PCR 反應產物 5 μ L，與 bromophenol blue 染劑混勻後，注入 1% Agarose gel 中，以 100 V 電壓進行電泳分析。確認核酸放大 ITS 基因片段訊號。

2. ITS 基因片段的質體構築

將 PCR 產物 3 μ L 加入 1 μ L 的 pGEM T-vector 及無菌水，將反應溶液確實混勻，置於室溫反應 5 分鐘，以完成 DNA 的接合反應，獲得一個大小約 3.25 kb 的重組質體。之後再轉型入大腸桿菌中 (*E. coli* Top 10F')，將轉型之大腸桿菌塗盤，置於 37°C 培養 18 小時後，挑菌培養於含 Ampicillin 之液態 LB 培養基中，置於 37°C 培養 18 小時，用限制酶 *EcoR* I 切割後，得到兩個核酸片段，委託生技公司加以定序，以確認其序列的正確性。序列比對則以美國國家衛生研究院 NCBI Genbank 中的 BLAST 功能進行比對。

二、恆溫圈環式核酸擴增法(Loop-mediated isothermal amplification ,

LAMP)鑑定

(一)、LAMP 引子之設計

LAMP 引子的設計則根據本實驗所選殖的台灣蒲公英正品及誤混用藥材之 ITS 序列，進行專一性引子設計。專一性引子以引子開拓者 V3 軟體(The primer Explorer V3 software, Eiken Chemical Co. Ltd. Tokyo, Japan) 進行分析與設計。選取 ITS2 序列來設計恆溫環式核酸增幅反應所需的兩條外引子 (F3、B3)、兩條內引子(FIP、BIP)共四條引子，其中 FIP 為 F1c (c 表互補序列)與 F2 兩條引子的連結，而 BIP 則為 B1c 與 B2 兩條引子的連結 (圖 2-14)。各引子的序列見表 2-1 所示。

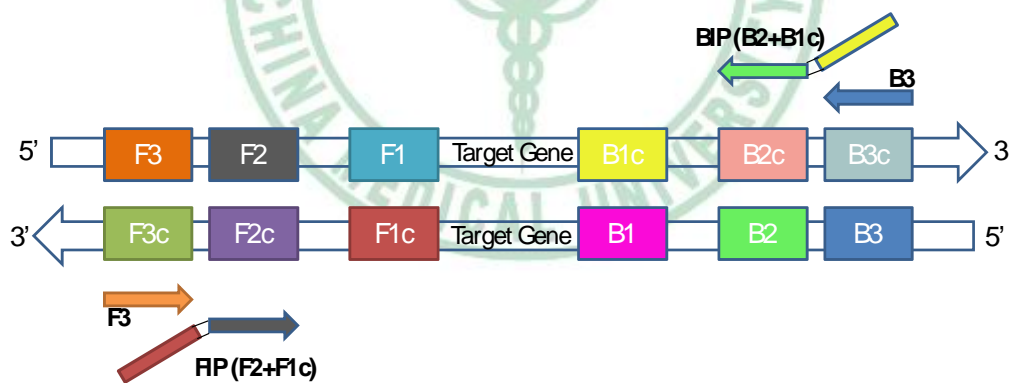


圖 2-14 LAMP primers design

Primer name	Type	Length (bp)	Sequences(5'-3')
F3	F3	18	GOGTGGCCCCATCATAG
B3	B3	20	GGTGAAGCATCATCCTAAG
FIP	F2+F1c	38	GTATTTTGACCAACCGCACAA- GTGATTGGGAGOGGAAT
BIP	B2+B1c	41	AOGGCTAGTGGTGGTTGTAAA- ATGGGGTCTTTTTGAGGGC

表 2-1 LAMP primers

(二)、LAMP 反應之進行

恆溫圈環式核酸增幅法 (LAMP)的試驗中，先加入 50 ng / μL 已萃取的植物 Genomic DNA 置於 0.2 mL 離心管中，再分別加入 4 μL 的內引子(inner primers) FIP 與 BIP (10 μM /each)，和 0.5 μL 的外引子(outer primers) F3 與 B3 (10 μM /each)，以及 0.5 μL 的 10 mM dNTP，2.5 μL 10X *Bst* buffer 及 10 μL d.d.water。於 LAMP 反應前，先將離心管置於 95 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 5 分鐘後，隨即於冰上冷卻約 1 分鐘，再加入 1 μL 的 *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs)，此步驟可幫助樣品核酸的變性，使 LAMP 引子能順利於目標基因黏合，以利後續之 LAMP 反應的進行。接著於 60 $^{\circ}\text{C}$ 進行 LAMP 反應 1 小時後，再於 80 $^{\circ}\text{C}$ 作用 10 分鐘終止反應。反應結果以 1% 瓊脂膠於 150V 電壓條件下進行 25 分鐘電泳，隨後以 Ethidium Bromide 染色 5 分鐘，再以純水洗淨脫色後置於紫外光燈箱上觀察結果。

(三)、LAMP 特異性(Specificity)測試

以恆溫圈環式核酸增幅法 (LAMP) 相同的試驗，分別加入已萃取之台灣蒲公英及其誤、混用藥材(西洋蒲公英、兔兒菜、黃鶴菜、刀傷草、紫背草)植物的 Genomic DNA，進行 LAMP 之反應，觀察反應結果。

(四)、LAMP 敏感性(Sensitivity)測試

萃取後的台灣蒲公英 genomic DNA 經 NanoVue 分光光度計(GE Health, USA)定量後，將之以滅菌水稀釋為 100 ng、20 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg、1 fg 等濃度後，進行 LAMP 反應。反應產物以 1%洋菜膠進行電泳後，浸泡 EtBr 於 UV 光下呈色觀察。LAMP 產物亦加入 SYBR Green，於 UV 光觀察是否有綠色螢光產生。



第四章 實驗結果

第一節 蒲公英與易混用藥材及市售品之植物型態比較

一、蒲公英及其易混用藥材之植物型態比較

(一)、台灣蒲公英 (*T. formosanum* Kitamura)

台灣蒲公英葉叢生於根際，排列成蓮座狀，葉片呈狹披針形，倒向羽狀深裂，葉緣具規則之齒裂，葉頂裂片三角戟狀，花梗由根莖先端長出，頭狀花序，單一，頂生。(圖 2-15)，瘦果紡錘形，長約 3 mm，具 5 大肋，10 小肋。果之上方具有瘤狀突起，果頂具長約 7 mm 之喙，冠毛白色，約 6 mm⁽¹²⁾ (圖 2-16)。



圖 2-15 台灣蒲公英植物外觀



圖 2-16 台灣蒲公英瘦果外觀

(二)、西洋蒲公英 (*T. officinale* Weber)

西洋蒲公英葉叢生根際，葉片呈線狀披針形，羽狀深裂，裂片有不規則細小齒裂，葉頂端尖銳。花梗由根莖先端長出，頭狀花序，單一，頂生，

花黃 (圖 2-17)。瘦果紡錘形，長約 3 mm，具 5 大肋，10 小肋。果之全部具有瘤狀突起，果頂具長約 8 mm 之喙，冠毛白色，約 6 mm⁽¹²⁾ (圖 2-18)。



圖 2-17 西洋蒲公英植物外觀



圖 2-18 西洋蒲公英瘦果外觀

(三)、兔兒菜 (*Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai)

根生葉大而叢生，莖生葉小而互生，葉片披針形，葉全緣或舒鋸齒緣 (圖 2-19)，花為疏聚散狀圓錐花序，黃色，舌狀花⁽¹²⁾ (圖 2-20)。



圖 2-19 兔兒菜植物外觀 圖 2-20 兔兒菜花外觀

(四)、黃鵪菜 (*Youngia japonica* L.)

黃鵪菜，基部分枝，基生葉蓮座狀，倒披針形，琴狀羽分裂 (圖 2-21)。頭花排列為繖房狀 (圖 2-22)。



圖 2-21 黃鵪菜植物外觀



圖 2-22 黃鵪菜乾燥植物外觀



(五)、刀傷草 (*Ixeridium laevigatum* (Bl.) Sch.)

根生葉呈披針形，莖生葉數枚，頭狀花序，成繖房狀排列(圖 2-23)。瘦果披針形，長約 3 mm，黃褐色，具 10 肋。果頂之喙長約 1 mm，冠毛污黃白色，約 3 mm⁽¹²⁾ (圖 2-24)。



圖 2-23 刀傷草乾燥植物外觀



圖 2-24 刀傷草瘦果外觀

(六)、紫背草(*Emilia sonchifolia* (L.) DC. var. *javanica* (Burm. f.) Mattfeld)

紫背草葉互生，葉莖背長呈紫紅色，疏散房狀花序。瘦果為狹矩圓錐形，長約 3 mm，具 5 大肋。果頂具無長喙，冠毛白色，約 8 mm⁽¹²⁾ (圖 2-26)。



圖 2-25 紫背草乾燥植物外觀

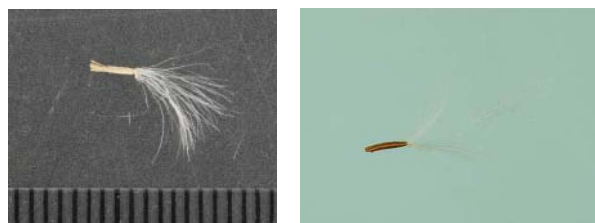


圖 2-26 紫背草瘦果外觀

二、市售品之植物型態比較

市售鮮品及藥材購自台灣北、中、南中藥店及青草藥店，購買之店家如表 2-2。經檢視鮮品及乾品之藥材，比對其外觀形態性狀^(3,12,13,56)，確認業者自稱蒲公英之 4 種鮮品及 5 種乾品為兔兒菜，另有 10 種乾品不是兔兒菜(圖 2-27)，故以此 10 種乾品進行恆溫圈環式核酸擴增法鑑定。

表 2-2 蒲公英市售品收集店家

	青草店名	鮮品	乾品 1	乾品 2
1	○蘭百草店	1-1 兔兒菜	1-2 兔兒菜	1-3 蒲公英
2	○強百草店	2-1 兔兒菜	2-2 兔兒菜	2-3 蒲公英
3	○賢青草行			3-3 蒲公英
4	○山青草行	3-1 兔兒菜	3-2 兔兒菜	
5	○○煌青草行			4-3 蒲公英
6	○仲堂中藥行			5-3 蒲公英
7	○村青草行	4-1 兔兒菜	4-2 兔兒菜	
8	○明中草藥行			6-3 蒲公英
9	弘○青草店			7-3 蒲公英
10	一○青草店			8-3 蒲公英
11	○記漢藥青草店			9-3 蒲公英
12	○順青草店			10-3 蒲公英
13	○益青草店		5-2 兔兒菜	

圖 2-27 十家蒲公英藥材乾品



1、○蘭百草店藥材乾品



2、○強百草店藥材乾品



3、○賢青草行藥材乾品



4、○○煌青草行藥材乾品



5、○仲堂中藥行藥材乾品



6、○明中草藥行藥材乾品



7、弘○青草店藥材乾品



8、一○青草店藥材乾品



9、○記漢藥青草店藥材乾品



10、○順青草店藥材乾品

第二節 台灣蒲公英之分子鑑定及其易誤、混用藥材的鑑別

一、分光光度計測定值估算 DNA 的濃度

萃取出 Genomic DNA，以分光光度計測定於波長 260 nm 之吸光值估算 DNA 的濃度。

	DNA 的濃度
台灣蒲公英	135 ng / μ L
西洋蒲公英	205.5 ng / μ L
兔兒菜	1016 ng / μ L
黃鵪菜	611 ng / μ L
刀傷草	533 ng / μ L
紫背草	245 ng / μ L

表 2-3 DNA 估算的濃度

二、台灣蒲公英及其易誤、混用藥材之 ITS 序列比對

台灣蒲公英及其易誤、混用藥材之 ITS 序列於 NCBI GenBank 資料庫搜尋中草藥已登錄之基因序列(*Taraxacum formosanum* EF114672，*Taraxacum officinale* AY862576，*Ixeridium laevigatum* AY862582，*Youngia japonica* AY862580，*Ixeris chinensis* AY862578，*Emilia sonchifolia* var. *javanica* EU057987)比對，以 BLAST 設計 nuclear ribosomal DNA ITS2 之 Forward primer F3-TF 及 Backward primer B3-TF 引子。

A

<i>T. formosanum</i>	ATCGCGTCGCCCCC--AT-CATAGTTCCTTAAGGGT
<i>T. officinale</i>	*****C-**-***A*****
<i>I. laevigatum</i>	*****--*C-***G**CT***AGTA***
<i>Y. japonica</i>	*****CTTC-***C***T*A*CC***
<i>I. chinensis</i>	*****T***CA*CATACTC*C**T*ATT****
<i>E. sonchifolia</i>	***T*A*GT*A**TCCTAA*--*CAC*T*CTG*T**A
F3-TF	5'-GCGTCGCCCCCATCATAG-3'

B

<i>T. formosanum</i>	AAGACCCCATGTATCGTCTTAGGATGATGCTTCGACC
<i>T. officinale</i>	***A***A*****TC*****C*****
<i>I. laevigatum</i>	*****C**TA*****C*****
<i>Y. japonica</i>	*****T*C*****T***CTA*****TACTTCGACT
<i>I. chinensis</i>	*****T*****G*T*C*****T
<i>E. sonchifolia</i>	*T*****T*A**C*****-T*C**A**G*T**TT
B3-TF	3'-GAATCCTACTACGAAGCTGG-5'

圖 2-28 台灣蒲公英引子設計

三、利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR) 鑑別台灣蒲公英 正品藥材

萃取台灣蒲公英以及其他誤用物的核酸，以這些純化後之核酸作為模版 DNA，分別使用所設計之引子對進行物種專一性的聚合酶連鎖反應 來測試所設計的引子：F3-TF 及 B3-TF 對於台灣蒲公英(*T. formosanum*) 核酸分子的專一性，結果如同圖 2-29 所示，以台灣蒲公英核酸作為模版 DNA 進行 PCR 反應後，可於瓊脂膠電泳後的膠體上觀察到明顯的放大訊號，其放大後之產物大小約為 250 個鹼基對(base pair, bp)。而以台灣蒲公英誤用

之植物：西洋蒲公英(*T. officinale*)、刀傷草(*I. laevigatum*)、黃鵪菜(*Y. japonica*)、兔兒菜(*I. chinensis*)以及紫背草(*E. sonchifolia* var. *javanica*)為 PCR 反應的模板 DNA 時，則無法於電泳後之瓊脂膠上發現放大訊號，顯示本實驗所設計之引子可專一性地放大台灣蒲公英核酸分子特定片段，具有鑑別台灣蒲公英與其他易誤用植物的能力。

為確定放大後之產物是否與台灣蒲公英的核酸特定序列吻合，將 PCR 反應後的產物構築至 pGEM-T vector 上後，質體構築的結果如圖 2-30，利用限制酶 *EcoRI* 切割後，可得到兩個核酸片段，分別為大小約 3 kb 的 pGEM-T vector 與大小約 250 bp 的 insert DNA，後者即為與 vector 接合的 PCR 放大產物。Insert 片段經定序後，將序列以 BLAST 軟體與 NCBI 基因資料庫作比較，發現其與資料庫中的台灣蒲公英 ITS2 序列 (GenBank accession no: AY862577) 有 99.5% 的相似，顯示本實驗所設計之引子具有專一性辨別台灣蒲公英核酸的能力。

接著，我們檢驗 F3-TF 與 B3-TF 對於 PCR 反應中，台灣蒲公英核酸分子的敏感性。將萃取純化後台灣蒲公英核酸，稀釋成不同的濃度：120 ng、20 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg，以作為模板 DNA，並利用上述之引子對進行 PCR 反應。由圖 2-31 可發現，當核酸濃度低於 1 pg 時，無任何 PCR 反應後的放大訊號，可於瓊脂膠電泳上觀測到，顯示本實驗所設計之引子對，其對於台灣蒲公英核酸偵測的濃度極限為 1 pg。結合上述結果，本實

驗所使用的引子同時具備專一性與敏感性，足可作為一個分辨台灣蒲公英與誤用植物的新工具。

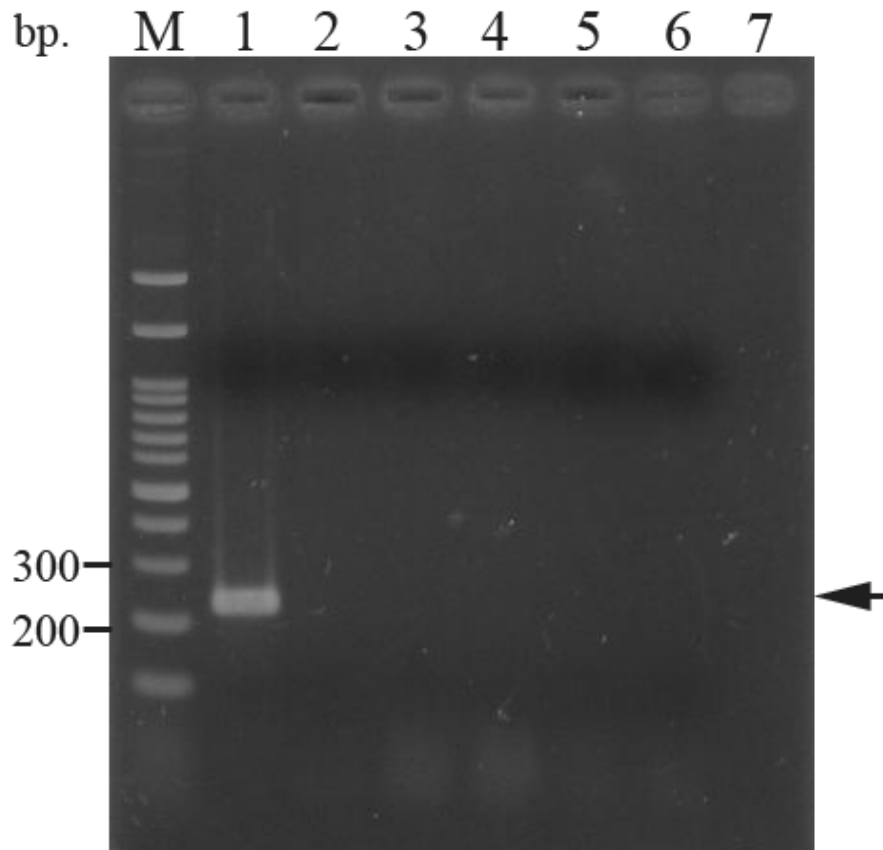


圖 2-29 台灣蒲公英引子 PCR 之電泳圖

Electrophoresis of PCR products from species-specific primer amplification using F3-TF and B3-TF, which were designed for identifying *Taraxacum formosanum* based on its nuclear ribosomal DNA (nrDNA) ITS2 region sequence. Lanes 1-6 indicates *Taraxacum formosanum*, *Taraxacum officinale*, *Ixeridium laevigatum*, *Youngia japonica*, *Ixeris chinensis*, and *Emilia sonchifolia* var. *javanica*, respectively.

Lane 7: blank. M: DNA marker.

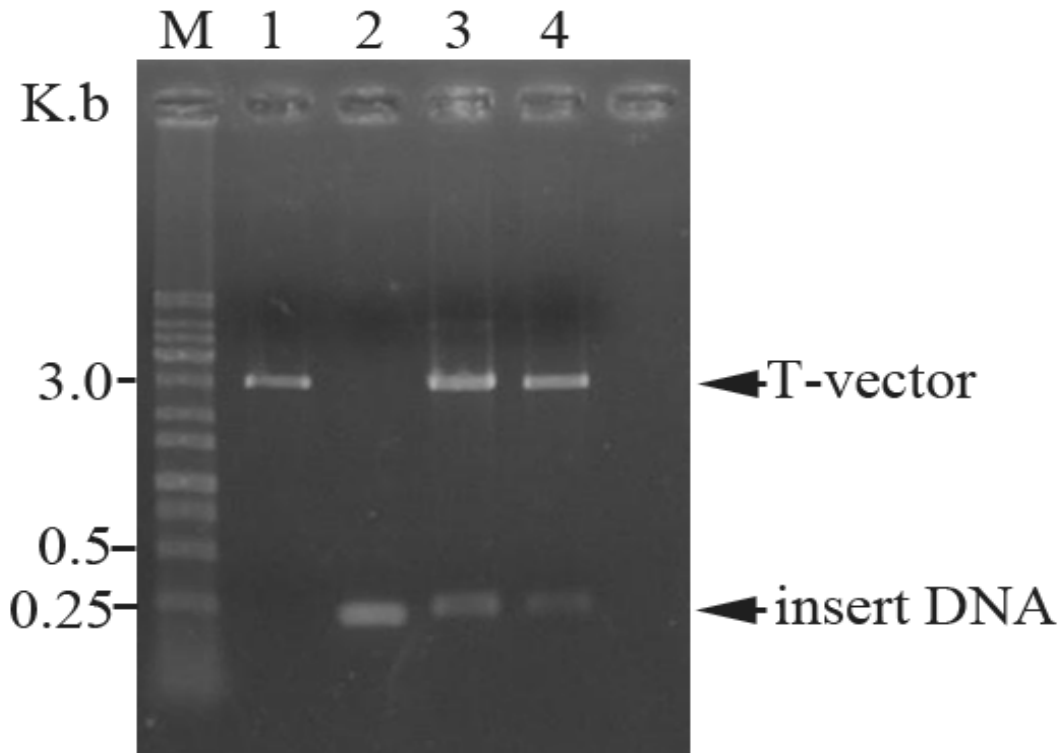


圖 2-30 PCR ITS2 建構質體經 *EcoRI* 水解後之產物電泳圖

Cloning of the *Taraxacum formosanum* PCR amplified DNA fragment of 250 bp into pGEM-T vector. Lane M, 100 bp DNA ladder marker; lane 1, insert DNA (250 bp of DNA fragment amplified by species-specific PCR); lane 2, pGEM-T vector only; lane 3, 250 bp of insert DNA was cloned into pGEM-T vector and the recombinant plasmid digested at two sites with *EcoRI*.

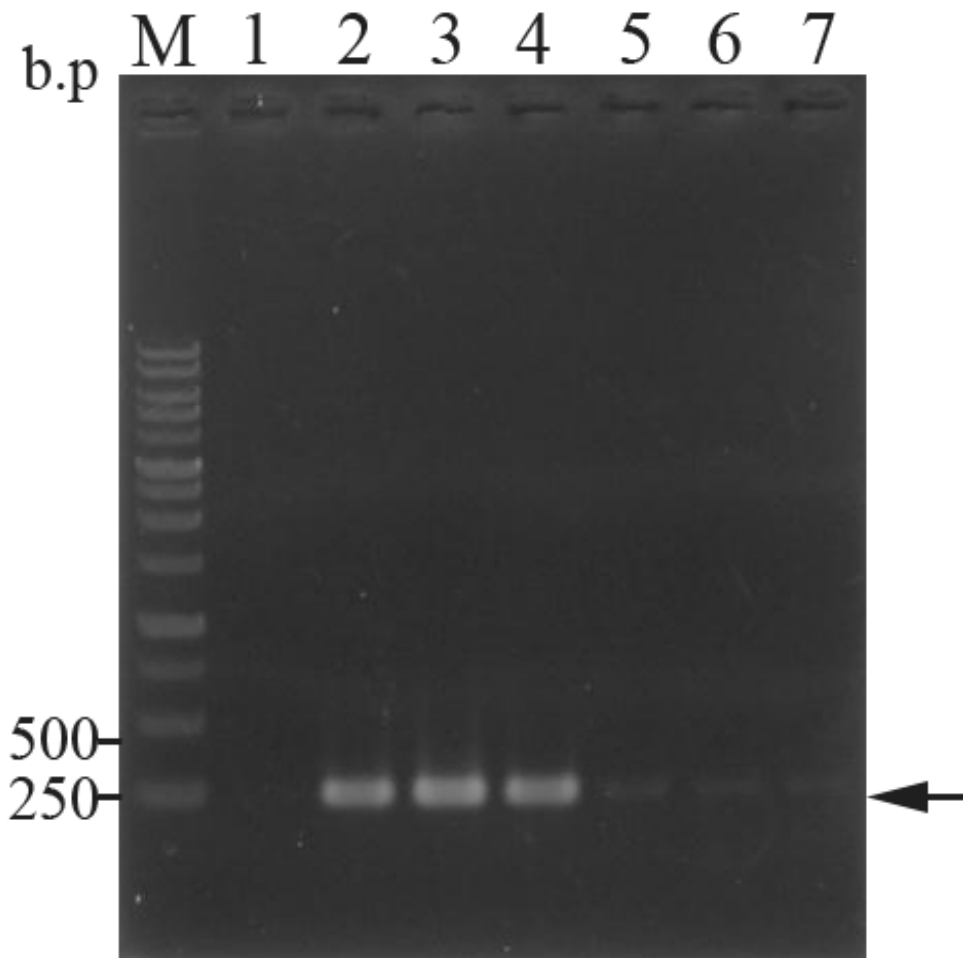


圖 2-31 以 F3-TF 及 B3-TF 引子對不同濃度之台灣蒲公英模版 DNA 進行 PCR 反應的結果

PCR sensitivity using allele-specific primers. The allele-specific primers, F3-TF and B3-TF, were used with genomic DNA from *Taraxacum formosanum* for the PCR reaction. The PCR reactions were performed after adding various amounts of *Taraxacum formosanum* genomic DNA. Lane M, 100 bp DNA ladder marker; lane 2-7 were amplified with 120 ng, 20 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg of extracted genomic DNA, respectively. Lane 1: blank.

四、利用聚合酶連鎖反應鑑別市售台灣蒲公英藥材

依據上述結果，我們利用所設計之引子對 F3-TF 與 B3-TF，針對購自 9 家不同中藥店及 1 家青草藥店，共十家業者自稱為蒲公英的藥材樣品，進行 PCR 反應，以鑑別台灣蒲公英的使用情況。將上述樣品經萃取純化其核酸並進行 PCR 反應，以瓊脂膠電泳觀察反應訊號。由圖 2-32 結果可發現，只有第 10 號樣品核酸可被本實驗之引子對放大，而其他 9 組樣品則無任何放大訊號，顯示中藥店皆未使用台灣蒲公英，而青草藥店使用台灣蒲公英，同時也證明本實驗所開發之鑑定方法，可作為日後台灣蒲公英正品與偽品植物相混用之良好平台。

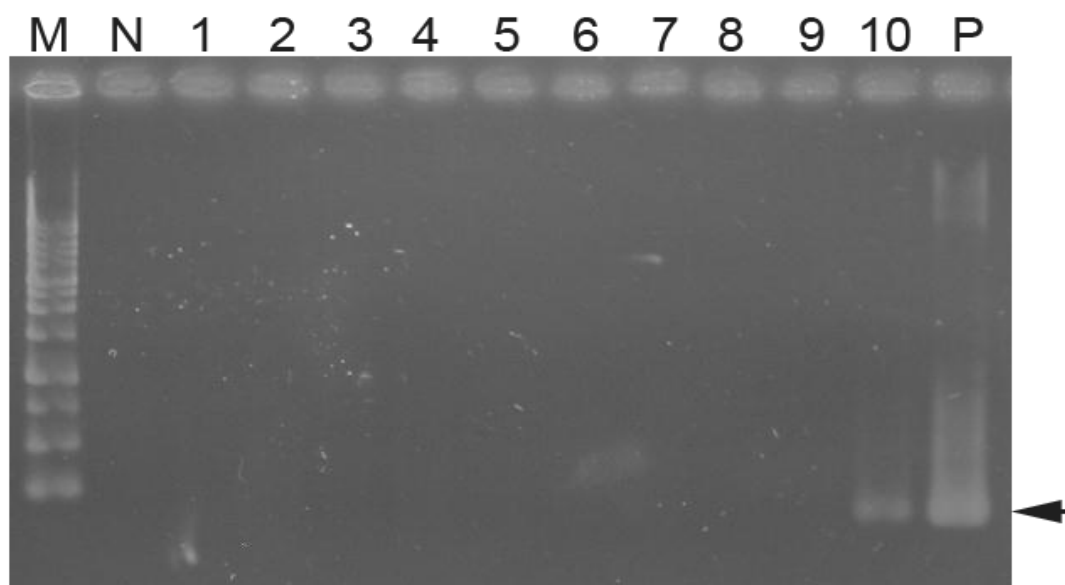


圖 2-32 十家市售台灣蒲公英樣品之 PCR 結果

Species-specific PCR for identifying *Taraxacum formosanum* among ten collected commercial plant species. Lane M, 100 bp DNA ladder marker; lanes 1-10 PCR amplification products using DNA extracted from ten collected commercial samples that were reputed to be *Taraxacum formosanum*; lane N, negative control; lane P, positive control.


第三節 建立恆溫圈環式核酸擴增法(LAMP)快速鑑定台灣

蒲公英正品藥材

一、恆溫圈環式核酸擴增法之引子設計與反應性測試

(一)、引子設計

以引子開拓者 V3 軟體設計一組共 4 條的 LAMP 引子，其中包含 2 條可使 LAMP 的反應起始的外引子(outer primer；即 F3 及 B3)，及 2 條可讓 LAMP 的反應持續進行的 inner primers (FIP 及 BIP)共 4 條高特異性的 LAMP 引子



	F3 →		F2 →
<i>T. formosanum</i>	GGGTCGCCCCCATC--ATAGTTCCCTTAAGGGTAGTCGTTGGTATTGGGAGCGGAAAT		
<i>T. officinale</i>	GCGTCGCCCCCATC--ATACTTCCCTTAAGGGTAGTCGTTGGTATTGGGAGCGGAGATT		
<i>I. laevigatum</i>	GCGTCGCCCCCATC--ATACTTCCCTTAACCGGTACATCTGGTG-CTGGGGCGGAGATT		
<i>Y. japonica</i>	GCGTCGCCCCCATC--ATACTTCCCTTAACCGGTACATCTGGTG-CTGGGGCGGAGATT		
<i>I. chinensis</i>	GTGTCGTCGCCCAACATACTCTCCCTTATTGGGTTGTCATGTTGATTGGG-GCGGAGATT		
<i>E. sonchifolia</i>	ATGTCACCTCCTAAC--ACACCTCCTGATGGAGATGTCATTGTT---GTGGTGGAGATT		
	← F1c ←		
<i>T. formosanum</i>	GGCCTCCCGTGCTTGTGTCGGTTGGTCAAATACGAGTCCCTTCGGTGGACACACGG		
<i>T. officinale</i>	GGCTTCCCGTGCTTGTGTCGGTTGGTCAAATAGGAGTCCCTTCGGTGGACACACGG		
<i>I. laevigatum</i>	GGCCTCCCATGCTGTGGTGTGGCTGGCCTAAAGAGTTGCCCATTTGGTGGACACACGG		
<i>Y. japonica</i>	GGCCTCCCATGCTGTGGTGTGGCTGGCCTAAAGAGTTGCCCATTTGGTGGACACACGG		
<i>I. chinensis</i>	GGCCTCCCGTACTTCTGGTTCGGTTGGCCTAAATAGGAGGCCCTTCGGTGGATACACGG		
<i>E. sonchifolia</i>	GGCTTCCGTTCCAGAGCGCGGTTAGCTAAAATAGGAGTCTCTTTTATTGACACACGA		
	→ B1c →		←
<i>T. formosanum</i>	CTAGTGGTGGTTGTAAAGACCCTTTTCTTCTGCTGTGTGTCGTTAGCTAGGAA GCC		
<i>T. officinale</i>	CTAGTGGTGGTTGTAAAGACCCTTTTCTTCTGCTGTGTGTTGTGAGCTAGGAAACC		
<i>I. laevigatum</i>	TTAGTGGTGGTTGTATAGACCCTCGTCTTGTCCCCTGTGTCGTTAGCCTCTAGGGACATA		
<i>Y. japonica</i>	TTAGTGGTGGTTGTATAGACCCTCGTCTTGTCCCCTGTGTCGTTAGCCTCTAGGGACATA		
<i>I. chinensis</i>	ATAGTGGTGGTTGTAAAGACCCTCGTATTGTGCTGTGTGTTGTGAGCTGTTAGGAAACC		
<i>E. sonchifolia</i>	TTAGTGGTGGTCG-AAAAGCCCTCTTCTCGAGTTGTGTT-CAAATATTTAAGAGGAA		
	← B2 ←		← B3 ←
<i>T. formosanum</i>	CTCAAAAAGACCCCAT TGTATCGT CTTAGGATGATGCTTCGACC		
<i>T. officinale</i>	CTCAAAAAGAACCCCAATGTATCGTCTTAGGACGATGCTTCGACC		
<i>I. laevigatum</i>	TT--GAAAAGACCCTACTGTATTGTCTCTAGATGATACTTCGACT		
<i>Y. japonica</i>	CT--GAAAAGACCCTACTGTATTGTCTCTAGATGATACTTCGAC-		
<i>I. chinensis</i>	CTCACCAAAAGACCCTATTGTATCGTCTTGGTAC-----		
<i>E. sonchifolia</i>	CTCATTGATGACCCTAATGTCTCGTCTT-GTACGAAGCGTTGATT		

表 2-4 LAMP 引子序列表

(二)、恆溫圈環式核酸擴增法之反應性測試與反應產物分析

透過 LAMP 所放大的核酸有許多大小不一的片段，因此在 DNA 電泳後會出現 ladder pattern 的結果，如圖 2-33。圖 2-33 中，Lane N 為不含蒲公英核酸的 negative control 組；Lane P 為 LAMP 產物。將 SYBR Green 染劑加入產物中可以直接以肉眼觀察結果，左側為不含蒲公英核酸的 negative control 組，無螢光產生。右側為 LAMP 產物，則有螢光產生(圖 2-33)。

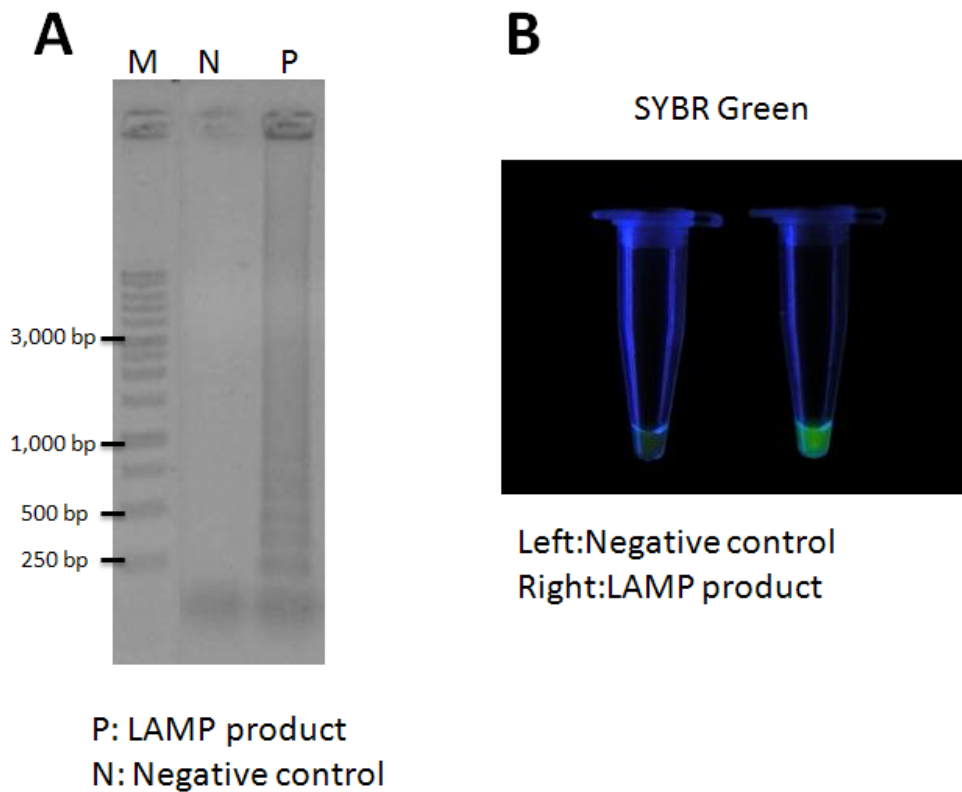


圖 2-33 台灣蒲公英 LAMP 反應產物之檢測

二、LAMP 引子的專一性測試 (Specificity of LAMP primers)

取正品蒲公英與其 5 種易誤、混用藥材，如西洋蒲公英藥材之 Genomic DNA，加入經設計之高特異性台灣蒲公英鑑別之 LAMP 引子，於 65°C 條件下藉由 *Bst* DNA polymerase 催化，進行 LAMP 反應。經 1% 洋菜膠電泳結果如圖 2-34，只有台灣蒲公英有 DNA ladder pattern 的訊號出現，顯示我們所設計的 LAMP 特異性佳，可初步用於台灣蒲公英真偽藥材的分子鑑定之用。

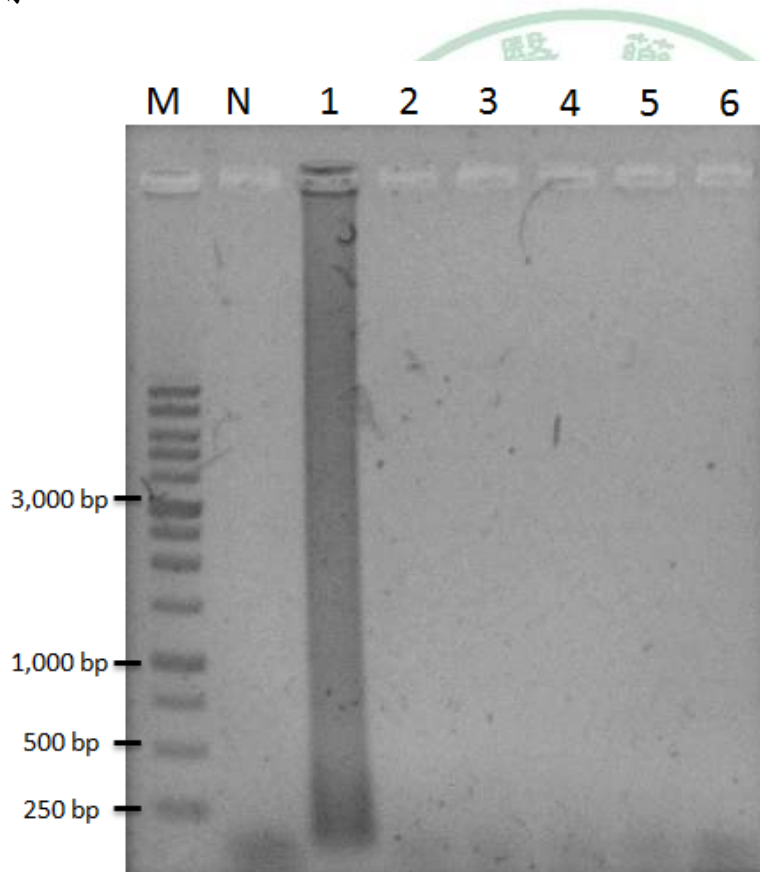


圖 2-34 台灣蒲公英 LAMP 反應產物之測試

M: DNA marker; Lane N: Negative control; Lane 1: *Taraxacum formosanum*; Lane 2: *Taraxacum officinale*; Lane 3: *Ixeridium laevigatum*; Lane 4: *Youngia japonica*; Lane 5: *Ixeris Chinensis*; Lane 6: *Emilia sonchifolia* var. *javanica*。

三、LAMP 引子的靈敏性測試 (Sensitivity of LAMP primers)

為瞭解所設計的 LAMP 引子之靈敏度，將抽取出來的台灣蒲公英核酸進行一系列稀釋，並於相同的條件下進行 LAMP 反應。另外，也利用 LAMP 引子中的外引子 F3 與 B3，做為傳統 PCR 反應的引子，同樣進行核酸放大的實驗。由圖 2-35 結果顯示，LAMP 反應可於最低約 1 pg 的核酸濃度中進行，相較於圖 2-36 的結果，當核酸濃度低於 1 ng 時，即無明顯核酸放大訊號，其靈敏度前者明顯優於後者。將 SYBR Green 染劑加入 LAMP 產物中以肉眼觀察綠色螢光，其結果與圖 2-34 之 1% 洋菜膠電泳相同。

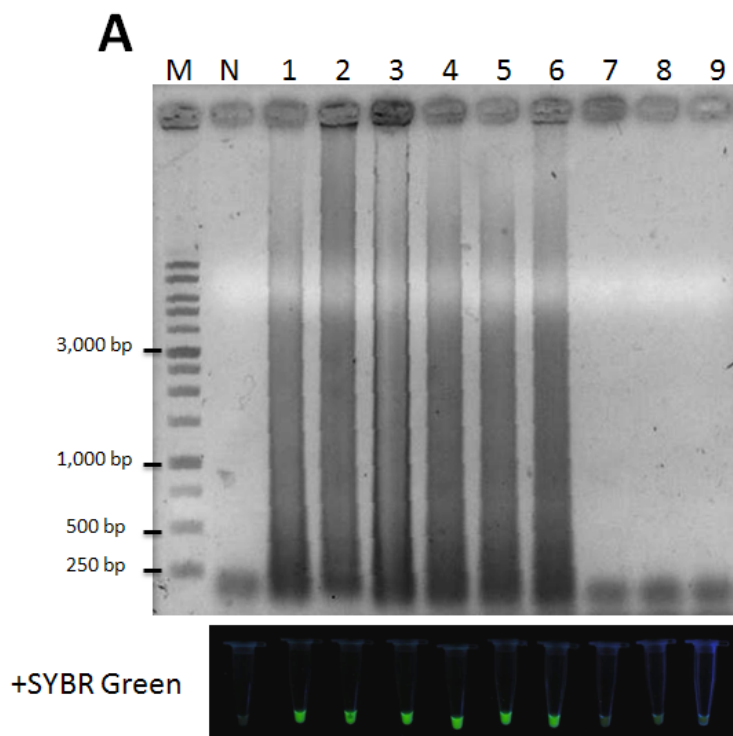


圖 2-35 台灣蒲公英 LAMP 反應的靈敏性測試

Lane N 為 negative control; Lane1:120 ng; Lane2:20 ng; Lane3:1 ng; Lane4:100 pg; Lane5:10 pg; Lane6:1 pg; Lane7:100 fg; Lane8:10 fg; Lane9:1 fg。

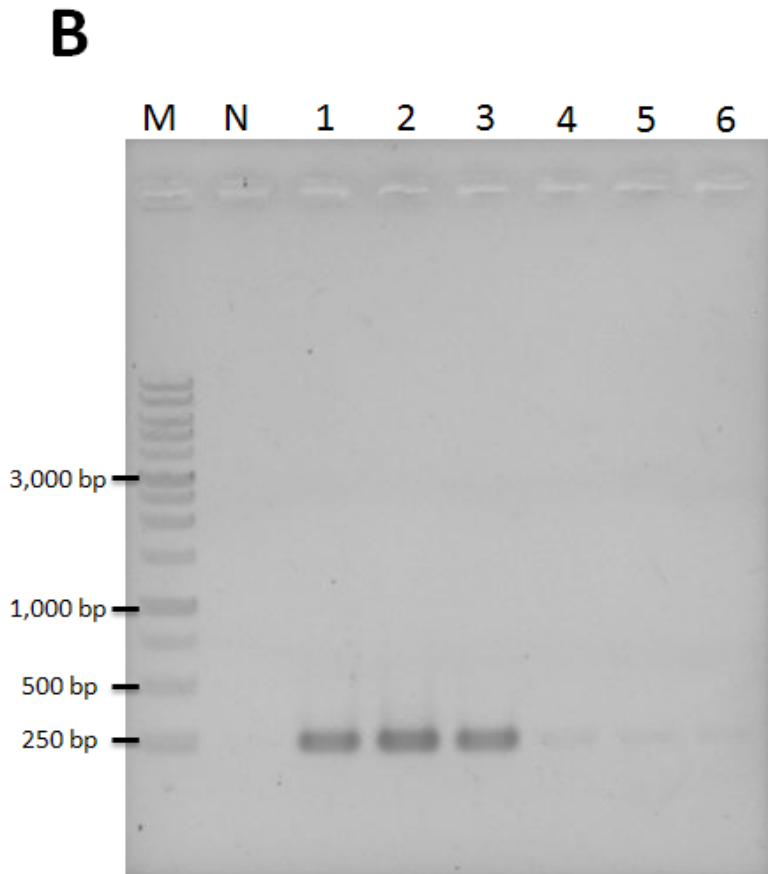


圖 2-36 以 LAMP 外引子 F3 及 B3 對不同濃度之台灣蒲公英模版 DNA 進行 PCR 反應的結果

Lane N 為 negative control ; Lane1:120 ng ; Lane2:20 ng ; Lane3:1 ng ; Lane4:100 pg ; Lane5:10 pg ; Lane6:1 pg 。

四、恆溫圈環式核酸擴增法與 PCR 方法鑑別市售台灣蒲公英藥材

分別抽取由北中南各地購入之市售蒲公英藥材 Genomic DNA，比較 LAMP 方法與 PCR 方法鑑定如圖 2-37、圖 2-38。LAMP 方法之鑑定與 PCR 鑑別方法所得結果是一致的。

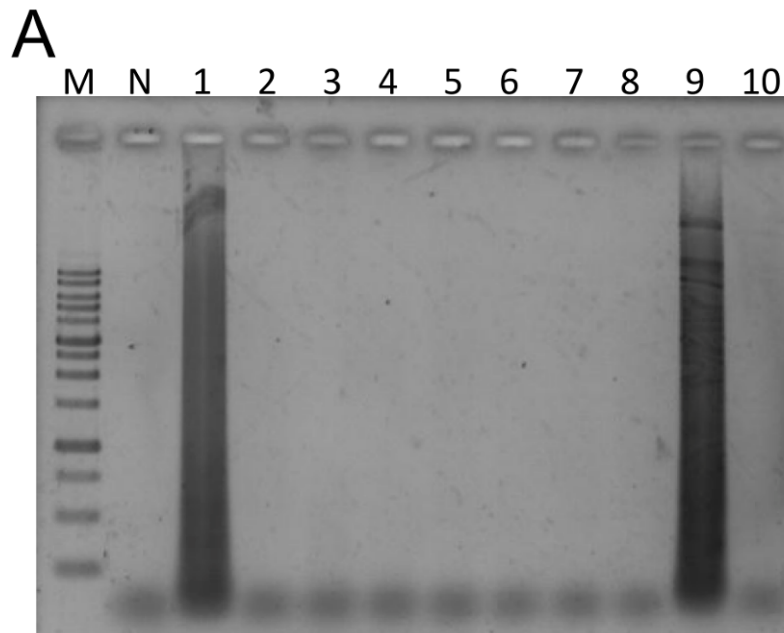


圖 2-37 LAMP 方法鑑定市售蒲公英藥材之真偽

Lane M, 1 kb of DNA ladder marker; lane N, genomic DNA of *Ixeris chinensis*; lane 1-10, ten commercial plants of *Taraxacum formosanum* from various herbal markets.

B

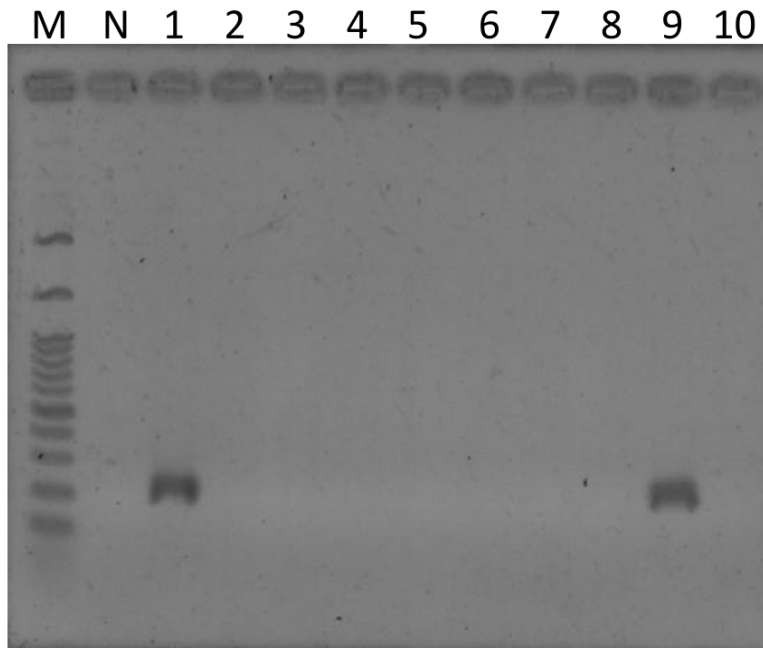


圖 2-38 PCR 方法鑑定市售蒲公英藥材之真偽

Lane M, 1 kb of DNA ladder marker; Lane N, genomic DNA of *Ixeris chinensis* ; Lane 1-10, ten commercial plants of *Taraxacum formosanum* from various herbal markets.

第五章 討論

根據「新修本草」最初記載的蒲公英為多種同屬植物之全草，因此台灣蒲公英、西洋蒲公英和中國產蒲公英皆為蒲公英屬植物，經由蒲公英植物形態，主要以總苞向下反轉與否，判斷是否為台灣蒲公英或西洋蒲公英，若為全草乾品萎凋後則不易明確區別，而且台灣蒲公英與中國產蒲公英總苞皆不反轉，因此乾品之外觀形態僅可做為初步鑑定之參考，而以台灣蒲公英與西洋蒲公英等誤用植物間不同的瘦果，也可作為鑑別的方法。

由於核酸檢驗法具有專一性、穩定性、微量、準確、易操作及快速等優點，特別適合近緣品種、破碎與腐爛藥材、標本、古化石等珍貴樣品的鑑定，達到快速篩選高品質藥材，並建立生藥質量標準。近年來中國大陸已開始注重珍貴及瀕危藥材之維護，正積極發展中草藥之 DNA 分子標誌研究，同時亦對原生藥、中成藥及其基源，進行真偽優劣的鑑定。

生物體內用於核糖體轉譯時所需的 5.8S rRNA，是由 5.8S rDNA 基因轉錄而來，而分佈於該基因上游與下游之 ITS1 及 ITS2 基因，其序列具重複性、多分歧性及共演化之特性⁽⁸²⁾，因此常被用於物種之分類及親源分析。ITS1-5.8S rDNA-ITS2 的 DNA 片段長度從 550 bp~850 bp⁽⁸³⁻⁸⁵⁾，而經由 GenBank 設計所比對選取之高特異性的 DNA 片段，能夠做為同種或不同種物種的鑑別之依據。因此，本研究首先藉由比對 GenBank 資料庫中，蒲公英與其易混用藥材間的 ITS 基因序列，找出其中差異較大的區域，以作

為引子設計的依據。比對結果，雖然發現台灣蒲公英與 *Taraxacum* 屬的其他近緣物種內的 ITS1 與 ITS2 核酸序列無太大的差異(變異度約為 4.70%及 4.88%)，然而台灣蒲公英與其誤、混用藥材的序列差一則較大，以 ITS2 的序列變化而言，其 ITS2 的種間差異性(interspecies variation)範圍約為 27.02%至 59.45%，因此便可進一步針對 ITS2 與其他蒲公英易混用藥材之 ITS2 加以比對，設計一組高特異性之台灣蒲公英引子對，藉以區辨其他誤用藥材的 ITS2 序列。取設計好的一對引子進行台灣蒲公英與其易混用藥材的聚合酶連鎖反應，發現僅台灣蒲公英藥材的 Genomic DNA 可以擴增出約 250 bp 大小的 ITS2 片段反應產物，將產物定序並分析比對 DNA 序列，證實該序列確為台灣蒲公英之 ITS 序列，顯見這組引子對具有鑑別台灣蒲公英的專一性及靈敏度。並能藉此鑑別出台灣蒲公英與其易混用的 5 種藥材。

以上述的 PCR 方法鑑定，約需耗費 3 到 4 個小時的時間，而為尋求更省時與便利的鑑定方法，我們應用可於恆溫進行的的恆溫圈環式核酸擴增法，使用台灣蒲公英與其混用藥材之 ITS2 基因組為 DNA 分子標誌，以引子開拓者 V3 軟體設計一組共 4 條的 LAMP 引子，其中包含 2 條可使 LAMP 的反應起始的外引子(outer primer；即 F3 及 B3)，及 2 條可讓 LAMP 的反應持續進行的 inner primers (FIP 及 BIP)共 4 條高特異性的 LAMP 引子；原則上，LAMP 引子需全部黏合並擴增到目標的 DNA 片段反應才能算完成反應；將該設計完成的這組 LAMP 引子對，加入含蒲公英模板 DNA 的反應

溶液中，經 65°C 進行反應後，取 LAMP 產物，經瓊脂膠核酸電泳後，由 EtBr 溶液中染色，可經由 UV 燈觀察出膠上呈現出 LAMP 反應特有的 ladder 訊號，由此可證實，本研究中所設計的這組 LAMP 引子對，具有高專一性地放大蒲公英 ITS2 的核酸片段。

再者，針對該引子之核酸需求的敏感度，本研究發現所設計的引子，對於含較少目標核酸的溶液中仍能進行核酸放大的反應。於敏感度試驗中，將台灣蒲公英的核酸稀釋成不同的濃度，最高為 100 ng，最低則為 1 fg，並於相同的 LAMP 反應條件下，觀察核酸放大情形。結果發現該引子對的靈敏度可至約 1 pg 之標的核酸的添加量。相較於前述的 PCR 反應鑑定台灣蒲公英，其 LAMP 反應靈敏度約高於 PCR 反應近 1000 倍。

LAMP 反應後，經瓊脂膠核酸電泳後，同樣浸泡 EtBr 染色，於 UV 燈下觀察到相同的 ladder 訊號，且訊號的產生與反應溶液中的蒲公英核酸濃度有關，當核酸濃度於 1 pg 時，LAMP 反應依然可不受影響進行，傳統 PCR 反應，如 PCR-RFLP、RAPD 或 ARMS，則無法達到與 LAMP 反應的靈敏度，於核酸濃度低於 1 ng 時，便無法順利進行反應，顯見 LAMP 反應之靈敏度遠勝傳統 PCR 法，十分具有作為快速物種鑑定方法的潛力。

第六章 結論

根據文獻報導目前台灣市售的蒲公英基源，常被以形態相似的其他菊科植物替代，此等混用或誤用的基源乾品，不易由外觀區別，而其主成分與藥理特性與蒲公英的差異，可能直接影響療效及用藥的安全性。

本論文運用 DNA 分子標誌研究，藉由比對 GenBank 資料庫上台灣蒲公英與其易混用藥材間的 ITS2 基因序列，找出差異較大的區域，設計一對可作為分子鑑定之引子。該引子對可直接進行台灣蒲公英與其易混用藥材的聚合酶連鎖反應，其擴增出之 PCR 產物約為 250 bp 大小的 ITS2 片段，將產物定序並分析確為台灣蒲公英 DNA 序列，顯示 Species-specific PCR Primers 可成功的鑑別出台灣蒲公英與其易混用的 5 種藥材。

此外，針對中藥材台灣蒲公英與其易混用藥材西洋蒲公英等之 ITS2 基因組，設計高特異性的 LAMP 引子，同時藉由最佳化反應條件，並分析方法的檢測靈敏度和特異性，觀察中藥材正品及易混用藥材的 LAMP 檢測效果，建立 LAMP 之基因體鑑別方法。

本研究所設計之 LMAP 引子可專一地放大含台灣蒲公英模板 DNA 的反應溶液，且可於核酸濃度 1 pg 下進行 LAMP 反應，其敏感性遠遠勝過傳統 PCR 法，顯見本研究已成功地建立了台灣蒲公英中藥材檢驗系統。

由於市場上所使用的蒲公英相當混亂，因此需要建立快速且簡易的方法以保障消費者用藥安全；根據一項市場調查，市面上所販售的蒲公英有

94.7% (36/38)都不是台灣蒲公英，而是西洋蒲公英、兔兒菜、黃鶴菜、刀傷草、紫背草等植物，透過本篇研究，我們除建立台灣蒲公英與常見易混用藥材檢測方法為模式研究，未來亦可應用於其他藥材或其他誤混用藥材的鑑定上，加速完成其他中藥材真偽之檢驗系統之 LAMP 方法的建立，以確保中草藥使用安全。



第七章 參考文獻

1. 袁秋英：中藥材真偽之分子標誌及檢驗方法建立-蒲公英，中醫藥年報，2008；26(4)：pp47-80。
2. 林宜信等：臺灣中藥 GMP 實施概況暨藥廠簡介，行政院衛生署中醫藥委員會，2006；p12。
3. 何玉鈴等：臺灣市售易混淆中藥圖鑑，行政院衛生署中醫藥委員會，2006；pVI。
4. 李玉娟：中藥材指紋圖譜質量控制方法研究，中藥新藥與臨床藥理，2001；12(3)：192-195。
5. 蘇薇薇、吳忠：中藥指紋圖譜及計算機信息處理，世界科學技術-中藥現代化，2001；3(2)：30-32。
6. Guidance for Industry Botanical Drug Products from U. S. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). June 2004. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
7. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine from World Health Organization. 2000.
8. Yip PY, Chau CF, Mak CY and Kwan HS. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Chin Med*. 2007; 2-9.
9. Zhang YB, Shaw PC, Sze CW, Wang ZT and Tong Y. Molecular authentication of Chinese herbal materials. *Journal of Food and Drug*

- Analysis* . 2007; 15:1-9.
10. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N and Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA . *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:E63.
 11. 台灣植物誌編輯委員會：台灣植物誌第一版 Flora of Taiwan-1st edition Vol. 4，現代關係出版社，1978；pP951-952。
 12. 張憲昌等：中藥檢驗方法專輯(十二)-易混淆及誤用藥材之鑑別(I)，行政院衛生署藥物食品檢驗局，2002；pp31-49。
 13. 陳忠川等：中藥材品質管制系列叢書(一)-台灣市售中藥材真偽及代用品圖集，行政院衛生署中醫藥委員會，2007；pp47-48。
 14. 唐，孫思邈：備急千金要方，人民衛生出版社，北京，1955；p455。
 15. 唐，蘇敬等：新修草本，安徽科學技術出版社，合肥，1981；p293。
 16. 唐，孫思邈：千金翼方，人民衛生出版社，北京，1955；p34。
 17. 宋，蘇頌：本草圖經，安徽科學技術出版社，合肥，1994；p302。
 18. 宋，唐慎微：證類本草，人民衛生出版社，北京，1957；p281。
 19. 宋，寇宗爽：本草衍義，商務印書館，上海，1937；p70。
 20. 明，蘭茂：滇南本草，雲南科技出版社，昆明，2004；p769。
 21. 明，劉文泰：本草品彙精要(上)，南天書局，1983；p436。
 22. 明，龔廷賢：藥性歌括四百味-藥性歌括四百味白話解，人員衛生出版社，北京，2002；p363。

23. 明，劉嘉謨：本草蒙筌，人民衛生出版社，北京，1988；p81。
24. 明，李時珍：本草綱目，人民衛生出版社，北京，1982；p1664。
25. 明，繆希雍：「炮炙大法」釋義，山西科學技術出版社，太原，2009；p122。
26. 明，李中梓：雷公炮製藥性解-中國醫學大成（二），岳麓書社，長沙，1990；p148。
27. 明，王磐：野菜譜-四庫全書存目叢書，齊魯書社，濟南，1995；p9。
28. 清，蔣居祇：本草擇要綱目-珍本醫書集成（二），上海科學技術出版社，上海，1985；p119。
29. 清，陳士鐸：本草新編，中國中醫藥出版社，北京，2008；p185。
30. 日，稻宣義：炮製全書，中醫古籍出版社，北京，1981；p93。
31. 清，汪昂：本草易讀，人民衛生出版社，北京，1987；p265。
32. 清，汪昂：本草備要，中國中醫藥出版社，北京，1998；p114。
33. 清，張璐：本經逢原，中國中醫藥出版社，北京，2007；p140。
34. 清，何克諫：生草藥性備要，見：嶺南本草古籍三種，中國醫藥科技出版社，北京，1999；p41。
35. 清，吳儀洛：本草從新，中醫古籍出版社，北京，2001；p163。
36. 清，沈金鰲：要藥分劑，上海科學技術出版社，上海，1959；p144。
37. 清，嚴西亭：得配本草，上海衛生出版社，上海，1957；p28。

38. 清，黃宮綉：本草求真，上海科學技術出版社，上海，1959；p230。
39. 清，姚瀾：本草分經，上海科學技術出版社，上海，1989；p106。
40. 清，楊時泰：「本草述鈞元」釋義，山西科學技術出版社，太原，2009；p366。
41. 清，吳其浚：植物名實圖考，中華書局，北京，1963；p356。
42. 清，劉興：草木便方今釋，貴州人民出版社，貴陽，1988；p64。
43. 清，劉其瑞：本草撮要-珍本醫書集成（二），上海科學技術出版社，上海，1985；p25。
44. 清，張秉成：本草便讀，上海衛生出版社，上海，1957；p85。
45. 中國醫學科學院藥物研究所等：中藥志，第四冊，人民衛生出版社，北京，1993；p697。
46. 中華人民共和國衛生部藥政管理局：中藥材手冊，人民衛生出版社，北京，1998；p469。
47. 《全國中草藥匯編》編寫組：全國中草藥匯編，上冊，人民衛生出版社，北京，1996；p898。
48. 江蘇新醫學院：中藥大辭典，上海科學技術出版社，上海，1977；p2459。
49. 《中醫大辭典》編輯委員會：中醫大辭典-中藥分冊，人民衛生出版社，北京，1982；p380。

50. 《中醫學》編輯委員會：中國醫學百科全書·中醫學，上海科學技術出版社，上海，1997；p997。
51. 中華人民共和國衛生部藥政管理局：全國中藥炮製規範，人民衛生出版社，北京，1988；p242。
52. 徐國鈞等：中國藥材學，中國醫藥科技出版社，北京，1996；p1663。
53. 吳蘭成等：中國中醫藥學主題詞表，中醫古籍出版社，北京，1996；p279。
54. 雷載權主編：普通高等教育中醫藥類規劃教材，中藥學，上海科學技術出版社，上海，1995；p68。
55. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會：中華本草第七冊，上海科學技術出版社，上海，1999；p986。
56. 楊遠波、劉和義、林讚標：台灣維管束植物簡誌第貳卷，行政院農業委員會，2000；pp264-265、284、386-387、400-401。
57. Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW. Construction of a genetic linkage in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* . 1980; 32:314-331.
58. Yamazaki M, Sato A, Shimomura K et al. Genetic relationship among Glycyrrhiza plants determined by RAPD and RFLP analysis. *Biol Pharm Bull*. 1994; 17:1529-1531.
59. Yamazaki M, Sato A, Saito K et al. Molecular Phylogeny based on RFLP

- and its relation with alkaloid patterns in *Lupinus* plants. *Biol Pharm Bull.* 1993; 16:1182-1184.
60. Mizukami H, Shimizu R, Kohda H, Kohjyouma M, Kawanishi F and Hiraoka N. Restriction fragment length polymorphisms of rDNA and variation of essential oil composition in *Atractylodes* plants. *Biol Pharm Bull.* 1996; 19:577-580.
61. Mizukami H, Ohbayashi K, Umetsu K and Hiraoka N. Restriction fragment length polymorphisms of medicinal plants and drugs. II. Analysis of *Glehnia littoralis* of different origin. *Biol Pharm Bull.* 1993; 16:729-731.
62. Mizukami H, Ohbayashi K, Kitamura Y and Ikenaga T. Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of medicinal plants and crude drugs. I. RFLP probes allow clear identification of *duboisia* interspecific hybrid genotypes in both fresh and dried tissues. *Biol. Pharm. Bull.* 1993; 16 (4):388-390.
63. Zhang KY, Leung HW, Yeung HW and Wong RN. Differentiation of *Lycium barbarum* from its related *Lycium* species using random amplified polymorphic DNA. *Planta Med.* 2001; 67:379-381.
64. Kaundun SS and Matsumoto S. Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in Tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between *assamica* and *sinensis* varieties. *J Agric Food Chem.* 2003;51: 1765-1770.

65. Ha WY, Shaw PC, Liu J, Yau FC and Wang J. Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA (DAMD). *J Agric Food Chem.* 2002; 50:1871-1875.
66. Ha WY, Yau FC, But PP, Wang J and Shaw PC. Direct amplification of length polymorphism analysis differentiates *Panax ginseng* from *P. quinquefolius*. *Planta Med.* 2001; 67:587-589.
67. Wang J, Ha WY, Ngan FN, But PP and Shaw PC. Application of sequence characterized amplified region (SCAR) analysis to authenticate *Panax* species and their adulterants. *Planta Med.* 2001; 67:781-783.
68. Zhu S, Fushimi H, Cai S and Komatsu K. Species identification from Ginseng drugs by multiplex amplification refractory mutation system (MARMS). *Planta Med.* 2004; 70:189-192.
69. Hon CC, Chow YC, Zeng FY and Leung FC. Genetic authentication of ginseng and other traditional Chinese medicine. *Acta Pharmacol Sin.* 2003; 24:841-846.
70. Shen J, Ding X, Liu D, Ding G, He J, Li X, Tang F and Chu B. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29:420-422.
71. Zhang YB, Wang J, Wang ZT, But PP and Shaw PC. DNA microarray for identification of the herb of *Dendrobium* species from Chinese medicinal

- formulations. *Planta Med* . 2003; 69:1172-1174.
72. Mori Y, Kitao M, Tomita N and Notomi T. J. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Biochem Biophys Methods*. 2004; 59:145-157.
73. Yip PY, Chau CF, Mak CY and Kwan HS. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Chin Med*. 2007;2:9.
74. Huang CH, Lai GH, Lee MS, Lin WH, Lien YY, Hsueh SC, Kao JY , Chang WT, Lu TC, Lin WN and Chen HJ. J. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis*. 2009; 32(10):873-881.
75. Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Tashiro M and Odagiri T. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine*. 2006; 24:6679-6682.
76. Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, Soeung SC, Sarath S, Nareth Y, Horiuchi Y, Kojima K, Takahashi M and Arakawa Y. J. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *Clin Microbiol*. 2006; 44:1899-1902.
77. Poon LL, Leung CS, Tashiro M, Chan KH, Wong BW, Yuen KY, Guan Y and Peiris JS. Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome

- (SARS) coronavirus by a loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Chem.* 2004; 50:1050-1052.
78. Yeh HY, Shoemaker CA and Klesius PH. J. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Microbiol Methods.* 2005; 63:36-44.
79. Hirayama H, Kageyama S, Takahashi Y, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Watanabe K, Kojiya S, Notomi T and Minamihashi A. Rapid sexing of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology.* 2006; 66:1249-1256.
80. Lee D, La Mura M, Allnutt T, Powell W and Greenland A. J Agric. Isothermal amplification of genetically modified DNA sequences directly from plant tissues lowers the barriers to high-throughput and field-based genotyping. *J Agric Food Chem.* 2009;57(20): 9400-9402.
81. Yohei Sasaki. Rapid detection of Panax ginseng by loop-mediated isothermal amplification and its application to authentication of Ginseng. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31: 1806-1808.
82. Baldwin, B.G. Molecular phylogenetics of Calycadenia (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. *Am J. Bot.* 1993; 80: 222–238.
83. Hon CC, Chow YC, Zeng FY, Leung FC. Genetic authentication of ginseng and other traditional Chinese medicine. *Acta Pharmacol. Sin.*

2003; 24: 841-846.

84. Pang X, Song J, Zhu Y, Xie C, Chen S. Using DNA barcoding to identify species with Euphorbiaceae. *Planta Med.* 2010; 76(15): 1784-6.

85. W. John Kress, Kenneth J. Wurdack, Elizabeth A. Zimmer, Lee A. Weigt and Daniel H. Janzen. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Prco. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102: 8369-8374.



附錄一 博士班期間發表之期刊論文

1. **Ying-Chen Chiang**, Wen-Te Chang, Mann-Duan Chen, Guan-Hua Lai, Hsi-Jien Chen, Jung Chao, Ming-Kuem Lin, Yuan-Shiun Chang, Yu-Mei Chou, Meng-Shiunn Lee and Meng-Shiou Lee. Rapid identification of the medicinal plant *Taraxacum formosanum* and distinguishing of this plant from its adulterants by ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) based DNA barcode. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10(24): 4838-4843
2. **Ying-Chen Chiang**, Guan-Jhong Huang, Yu-Ling Ho, Po-Chow Hsieh, Hsiao-Ping Chung, Fong-In Chou, Yuan-Shiun Chang. Influence of gamma irradiation on microbial load and antioxidative characteristics of *Polygoni Multiflori Radix*, *Process Biochemistry*. 2011; 46: 777-782
3. Po-Chow Hsieh, Guan-Jhong Huang, Yu-Ling Ho, Yaw-Huei Lin, Shyh-Shyun Huang, **Ying-Chen Chiang**, Mu-Chuan Tseng and Yuan-Shiun Chang. Activities of antioxidants, α -Glucosidase inhibitors and aldose reductase inhibitors of the aqueous extracts of four *Flemingia* species in Taiwan. *Botanical Studies*, 2010; 51: 293-302
4. Po-Chou Hsieh, Yu-Ling Ho, Guan-jhong Huang, Ming-Hsing Huang, **Ying-Chen Chiang**, Shyh-Shyun Huang, Wen-Chi Hou, Yuan-Shiun

Chang. Hepatoprotective effect of the aqueous extract of *Flemingia macrophyll* on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats through anti-oxidative activities. *American Journal of Chinese Medicine*, 2011; 39(2):349-65.

5. Tien-Ning Chang, Yu-Ling Ho, Guan-Jhong Huang, Shyh-Shyun Huang, Chao-Jung Chen, Po-Chow Hsieh, **Ying-Chen Chiang** and Yuan-Shiun Chang. Hepatoprotective Effect of *Crossostephium chinensis* (L.) Makino in Rats. *American Journal of Chinese Medicine*, 2011; 39(3):503-21.



附錄二 博士班期間參與之壁報論文

- 1、江瑩真、郭昭麟、江倍漢、周榆翔、謝伯舟、張永勳：台灣市售土茯苓、葶藶藥材之調查研究。94 年度臺灣藥學會年會暨學術研討會，高雄醫學大學，2005/12/16。
- 2、謝伯舟、江瑩真、何玉鈴、彭文煌、張永勳：白鳳菜保肝活性研究。94 年度臺灣藥學會年會暨學術研討會，高雄醫學大學，2005/12/16。
- 3、Ying-Chen Chiang, Po-Chou Hsieh, Yen-Ling Yu, Meng-Hong Liu, Yu-Chi Tsai, Hung-Ting Lin, Perng-Haur Wang, I-Hsin Lin, Ching-Liang Chu, Wen-Te Chang. The Evaluation of Processing Methods on *Polygonum multiflorum* Using Metabolomic Approach and Dentrific Cells Platform. 東洋醫學會，台灣大學，2007/12/02。
- 4、江瑩真、賴尚志、謝伯舟、何玉鈴、張文德、周鳳英、張永勳：輻射滅菌劑量對陳皮成分及抗氧化活性之影響。台灣藥學會年會暨學術研討會，高雄醫學大學，2007/12/08。
- 5、Ying-Chen Chiang, Tsung-Chun Lu, Yu-Chi Tsai, Meng-Hong Liu, Wen-Huang Peng, Ching-Liang Chu, Yuan-Shiun Chang, Wen-Te Chang. The Establishment of Scientific Standard Procedure for TCM Materials Processing Using Metabolomic Strategy-The Comparison

of *Polygonum multiflorum* Processing Methods. Plant System Biology, Symposium Pharmacognosy, IBL, Leiden University, 2008/04/25。

- 6、江瑩真、張恬寧、謝伯舟、何玉鈴、黃冠中、張文德、張永勳：
何首烏藥材炮製之抗氧化活性評估。國防醫學院藥學系百週年暨九十七年度臺灣藥學會與臺灣臨床藥學會聯合年會，國防醫學院，2008/11/22。
- 7、賴美州、江瑩真、張恬寧、謝伯舟、何玉鈴、劉崇喜、劉怡旻、張永勳：烏頭屬植物（川烏、草烏、附子及天雄）之抗氧化活性評估。國防醫學院藥學系百週年暨九十七年度台灣藥學會與臺灣臨床藥學會聯合年會，國防醫學院，2008/11/22。
- 8、謝伯舟、江瑩真、張恬寧、賴尚志、鍾曉萍、何玉鈴、周鳳英、張永勳：Studies on Antiseptic Dose of Gamma Radiation and the Radiation Effect on Ingredients and Antioxidant Activity of *Polygoni Multiflori Radix*. 國防醫學院藥學系百週年暨九十七年度台灣藥學會與臺灣臨床藥學會聯合年會，國防醫學院，2008/11/22。
- 9、黃世勳、黃冠中、彭文煌、張恬寧、江瑩真、洪心容、何玉鈴、張永勳：Analgesic and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of *Hydrocotyle nepalensis* Hook. in mice. 國防醫學院藥學

系百週年暨九十七年度台灣藥學會與臺灣臨床藥學會聯合年會，國防醫學院，2008/11/22。

10、**Ying-Chen Chiang**, Hsiu-Ying Lu, Meng-Shiou Lee, Wen-Chien Lu, Yuan-Shiun Chang and Wen-Te Chang. Discrimination between dried ginseng rootlet and root from its commercial products using a metabolomic strategy. Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009, Kobe International Conference Center, Port Island, Kobe, Japan, 2009/11/24~2009/11/28, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009; 108(Issue S1): 174

11、**Ying-Chen Chiang**, Mann-Duan Chen, Guan-Hua Lai, Hsi-Jien Chen, Jung Chao, Wen-Te Chang, Ming-Kuem Lin, Yuan-Shiun Chang, Yu-Mei Chou, Meng-Shiunn Lee, Meng-Shiou Lee. Rapid Identification of the Medicinal Plant *Taraxacum formosanum* from Its Adulterants by Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS)- Primed Polymerase Chain Reaction. The 9th Meeting of the Consortium for Globalization of Chinese Medicine (CGCM), School of Chinese Medicine (SCM), Hong Kong Baptist University (HKBU), 2010/08/23~2010//08/25

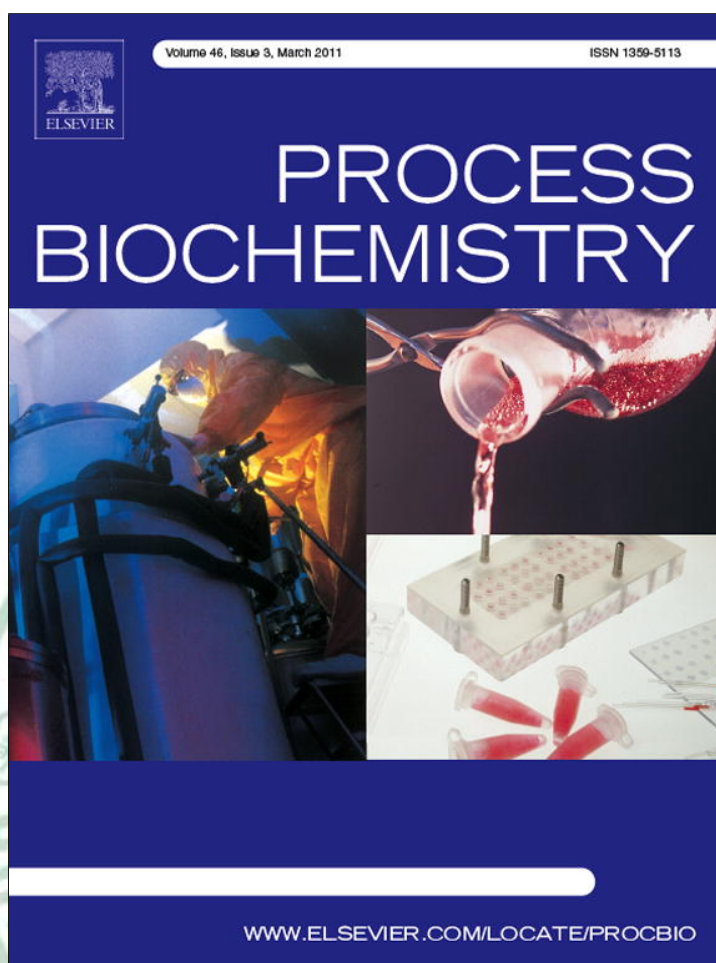
12、**Ying-Chen Chiang**, Mann-Duan Chen, Guan-Hua Lai, Hsi-Jien Chen, Jung Chao, Wen-Te Chang, Ming-Kuem Lin, Yuan-Shiun Chang, Yu-Mei Chou, Meng-Shiunn Lee, Meng-Shiou Lee. Rapid

Authentication of the Medicinal Plant *Taraxacum formosanum* and Distinguishing of this Plant from Its Adulterants by Loop-Mediated Isothermal Amplification. 第二十五屆天然藥物研討會，國立海洋生物博物館，2010/11/5~2010/11/7

- 13、**Ying-Chen Chiang**, Mann-Duan Chen , Guan-Hua Lai, Hsi-Jien Chen, Wen-Te Chang, Ming-Kuem Lin, Yuan-Shiun Chang, Meng-Shiunn Lee, Meng-Shiou Lee. Rapid Identification of the Medicinal Plant *Fallopia multiflora* and Distinguishing of this Plant from Its Adulterants by Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Based DNA Barcode, 台灣藥學會年會暨學術研討會, 台灣大學，臺大醫院國際會議中心，2010/12/11



Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

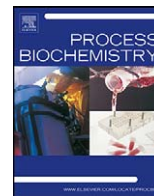
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Influence of gamma irradiation on microbial load and antioxidative characteristics of Polygoni Multiflori Radix

Ying-Chen Chiang^{a,1}, Guan-Jhong Huang^{a,1}, Yu-Ling Ho^b, Po-Chow Hsieh^a, Hsiao-Ping Chung^c, Fong-In Chou^c, Yuan-Shiun Chang^{a,*}

^a Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, China Medical University, Taichung, Taiwan

^b Department of Nursing, Hung Kuang University, Taichung, Taiwan

^c Nuclear Science and Technology Development Center, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2010

Received in revised form

29 November 2010

Accepted 13 December 2010

Keywords:

Polygoni Multiflori Radix

Gamma irradiation

Antiseptic effect

Antioxidation

ABSTRACT

Gamma radiation is a physical process commonly used for the eradication of microorganisms distributed in food ingredients, medicinal plants and other bioresearches. The aim of this study was to investigate the effect of radiation dosage on the microbial load, chemical compounds and antioxidative characteristics of Polygoni Multiflori Radix (POMU). Ten commercial POMUs were purchased from different herbal markets and treated with 2 kGy, 4 kGy, 6 kGy, 8 kGy and 10 kGy gamma radiation doses to evaluate the microbial burdens of irradiated and unirradiated POMUs.

Our results confirmed that 2 kGy was sufficient for the inactivation of enterobacteria; at 4 kGy, mold and yeast counts were obviously reduced; and at 6 kGy, neither yeasts nor fungi were observed any longer.

The antioxidative effects and major antioxidant components of 0 kGy, 5 kGy, 10 kGy and 15 kGy irradiated POMU samples were also examined. Our results confirmed that 5 kGy irradiated POMU had both the highest antioxidative activity and lowest value in IC₅₀ of DPPH radical-scavenging activity. The content of total phenols had no statistically significant changes. Therefore gamma irradiation at 5 kGy could be a potential method for decontaminate the microbial load of POMU to prolong shelf life and to improve hygienic quality.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Herbs quite commonly harbor large quantities of bacteria, fungi and spoilage-inducing organisms [1]. The most common bacteria are aerobic sporeformers, such as Bacillus and Salmonella species [2–4]. Today, three major methods are in use for the antiseptics of herbs, namely steam, fumigation (ethylene oxide and propylene oxide) and irradiation [5]. However, steam degrades light-weight leafy herbs, and ground products are difficult and sometimes impossible to handle in the steam system [5–8]. As for ethylene oxide gas, such disinfection method has been banned in the European Union and many other countries [9]. Gamma radiation within 3–10 kGy proved to be a viable alternative to fumigation or steam to ensure the hygienic quality of herbs; and there has been a steady

increase of radiation utilization in the last 10 years after the banning of ethylene oxide [1,10–12].

According to the standards established by World Health Organization (WHO) [13], most untreated herbs, harvested and handled under hygienic conditions and tested by appropriate methods of sampling and examination, should contain no more than 1×10^4 bacteria cfu/g. However, there are no literatures available on POMU regarding its variance in microbial burdens and chemical contents due to different doses of irradiation, especially when high doses (up to 15 kGy) are employed.

Polygoni Multiflori Radix (POMU), “He Shou Wu” in Chinese, is the dried root of *Polygonum multiflorum* Thunb. (Polygonaceae). It is an herb that has been used in traditional Chinese medicine for the treatment of liver diseases, anemia, and hypopigmentary skin diseases, as well as for the prevention of hair-graying and other diseases associated with aging. POMU also counteracts toxicity, cures carbuncles and relaxes the bowels whereas processed POMU replenishes the liver and kidney with vital essence and blood, blackens the hair and strengthens the tendons and bones [14]. 2,3,5,4'-Tetra-hydroxystilbene-2-O-glucoside (THSG), a water-soluble active component extracted from dried tuberous

* Corresponding author at: Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, China Medical University, 91 Hsueh-Shih Road, Taichung 40402, Taiwan. Tel.: +886 4 22030380; fax: +886 4 22083362.

E-mail address: yschang@mail.cmu.edu.tw (Y.-S. Chang).

¹ These authors contributed equally to this work.

root of POMU, can promote the release of nitric oxide (NO) from vascular endothelial cells and has a strong antioxidative effect [15]. Structurally, THSG belongs to hydroxystilbene, and its structure is similar to that of resveratrol in red wine which has significant protective effects on myocardial ischemia-reperfusion injury.

The present work was mainly undertaken to investigate the effect of different doses of gamma radiation on the elimination of microbes; whether they bring about any changes in the antioxidants composition of POMU and to find the lowest possible effective radiation dosage for POMU.

2. Materials and methods

2.1. Materials

BHT, GSH, potassium peroxodisulfate ($K_2S_2O_8$), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), Tris (hydroxymethyl) aminomethane, trypsin, potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), TCA, ferric chloride ($FeCl_3$), catechin, MTT, aluminum chloride hexahydrate ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$), rutin, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS), sodium bicarbonate (Na_2CO_3), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4) and other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Folin–Ciocalteu solution and 95% ethanol were purchased from Merck Co. (Santa Ana, CA, USA). THSG was purchased from the National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products.

2.2. Sampling and irradiation of *Polygoni Multiflori Radix*

Ten samples of *Polygoni Multiflori Radix* were all used in this manuscript. The samples were purchased from eight traditional Chinese medicine importers, one manufactory and one Chinese drugstore, of which all herbs originated from Mainland China. POMU was packaged as 15 g samples in PVC (poly-vinyl chloride) containers for irradiation. Gamma irradiation was performed at National Tsing Hua University according to the method of Wen et al. with slight changes [16]. Samples were placed on a hot cell stand and irradiated with cobalt-60 at room temperature. The irradiated stand rotated 10 rounds per minute to ensure a well-distribution of radiation applied to each sample. The samples were treated for various time intervals in order to achieve absorbed doses of 2, 4, 6, 8 and 10 kGy. Additional samples were treated with 5, 10 and 15 kGy of gamma radiation in the same way to evaluate any changes in antioxidant activities and active compounds. The absorbed dose was measured with silver dichromate dosimeter [17].

2.3. Enumeration of microbes

The microbial contents of POMU samples were measured immediately after irradiation. Direct observation and spread plate method were applied for the quantification of microorganisms [18]. The solid culture media used in this study included plate count agar (PCA; Difco, Detroit, USA), potato dextrose agar (PDA; Difco, Detroit, USA) and violet red bile glucose agar (VRBGA; Difco, Detroit, USA), and the liquid culture medium used in this experiment was plate count broth (PCB, Difco, Detroit, USA).

Appropriate dilutions of the homogenates with PBS were spread and plated onto PCA culture plates for total aerobic bacterial enumeration. Molds and yeasts were enumerated by the spread plate method using PDA. Each sample was examined on violet red bile glucose agar (VRBGA, Difco, Detroit, USA) to determine the total number of *Enterobacteriaceae* bacteria. Counts were recorded in colony forming units (cfu/g). The presented data was the average count in three petri dishes for each diluted suspension [16].

2.4. Preparation of the methanol extract of *Polygoni Multiflori Radix*

The POMU sample which purchased from traditional Chinese medicine importer was treated with different gamma radiation doses (0 kGy, 5 kGy, 10 kGy and 15 kGy) and macerated with methanol for 24 h at room temperature. Filtration and collection of the extracts were done three times. The methanol extracts were dried in vacuum at 40 °C. The dried extracts were weighed and dissolved in methanol (stock 10 mg/mL) and stored in –20 °C for further use.

2.5. Determination of antioxidant activity by ABTS*

ABTS* scavenging ability was determined according to the method of Chang et al. [19]. Aqueous solution of ABTS (7 mM) was oxidized with potassium peroxodisulfate (2.45 mM) for 16 h in the dark at room temperature. The ABTS* solution was diluted with 95% ethanol to an absorbance of 0.75 ± 0.05 at 734 nm (Beckman UV–vis spectrophotometer, Model DU640B). An aliquot (20 μ L) of each sample (125 μ g/mL) was mixed with 180 μ L ABTS* solution and the absorbance was read at 734 nm after 1 min. Trolox was used as the reference standard. A standard curve was constructed for Trolox at 0, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 μ M

concentrations. TEAC was expressed as millimolar concentration of Trolox solution with the antioxidant equivalent to a 1000 ppm solution of the sample under investigation.

2.6. Determination of antioxidant activity by DPPH radical scavenging ability

The effect of crude extracts and positive controls (GSH and BHT) on DPPH radicals was estimated according to the method of Huang et al. [20]. 20 μ L of sample extract was mixed with 100 mM Tris–HCl buffer (80 μ L, pH 7.4) and 100 μ L of DPPH in ethanol to a final concentration of 250 μ M. The mixture was shaken vigorously and left to stand at room temperature for 20 min in the dark. The absorbance of the reaction solution was measured spectrophotometrically at 517 nm. The percentage of DPPH decolorization was calculated according to the equation: % decolorization = $[1 - (ABS_{\text{sample}}/ABS_{\text{control}})] \times 100$. IC_{50} value is the effective concentration by which 50% of DPPH radicals are scavenged and was obtained by interpolation with linear regression analysis. A lower IC_{50} value indicated a greater antioxidant activity.

2.7. Determination of antioxidant activity by reducing power measurement

The reducing power of the crude extracts and BHT was determined according to the method of Yen and Chen [21]. POMU samples (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mg/mL) and BHT were each mixed with an equal volume of 0.2 M phosphate buffer, pH 6.6, and 1% potassium ferricyanide. The mixture was incubated at 50 °C for 20 min, during which time ferricyanide was reduced to ferrocyanide. Then an equal volume of 1% trichloroacetic acid was added to the mixture before centrifugation at 6000 \times g for 10 min. The upper layer of the solution was mixed with distilled water and 0.1% $FeCl_3$ at a ratio of 1:1:2, then the absorbance was measured at 700 nm to determine the amount of ferric ferrocyanide (Prussian Blue) formed. Increased absorbance of the reaction mixture indicated increased reducing power of the sample.

2.8. Determination of total polyphenol content

The total polyphenol content of the crude extracts was determined according to the method of Huang et al. [22]. 20 μ L of sample extract (125 μ g/mL) was added to 200 μ L distilled water and 40 μ L of Folin–Ciocalteu reagent. The mixture was allowed to stand at room temperature for 5 min, and then 40 μ L of 20% sodium carbonate was added to the mixture. The resulting blue complex was measured at 680 nm. (+)-Catechin was used as standard for the calibration curve. The polyphenol content was calibrated using a linear equation based on the calibration curve. The total polyphenol content was expressed as μ g (+)-catechin equiv./mg dry weight (μ g CE/mg). The dry weight indicated was the sample dry weight.

2.9. Determination of total flavonoid content

The total flavonoid content of the crude extracts was determined according to the method of Huang et al. [22]. 1.5 mL aliquot of each extract was added to an equal volume of 2% $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (2 g in 100 mL methanol) solution. The mixture was vigorously shaken, and the absorbance at 430 nm was read after 10 min of incubation. Rutin was used as the standard for the calibration curve. The total flavonoid content was calibrated using a linear equation based on the calibration curve. The total flavonoid content was expressed as μ g rutin equiv./mg dry weight (μ g RE/mg). The dry weight indicated was the sample dry weight.

2.10. Determination of total flavonol content

The total flavonol content of the crude extracts was determined according to the method of Chang et al. [23]. 200 μ L of sample extract was added to 1 mL of 0.1% *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) in methanol/HCl (3:1, v/v). The mixture was vigorously shaken, and the absorbance was read after 10 min of incubation at 640 nm. (+)-Catechin was used as standard for the calibration curve. The total flavonol content was calibrated using a linear equation based on the calibration curve, and expressed as μ g (+)-catechin equiv./mg dry weight (μ g CE/mg).

2.11. Analyses of THSG by HPLC

Moderate amount of the methanol extracts from POMU was weighed and dissolved in methanol. At first, the solutions were filtered through 0.45 μ m PVDF filters. HPLC (Waters 2695 separations module; detector: Waters 996 photodiode array detector) analysis was carried out under the following conditions: Waters XTerra RP18 column (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm) was used with deionized water as mobile phase A, and acetonitrile was used as mobile phase B; in a ratio of 25:75 and ran for 30 min at a flow rate of 0.6 mL/min. The injection volume was 10 μ L, and a wavelength of 320 nm was used for detection. THSG was also analyzed by HPLC under the same conditions, and the retention time was used to identify THSG contents in the samples.

2.12. Statistical analyses

Experimental results were presented as the mean \pm standard deviation (SD) of three parallel measurements. Statistical analyses were performed by one-way

Table 1
Effect of gamma irradiation on the microbial count (CFU/g \pm SD) of *Polygoni Multiflori Radix* samples.

Sample no.	Irradiation dose (kGy)				
	0	2	4	6	8
1					
T ^a	$(1.2 \pm 0.4) \times 10^3$	$(1.3 \pm 0.4) \times 10^2$	$(5.0 \pm 0.6) \times 10^1$	ND ^b	ND
M ^c	$(6.2 \pm 0.7) \times 10^2$	$(4.0 \pm 0.6) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND
E/Pa ^d	ND	ND	ND	ND	ND
2					
T	$(2.1 \pm 0.3) \times 10^2$	$(2.0 \pm 0.4) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.5) \times 10^1$	ND	ND
M	$(1.7 \pm 0.4) \times 10^2$	ND	ND	ND	ND
E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
3					
T	$(5.1 \pm 0.9) \times 10^2$	$(7.0 \pm 1.4) \times 10^1$	ND	ND	ND
M	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^2$	$(2.0 \pm 0.4) \times 10^1$	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^1$	ND	ND
E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
4					
T	$(2.9 \pm 0.3) \times 10^3$	$(3.5 \pm 0.5) \times 10^2$	$(6.9 \pm 1.1) \times 10^1$	ND	ND
M	$(4.5 \pm 0.4) \times 10^1$	$(1.9 \pm 0.3) \times 10^1$	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^1$	ND	ND
E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
5					
T	$(6.5 \pm 1.2) \times 10^1$	$(4.0 \pm 0.7) \times 10^1$	$(2.5 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND
M	$(5.0 \pm 0.8) \times 10^1$	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^1$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND
E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
6					
T	$(3.0 \pm 0.4) \times 10^2$	$(7.5 \pm 0.5) \times 10^1$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^1$	ND	ND
M	$(5.0 \pm 0.9) \times 10^1$	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^1$	ND	ND	ND
E/Pa	$(1.0 \pm 0.4) \times 10^1$	ND	ND	ND	ND
7					
T	$(5.0 \pm 0.5) \times 10^1$	ND	ND	ND	ND
M	$(2.5 \pm 0.4) \times 10^1$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^1$	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^1$	ND	ND
E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
8					
T	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^2$	$(5.0 \pm 0.5) \times 10^1$	ND	ND	ND
M	$(5.0 \pm 1.3) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND	ND
E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
9					
T	$(5.0 \pm 0.7) \times 10^1$	$(3.0 \pm 0.4) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND
M	$(5.0 \pm 0.3) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND	ND
E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND
10					
T	$(2.6 \pm 0.4) \times 10^2$	$(5.0 \pm 0.6) \times 10^1$	$(3.0 \pm 0.3) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^1$	ND
M	$(5.0 \pm 0.5) \times 10^1$	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^1$	ND	ND	ND
E/Pa	ND	ND	ND	ND	ND

^a T: Total aerobic microbes.

^b ND: No microbe detected on plates.

^c M: Molds.

^d E: Enterobacteriaceae; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*.

ANOVA, followed by Dunnett's *t* test. The difference was considered to be statistically significant when *p* value was less than 0.05.

3. Results

3.1. Effect of gamma irradiation on the microbial burden of *Polygoni Multiflori Radix*

The microbial loads in POMU specimens of different origins were analyzed immediately after irradiation by the spread plate method. The viability of microorganisms in POMU specimens irradiated with different gamma-ray doses of 0, 2, 4, 6, 8 and 10 kGy are shown in Table 1. POMU specimens contained total mesophilic bacterial counts of 5.0×10^1 to 2.9×10^3 cfu/g, and mold and yeast counts of 1.0×10^1 to 6.2×10^2 cfu/g. Total bacterial counts were much higher than the mold and yeast counts in all examined samples. Enterobacteria were also found in one of the ten POMU specimens, and ranged from not detected to 1.0×10^1 cfu/g. Although the microbial profiles of specimens from different sources varied markedly,

following irradiation at 2 kGy, enterobacteria were inactivated; at 4 kGy, mold and yeast counts were obviously reduced; and yeast and fungi were no longer observed in POMU specimens after irradiation at 6 kGy. As the radiation dosage increased, microbial profiles in the POMU specimens changed dramatically; the microbial counts decreased as the irradiation dose increased.

3.2. Detecting changes in antioxidant activity after gamma irradiation by ABTS assay

ABTS assay is often used for the evaluation of total antioxidant power of single compounds and complex mixtures of various plants [24]. In this assay, ABTS radical monocation was generated directly in stable form from potassium peroxodisulfate. Radicals were generated before antioxidants were added; this modification made the assay less susceptible to interruptions and prevented overestimation of antioxidant power [25]. The sample was added to the reaction medium when stable absorbance was obtained, and the antioxidant activity was measured in terms of decolorization.

Table 2
Total antioxidant activity assessed by TEAC.

Samples and positive control	TEAC ($\mu\text{M Trolox}/\text{mg} \pm \text{SD}$) ^a
0 kGy	52.08 \pm 0.79
5 kGy	63.62 \pm 0.84
10 kGy	59.77 \pm 1.03
15 kGy	55.92 \pm 0.80
THSG	1871.53 \pm 15.38
BHT	1869.41 \pm 34.63
GSH	1827.68 \pm 76.84

^a All values are expressed as mean \pm S.D. of triplicate tests ($n=3$). Values represented mean \pm S.D. of three parallel measurements ($p < 0.05$) when analyzed by ANOVA and Duncan's multiple-range tests.

The results of ABTS assay were expressed in TEAC values. A higher TEAC value meant that the sample had a stronger antioxidant activity. TEAC values determined from the calibration curve for POMU are shown in Table 2. Antioxidant activities of the POMU extracts were in the following decreasing order: 5 kGy (63.62 \pm 0.84 $\mu\text{M}/\text{mg}$ extract) > 10 kGy (59.77 \pm 1.03 $\mu\text{M}/\text{mg}$ extract) > 15 kGy (55.92 \pm 0.80 $\mu\text{M}/\text{mg}$ extract) > 0 kGy (52.08 \pm 0.79 $\mu\text{M}/\text{mg}$ extract). The antioxidant potency of THSG (positive control) was 1871.53 \pm 15.38 $\mu\text{M}/\text{mg}$ extract.

ABTS assay was used to estimate the total antioxidant power because it is quick and simple to perform, and reactions are reproducible and linearly related to the molar concentration of antioxidants [26]. Furthermore it can also be used to measure the antioxidant capacity of a wide range of biological samples, pure compounds, fruits, wines, and animal tissues [27].

3.3. Detecting the effect of gamma irradiation on antioxidant activity by DPPH assay

The relatively stable organic radical DPPH is widely used in modeling systems to investigate the scavenging activity of several natural compounds, such as phenolics and anthocyanins, or crude mixtures. DPPH radical is scavenged by antioxidants through the donation of a proton to form reduced DPPH. The color changes from purple to yellow after reduction, and can be quantified by the decrease in absorbance at wavelength 517 nm. Table 3 shows IC₅₀ values for the radical-scavenging activities of POMU, THSG, and BHT using the DPPH colorimetric method. It was found that 0 kGy had the lowest IC₅₀ value (513.04 \pm 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$), followed by 5 kGy (514.28 \pm 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 10 kGy (526.79 \pm 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 15 kGy (546.03 \pm 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The four extracts showed significant differences ($p < 0.05$) in radical-scavenging activity. As shown from the above results, the sample without any treatment of gamma radiation (0 kGy) had the highest DPPH radical scavenging activity. However, its capacity was still much lower compared to the positive controls of BHT and THSG (41.06 \pm 0.76 and 37.51 \pm 0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Table 3
IC₅₀ values of the DPPH radical scavenging activities of the methanol extracts of Polygoni Multiflori Radix that had been irradiated with different dosages of gamma ray.

The dosage of gamma radiation	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^a
0 kGy	513.04 \pm 0.01
5 kGy	514.28 \pm 0.01
10 kGy	526.79 \pm 0.01
15 kGy	546.03 \pm 0.02
THSG	37.51 \pm 0.31
BHT	41.06 \pm 0.76

^a Values represented mean \pm S.D. of three parallel measurements ($p < 0.05$).

Table 4
Total polyphenol, flavonoid and flavonol contents of the methanol extracts of Polygoni Multiflori Radix that had been exposed to different doses of gamma radiation.

Dose of gamma radiation	Total polyphenols ($\mu\text{g CE}/\text{mg}$) ^b	Total flavonoids ($\mu\text{g RE}/\text{mg}$) ^c	Total flavonols ($\mu\text{g CE}/\text{mg}$) ^b
0 kGy	27.84 \pm 0.06	6.99 \pm 0.02	5.74 \pm 0.27
5 kGy	28.21 \pm 0.02	7.14 \pm 0.04	5.78 \pm 0.06
10 kGy	27.77 \pm 0.01	7.01 \pm 0.03	5.79 \pm 0.03
15 kGy	26.82 \pm 0.01	5.12 \pm 0.02 ^d	5.71 \pm 0.07

^a Values represented mean \pm S.D. of three parallel measurements.

^b Data expressed in μg (+)-catechin equiv./mg dry weight ($\mu\text{g CE}/\text{mg}$).

^c Data expressed in μg rutin equiv./mg dry weight ($\mu\text{g RE}/\text{mg}$).

^d Values significantly differing from others at 5%.

3.4. Detecting changes in antioxidant activity after gamma irradiation by reducing power measurement

We investigated Fe³⁺–Fe²⁺ transformation in POMU samples for the measurement of their reducing capacity. The reducing capacity of a compound may serve as an important indicator of its potential antioxidant activity [28]. The antioxidant activity of putative antioxidants have been attributed to various mechanisms, such as prevention of chain initiation, binding of transition metal ion catalysts, decomposition of peroxides, prevention of continued hydrogen abstraction, and radical scavenging [29]. In this assay, potassium ferricyanide was added to POMU samples and positive controls of THSG and BHT for the determination of any changes in reducing power after gamma irradiation. The mixtures were allowed to incubate during which time ferricyanide was reduced to ferrocyanide.

The reducing power was measured in terms of absorbance of the reaction mixtures at 700 nm. A higher absorbance indicated a stronger reducing power, vice versa. The reducing powers of the samples were in the following decreasing order: 0 kGy (0.79 \pm 0.02) > 5 kGy (0.55 \pm 0.02) > 10 kGy (0.52 \pm 0.01) > 15 kGy (0.46 \pm 0.01) at the dose of 1 mg/mL of POMU. The reducing powers of THSG and BHT were 1.98 \pm 0.04 and 1.30 \pm 0.02 respectively (data not shown).

3.5. Effect of gamma irradiation on total polyphenol, flavonoid, and flavonol contents

The total polyphenol, total flavonoid, and total flavonol contents of POMU are shown in Table 4. The total polyphenol content of POMU extracts ranged from 26.82 to 28.21 $\mu\text{g CE}/\text{mg}$. 0 kGy was 27.84, 5 kGy was 28.21, 10 kGy was 27.77 and 15 kGy was 26.82 $\mu\text{g CE}/\text{mg}$. 5 kGy had the highest polyphenolic content and 15 kGy was the lowest.

The total flavonoid content was expressed as μg rutin equiv./mg dry weight, and ranged from 7.14 to 5.12 $\mu\text{g RE}/\text{mg}$. 0 kGy was 6.99, 5 kGy was 7.14, 10 kGy was 7.01 and 15 kGy was 5.12 $\mu\text{g RE}/\text{mg}$. 5 kGy had the highest flavonoid content. 15 kGy was the lowest and significant different from others.

The total flavonol content was expressed as μg catechin equiv./mg dry weight. The total flavonol content of POMU extracts varied slightly and ranged from 5.79 to 5.71 $\mu\text{g CE}/\text{mg}$.

Both flavonoids and flavonols are polyphenolic compounds. Polyphenolic compounds have important roles in stabilizing lipid oxidation and are associated with antioxidant activities [30]. Phenolic compounds may contribute directly to antioxidative actions [19]. It is suggested that when as much as 1.0 g of polyphenolic compounds is ingested from a daily diet rich in fruits and vegetables, there may be inhibitory effect on mutagenesis and carcinogenesis in humans [31]. The antioxidative activities observed could

be ascribed both to variant mechanisms exerted by different phenolic compounds and to their synergistic effects. The antioxidant assays used in this study measured the oxidative products at the early and final stages of oxidation. Antioxidants have different functional properties, such as reactive oxygen species scavenging, e.g. quercetin, rutin, and catechin [32]; and inhibition of free radical generation and chain-breaking activity, e.g. *p*-coumaric acids [33] and metal chelation [34]. These compounds are normally phenolic compounds, which are effective proton donors, such as tocopherols, flavonoids and other organic acids. However, the components responsible for the antioxidative activity of POMU are still currently unclear.

3.6. Compositional changes of *Polygoni Multiflori Radix* after gamma irradiation

The effect of different doses of gamma radiation on the compositional changes of POMU was assessed. Quantitative analyses of POMU were conducted with HPLC–UV. THSG content of unirradiated and irradiated POMU was quantified based on a previously constructed HPLC–UV calibration curve for THSG standard ($R^2 = 0.996$). The content ranged from 2.13 to 3.05 mg/g of dry weight (DW) for unirradiated or irradiated POMU. Irradiation treatment resulted in significant changes in THSG content at different doses.

In this database, THSG showed statistically significant decreases from 3.05 mg/g (0 kGy, $p < 0.05$) to 2.60 mg/g after 5 kGy of irradiation ($p < 0.05$), 2.50 mg/g at 10 kGy ($p < 0.05$) and 2.13 mg/g at 15 kGy ($p < 0.01$) (Fig. 1; $N = 3$). Therefore, it was indicated that gamma irradiation caused damage to THSG content in POMU.

4. Discussion

POMU has long been used as a medicinal herb in Asia. Insect infestation and microbial contamination are serious problems for POMU storage. Gamma irradiation is able to penetrate deeply, and has been found to be useful for the hygienization of herbal products even when they are already in packages or sacks. The choice of a suitable radiation dosage is particularly important for decontaminate the microbial load of stored POMU. In this research, the optimal dosage for the inactivation of microorganisms in POMU was evaluated.

2 kGy was sufficient for the hygienization of enterobacteria, whereas a dosage of 6 kGy was required for the hygienization of yeasts and fungi. Since the dosage required removing microbial contamination is higher than that required killing insects, insects would be killed at the same time [35].

Our results confirmed that at the dose of 4 kGy, mold and yeast counts were obviously reduced; and at 6 kGy, neither yeasts nor fungi were observed any longer in POMU specimens. Thus in our research, it was demonstrated that 4–6 kGy of treatment was effective for the inactivation of microorganisms and 8 kGy treatment could induce complete inactivation.

Phenols are regarded as main contributors to antioxidant activities, the measurements are based on radical scavenging. Antioxidant capacity depends on various factors, such as the number and location of hydroxyl groups on the aromatic ring, as well as their mutual positions [36]. Our results demonstrated that the irradiation dosage on POMU (5 kGy, $63.62 \pm 0.84 \mu\text{M}/\text{mg}$ extract) had both the highest antioxidative activity and the lowest value in IC_{50} of DPPH radical-scavenging activity, and as expected, an increase of radiolytic products, which agreed with literary reports for other foods and medicines. In this study, 5 kGy γ -irradiation increased radiolytic products of POMU; however it seemed to increase the antioxidant effect of POMU in the ABTS assay.

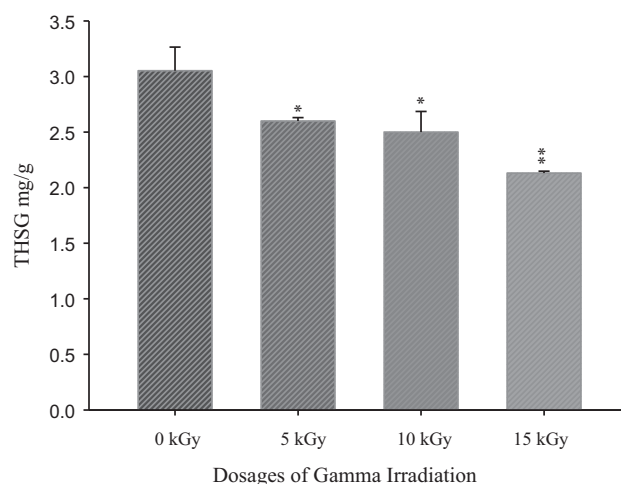


Fig. 1. Quantitation of THSG contents in the methanol extracts of *Polygoni Multiflori Radix* by HPLC.

The content of total phenols, expressed as μg (+)-catechin equiv./mg dry weight value, did not vary distinctively in irradiated POMU samples. The values were slightly lower; however variations were not statistically significant (Table 4). THSG content of POMU had decreased as the γ -radiation increased (Fig. 1). However, the total phenolic compounds and antioxidative activities were increased, probably because other phenolic compounds were formed during irradiation. It has to be mentioned that irradiation of aqueous systems containing aromatic compounds can implicate the formation of phenols.

5. Conclusion

The results of this study indicated that 5 kGy of gamma irradiation was effective for the hygienization of POMU. It did not alter the appearance of POMU before and after gamma irradiation. Though, after 5 kGy of irradiation, some physicochemical properties were slightly changed or compensated for the improved hygiene of this medicinal herb, such as the decrease in THSG content. However, the total phenolic compounds and antioxidative activities were increased. Therefore gamma irradiation at 5 kGy could be a potential method for decontaminate the microbial load of POMU to prolong shelf life and improve hygienic quality.

References

- [1] Farkas J. Irradiation of dry food ingredients. Florida: CRC Press Inc.; 1988. p. 2.
- [2] McKee LH. Microbial contamination of spices and herbs: a review. *Lebensm Wiss Technol* 1995;28:1–11.
- [3] Kneifel W, Berger E. Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *J Food Prot* 1993;57:893–901.
- [4] Pafumi J. Assessment of the microbiological quality of spices and herbs. *J Food Prot* 1986;49(12):958–63.
- [5] Eiss I. Growing impact of irradiation on global production of and trade in spices. Irradiation for food safety and quality. In: Loaharanu P, Thomas P, editors. *FAO/IAEA/WHO international conference on ensuring the safety and quality of food through radiation processing*. Turkey: American Spice Trade Association; 2001. p. 178–91.
- [6] Ehrenberg L, Hussain S. Genetic toxicity of some important epoxides. *Mutat Res* 1981;86:112–3.
- [7] Kligerman AD, Erexson GL, Phelps ME, Wilmer JL. Sister-chromatid exchange induction of peripheral blood lymphocytes of rats exposed to ethylene oxide by inhalation. *Mutat Res* 1983;120:37–44.
- [8] Pfeiffer EH, Dunkelberg H. Mutagenicity of ethylene oxide and propylene oxide and of the glycols and halohydrins formed from them during the fumigation of foodstuffs. *Food Cosmet Toxicol* 1980;18(2):115–8.
- [9] Intergovernmental Negotiating Committee. Operation of the interim prior informed consent procedure for banned or severely restricted chemicals in international trade. In: Debois M, Karmen K, editors. *Proceedings of the Rotterdam convention on the prior informed consent procedure for certain hazardous*

- chemicals and pesticides in international trade. Rotterdam: United Nations Environment Program; 2001. p. 12.
- [10] Farkas J, Andrassy E. Increased sensitivity of surviving bacterial spores in irradiated spices. In: Dring GJ, Ellar DJ, Gould GW, editors. *Fundamental and applied aspects of bacterial spores*. London: Academic Press, London; 1985. p. 397–407.
- [11] Farkas J. Irradiation as a method for decontaminating food—a review. *Int J Food Microbiol* 1998;44(3):189–204.
- [12] Ito H, Kamakura G, Sekita H, Kamiyoga S. Distribution of microorganisms in herb medicines and their decontamination by gamma-irradiation. *Shokuhin-shosha* 1999;34(1–2):16–22.
- [13] World Health, Organization. Report of an ICGFI consultation on microbiological criteria for foods to be further processed including irradiation. Geneva: WHO/EHE/FOS/89.5 WHO; 1989. p. 1.
- [14] Chinese Pharmacopoeia, Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, vol. 1. Beijing: People's Medical Publishing House; 2010. p. 164–5.
- [15] Ye S, Tang L, Xu J, Liu Q, Wang J. Postconditioning's protection of THSG on cardiac ischemia-reperfusion injury and mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2006;26(1):13–6.
- [16] Wen HW, Wang YT, Chung HP. Efficacy of gamma irradiation for protection against postharvest insect damage and microbial contamination of the adlay. *Postharvest Biol Technol* 2008;50(2–3):208–15.
- [17] Janovsky I. Response of three types of aqueous chemical dosimeters to gamma and electron radiations in the dose range 0.1–10 kGy. *Int J Radiat Appl Instrum* 1986;37(1):61–3.
- [18] Wen HW, Chung HP, Chou FI, Lin IH, Hsieh PC. Effect of gamma irradiation on microbial decontamination, and chemical and sensory characteristic of Lycium Fruit. *Radiat Phys Chem* 2006;75:593–603.
- [19] Chang TN, Huang GJ, Ho YL, Huang SS, Chang HY, Chang YS. Antioxidant and antiproliferative activities of *Crossostephium chinensis* (L.) Makino. *Am J Chin Med* 2009;37:797–814.
- [20] Huang DJ, Chen HJ, Lin CD, Lin YH. Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) constituents. *Bot Bull Acad Sin* 2005;46:99–106.
- [21] Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 1995;43:27–32.
- [22] Huang DJ, Lin CD, Chen HJ, Lin YH. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') constituents. *Bot Bull Acad Sin* 2004;45:179–86.
- [23] Chang HC, Huang GJ, Agrawal DC, Kuo CL, Wu CR, Tsay HS. Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as Gusuibu. *Bot Stud* 2007;48:397–406.
- [24] Jagetia GC, Baliga MS. Evaluation of the radioprotective action of geriforte in mice exposed to different doses of γ -irradiation. *Am J Chin Med* 2004;32(4):551–67.
- [25] Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 2002;8:121–37.
- [26] Benzie IFF, Wai Y, Strain JJ. Antioxidant (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *J Nutr Biochem* 1999;10:146–50.
- [27] Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* 2006;94:550–7.
- [28] Meir S, Kanner J, Akiri B, Hadas SP. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J Agric Food Chem* 1995;43:1813–9.
- [29] Diplock AT. Will the 'good fairies' please prove to us that vitamin E lessens human degenerative of disease? *Free Radic Res* 1997;27:511–32.
- [30] Oh YC, Kang OH, Choi JG, Chae HS, Lee YS, Brice OO, et al. Anti-inflammatory effect of resveratrol by inhibition of IL-8 production in LPS-induced THP-1 cells. *Am J Chin Med* 2009;37(6):1203–14.
- [31] Tanaka M, Kuei CW, Nagashima Y, Taguchi T. Application of antioxidative maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkai Shi* 1988;54:1409–14.
- [32] Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Moti A, Fujita Y, Yasuhara T, et al. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull* 1989;37:2016–21.
- [33] Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption versus regeneration. *Arch Biochem Biophys* 1995;323(2):373–81.
- [34] Van-Acker SABE, Van-Balen GP, Van-den-Berg Bast A, Van der vijgh WJF. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1998;56(8):935–43.
- [35] Younes MWF, Shehata NF, Mahmoud YA. Histopathological effects of gamma irradiation of the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saund.) female gonads. *J Appl Sci Res* 2009;5(3):305–10.
- [36] Rahman A, Rahman MM, Mominul IS, Mashiar R, Sheik MMI, Rahman MM, et al. Free radical scavenging activity and phenolic content of *Cassia sophera* L. *Afr J Biotechnol* 2008;7(10):1591–3.

Full Length Research Paper

Rapid identification of the medicinal plant *Taraxacum formosanum* and distinguishing of this plant from its adulterants by ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) based DNA barcode

Ying-Chen Chiang^{1#}, Wen-Te Chang^{2#}, Mann-Duan Chen², Guan-Hua Lai³, Hsi-Jien Chen⁴, Jung Chao⁵, Ming-Kuem Lin², Yuan-Shiun Chang¹, Yu-Mei Chou², Meng-Shiunn Lee⁶ and Meng-Shiou Lee^{2*}

¹College of Pharmacy, China Medical University, Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, Taichung, Taiwan.

²School of Chinese Medicine Resources, China Medical University, Taichung, Taiwan.

³Institute of Biochemistry, College of Life Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.

⁴Department of Safety, Health and Environmental Engineering, Mingchi University of Technology, Taipei, Taiwan.

⁵Graduate Institute of Life Sciences, National Defense Medical Center Taipei, Taiwan.

⁶Department of Medical Research, Tung's Taichung MetroHarbor Hospital, Taichung, Taiwan.

Accepted 2 May, 2011

Original identification of medicinal plants is essential for quality control. In this study, the internal transcribed spacer 2 (ITS2) nuclear ribosomal DNA served as a DNA barcode and was amplified by allele-specific PCR. This approach was exploited to differentiate *Taraxacum formosanum* from five related adulterants. Using a set of designed PCR primers, a highly specific 223 bp PCR product of *T. formosanum* was successfully amplified by PCR. However, no similar DNA fragment was amplified from any of the other adulterants. This indicates that, our allele specific primers have high specificity and can accurately discriminate *T. formosanum* from its adulterant plants.

Key words: Medicinal plant, polymerase chain reaction (PCR), authentication, *Taraxacum formosanum*, traditional Chinese medicinal, internal transcribed spacers 2 (ITS2).

INTRODUCTION

Taraxacum formosanum (TF) kitamura is a traditional Chinese medicine used in Taiwan and China. A whole plant extract of *Taraxacum*, commonly also known as herbal tea, is a popular folk drink and has a number of functional ingredients. It is traditionally used by herbalists and doctors for the treatment of boils, sores, inflammation of the

eye, urethral infection, lung and breast abscesses, acute appendicitis and jaundice (Li et al., 1992). *Taraxacum* has been found to have antibacterial, antifungal, antileptospiral and antiviral effects, all of which have been reported by previous studies (Li et al., 1992; Ou et al., 1994; Zhao et al., 2006).

Taraxacum officinale, *Ixeridium laevigatum*, *Youngia japonica*, *Ixeris chinensis* and *Emilia sonchifolia* var. *javanica* are very commonly misused in place of *T. formosanum*, because they have very similar morphological characteristics or because some of the key diagnostic features have been removed during processing. Especially, there is a high risk of exchange of TF specimens with its adulterants in the herbal medicine market (Cao et

*Corresponding author. E-mail: leemengshiou@mail.cmu.edu.tw. Tel: 886 (4) 2205-3366 ext 5208. Fax: +886-4-24075683.

#These Authors contributed equally to this work

al., 1997; Tong et al., 1999; Yuan et al., 2001; Zhao et al., 2006). A histological approach using microscopy together with chemical profiling by high pressure liquid chromatography (HPLC) is often used to authenticate TF and identify its adulterants and these approaches have been documented in a previous study (Committee of Chinese Medicine and Pharmacy, 2002). However, environmental and other factors such as growth, harvest time and storage condition can affect the morphological features and chemical composition of *T. formosanum*. This can result in difficulties when discriminating the various species (Zhang et al., 2007). Various DNA based methods for plant identification have been developed, for instance, random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP) and authentication by sequencing of ITS regions (Zhang et al., 2001; Ha et al., 2002; Ding et al., 2002; Kaundun et al., 2003). Identification at a DNA level has a number of advantages. These include higher effectivity, sensitivity, reliability and easy standardization when compared with other more conventional methods. DNA barcoding using a highly variable DNA region is a powerful technique when employed to distinguish organisms or species (Chase et al., 2005). The ITS of nuclear ribosomal DNA (nrDNA) and some non-coding or coding regions of plastid genomes such as *rbcL*, *matK*, *ropC1*, *ycf5* and *psbA-trnH* have been widely used as barcode candidates for plant species identification (Hon et al., 2003; Kress et al., 2005; Pang et al., 2010). Up to this day, a few molecular DNA techniques, such as RAPD analysis and PCR-RFLP have been used to identify or authenticate TF and these have allowed this plant to be distinguished from its common misused adulterants (Cao et al., 1997; Yuan et al., 2007). Nonetheless, the RADP and RFLP approaches still have some disadvantages, such as their low reproducibility and a complex and time-consuming procedure.

The aim of this study was to employ the highly specific ITS regions of TF as a DNA barcode for developing an allele-specific primer set that would allow the rapid identification of TF from its adulterants. This successfully established ITS-based PCR approach is more convenient than other molecular methods and using this approach will make it feasible to create an identification kit for TF and its adulterants in the future. The DNA barcoding methodology described in this study is the first available for the identification of TF.

MATERIALS AND METHODS

Plant source

Plants samples of *T. formosanum*, *T. officinale*, *I. laevigatum*, *Y. japonica*, *I. chinensis* and *E. sonchifolia* var. *javanica*, were collected from the China Medical University (CMU) medicinal plant garden (Taichung, Taiwan) and were identified by Associate Professor Chao-Lin Kuo of the CMU. The plant voucher specimens

were deposited at the School of Chinese Medicine Resources (SCMR) of CMU.

DNA extraction from plants

Dried leaves of *T. formosanum*, *T. officinale*, *I. laevigatum*, *Y. japonica*, *I. chinensis* and *E. sonchifolia* var. *javanica*, were collected and ground with liquid nitrogen into powder. Total DNA from each plant was extracted from the homogenized plant tissue by the Geneaid genomic extraction mini kit (Geneaid, Taipei, Taiwan) according to the manufacturer's instructions (Huang et al., 2010). The concentration of total plant DNA obtained was determined by spectrophotometer (NanoVue™, GE Healthcare, USA), and then the samples were stored at -20°C until required.

Internal transcribed spacer (ITS) sequence alignment and design of the primers

For sequence alignment, the ITS regions of *T. formosanum*, *T. officinale*, *I. laevigatum*, *Y. japonica*, *I. chinensis* and *E. sonchifolia* var. *javanica*, were identified by BLAST and subjected to multiple-sequence alignment. The GenBank accession numbers of *T. formosanum*, *T. officinale*, *I. laevigatum*, *Y. japonica*, *I. chinensis* and *E. sonchifolia* var. *javanica* used in this study were AY862577, AY862576, AY862582, AY862580, AY862578 and EU057987, respectively. Sequence alignment was carried out by Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) (Li, 2003). Oligonucleotide primers for PCR, F3-TF (5'-GCGTCGCCCCCATCATAG-3') and B3-TF (5'-GGTGAAGCATCATCCTAAG-3'), were designed based on the intraspecific variation and interspecific divergence of the aligned sequence of the ITS2 within *T. formosanum* and its adulterants. The sequence and the target positions of the primers are shown in Figure 1.

Determination of intraspecific variation of internal transcribed spacer (ITS)

The intraspecific variation was determined by calculating the ratio of numbers of aligned different nucleotides base pairs to total aligned nucleotide base pairs within ITS1 and ITS2, respectively.

Polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing

In total, 50 ng of genomic DNA of *T. formosanum* were used as template in PCR. The PCR was carried out in a 25 µl reaction mixture containing 1× Pro-taq buffer (10 mM Tri-HCl, 50 mM KCl, 0.01% gelatin, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, pH 9.0), 0.4 mM dNTPs, 5 pmole each of F3-TF and B3-TF primers, 1U Pro-taq™ DNA polymerase (Protech, Taiwan). The conditions used for PCR was 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min and a final extension cycle at 72°C for 10 min. The PCR product was separated by 2% agarose gel electrophoresis and detected by observation of the presence of visible DNA bands after ethidium bromide staining. Using 300 ng of amplified PCR product as insert DNA and 50 ng of pGEM™-T vector, the PCR amplified was DNA TA cloned according to the manufacturer's instructions (Promega, USA) using T4 DNA ligase at 4°C overnight. The ligation mixture was then transformed into competent *Escherichia coli* Top10 cells for subsequent plasmid purification and DNA sequencing.

Sensitivity and specificity of the polymerase chain reaction (PCR) amplification

To determine PCR sensitivity, different amounts of extracted genomic DNA were used as template for the PCR reaction in the

A

<i>T. formosanum</i>	ATCGCGTCGCCCCC--AT-CATAGTTC CCTTAAGGGT
<i>T. officinale</i>	*****C-**-*****A*****
<i>I. laevigatum</i>	*****--*C-***G**CT***AGTA***
<i>Y. japonica</i>	*****CTTC-*****C*****T*A*CC***
<i>I. chinensis</i>	*****T****CA*CATACTC*C**T*ATT****
<i>E. sonchifolia</i>	***T*A*GT*A**TCCTAA*--*CAC*T*CTG*T**A
F3-TF	5' -GCGTCGCCCCCATCATAG-3'

B

<i>T. formosanum</i>	AAGACCCCATTTGTATCGTCTTAGGATGATGCTTCGACC
<i>T. officinale</i>	****A****A*****TC*****C*****
<i>I. laevigatum</i>	*****C**TA*****C*****
<i>Y. japonica</i>	*****T*C*****T***CTA*****TACTTCGACT
<i>I. chinensis</i>	*****T*****G*T*C*****T
<i>E. sonchifolia</i>	*T*****T*A***C*****-*T*C**A**G*T**TT
B3-TF	3' -GAATCCTACTACGAAGCTGG-5'

Figure 1. Species-specific primers designed for identifying *T. formosanum* based on the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) ITS2 region sequences among six plant species. (A) Forward primer F3-TF; (B) backward primer B3-TF; (*) represents aligned nucleotide that are identical to upper sequence; (-) represents a gap in the aligned sequence; accession numbers of GenBank EF114672, AY862576, AY862582, AY862580, AY862578 and EU057987 represents *T. formosanum*, *T. officinale*, *I. laevigatum*, *Y. japonica*, *I. chinensis* and *E. sonchifolia* var. *javanica*, respectively.

presence of the F3-TF and B3-TF primers. The specificity of the PCR using the F3-TF and B3-TF primers was examined using extracted genomic DNA from *T. officinale*, *I. laevigatum*, *Y. japonica*, *I. chinensis* and *E. sonchifolia* var. *javanica* as the negative controls.

RESULTS**Analysis of internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequence alignment**

To design the allele-specific primers for identifying TF, the ITS regions of the nrDNA of TF and its adulterants, *T. officinale* (TO), *I. laevigatum* (IL), *Y. japonica* (YJ), *I. chinensis* (IC) and *E. sonchifolia* var. *javanica* (ES) available from the GenBank were collected and aligned. The ITS sequences of one TF sample (GenBank accession no: AY862577), four TO samples (GenBank accession no: AY862583, AY862576, AY548211 and

L48337), two IL samples (GenBank accession no: EU363588, AY862582), two YJ samples (GenBank accession no: AY862580, AJ633294), two IC samples (GenBank accession no: EU363587, AY862578) and one ES samples (GenBank accession no: GQ434537, FJ980356, EU057987 and EF108405) were used to determine the species-specific conservative DNA region. Based on the interspecies and intraspecies sequence variation of ITS2, the allele-specific primers for TF, F3-TF and B3-TF, were designed using NCBI primer blast tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Figure 1).

Development of allele specific primers for authentication of *T. formosanum*

To examine the primer specificity for TF, extracted genomic DNA of TF and its adulterants were individually used as template to perform the species-specific PCR for

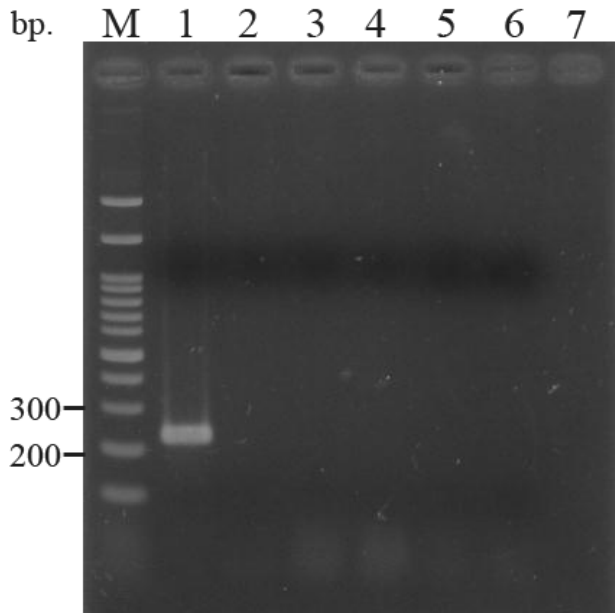


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products from species-specific primer amplification using F3-TF and B3-TF, which were designed for identifying *Taraxacum formosanum* based on its nuclear ribosomal DNA (nrDNA) ITS2 region sequence. Lanes 1-6 indicates *Taraxacum formosanum*, *Taraxacum officinale*, *Ixeridium laevigatum*, *Youngia japonica*, *Ixeris chinensis*, and *Emilia sonchifolia* var. *javanica*, respectively. Lane 7: blank. M: DNA marker.

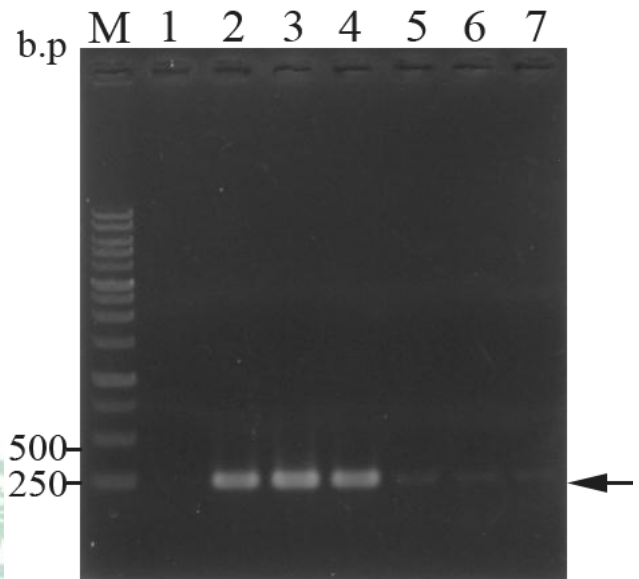


Figure 4. Determination of the PCR sensitivity using allele-specific primers. The allele-specific primers, F3-TF and B3-TF, were used with genomic DNA from *Taraxacum formosanum* for the PCR reaction. The PCR reactions were performed after adding various amounts of *Taraxacum formosanum* genomic DNA. Lane M, 100 bp DNA ladder marker; Lane 1, negative control, lane 2 to 7 were amplified with 100 ng, 20 ng, 1 ng, 100, 10 and 1 pg of extracted genomic DNA, respectively.

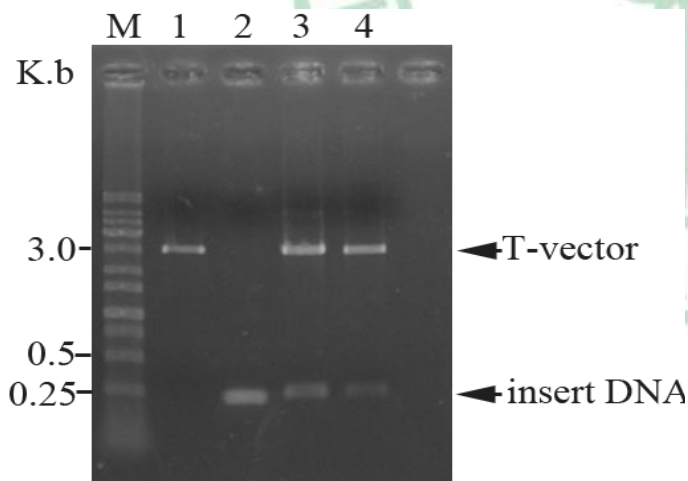


Figure 3. Cloning of the *T. formosanum* PCR amplified DNA fragment of 250 bp into pGEM-T vector. Lane M, 100 bp DNA ladder marker; lane 1, insert DNA (250 bp of DNA fragment amplified by species-specific PCR); lane 2, pGEM-T vector only; lane 3, 250 bp of insert DNA was cloned into pGEM-T vector and the recombinant plasmid digested at two sites with *EcoRI*

TF identification. As shown in Figure 2, an abundant DNA fragment of 223 bp, approximately the size amplified, was detected by agarose gel electrophoresis when genomic DNA of TF was added to the PCR reaction. In contrast,

PCR reactions involving genomic DNA template of the adulterants, *T. officinale*, *I. laevigatum*, *Y. japonica*, *I. chinensis* and *E. sonchifolia* var. *javanica*, did not result in any PCR product. These results indicate that the PCR primers designed for TF are suitable for amplifying the target nucleic acid of TF and are able to discriminate between TF and its adulterants. To further confirm the identity of the amplified PCR product in the TF sample, the PCR product was cloned and sequenced. As shown in Figure 3, the PCR product cloned into pGEM-T vector gave a plasmid, approximately 3.25 kb in size. After sequencing, the obtained sequence of the PCR product was 99.5% identical to the ITS2 sequence of TF (GenBank accession no: AY862577), which confirms that the species-specific PCR specifically detects TF.

Sensitivity of PCR for authentication of *T. formosanum*

To evaluate the sensitivity of the PCR method for authenticating TF genomic DNA, extracted TF genomic DNA was serially diluted 10-fold and used as template DNA. Genomic DNA amounts ranging from 1 ng to 1 fg were used in the PCR reaction. After performing the PCR reaction, the 223 bp of PCR product was detected over the DNA range 1 ng to 1 pg as shown in Figure 4. No PCR product was detected by DNA electrophoresis when less than 1 pg of template DNA was added to the PCR

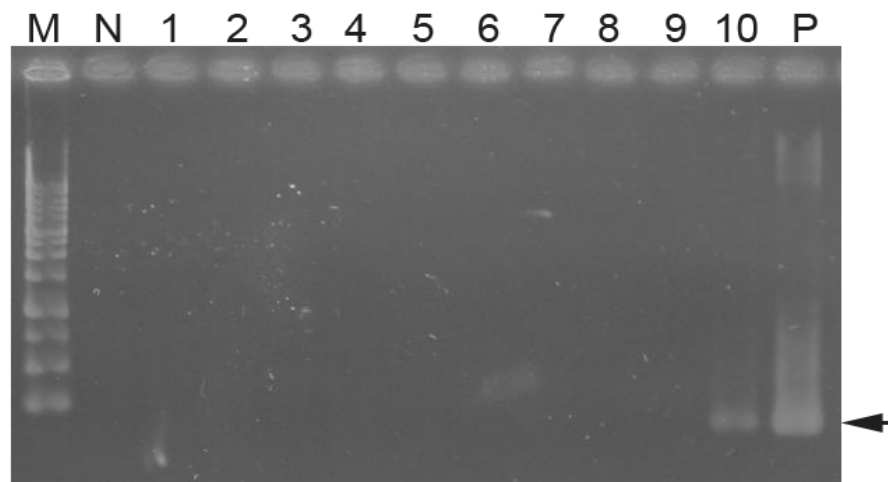


Figure 5. Species-specific PCR for identifying *T. formosanum* among 10 collected commercial plant species. Lane M, 100 bp DNA ladder marker; lanes 1 to 10 PCR amplification products using DNA extracted from 10 collected commercial samples that were reputed to be *T. formosanum*; lane N, negative control; lane P, positive control.

reaction. Therefore, the sensitivity of species-specific PCR for authenticating TF was determined to be 1 pg. These results suggested that, this newly established PCR assay using allele-specific primers is both highly specific and sensitive when authenticating TF genomic DNA from its common misused adulterants.

Application of PCR to the authentication of *T. formosanum* from an herbal market

Based on the stated results, we applied this species-specific PCR in practice by examining 10 commercially obtained TF plants purchased from different herbal markets in Taiwan. After DNA extraction and performing the PCR reaction, the desired PCR product was amplified from one of 10 crude samples of TF plant (Figure 5). These results indicate that most of the commercial specimens of TF were significantly adulterated; that the PCR assay for identifying TF material works well and shows high selectivity; that this approach is able to amplify any species-specific DNA present; and that when TF was mixed with its adulterants, this specific PCR product of TF could be detected.

DISCUSSION

In this study, we have successfully developed an allele-specific PCR method for sensitive and specific identification of TF. Herein, the allele-specific PCR primer was designed based on the specific DNA region of ITS2 of TF. The results of sequence alignment revealed that, the ITS2 of TF showed higher interspecies variation than intraspecies variation. However, ITS1 did not show

significantly different sequence divergence across the *Taraxacum* species between ITS1 (4.70%) and ITS2 (4.88%). Therefore, the ITS2 sequence was chosen and the conservative DNA regions of ITS2 were aligned and are presented in Figure 1. The interspecies variation of ITS2 among TF and its adulterants ranged from 27.02 to 59.45%, which is very useful when designing allele-specific primers.

After establishing the allele-specific PCR method, it was also showed to be applied in practice for identifying TF medicinal plant. Thus, the approach employed in this work was proved to be both sensitive and specific in the further studies (data not shown). The length of the ITS regions seems to vary with the medicinal plants sample and, if necessary, can be sequenced during the process of identification. The length of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 fragments ranged from 550 to 850 bp (Hon et al., 2003; Kress et al., 2005; Pang et al., 2010). Direct sequencing of the ITS regions is frequently employed when these regions are amplified by PCR with various universal primer sets. However, a lack of truly universal primers for amplification of ITS regions from plants has limited their usefulness when this methodology is applied to species identification (Kress et al., 2005). In contrast, using suitable target DNA sequence information from the GenBank, it is possible to examine the interspecies and intraspecies variation of specimens and this information can be used to design species-specific primers. In this study, the newly established species-specific PCR for medicinal identification is highly effective, simple and quite easy to apply and this will allow more effective high-throughput authentication than directly sequencing. Additionally, widely used traditional Chinese medicine materials are usually processed into dried slices for long-term storage or transportation. DNA degradation is

common during this process. The presented species-specific PCR should be able to overcome the problems associated with this processing, because in the future the length of amplified PCR product can be adjusted during primer designing to increase the probability of the PCR succeeding. Other advantages of this approach are its time-effectiveness and lower cost compared with the other methods such as DNA sequencing. Based on the stated findings, it would seem that, this established PCR assay should have worldwide applications in medicinal plant identification (Xue et al., 2006; Li et al., 2007).

In conclusion, this investigation has successfully developed a species-specific PCR system for identifying TF that is rapid, cost-effective and highly specific. It targets the DNA barcode of ITS2 and distinguishes TF from its adulterants. It is an easy, useful and standard method that can be developed for use with many herbal ingredients. Therefore, in the future, species-specific PCR should become a powerful tool for quality control for the authentication of herbal plants in the market place.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the grants from China Medical University of Taiwan (CMU96-253) and Committee on Chinese Medical and Pharmacy, Department of Health, Executive Yuan of Taiwan (CCMP99-RD-021).

Abbreviations

PCR, Polymerase chain reaction; **ITS**, internal transcribed spacer; **HPLC**, high pressure liquid chromatography; **RAPD**, random amplified polymorphic DNA; **PCR-RFLP**, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; **AFLP**, amplified fragment length polymorphism.

REFERENCES

- Cao H, But PP, Shaw P (1997). Identification of herbal *Taraxaci* and its adulterants in Hong Kong market by DNA fingerprinting with random primed PCR. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 22: 197-200.
- Chaseb MW, Salamin N, Wilkison M, Dunwell JM, Keasanakurthi RP, Haidar N, Savolainen V (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos. Trans R. Soc. Lon. B Biol. Sci.* 360: 1889-1895.
- Committee of Chinese Medicine and Pharmacy (2002). Adulteration and substitution species of Chinese crude drugs in Taiwan. Committee on Chinese Medicine and Pharmacy, Department of Health, Executive Yuan (ed.) Taipei, p. 111.
- Ding X, Xu L, Wang Z, Zhou K, Xu H, Wang Y (2002). Allele-specific primers for diagnostic PCR authentication of *Dendrobium officinale*. *Planta Med.* 68: 191-192.
- Ha WY, Shaw PC, Liu J, Yau FC, Wang J. (2002). Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA (DAMD). *J. Agric. Food Chem.* 50: 1871-1875.

- Hon CC, Chow YC, Zeng FY, Leung FC (2003). Genetic authentication of ginseng and other traditional Chinese medicine. *Acta Pharmacol. Sin.* 24: 841-846.
- Huang CH, Lai GH, Lee MS, Lin WH, Lien YY, Hsueh SC, Kao JY, Chang WT, Lu TC, Lin WN, Chen HJ, Lee MS (2010). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of chicken anaemia virus. *J. Appl. Microbiol.* 108: 917-924.
- Kaundun SS, Matsumoto S (2003). Identification of processed Japanese green tea based on polymorphisms generated by STS-RFLP. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1765-1770.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Prco. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8369-8374.
- Li GX (1992). *Pharmacology, Toxicity and Clinic of Traditional Chinese Medicine*; Tianjin Science and Technique Translation Publishing House: Tianjin, p. 207-208.
- Li KB (2003). ClustalW-MPI: ClustalW analysis using distributed and parallel computing. *Bioinformatics* 19: 1585-1586.
- Li X, Ding X, Chu B, Ding G, Gu S, Qian L, Wang Y, Zhou Q (2007). Molecular authentication of *Alisma orientale* by PCR-RFLP and ARMS. *Planta Med.* 73: 67-70.
- Ou M, Li YW (1994). *The Traditional Chinese Drug and its usage*; Hai Feng Press: Hong Kong, pp. 49-51.
- Pang X, Song J, Zhu Y, Xie C, Chen S (2010). Using DNA barcoding to identify species with Euphorbiaceae. *Planta Med.* DOI: 10.1055/s-0030-1249806.
- Tong CF, He YL, Zhang XZ, Cai HY, Zhang YX (1999). Investigation of adulteration and substitution species of Chinese crude drugs in Taiwan. *Chinese Med. College J.* 8: 35-46.
- Xue CY, Li DZ, Lu JM, Yang JB, Liu JQ (2006). Molecular authentication of the traditional Tibetan medical plant *Swertia mussotii*. *Planta Med.* 72: 721-726.
- Yuan CC (2001). Textual research of material medica *Taraxacum mongolicum* and varietal identification. *Chinese Wild Plant Res.* 20: 6-8.
- Yuan CI, Lin LC, Kao CL, Chiang MY (2007). PCR-RFLP marker of ribosomal DNA used in detection of adulterant species of *Taraxacum mongolicum*. *Crop Environ. Bioinform.* 4: 285-296.
- Zhang KY, Leung HW, Yeung HW, Wong RN (2001). Differentiation of *Lycium barbarum* from its related *Lycium* species using random amplified polymorphic DNA. *Planta Med.* 67: 379-381.
- Zhang YB, Shaw PC, Sze CW, Wang ZT, Tong Y (2007). Molecular authentication of Chinese herbal materials. *J. Food Drug Anal.* 15: 1-9.
- Zhao L, Yang YJ, Lin D (2006). Economic values of Dandelion. *Liaoning Agric. Sci.* 6: 33-35.