

壹、前言

蜂膠為蜜蜂採集特定植物之樹脂狀物質，再混合其大顎腺分泌物、蜂蠟及花粉等物質而成之混合物。蜜蜂利用蜂膠來修補巢房、黏著巢框、縮小巢門、封閉病變幼虫巢房等，以抑制病原微生物的擴散。雖然採集地區植物相的分佈、季節及蜜蜂品系皆會影響蜂膠的組成，一般而言，其內約含有50~55%樹脂、30%蜂蠟、8~10%植物精油、5%花粉及其它物質。

在現代醫學興盛以前，蜂膠一直是歐洲及蘇聯地區的民俗藥方。近年來許多研究指出蜂膠具有多種生物活性(如抗菌、抗濾過性病毒、抗氧化、活化巨噬細胞及抗腫瘤等)，而此一活性表現可能與蜂膠之多元酚類化合物及其衍生物有關。然上述之活性表現多為體外試驗之結果，對於人體影響之研究仍相當缺乏。

順勢療法已成為一種趨勢，主要是藉由提高身體的免疫能力與自然之治療能力來預防疾病的產生或協助身體的復原，因而使得許多具有功能性的保健食品受到重視。由於心血管疾病已為國人日趨嚴重的健康問題，而自由基與氧化反應又是其重要導因。因此本研究室將針對蜂膠之抗氧化性，由 *in vitro* 至人體試驗進行一系列之探討，以了解蜂膠之實際功效與表現。

貳、文獻整理

一、氧化壓力與人體的關係

近年來有許多研究指出活性氧(reactive oxygen)、自由基(free radical)與多種症狀或疾病有密切的相關性。故探討氧化壓力的生成、對人體的影響、體內防禦系統的作用情形及如何降低氧化傷害等為現今研究的重要課題之一。

(一) 活性氧與自由基

在自然界中，氧是以安定的三重態氧(triplet state oxygen； $^3\text{O}_2$)存在。其可經由數種途徑活化而形成反應性較三重態氧強之含氧分子，此即稱之為活性氧。活性氧中亦包含許多的自由基。

自由基為帶有不成對電子的原子、分子或離子，而這些未配對的電子圍繞在分子軌道上時，會因呈現不穩定的狀態而具有很大的活性。自由基與其他非自由基之活性氧統稱為活性氧分子(reactive oxygen species；ROS)(Chen et al., 1998)。

(二) 活性氧與自由基的生成

生物體之細胞常處於活性氧和自由基存在的環境下，諸如 $^1\text{O}_2$ (singlet oxygen)， O_2^- (superoxide anion)， H_2O_2 ， $\cdot\text{OH}$ (hydroxyl radical)等。自由基與活性氧會經由生物性及環境因子等過程產生，並且經由連鎖反應而形成更多的自由基。除此之外，一些較不具活性的自由基也會經由其間的交互作用

產生更具活性的自由基，如 $O_2^{\cdot-} + NO^{\cdot} \rightarrow ONNO^{\cdot-}$ (peroxynitrite)(Berry et al., 1994)及超氧陰離子 ($O_2^{\cdot-}$)經由過度金屬 (Fe^{3+} 或 Cu^{2+}) 的催化而產生氫氧自由基 ($\cdot OH$) (Halliwell et al., 1989 ; Liochev et al., 1994)進而對人體造成更大的傷害。

1. 生理代謝反應

在正常的生理代謝過程中，活性氧和自由基多源自於粒腺體電子傳遞鏈 (electron transduction chain)、過氧化氫酶 (peroxidase)、cytochrome P-450 等系統下產生。而在活化白血球細胞及其他如淋巴球細胞、纖維細胞及血管內皮細胞等，皆會利用活性氧來進行殺菌及調節細胞訊號傳遞和影響細胞生長等作用 (Curnutte et al., 1987 ; Maly et al., 1990 ; Meier et al., 1990 ; Halliwell et al., 1993)。William 等(1994)整理出生物體中較常見之活性氧及自由基的來源、作用位置及可能衍生的氧化產物(表一)。

2. 環境因子

當身體接觸到一些化學物質，如四氯化碳等，暴露於離子輻射、空氣污染、煙等環境中 (Poyer et al., 1980 ; Nakayama et al., 1984 ; 陳, 1996 ; 吳, 1997)，或攝入含多環芳香烴化合物的食物，如烤肉等，及藥物代謝等過程 (Biaglow et al., 1977 ; Cerutti et al., 1985 ; 林等, 1994)皆有可能會促使體內生成更多的活性氧及自由基。

(三) 對生物體所造成的傷害

當其攻擊細胞內或外之巨大分子，如脂質、蛋白質或核酸時，則易因膜上脂質氧化而導致膜的完整性受損；蛋白質之氨基酸殘基受到氧化修飾，如羰基 (carbonyl) 的生成 (Quinol et al., 1994)、 $-SH$ 基受氧化而形成 $-S-S-$ 等，使得重要的酵素無法活化；DNA 受自由基攻擊時，會造成 DNA 鹽基之修飾、交插聯結 (cross - link)、DNA 單股 (或雙股) 斷裂等現象 (Saul et al., 1986)而引起基因突變等諸多傷害，而導致細胞功能異常，進而影響整個生物體的健康。

(四) 氧化壓力與疾病之關係

許多疾病如粥狀動脈硬化、糖尿病的併發症、肌萎縮性側索硬化症、神經性病變、自體免疫性疾病及老化等的發生皆與氧化傷害有關。其中因物資充裕而發生之粥狀動脈硬化等疾病已為國人日趨嚴重的問題，有學者研究指出 LDL 的氧化與此一疾病的發生率有極大的相關性 (Witztum et al., 1991)。圖一為四種可能導致粥狀動脈硬化的機制。此外，Gutteridge 等(1993)亦列出一些常見疾病或症狀與自由基或活性氧間的關係(表二)。

(五) 抗氧化防禦系統

在正常情況下，生物體受到氧化傷害時，會經由抗氧化酵素及抗氧化物質來移除活性氧及自由基，並藉由修復系統(體內所含之各種將 DNA 或蛋白質受損部位加以移除或修復的酵素)使其恢復功能(Chen et al., 1993)。其中抗氧化物質包含 vitamin A, β -Carotene, vitamin C, glutathione 及 Uric acid 等；抗氧化酵素則包括 superoxide dismutase, catalases, peroxidases 及 glutathione peroxidase/transferase 等；而體內一些金屬結合蛋白，如 albumin, transferrin, ceruloplasmin, ferritin 及 metallothionein 等皆會利用其特殊結構嵌合金屬，使其無法呈現游離態進而催化氧化反應的進行。King 等(1975)，描述抗氧化酵素及抗氧化物間如何清除體內主要之活性氧及自由基的相互作用關係圖(圖二)。

因氧化傷害與抗氧化系統間的關係相當複雜，所牽涉的範圍相當廣泛，故除了上述已確定之抗氧化機制外，至今仍有許多值得研究的空間，如近幾年來，亦有學者陸續地發現存於植物中的酚類化合物亦可能具有抗氧化能力(Hertog et al., 1992; 1993)。

二、酚類化合物

(一) 酚類化合物的定義及其分類

酚類化合物廣泛存於各種植物中，其在化學上的定義為結構中帶有一個或多個 OH 基 (hydroxyl group) 的芳香環及其衍生物 (Harborne et al., 1989)。

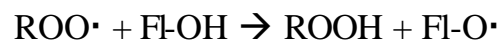
酚類化合物種類甚多，學者對其分法亦不相同。Ho 等 (1992)，將酚類化合物分為三大類：(1) simple phenol 和 phenolic acids, (2) flavonoids, (3) hydroxycinnamic acid 及其衍生物。William 等 (1994)，將自然界中的酚類化合物分為五大類：(1) flavonoids (anthocyanidins, anthoxanthins, catechins, leucoanthocyanidins, flavanones, flavanonols, flavones, flavonols 及 isoflavones 等), (2) tannins (ellagic acid 及 gallic acid), (3) phenylpropanoids (phenylpropanoic acids: caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid 及 sinapic acid 等; coumarins: esculetin 及 umbelliferone 等), (4) lignans (lariciresinol, isolariciresinol, secoisolariciresinol, matairesinol, enterolactone 及 enterodiol 等), (5) others (catechol, rosmarinic acid 及 rosmariquinone 等)。

(二) 酚類化合物的生理活性

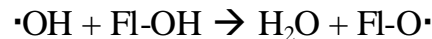
約有 500 種左右已知之 flavonoids 廣泛存於植物界，且可經由飲食攝取而進入人體 (Havsteen, 1983)。Hertog (1993) 表示，每人每日自蔬果中約攝取 20 毫克至 1 克左右的 flavonoids。目前所知酚類化合物所具有的生理活性包括了抗病毒 (Selway et al., 1986)、抗霉 (Sudhir et al., 1987)、抗菌 (Sakanka et al., 1996)、抗癌 (Isao, 1990)、抗發炎 (Brasseur et al., 1989)、抗誘突變 (Yen and Chen, 1995) 及抗氧化 (Wang et al., 1997) 等功能。

(三) 酚類化合物與抗氧化之關係

Flavonoids 為 benzo-*r*-pyrone 衍生物，能有效減緩氧化壓力所造成的傷害與其本身的結構有絕對的關連性，flavonoids 可經由下列方程式作為氫離子的提供者以穩定較具活性的自由基 (Igor et al., 1989)



(flavonoid phenoxyl radicals)



而其苯環結構所具之位移 (delocalization) 能力則可穩定自身之未配對電子 (unpaired electron) 以形成較不具攻擊性的自由基。除此之外，其亦可透過 B 環螯合游離的金屬離子，以減少藉由金屬離子所催化而生成的活性氧分子等方式來降低氧化壓力所造成的影響 (Morel et al., 1994)。

三、蜂膠

蜜蜂是一種超高密度群棲型的動物，在此一壅塞、潮濕的環境中，蜜蜂利用蜂膠來修補蜂巢、黏固巢框、縮小巢門、封閉病變幼蟲及外侵物，為協助蜂群抵抗細菌、病毒或其他微生物侵擾之重要物質。

(一) 蜂膠的定義及其來源

蜂膠為蜜蜂採集特定植物的幼芽、樹皮、嫩枝上之樹脂狀物質，攜回蜂巢交由工蜂混入其大顎腺分泌物，而後再與蜂蠟及花粉等物質結合而製成蜂膠。其產量依蜜蜂種類和地區的不同而有所差異。一般而言，一個蜂窩一年大約可得200~500 克的蜂膠 (岡田, 1999)。

蜂巢所處地區的植物生態系對蜂膠的組成有很大的影響，一般而言，因溫帶地區植物相較為單純故蜜蜂所採集的樹種亦較為固定，多以白楊樹為主 (Bankova, et al., 1992)。熱帶地區植物相較為複雜，如巴西雖以尤加利樹及松樹為主，但仍有許多膠源植物的來源是未知的(Bankova et al., 1998)；解等 (1999)則指出，美國以白楊及松樹為主；歐洲以白楊、樺樹、橡樹、榛樹、柳樹及赤楊為其主要採集樹種，其中白楊樹為東歐主要之蜂膠來源。

(二) 外觀

蜂膠是一種具有香味的天然樹脂，常呈現不透明固狀，表面光滑或粗糙，折斷面呈砂粒狀，且因樹種來源不同而呈現出黃綠至暗栗不等的顏色，如大陸膠顏色較深，呈黑褐色，具濃厚的中藥味；巴西膠則為黃褐或綠褐色，具有樹木的芳香味。其於室溫下呈黏稠狀；15°C 以下較為堅硬；5°C 以下則變脆。

(三) 自原塊中萃出的方法

白友及石塚等 (1999)指出，由原塊中抽出蜂膠成份(萃取液)的方法有以下五種：

1. 乙醇萃取法

將原塊浸泡於酒精中，反覆攪拌數次，而後經過一定時間使其內含物溶出，再將雜質移除即可製得萃取液。此為一般商家最常用的萃取方式，因原塊中約 80%以上皆由含有蜜蠟的樹脂所形成以此法最易將其內所含成份萃出。所萃出的成份多為類黃酮類、芳香族及有機酸乙脂類等，然其具有辛辣的刺激味及以水溶解後油脂會附著在容器上等缺點。

2. 微膠粒化萃取法

此法為乙醇萃取法之改良法。首先將乙醇萃取液去除酒精成份、加入乳化劑，再與甘油混合而製得。此法所得之萃取液不具刺激味且因甘油具有甜味，故有容易服用的特點。然有研究者指出其內所含之類黃酮類隨酒精之去除而降低。

3. 水萃取法

有學者指出，蜂膠的作用效果，不止在於類黃酮類而已。以此萃取法可將類黃酮以外之有效成份萃出。水萃液可再經由冷凍乾燥法製成粉末(此法須考慮微生物滋長問題)。除此之外，因其能完全溶於水，故於體質上的限制較少，接受度大為其主要特點。

4. 含水及乙醇萃取法

此法為結合水萃及乙醇萃取法兩項優點之兩階段萃取法。

5. 超臨界萃取法

此法是利用高壓將二氧化碳液化，溶出蜂膠原塊中的成份後再降壓，使二氧化碳成為氣體揮發掉而得到精製的萃取液。

上述的方法，各有其優劣性，雖然乙醇萃取法為目前最常使用的萃取方式，但究竟何種萃取方式能製得最有效之蜂膠液則仍待學者再做進一步的研究。

(四) 蜂膠的組成份

因各地植物相有所差異，故蜜蜂所採得蜂膠的成份及性質皆有所不同，甚至同一地區不同季節所產出蜂膠的組成份也不一樣。一般而言，蜂膠原塊中約含有 50~55%的樹脂類

(flavonoids, phenolic acid 及其酯類)、20~60%(平均 30%)的蜂蠟、8~10%的精油或揮發油、5%的花粉及其他有機物質和礦物質；蜂膠原塊多以乙醇萃取，主要萃出原塊中樹脂及樹膠部分。Marcucci 等(1995)指出，蜂膠萃取物中約含有二百多種物質，包括類黃酮 (flavonoids)、醇類、醛類、酮類、脂肪酸及酯類、月安基酸、芳香族及其酯類、固醇類、多醣聚合體、維生素及礦物質等等各種物質。其中，以類黃酮的含量最高，約佔萃取物的 30~40%，推測其為蜂膠中最具活性的主成份。

Flavonoids 是植物細胞色素成份之一，結構上是以 C6-C3-C6 為骨架，再銜接上不同的取代基而呈現出多種面貌。陳(1999)指出，蜂膠中主要的 flavonoids 包含(1) flavones: acacetin, chrysin, pinocembrin 及 apigenin 等；(2) flavonols: galangin, kaempferol, quercetin 及 rhamnocitrin 等；(3) flavonones: isosakuranetin, pinocembrin 及 pinostrobin 等。然因地域不同，其內之 flavonoids 組成亦有所差異性。除此之外，蜂膠中的其他成份，如 caffeic acid, cinammic acid 及其酯類，benzoic acid, gallic acid 及 diterpene 等物質亦有其功效。蜂膠因含有多種成份而賦予他多方預防及治療上的功用。

(五) 蜂膠的效用

蜂膠為一具有多功能之物質，其所擁有的生物與藥理作用包含了增強免疫力、抗菌、抗腫瘤、消炎、抗病毒、抗氧化等作用。

1. 抗發炎作用

蜂膠萃取物具有抑制發炎的能力，推測其可能與抑制發炎介質有關。而其中以 caffeic acid phenethyl ester (CAPE)的作用力最強 (Mirzoeva et al., 1996)。Rao 等(1993)亦指出蜂膠具有抑制 orithine decarboxylase, lipoxygenase, tyrosine protein kinase 及 arachidonic acid 代謝等能力。

2. 抗菌性

Grange 等(1990)證實蜂膠萃取液對革蘭氏陽性球菌及結核桿菌有明顯的抑制效果。而當其和抗生素如 penicillin 等共用時，對抗菌作用亦有相乘性 (Krol et al., 1993)。

3. 抗病毒性

Debiaggi 等(1990)發現，蜂膠中所含之 chrysin 及 kaempferol 具有抑制泡疹病毒及腺病毒的能力。Harish 等(1997)亦指出蜂膠萃取物具有抑制 HIV-1 病毒複製的能力。

4. 抗腫瘤、抗誘突變作用

Frankel 等(1993)發現，CAPE 會對腫瘤細胞造成毒性，但對一般正常的細胞則沒有影響。Quercetin 亦會抑制由 azoxymethanol 及 *N*-nitrosomethylurea 對齧齒類動物所誘發的癌化反應(Verma et al., 1988; Deschner et al., 1991)。

5. 免疫活化作用

蜂膠成份中的 artemillin C (3, 5 - diprenyl - 4-hydroxycinnamic acid)除了能抑制腫瘤細胞的生長外，其亦能增加 CD4 的數目，提高 CD4/CD8 的比值(Kimoto et al., 1998)。而松等(1992)的研究中亦發現，給予肝癌或胃癌患者每日服用 30~40 c.c.的蜂膠萃取液後，會增加自然殺手細胞的數量。

6. 抗氧化作用

蜂膠含有多種酚類化合物,推測其可能是蜂膠中主要的抗氧化物質。如，CAPE 可降低 H₂O₂ 及 TPA (12-*o*-tetradecanoylphorbol- 13-acetate,為一種癌促進劑)所誘發之 DNA 鹼基氧化，其亦可抑制 5-lipoxygenase 和 xanthine/xanthine oxidase 的活性(Rao et al., 1993 ; Frankel et al., 1993 ; Sudina et al., 1993)。而陳等(1999)亦提及，蜂膠乙醇萃取液具有清除自由基及活性氧的能力。此外，在由四氯化碳所誘發之肝損傷實驗中，Merino 等(1996)亦發現古巴蜂膠萃取物能降低肝中三酸甘油酯(TG)濃度及 ALT (alanine aminotransferase)活性，且其肝臟受損程度也有顯著性降低，作者推測可能與蜂膠之抗氧化性有關。

雖有許多學者證實了蜂膠可能具有多重療效，然多數研究皆為針對蜂膠中之有效成份進行試管、微生物或動物試驗，較少有學者對人體進行研究。且因蜂群所處之環境、萃取方式的不同所產生之蜂膠療效亦會因組成份不同而有所差

別；人體與微生物或動物實驗間之代謝程序亦具某種程度上的差異性。故於蜂膠的活性探討課題中仍有許多疑慮尚待釐清。

四、研究目的

由於所使用溶劑種類不同，蜂膠原塊中被溶出之物質亦不相同，使得所表現之生理活性亦因此而有所差異。因此本研究將比較蜂膠乙醇萃取液與水萃液於抗氧化及抗誘突變性之差異。並進一步探討蜂膠經人體攝食後，其抗氧化、血脂調整及免疫功能之表現。

參、材料與方法

一、實驗材料

(一) 蜂膠

1. 蜂膠原塊來源：分別取自台灣(1 種)、中國大陸(浙江 2 種、新疆及蒙古各 1 種)及巴西(4 種)等三地之蜂膠原塊進行分析。

2. 市售蜂膠商品：分別取 9 種滴液、3 種固狀及 2 種粉狀蜂膠進行分析。

3. 蜂膠乙醇及水萃取物之製備：

取蜂膠原塊與溶劑(以蜂膠原塊重量之四倍體積的 95% 乙醇或水)置於燒杯中，以磁石連續攪拌隔夜後，再以濾紙(Whatman No.4)過濾，所得之濾液以定量瓶定量體積即得 *in vitro* 實驗用之蜂膠萃取液。市售之固態及粉狀蜂膠則僅以 95% 乙醇萃取之。其中進行清除過氧化氫之能力、清除氫氧自由基之能力、清除 DPPH 自由基之能力及螯合亞鐵離子的能力等抗氧化性試驗以及蜂膠抑制誘突變能力之試驗，則先行將乙醇溶劑去除後再以 DMSO 溶解之。

4. 人體試驗之蜂膠液：由金佳蜂公司提供之蜂膠乙醇萃取液，酚類化合物含量為 32.11 mg gallic acid equivalent/ml 。

(二) 試驗菌株

Salmonella typhimurium TA98、TA100 及 TA102 等菌株
購自新竹食品工業發展研究所。

二、藥品

(一) 標準品

Albumin, Bovine (BSA): 購自美國 Sigma 公司

2- Cholesterol standard: 購自義大利 Clonital 公司

Gallic acid: 購自美國 Sigma 公司

Glutathione, reduced form (GSH): 購自美國 Sigma 公司

2- Glycerol standard: 購自義大利 Clonital 公司

Retinal: 購自美國 Sigma 公司

1, 1, 3, 3-Tetramethoxypropane (TMP):

購自美國 Sigma 公司

α Tocopherol: 購自美國 Sigma 公司

(二) 試驗用藥

L(+) Ascorbic acid: 購自美國 Sigma 公司

2, 2' - Azino- *bis* (3-ethylbenzthiazoline-6- sulfonic acid
(ABTS): 購自美國 Sigma 公司

Bacto-agar : 購自美國 Difco 公司

d-Biotine : 購自美國 Sigma 公司

Butylated hydroxytoluene (BHT): 購自美國 Sigma 公司

CD19(LeuTM -3a/2a) reagent: 購自日本 Becton Dickinson
公司

CD3 PreCP: 購自日本 Becton Dickinson 公司

Cholesterol- HDL precipitant reagent: 購自義大利 Clonital 公司

Cholesterol- LDL precipitant reagent: 購自 Randox 公司

Cholesterol: 購自義大利 Clonital 公司

Citric acid monohydrate : 購自美國 Sigma 公司

Copper (II) sulfate pentahydrate: 購自德國 Merck 公司 , GR 級

2- Deoxy- D- ribose: 購自美國 Sigma 公司

D-(+)-Glucose : 購自美國 Sigma 公司

L-Histidine : 購自美國 Sigma 公司

Magnesium chloride hexahydrate : 購自德國 Merck 公司 , GR 級

Magnesium sulphate hexahydrate : 購自德國 Merck 公司 , GR 級

Ethylenediamine tetra acetic acid, disodium salt (EDTA): 購自日本石津公司

Ferric chloride: 購自美國 Sigma 公司

Ferrous chloride: 購自美國 Sigma 公司

Folin- Ciocalteus' s phenol reagent: 購自德國 Merck 公司 , GR 級

Linoleic acid: 購自美國 Sigma 公司

Magnesium chloride hexahydrate : 購自德國 Merck 公司 , GR 級

Magnesium sulphate hexahydrate : 購自德國 Merck 公司 , GR 級

Metaphosphoric acid (MPA): 購自日本 Wako 公司

Myoglobin: 購自美國 Sigma 公司

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate :
購自美國 Sigma 公司

b Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
(**b** NADH):購自美國 Sigma 公司

Nutrient agar : 購自美國 Difco 公司

Nutrient broth No.2 : 購自美國 Difco 公司

Nitro blue tetrazolium (NBT): 購自美國 Sigma 公司

Phenazine methosulphate (PMS): 購自美國 Sigma 公司

*1, 1'-di*phenyl- 2- picrylhydrazyl: 購自美國 Sigma 公司

Phosphate buffer solution(PBS): 購自日本 FACSC 公司

Potassium chloride: 購自德國 Merck 公司 , GR 級

Potassium dihydrogen phosphate: 購自德國 Merck 公司 ,
GR 級

Potassium dihydrogen phosphate: 購自德國 Merck 公司 ,
GR 級

Potassium- sodium(+) tartrate tetrahydrate: 購自日本
Wako 公司

2- 2' - *di*pyridyl: 購自美國 Sigma 公司

3- (2- pyridyl)- 5, 6- *bis* (4- phenyl- sulfonic acid)- 1, 2, 4-
triazine (ferrozine): 購自美國 Sigma 公司

RBC lysing solution: 購自日本 FACSC 公司

S9 : 購自瑞士 Organon Teknika 公司 , 蛋白質含量 41.2
mg/ml

SimultestTM CD4/CD8(LeuTM-3a/2a) reagent:
購自日本 Becton Dickinson 公司

SimultestTM Control γ_1/γ_2a reagent: 購自日本 Becton
Dickinson 公司

Sodium ammonium hydrogen phosphate tetrahydrate :
購自德國 Merck 公司 , GR 級

Sodium carbonate: 購自日本 Wako 公司

Sodium chloride: 購自德國 Merck 公司 , GR 級

Sodium dihydrogen phosphate : 購自德國 Merck 公司 ,
GR 級

di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous :
購自德國 Merck 公司 , GR 級

Sodium dihydrogen phosphate monohydrate:
購自德國 Merck 公司 , GR 級

Sodium hydroxide: 購自日本昭和公司

di- Sodium hydrogen phosphate anhydrous:
購自德國 Merck 公司 , GR 級

5,5' - *di*thio- *bis*(2-nitrobenzoic acid) (DTNB):
購自美國 Sigma 公司

2- Thiobarbituric acid (TBA): 購自美國 Sigma 公司

Trichloroacetic acid, 99% (TCA): 購自英國 Lancaster
公司

Triglycerides: 購自義大利 Clonital 公司

(三) 溶劑

95% 藥用酒精: 購自台灣省公賣局

Acetonitrile: 購自德國 Merck 公司, LC 級

Dichloromethane: 購自美國 Tedia 公司, LC 級

Ethanol, 99.8%: 購自日本昭和公司

Hydrochloric acid: 購自日本 OSAKA 公司

Hydrogen peroxide, 35%: 購自德國 Merck 公司

Methanol: 購自德國 Merck 公司, LC 級

n-Hexane: 購自德國 Merck 公司, LC 級

ortho-Phosphoric acid, 85%: 購自德國 Merck 公司

三、儀器設備

(一) 高效能液相層析儀(HPLC)

1. Pump, model LC 6200A, Hitachi, Japan
2. Photodiode array detector, model LC 4200, Hitachi, Japan

(二) 分光光譜儀

Spectrophotometer, U-1100, Hitachi, Japan

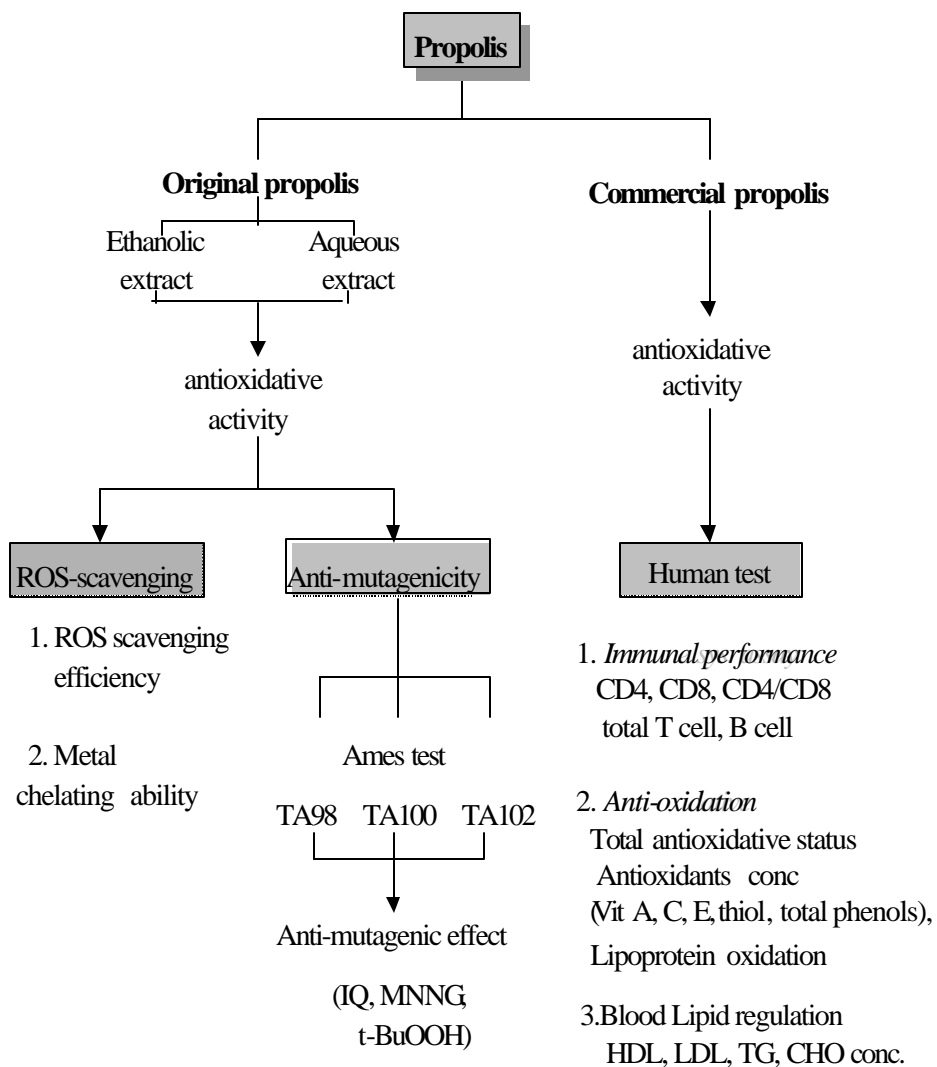
(三) 血液生化分析儀

Automatic analyzer, ARCO; Biotecnica Instruments, Italy

(四) 流式細胞儀

Flow Cytometer, Becton Dickinson FACSCalibur, Japan.

四、實驗流程



五、實驗方法

I、蜂膠 *in vitro* 抗氧化性及對誘突變性之抑制

(一) 蜂膠萃取物 *in vitro* 之抗氧化性

1. 抗氧化性之測定

參考 Lingnert 等(1979)之方法，以 linoleic acid、Tween 20 及 0.1M pH6.5 磷酸鉀緩衝液(利用均質機均質 10 秒鐘將上述三種液體混勻)製備 10mM linoleic acid emulsion。取 200 μ l 之蜂膠萃取液與 2ml 10mM linoleic acid emulsion 混勻後置於 37°C 暗室中放置 15 小時，分別於反應前後各取混合液 0.2 ml，於加入 2ml 甲醇及 6ml 60% 甲醇水溶液後，測 234nm 吸光值。樣品之抗氧化性以 A.O.A.值表示，A.O.A.值愈高表示樣品之抗氧化性愈強。其計算方法如公式 (1)：
$$A.O.A. = [\Delta A_{234}(c) - \Delta A_{234}] / \Delta A_{234}(c)^{(1)}$$
，其中， $\Delta A_{234}(c)$ 為不含樣品之 linoleic acid emulsion 於 37°C 15 小時反應前後所測得 234nm 吸光值之差值； ΔA_{234} 為含樣品之 linoleic acid emulsion 於 37°C 15 小時反應前後所測得 234nm 吸光值之差值。

2. 清除自由基之能力

(1) 清除氫氧自由基作用

參考陳等(1996)之方法，各取 2.99mM 2'-dG、0.1M pH

7.4 之磷酸鉀緩衝液、14.4mM ascorbic acid、61.8 μ M H₂O₂、28mM EDTA 及 8.756mM FeCl₃ 等六種反應液各 0.1ml 與 0.1ml 蜂膠萃取液混勻後，於 37°C 環境下水浴反應 25 分鐘後，置於冰浴終止反應，經 0.45 μ m 濾膜過濾後進行 HPLC 分析。管柱為 Lichrospher 100 RP-18 (5 μ m), 250mm x 4mm (德國 Merck 出品)，移動相為 100% A 液 (濃度為 50mM (pH 4.6) 的磷酸鉀溶液及 MeOH 以 88.8% 及 11.2% 比例混合)，流速為 0.8ml/min，檢測波長為 254nm。樣品之促氧化活性以公式(2) 計算： $8\text{-OH-dG}(\%) = S/C \times 100\%$ ⁽²⁾，其中，C 為控制組 8-OH-dG 之波峰面積，S 為實驗組 8-OH-dG 之波峰面積。

(2) 清除 DPPH 自由基作用

參考 Shimada 等(1992)之方法，先以甲醇配製不同濃度之蜂膠萃取液，而後各取 1ml 不同濃度之蜂膠萃取液，加入 250 μ l 新鮮配製之 1mM DPPH 甲醇溶液，振盪混勻後於 37°C 環境下反應 30 分鐘，再以分光光度計檢測 517nm 之吸光值。樣品對 DPPH 之清除率以公式(3)計算： $\text{清除率}(\%) = [1 - A_{517}/A_{517}(c)] \times 100\%$ ⁽³⁾，其中，A₅₁₇ 為樣品於 517nm 的吸光值；A_{517(c)} 為未添加樣品之控制組於 517nm 的吸光值。

(3) 清除超氧陰離子作用

參考 Fridovich (1984)、Gryglewski (1988) 及 Butacer (1989) 等之方法，先以 95% 乙醇配製不同濃度之蜂膠萃取液，而後

取 0.4ml 之蜂膠萃取液, 依序加入 0.2ml 0.6mM NADH 0.2ml 1.25mM NBT 及 0.2ml 0.25mM PMS 於室溫下反應 1 分鐘後測其 560nm 的吸光值。其清除率以公式(4)計算:

清除率(%)=[1-A560/A560(c)] x 100%⁽⁴⁾, 其中, A560 為樣品於 560nm 的吸光值; A560(c)為未添加樣品之控制組於 560nm 的吸光值。

(4)清除過氧化氫作用

參考 Rinis 等(1990)之方法, 取 0.6ml 之蜂膠萃取液加 0.24ml, 4mM 之 H₂O₂ 於室溫反應 20 分鐘後再加入 0.36ml 之 HRPase- phenol red (HRPase: 0.5mg/ml; phenol red: 7.5mM)。將上述之反應液置於室溫下反應 10 分鐘後, 再冰浴 10 分鐘終止其反應, 並測 610nm 之吸光值。其清除率以公式(5)計算: 清除率(%)=[1-A610/A610(c)] x 100%⁽⁵⁾, 其中, A610 為樣品於 610nm 的吸光值; A610(c)為未添加樣品之控制組於 610nm 的吸光值。

3.螯合鐵能力作用之測定

參考 Dinis 等(1994)之方法, 取 300μl 蜂膠萃取液, 加入 1.11ml 甲醇及 30μl 2mM FeCl₂, 30 秒後再加入 60μl 5mM Ferrozine, 混勻後分別於 1 分 30 秒及 10 分鐘測蜂膠乙醇萃取液及蜂膠水萃取液於 562nm 之吸光值。其對亞鐵離子之螯合能力以公式(6)計算:

螯合率(%)=[1-A562/A562(c)] x 100%⁽⁶⁾, 其中, A562 為

樣品於 562nm 的吸光值；A562(c)為未添加樣品之控制組於 562nm 的吸光值。

(二) 蜂膠萃取物對誘突變性之抑制

參考 Maron 及 Ames (1983)之方法，以 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100 及 TA102 等三種菌株進行實驗。

1. 毒性試驗

分別以有無 S9 存在之條件進行測試，無 S9 者以磷酸緩衝溶液替代，控制組則同樣以磷酸緩衝溶液代之。菌液、磷酸緩衝液及樣品各取 0.1ml 與 0.5ml 之 S9 溶液混勻，將上述之混合液置於 37°C 下水浴 20 分鐘後加入 9.2ml 無菌水，再以無菌水稀釋 10000 倍，取 1ml 稀釋液至培養皿中，倒入 nutrient agar，於 37°C 下培養 48 小時後計算菌落數，取試驗組之菌落數為控制組的 70% 以上之樣品濃度進行誘突變試驗。

2. 誘突變試驗

分別以有無 S9 存在之條件進行測試，無 S9 者以磷酸緩衝溶液替代，控制組則同樣以磷酸緩衝溶液代之。菌液、磷酸緩衝液及樣品各取 0.1ml 與 0.5ml 之 S9 溶液混勻，將上述之混合液置於 37°C 下水浴 20 分鐘後加入 2ml molten top agar，倒入已凝固之 glucose minimal agar plate，於 37°C 下培養 48 小時後計算菌落數。

3. 對誘突變劑之影響

參考 Wang 及 Lee (1996) 之方法，利用需 S9 活化之 2-amino-3-methylimidazo-[4, 5-f]-quinoline(IQ)(0.5 μ g/plate)及不需 S9 活化之 N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) (TA100: 10 μ g/plate; TA102: 0.5 μ g/plate)及 1 μ M/0.1 ml 菌液之 t-BuOOH 作為標準誘突變物，分別針對 TA98、TA100 及 TA102 進行實驗。無 S9 者以磷酸緩衝溶液替代。取 0.1ml 蜂膠萃取液、0.1ml 標準誘突變物、0.5ml S9 溶液與 0.1ml 菌液混勻，於 37°C 下水浴 20 分鐘後加入 2ml molten top agar，倒入已凝固之 glucose minimal agar plate，於 37°C 下培養 48 小時後計算菌落數。當實驗組菌落數相對於控制組之百分比愈小，表示樣品抑制誘突變之能力愈強(Francis et al., 1989)。

II、人體試驗

血液樣本之收集

對象為 26 位(約 21 歲之 13 位男性與 13 位女性)健康自願者，於每日中午服用 2ml 之蜂膠乙醇液(32.11 mg gallic acid equivalent / ml)，而於實驗期間受試者之生活作息及飲食習慣皆未作任何限制。血液樣本之收集則是於服用蜂膠前、服用蜂膠後一個星期及一個月分別以真空採血管(內含適量之抗凝血劑 EDTA 或 Heparin)抽取約 15ml 血液(禁食 12 hr)進行各項分析及服用前後各項數據之比較。

所採集之血液樣本以 2500rpm 15 分鐘、4°C 進行離心，所取得之上清液即為血漿，其中 TBARs、total antioxidative status 及 LDL oxidation 等試驗立即進行之，其餘血漿於分裝後立即置於-20°C 冰箱中凍藏，作為後續相關分析之用。

(一) 蜂膠乙醇萃取液對人體抗氧化性之探討

1. 血漿中脂質過氧化物含量測定

參考 Draper 等(1990)之方法，取 50 μ l 血漿分別加入 2ml 15% TCA 及 10 μ l 1% BHT(溶於甲醇中)，而後置於 100°C 沸水浴中反應 30 分鐘，待其冷卻後再加入 1 ml TBA (375mg / 75 ml-0.25N HCl)，而後再次將反應液置於 100°C 沸水浴中反應 30 分鐘，待溶液冷卻後以 2500rpm 進行離心 15 分鐘，取上清液測 532nm 吸光值。本實驗以 TMP 製作標準取線，血漿中之脂質過氧化物生成量則以 MDA μ mole/ L plasma 表示。

2. 血漿中總抗氧化狀態之測定

參考 Arnao(1990)及 Miller(1993)之方法，取 20 μ l 血漿依序加入以 5mM (內含 1.35mM KCl 及 68.5 mM NaCl)磷酸鹽緩衝液(pH7.4)調整 pH 值之 250 μ l 10 μ M myoglobin、250 μ l 600 μ M ABTS 及 300 μ l 335 μ M H₂O₂，混勻後置於 37°C 環境下反應 3 分鐘，而後立即測定 735nm 吸光值。總抗氧化狀態以公式(7)計算：

總抗氧化狀態(%)=[1-A735/A735(c)] x 100%⁽⁷⁾，其中，A735為含血漿樣品於 735nm 的吸光值；A735(c)為未添加血漿樣品之控制組於 735nm 的吸光值。

3. 血漿中 LDL 氧化延滯期之測定

(1) LDL 之分離

採血 8ml，經 2500rpm, 15 分鐘, 4°C 離心後即得血漿。取 3ml 血漿加 0.5ml (d=1.097)之 NaBr 溶液, 以 4°C, 50000rpm 離心 16 小時, 所得之上清液即為 VLDL 與 IDL。將上清液移除(約取出 1ml)後再加入 0.5ml (d=1.283)之 NaBr 溶液, 再以 4°C, 50000rpm 離心 20 小時, 所得之上清液即為 LDL。

(2) LDL 氧化延滯期之測定

由步驟(1)所取得之 LDL, 除了取出部分進行蛋白質測定外, 剩餘之 LDL 即以磷酸鹽緩衝液進行透析, 透析後所得之 LDL 再以磷酸鹽緩衝液調至適當濃度。*in vitro* 之 LDL 氧化測定, 將 LDL(最終濃度 50 μ g/ml)於 37°C 環境下與 CuSO₄ 溶液(最終濃度為 2 μ M)及各濃度之蜂膠(最終濃度分別為 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 μ g/ml)反應, 並於 234nm 下記錄其 3 小時內吸光值之變化; *in vivo* 之 LDL 氧化測定, 則是將 LDL(最終濃度 50 μ g/ml)於 37°C 環境下與 CuSO₄ 溶液(最終濃度為 2 μ M)反應, 並於 234nm 下記錄其 3 小時內吸光值之變化。

4.血漿中總酚類化合物含量之測定

參考 Serafini 等(1998)及 Julkune 等(1985)之方法,取 50 μ l 血漿加入 0.5ml 1M HCl , 於 37°C 環境下反應 30 分鐘後加入 0.5ml 2M NaOH (溶於 75% 甲醇中), 再次將反應液置於 37°C 中反應 30 分鐘, 而後加入 0.1ml 30% MPA (mataphosphoric acid), 靜置 3 分鐘後以 14000 rpm 離心 10 分鐘, 取上清液 50 μ l 加入 2 ml 去離子水及 1ml Folin reagent , 混勻後再加入 5ml 20% Na₂CO₃ , 再次混勻後靜置 20 分鐘, 測 735nm 吸光值。本實驗以 gallic acid 作標準曲線, 血漿中總酚類化合物含量以 mg gallic acid equivalent / ml plasma 表示。

5.LDL 中蛋白質含量測定

參考 Lowry 等(1951)之方法, 取 10 μ l 或 20 μ l LDL 加入 90 μ l 1N NaOH, 混勻後加入 200 μ l 去離子水及 100 μ l (25%Na₂CO₃: % Na-K tartrate: 1% CuSO₄=8:1:1)混合液, 靜置 10 分鐘後加入 Folin reagent (Folin : H₂O = 1 : 19.5), 而後將其置於 37°C 水浴中反應 20 分鐘, 回溫後測 660nm 吸光值。本實驗以 BSA 作標準曲線, LDL 中蛋白質含量以 mg protein / ml LDL 表示。

6.血漿中 Vit A 及 Vit E 濃度測定

參考 Arnaud 等(1991)之方法, 取 200 μ l 血漿依序加入 100 μ l 99.8% ethanol(內含 0.125% BHT)及 500 μ l hexane, 混勻

後以 4°C, 8500rpm 離心 20 分鐘。取上清液 400 μ l 置於微量離心管中,以氮氣吹乾後加入 200 μ l 移動相,溶勻後取 100 μ l 進行 HPLC 分析。所使用之分析管柱為 Lichrospher 100RP-18e (250 mm \times 4mm I.D., 5 μ m, Merck), 移動相為一有機混合液 (dichromethane : acetonitrile : methanol=20 : 70 : 10), 流速為 0.8ml / min, Retinol 及 α -tocopherol 之檢測波長分別為 325nm 及 291nm, 滯留時間分別約為 4.11 及 9.08 分鐘。本實驗分別以 retinol 及 α -tocopherol 作標準曲線。血漿中之 Vit A 及 Vit E 濃度分別以 μ g retinol / dl plasma 及 mg α -tocopherol / ml plasma 表示。

7. 血漿中 Vit C 濃度測定

參考 Zannoni 等(1974)之方式,取 100 μ l 血漿與 100 μ l 5% TCA 於冰浴狀態下反應 10 分鐘,以 4°C, 8500rpm 離心 20 分鐘,取上清液 50 μ l 加入 100 μ l 5% TCA, 10 μ l 85% *o*-H₃PO₄, 80 μ l 1% 2-2'-dipyridyl 及 10 μ l 3% FeCl₃, 混勻後於室溫下反應 20 分鐘,加入 1ml 去離子水測 532 nm 吸光值。本實驗以 L(+)-ascorbic acid 作標準曲線。血漿中 Vit C 濃度以 mg ascorbic acid / dl plasma 表示。

8. 血漿中硫醇含量測定

參考 Riddles 等(1979)之方法,取 50 μ l 血漿加入 550 μ l 去離子水、200 μ l 0.1M pH7.4 sodium phosphate saline buffer(內含 0.15M NaCl)及 200 μ l Ellman's reagent (10mM DTNB 溶於

0.1M sodium phosphate buffer 中)。混勻後於室溫下靜置 15 分鐘，測 412nm 吸光值。本實驗以 GSH 作標準曲線，血漿中硫醇含量則以 μM GSH 表示。

(二)人體免疫系統之測定方法

取 10 μl control γ_1 / γ_2 reagent、10 μl CD4/CD8 reagent 及 10 μl CD19 reagent，於上述三管中分別加入 50 μl 的全血及 50 μl PBS，經暗反應 30 分鐘後加入 2ml RBC lysing solution，再經暗反 10 分鐘後以 1500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後加入 2ml PBS，再次以 1500 rpm 離心 5 分鐘，再次去除上清液。最後加入 1ml PBS，混勻後以流式細胞儀分析體內 total T cell、B cell、CD4 及 CD8 的含量。

(三)血脂濃度之測定方法

TG 及 CHO 之含量分析皆為取 200 μl 血漿於檢體杯中直接與市售之 TG 及 CHO 血液生化分析儀專用試劑反應，而後利用血液生化分析儀進行分析。

HDL 及 LDL 則是先分別以各自專用之沉澱劑依其所須之比例混勻後，皆靜置 10 分鐘，以 4000rpm 離心 15 分鐘，取其上清液 200 μl 於檢體杯中與 CHO 血液生化分析儀專用試劑反應，而後利用血液生化分析儀進行分析。

六、統計分析

本實驗所獲致之結果，*in vitro* 部份皆以 SAS 統計軟體之 ANOVA(analysis of variance)進行分析，處理組間之差異比較則利用 Duncan's New Multiple Range Test 進行之；*in vivo* 部份則以 SPSS 統計軟體之 pair t test 進行之。

肆、結果與討論

I、蜂膠 *in vitro* 之抗氧化性及對誘突變性之抑制

一、蜂膠原塊萃取液中固形物之含量

蜂膠萃取液所具備的功效與蜜蜂所採集植物的種類及萃取溶劑的使用有密切的相關性。因此，本研究選取九種分別來自台灣、中國大陸及巴西三地之蜂膠原塊，分別以乙醇及水萃取之。所得之蜂膠液即為蜂膠乙醇萃取液(OE1~9)及蜂膠水萃取液(OW1~9)。由表三可知，以乙醇為溶劑較能將蜂膠原塊中所含之物質萃出。於同樣以乙醇為萃取溶劑的比較中得知，固形物含量依序為 OE-1 > OE-3 > OE-2 > OE-8 > OE-4 = OE-5 > OE-7 > OE-9 > OE-6，若以產地為區分基準，則可知台灣地區所萃得之固形物含量顯著地高於中國大陸及巴西地區($p < 0.05$)，中國大陸與巴西地區之蜂膠乙醇萃取液其固形物含量於統計上則未有顯著性差異；於同樣以水為萃取溶劑的比較中可知，固形物含量依序為 OE-6 > OE-3 = OE-8 > OE-1 = OE-5 > OE-2 = OE-9 > OE-7 > OE-4，若以產地為區分基準，則發現三地間蜂膠水萃取液之固形物含量並無統計上之差異。

雖蜂膠乙醇萃取液所含之固形物含量明顯較水萃取液多；台灣蜂膠乙醇萃取液內之固形物含量顯著較大陸及巴西高，此結果僅得知以乙醇為溶劑，能溶出較多之蜂膠原塊內物，但並不表示所溶出之有效成份與固形物含量成正比。

表三、蜂膠原塊萃取液中固形物之含量

Table 3. Solid contents of ethanolic and aqueous extracts of various propolis

Sample	Solid content (mg / ml extract of propolis)	
	EtOH	ddH ₂ O
Taiwan	979 (OE-1)	9 (OW-1)
Che-Chiang (1)	762 (OE-2)	8.9 (OW-2)
Che-Chiang (2)	783 (OE-3)	9.1 (OW-3)
Hsin-Chiang	699 (OE-4)	8.1 (OW-4)
Meng-Ku	699 (OE-5)	9 (OW-5)
Brazil (1)	319 (OE-6)	9.4 (OW-6)
Brazil (2)	664 (OE-7)	8.5 (OW-7)
Brazil (3)	752 (OE-8)	9.1 (OW-8)
Brazil (4)	632 (OE-9)	8.9 (OW-9)

Volpert 等(1993)於 diaphorase-catalyzed reduction 及 xanthine oxidase-catalyzed oxidations 的試驗中發現蜂膠水萃取液在清除自由基能力上明顯較乙醇萃蜂膠液強，此一結果與一般認知相左。由於 Takahama 等(1984)及 Erben-Russ 等(1987)指出，flavonoids 具有清除脂質過氧化自由基的能力。而蜂膠所表現之抗氧化性，可能是因其富含 flavonoids 所致(Krol et al., 1986)。因此，本研究將以亞麻油酸(linoleic acid)為模式系統，探討各種蜂膠萃取液抑制脂質氧化的情形。

二、蜂膠之抗氧化特性

(一) 蜂膠原塊萃取液及市售蜂膠商品抑制脂肪酸氧化之能力

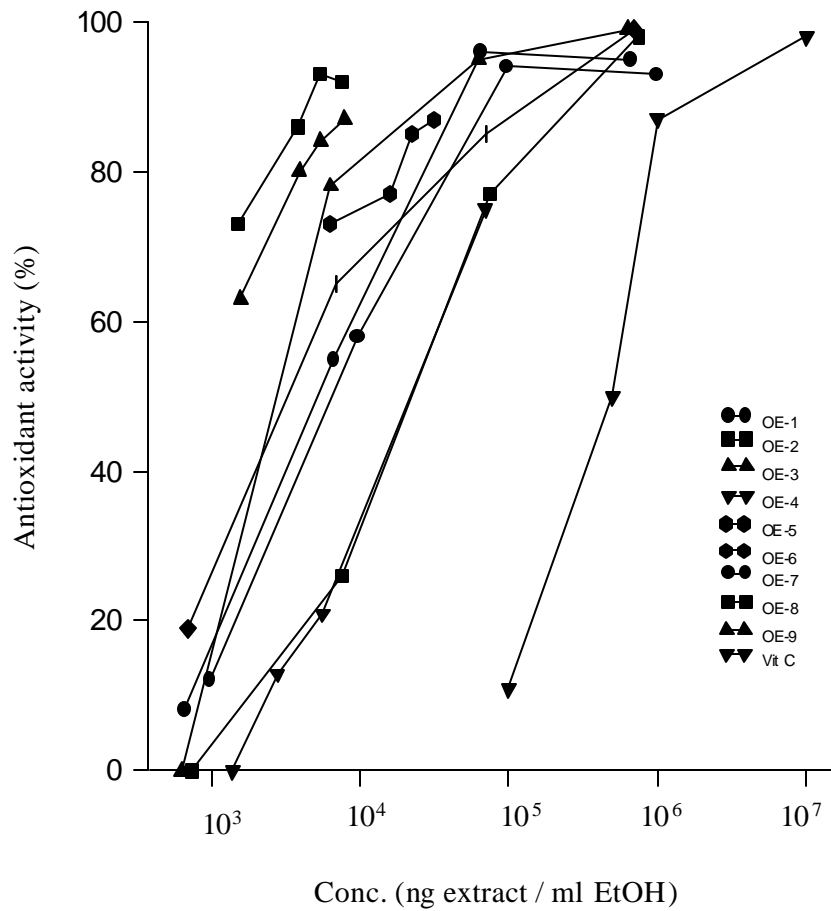
蜂膠原塊產地及萃取方式的不同皆為影響蜂膠萃取液品質優劣之重要因素。本研究以各種蜂膠萃取液抑制 linoleic acid 氧化之能力，探討原塊產地及萃取方式與其抗氧化性之關聯性。此外，由於蜂膠為聲稱具有保健功效之熱門健康食品，但市售品牌眾多且品質良莠不齊，因此本研究亦同時選擇九種市售滴劑(CL1~9)及三種錠狀(CS1~3)和兩種粉狀(CP1~2)之固態蜂膠製品，並以維生素 C 為相對之抗氧化劑，比較其抑制 linoleic acid 氧化之能力。

本研究以亞麻油酸為受質，利用脂質氧化過程中所形成之共軛雙火希鍵(conjugated double bond)物質於 234nm 波長之吸收特性來評估蜂膠原塊萃取液及市售蜂膠商品之抗氧化性。

由圖三及圖四可知，無論是蜂膠乙醇萃取液或蜂膠水萃取液，其抑制率皆隨著使用劑量的增加而提升且其抗氧化性亦較維生素 C 強。其中蜂膠乙醇萃取液在低劑量時即具有極佳的抑制效果，其抑制 linoleic acid 氧化能力遠較蜂膠水萃取液強，由此可知，乙醇能較有效地將蜂膠原塊中之抗氧化物質萃取出來。

整體而言，無論是台灣、中國大陸或巴西所產之原塊皆具有相同之抗氧化趨勢。其中又以中國大陸地區之原塊具有較佳之抗氧化性。故選擇中國大陸地區之蜂膠原塊作為往後各項 *in vitro* 試驗之原塊樣品。

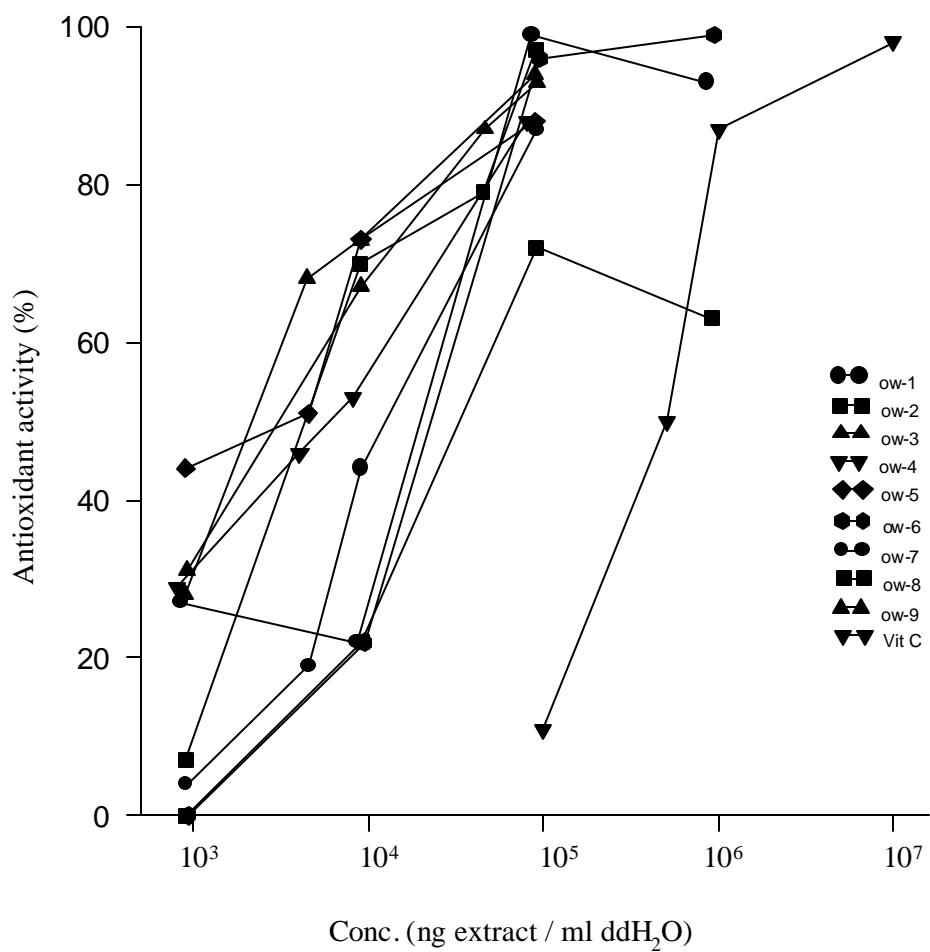
在市售蜂膠抗氧化性比較上可知(圖五及圖六)，市售產品之抗氧化功效皆隨濃度之提高而增強，市售滴劑所呈現之抗氧化能力優於錠狀及粉狀產品。滴劑之抗氧化表現較固態蜂膠產品為佳，可能是原塊經由溶劑以固定比例萃出後即得滴劑製品，而固態商品則需再經加工方能呈現出膠囊及錠狀形態，而於此過程中需添加其它物質，因而減低蜂膠於其內所佔的百分比，進而降低蜂膠之功效。



圖三、蜂膠原塊乙醇萃取物之抗氧化性

Fig. 3 Antioxidant activity of ethanolic extract of original propolis

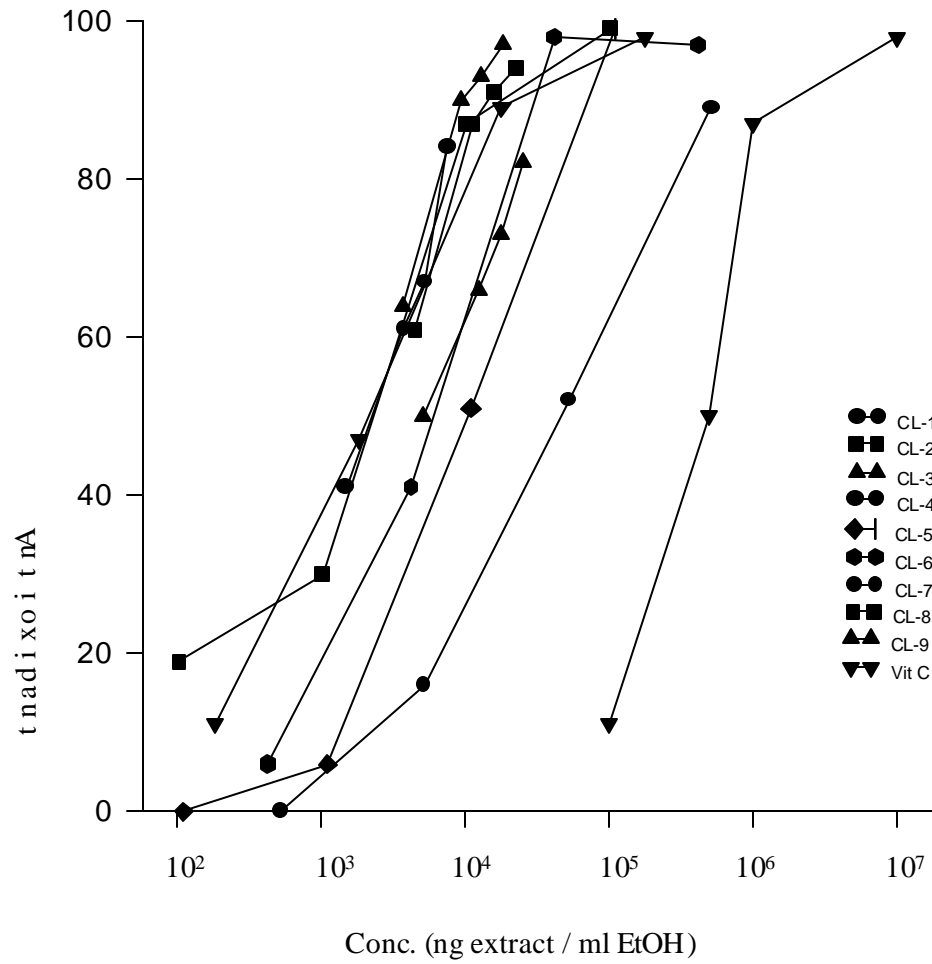
OE-1: 台灣, OE-2: 浙江(1), OE-3: 浙江(2), OE-4: 新疆, OE-5: 蒙古
 OE-6: 巴西(1), OE-7: 巴西(2), OE-8: 巴西(3), OE-9: 巴西(4)



圖四、蜂膠原塊水萃取物之抗氧化性

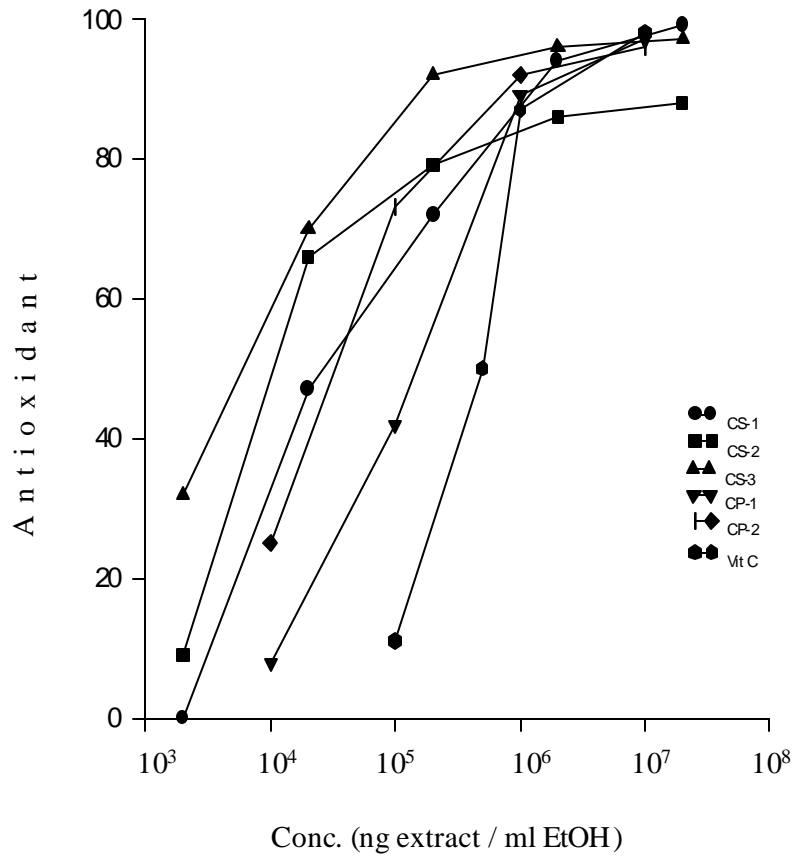
Fig. 4 Antioxidant activity of aqueous extract of original propolis

OW-1: 台灣, OW-2: 浙江(1), OW-3: 浙江(2), OW-4: 新疆, OW-5: 蒙古
 OW-6: 巴西(1), OW-7: 巴西(2), OW-8: 巴西(3), OW-9: 巴西(4)



圖五、市售蜂膠液之抗氧化性

Fig. 5 Antioxidant activity of commercial propolis liquid



activity

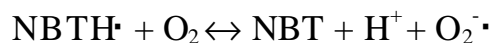
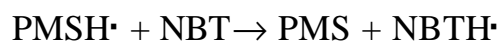
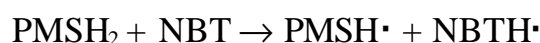
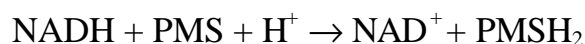
圖六、市售蜂膠膠囊粉末及硬殼膠囊乙醇萃取物之抗氧化性
 Fig. 6 Antioxidant activity of ethanolic extract of commercial propolis capsules

(二) 蜂膠對活性氧清除作用之研究

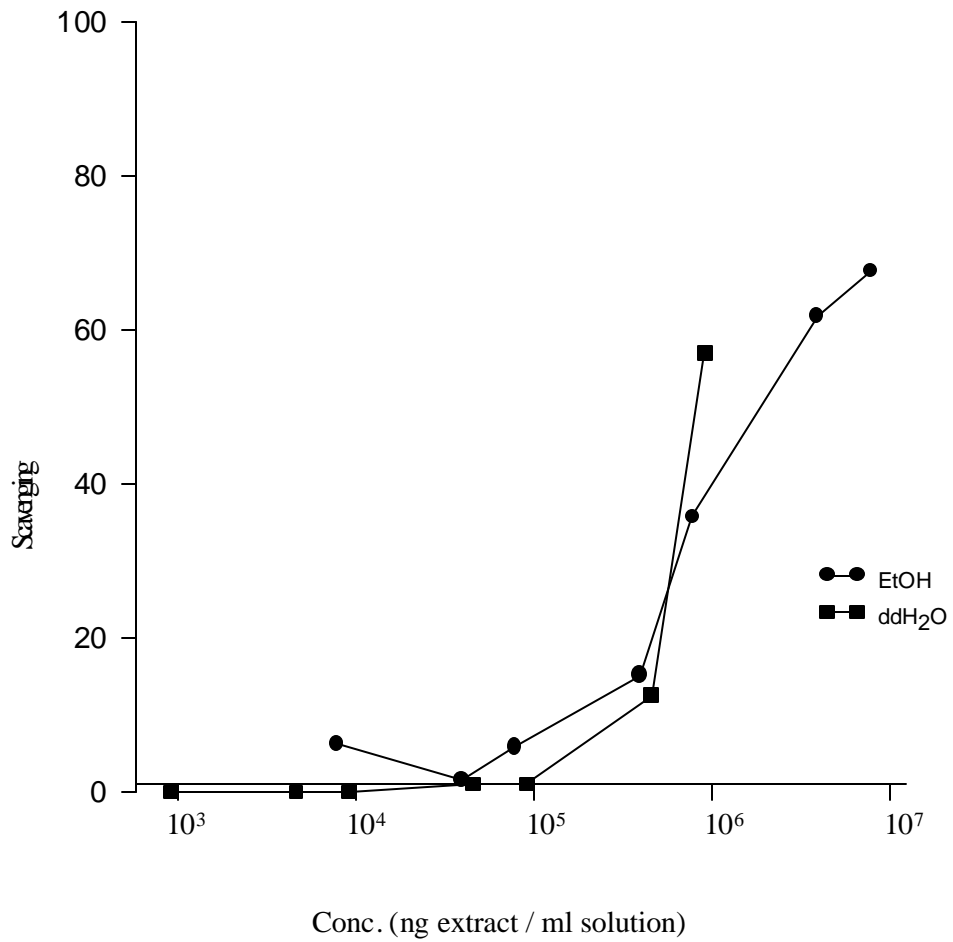
由於活性氧易對人體造成傷害，因此本研究進一步探討蜂膠對活性氧之影響。偵測的項目包括超氧陰離子($O_2^{\cdot-}$)、過氧化氫(H_2O_2)及氫氧自由基($\cdot OH$)等三種活性氧。

1. 清除超氧陰離子之能力

於非酵素系統中，Fridovich 等(1984)指出 PMS 與 NADH 所產生之超氧陰離子會將 NBT 還原成 diformazan，此化合物在 560nm 處有最大吸收波峰，當所添加之蜂膠液能使吸光值下降即表示其具有清除超氧陰離子的能力。



Robak 等(1988)發現於酵素系統 (xanthine- xanthine oxidase system)及非酵素系統所誘發之超氧陰離子皆可被 quercetin 等七種 flavonoids 所抑制。而 Chen 等(1990)亦證實 flavonoids 具有清除超氧陰離子的能力，且推論清除力之優劣與 3', 4' -diphenolic group 有關。圖七顯示，蜂膠乙醇萃取液及蜂膠水萃取液皆有清除超氧陰離子之能力，其清除力會隨著所使用蜂膠液劑量上升而有增加的趨勢，且蜂膠乙醇萃取液之清除力較水萃液為佳。

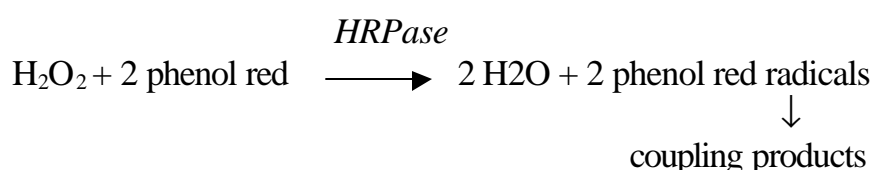


圖七、蜂膠萃取液清除超氧陰離子之能力

Fig. 7 Scavenging efficiency of ethanolic and aqueous extracts of propolis on superoxide anion

2. 清除過氧化氫之能力

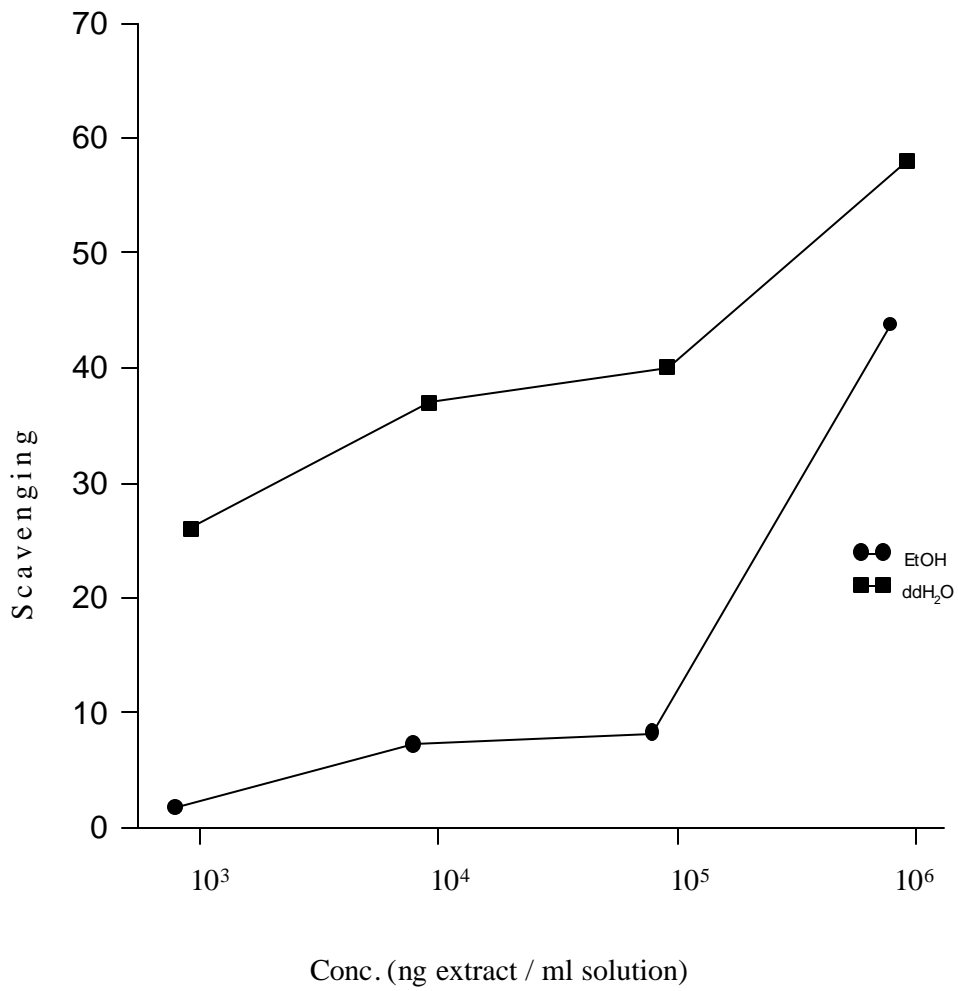
利用 Rinkus 等(1990)的方法, 以 HRP_{ase}- phenol red assay 來觀察蜂膠清除過氧化氫的能力。因 HRPase 會與 H₂O₂ 作用, 進而氧化酚紅(phenol red)產生 phenol red radicals, 最後形成 coupling products, 經由測定 610 nm 之吸光值即可判定其清除過氧化氫的能力。



由圖八可知, 蜂膠乙醇萃取液及蜂膠水萃取液皆有清除過氧化氫之能力, 其清除力會隨著所使用之蜂膠液劑量上升而有增加的趨勢。此與 Krol 等(1990)由蜂膠乙醇萃取液能有效抑制 H₂O₂ 氧化 luminol 的結果相似, 亦即蜂膠萃取液具有清除過氧化氫的能力。此外, 蜂膠乙醇萃取液之清除能力較水萃液為佳。

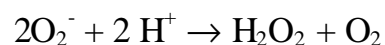
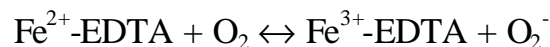
3. 清除氫氧自由基之能力

Niki (1992)指出, 氫氧自由基為相對活性較高之活性氧。當 DNA 受到氫氧自由基攻擊時會發生 hydroxylation 使得 2'-dG 在第 8 個碳上接上 -OH 基而形成 8-hydroxydeoxyguanine (8-OHdG) (Simic et al., 1994)。故本研



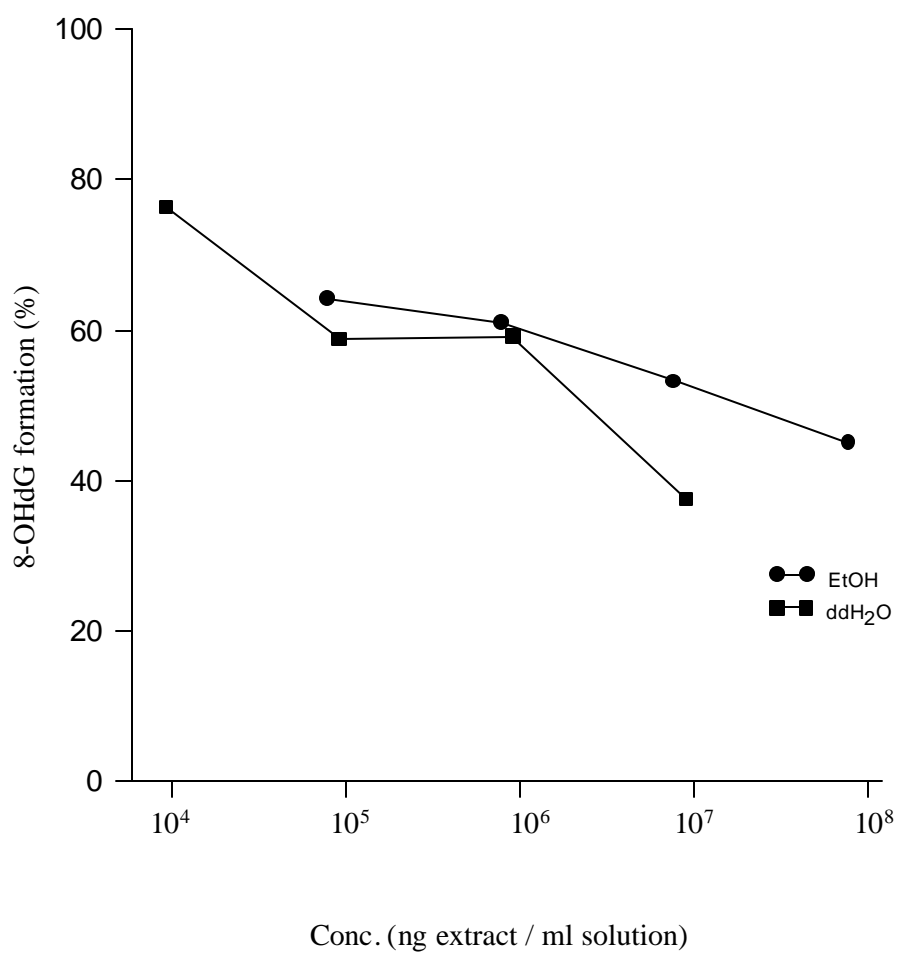
圖八、蜂膠萃取液清除過氧化氫之能力
 Fig. 8 Scavenging efficiency of ethanolic and aqueous extracts of propolis on hydrogen peroxide

究利用下列之反應式產生·OH:



藉由連接 photodiode array 檢測器之 HPLC 測定 8-OHdG, 8-OHdG 之吸收光譜顯示於 254 及 290nm 有兩個最大的吸收波峰, 此一結果與 Stadler 等(1994)之結果是相同的, 故利用 8-OHdG 之相對生成量來觀察蜂膠對·OH 的影響

圖九為實驗組相對於對照組之 8-OHdG 生成百分比, 由圖中可知, 蜂膠乙醇萃取液及蜂膠水萃取液皆有抑制 8-OHdG 產生之能力, 其抑制率會隨著所使用蜂膠液劑量上升而有增加的趨勢。Shi 等(1991)於富含酚類化合物的咖啡中亦證實其具有清除氫氧自由基的能力。Yutig 等(1990)及 Van Acker 等(1996)指出 myricetin, quercetin 及 rhamnetin 皆為有效之氫氧自由基清除者, 且此一結果與酚類化合物 B 環上氫氧基之多寡有關。此外, 蜂膠乙醇萃取液之抑制率較水萃液為佳。



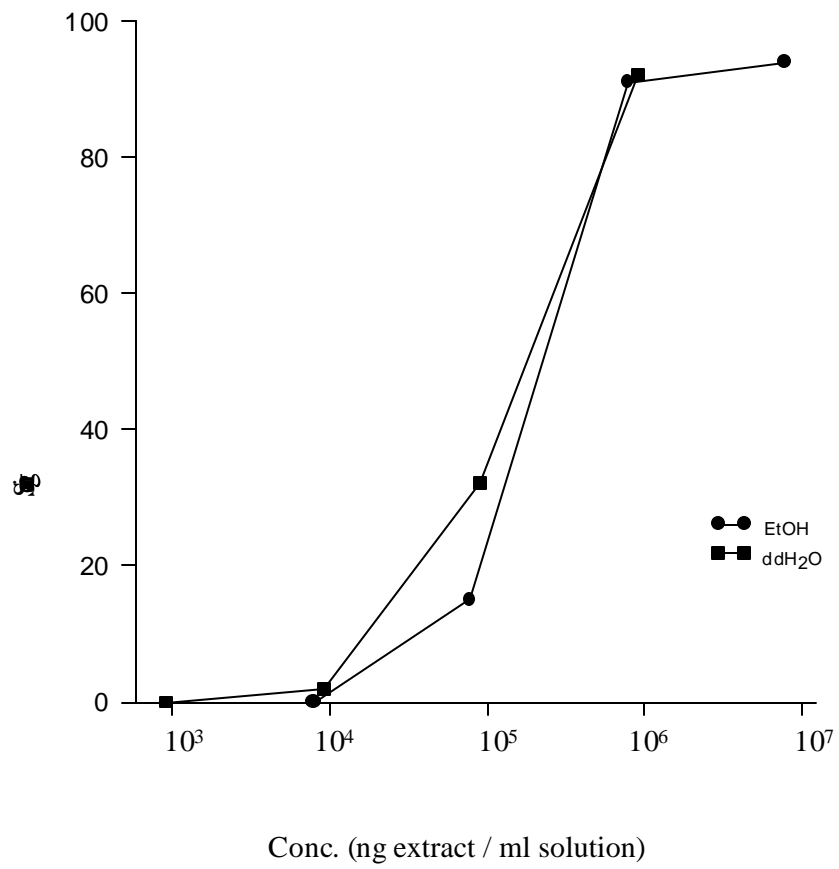
圖九、蜂膠萃取液清除氫氧自由基之能力
 Fig. 9 Scavenging efficiency of ethanolic and aqueous extracts of propolis on hydroxyl radical

4.清除 DPPH 自由基之能力

脂質在自氧化的過程中會產生自由基，若抗氧化物質提供氫離子的能力即可清除脂質過氧化自由基(peroxy radical)進而抑制氧化鏈鎖反應之進行。

DPPH 為帶有一未配位電子之自由基，因其在結構上可以產生穩定的共振，不易衰竭，並於 517nm 的波長下有獨特的吸光值。當其接受一電子或氫離子時吸光值會降低 (Kurechi et al., 1980)，故可藉由此一特性來觀察原塊蜂膠萃取液的供氫能力。

由圖十可知，蜂膠乙醇萃取液及蜂膠水萃取液皆有清除 DPPH 自由基之能力，其清除力會隨著所使用蜂膠液劑量上升而有增加的趨勢。 Scheller 等(1990)以 electron spin resonance spectroscopy 方式來探討蜂膠乙醇萃取液對 DPPH 之影響亦和本研究之結果相似。陳(1998)亦證實蜂膠乙醇萃取液能穩定 DPPH 上所帶有的自由基。故由此推測蜂膠乙醇及水萃取液內的成份皆可藉由提供氫離子而達清除 DPPH 自由基的能力。此外，蜂膠乙醇萃取液之清除力明顯較水萃液為佳。



圖十、蜂膠萃取液清除DPPH自由基之能力

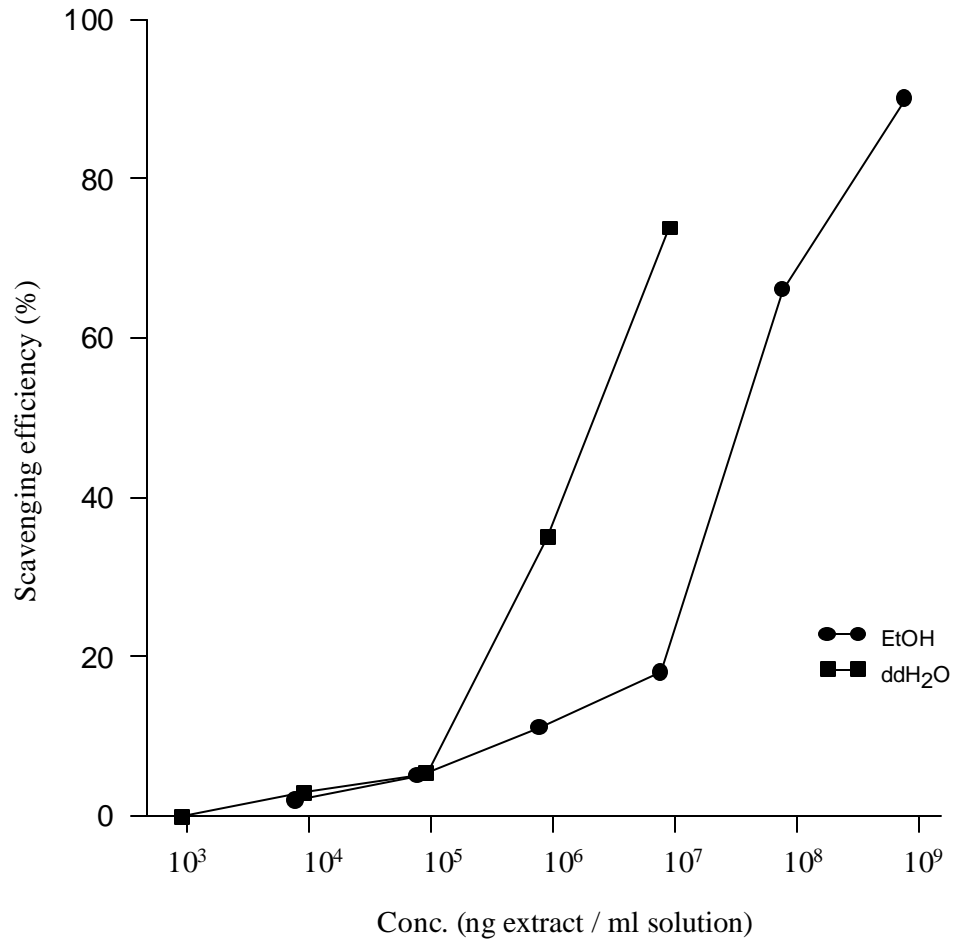
Fig. 10 Scavenging efficiency of ethanolic and aqueous extracts of propolis on DPPH radical

(三) 蜂膠螯合亞鐵離子之能力

金屬離子的促氧化作用亦為造成脂質過氧化的主因之一，只需少量的金屬離子便可藉由 redox cycle 反應而產生自由基，進而加速脂質氧化的進行。在多種金屬離子中， Fe^{2+} 是最具影響力的助氧化劑之一。故可利用 Fe^{2+} 與 ferrozine 的複合物於 562nm 呈色的特性來觀察蜂膠對 Fe^{2+} 的螯合能力。當其吸光值越低時即表示螯合力越強。

圖十一顯示，蜂膠乙醇萃取液及蜂膠水萃取液皆有螯合亞鐵離子之能力，螯合力會隨著所使用蜂膠液劑量上升而有增加的趨勢。此外，蜂膠乙醇萃取液之螯合力較水萃液為佳。而 Afanas' EV 等(1989)亦證實 rutin 及 quercetin 能有效抑制由過渡金屬所誘發之脂質過氧化現象。Sugihara 等(1999)指出，酚類化合物能有效螯合金屬離子與其 (1)B 環 3', 4'-dihydroxy group (2)C 環之 3-hydroxy 及 4-carbonyl group (3)A 環 5-hydroxy 及 C 環 4-carbonyl group 有關，推測可藉由上述之取代基與游離之金屬離子以氫鍵方式鍵結而有效螯合金屬離子。

綜合上述之各種抗氧化試驗皆可發現蜂膠萃取液能有效抑制(1)linoleic acid 氧化；(2)清除超氧陰離子、過氧化氫、氫氧自由基及 DPPH 自由基；和(3)螯合游離之過渡金屬等方式表現其抗氧化性。而由蜂膠乙醇萃取液所表現之較佳抗氧化性，可推知乙醇能較有效地將蜂膠原塊中之有效抗氧化物質萃取出來。



圖十一、蜂膠萃取液螯合亞鐵離子之能力

Fig. 11 Chelating efficiency of ethanolic and aqueous extracts of propolis on ferrous ion

三、蜂膠抗誘突變之能力

許多研究指出，自由基於哺乳動物之組織及細菌培養中皆已被證實會造成多種不同型式 DNA 損傷(Cerutti, 1985; Ames, 1989; Stich and Anders, 1989)，而這些傷害亦可能與癌症的病程發展有關(Cerutti, 1985)。因此自由基之清除與減少細胞毒性、誘突變性、致癌性及致粥瘤性等現象之發生，有極大之相關性。由前述結果可知，蜂膠具有良好之抗氧化活性。為了解蜂膠之抗氧化性與誘突變性是否有關，故選擇由 Ames 等人所發展出來，對誘突變及致癌物質預測準確性高之沙門菌回復突變測試法(Salmonella/microsome reversion assay)(McCann et al., 1976; Purchase et al., 1976; Brusick et al., 1993)，並以鼠肝酵素混合物(S9)模擬生物體內代謝活化系統。本研究選擇 TA98 及 TA100、TA102 分屬 frameshift(框架位移)及 base pair substitution(鹼基對突變)二種基因型態的菌株，進行蜂膠原塊萃取液對誘突變劑影響之試驗，並分別選擇不需及需要酵素代謝方能誘發之突變劑進行探討。

(一) 蜂膠原塊萃取液之毒性及誘突變性

在進行對誘突變劑影響之試驗前，若蜂膠萃取液對 *S. typhimurium* 菌株具有毒性或誘突變性，皆會影響其對誘突變劑影響之判斷，因此本研究先行測試蜂膠萃取液之毒性及誘突變性。本研究於誘突變及抑制誘突變試驗所選擇之劑量皆經毒性試驗而來，採用會對 TA98、TA100 及 TA102 等三株菌之菌落數維持相對於對照組菌數 70% 以上之劑量。

Meresta 等(1985)指出，蜂膠萃取物對 75 種細菌均具有顯著的抑制效果，其中有 69 種是為害人體之葡萄球菌及鏈球菌。此外，Grange 等(1990)亦指出蜂膠可抑制假螢光單孢菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)及大腸桿菌的生長。而本結果卻發現蜂膠原塊萃取液並未對試驗中所使用之三株菌造成重大的影響，推測其可能的原因為所採用之菌株特性不同或實驗中所使用之劑量並未達到抑菌最低濃度所致。

依 Ames 等(1971)提出的標準，當樣品所誘發 His⁺ revertants 之菌數高於自發性 revertants 兩倍以上，則表示此一樣品具有致突變性。由表四及表五之結果顯示，不論有無添加 S9，蜂膠萃取物對 TA98、TA100 及 TA102 等三株菌種並無誘突變作用。

(二) 蜂膠原塊萃取液對誘突變劑之影響

1. 對 t-BuOOH 之影響

TA102 為一對自由基敏感之菌株(Levin et al., 1982)，Taffe 等(1987)指出 t-BuOOH 是一種有機型態的過氧化氫，在過渡金屬存在的狀況下會迅速被分解為有害之 organic alkoxy (RO·)及 peroxy (RO₂·)等含氧自由基；Epe 等(1990)亦指出 t-BuOOH 在生理狀態下即可產生含氧自由基，而此一特性已被證明為嚙齒類動物皮膚癌之促進因子。故選擇

表四、蜂膠乙醇萃取物對 TA98, TA100 及 TA102 之誘突變性

Table 4. Mutagenic activity of ethanolic extract of propolis in *Salmonella Typhimurium* TA98, TA100 and TA102

Amount per plate (mg)	His ⁺ revertant per plate					
	TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0.01	45±3	35±4	348±33	339±6	404±13	446±15
0.1	30±3	34±3	291±31	349±6	379±30	478±13
1	30±1	25±4	214±4	281±8	295±1	382±19
Spontaneous revertants	35±1	36±1	395±2	345±1	354±21	488±42

Data are mean ± SD of three plates.

The number of spontaneous revertants was determined without sample.

表五、蜂膠水萃取物對 TA98, TA100 及 TA102 之誘突變性

Table 5. Mutagenic activity of aqueous extract of propolis in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and TA102

Amount per plate (mg)	His ⁺ revertant per plate					
	TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0.01	27±4	38±6	344±4	344±19	478±46	374±31
0.05	29±5	37±5	357±8	351±12	450±12	412±56
0.1	35±4	36±1	383±11	344±8	403±48	407±2
Spontaneous revertants	25±2	52±1	346±8	363±9	455±14	386±16

Data are mean ± SD of three plates.

The number of spontaneous revertants was determined without sample.

t-BuOOH 為誘突變劑來觀察蜂膠萃取液抑制 TA102 經 t-BuOOH 所誘發突變之能力。而由表六之結果顯示本實驗之對照組與實驗組之菌數差距稍小，推測為本實驗所使用之系統未經過度金屬活化，而減低 t-BuOOH 對菌體之傷害程度所致。雖菌數差異不大，亦可約略看出蜂膠乙醇萃取液具有較佳之抑制力，能有效清除 t-BuOOH 所造成的氧化傷害。於相一特性已被證明為嚙齒類動物皮膚癌之促進因子。故選擇 t- 似之實驗模式下，Kato 等(1991)指出咖啡在具有氧及過渡金屬存在的環境下所表現之抑突變能力與其咖啡本身富含之酚類化合物有關，其可藉由氧化自身之 phenolics 成為 quinones 而穩定較具活性之自由基。故推測富含酚類化合物之蜂膠萃取液亦是經由此一途徑達抑制由 t-BuOOH 誘發突變的效果

由抗氧化及前述之抑突變試驗後證實蜂膠原塊萃取液未經酵素作用時具有抗氧化及抑制自由基所誘發突變的能力。接下來則欲觀察蜂膠原塊萃取液經酵素代謝前後於功能上之差異性。

2.對 MNNG 誘突變劑之影響

N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine (MNNG)為一亞硝基化合物，是一種不需利用酵素作用，即可經由自發性水解而具誘突變性之誘突變劑(Mandell et al., 1960)，主要引發鹼基對的取代(McCann et al., 1975)，因此本試驗以 TA100 及 TA102 為試驗菌株來觀察蜂膠未經酵素代謝之活性表現。

表六、蜂膠乙醇及水萃取物對 t-BuOOH 誘突變性之影響

Table 6. Effect of the ethanolic and aqueous extract of propolis on the activity of t-BuOOH toward *Salmonella typhimurium* TA102 in the absence of S9

Amount per plate (mg)	His ⁺ revertant per plate
	TA102
EtOH	
Control*	746±25 ^{a**}
0.01	656±33 ^b
0.1	566±34 ^c
1	380±26 ^d
2	361±21 ^d
ddH ₂ O	
Control	772±17 ^a
0.01	677±58 ^b
0.05	759±20 ^a
0.1	728±8 ^{ab}

*The control number was determined without sample.

**Data within the same column bearing different superscript letters in the same group were significantly different (p<0.05)

Francis 等(1989)對 18 種分屬於 flavone, isoflavone, flavanone, flavanol 及 flavonol 等五大類之 flavonoids 進行研究, 觀測其抑制由 MNNG 所誘發 TA100 突變的能力。此一作者發現所測試之各項 flavonoids 皆具有抑制誘突變效果, 其中尤以 flavonols 及 flavanones 之抑制力最強 而 flavonoids 可能是經由(1) 與細菌之細胞壁發生交互作用, 妨礙 MNNG 進入菌體內部; 或(2) 促進對受損 DNA 的重組修復能力等方式降低 MNNG 造成的傷害(Kada et al., 1984)。Cizmarik 等(1998)亦發現蜂膠能有效抑制 MNNG 對 TA100 之致突變性。表七為蜂膠乙醇及水萃取液對 TA100 及 TA102 經 MNNG 誘發突變之影響。由結果可知, 回復的菌數隨所使用蜂膠液之劑量而下降, 再次論證蜂膠水萃取液及蜂膠乙醇萃取液皆具有抑制突變的能力。且蜂膠乙醇萃取液之抑制效果較水萃組為佳。

3.對 IQ 誘突變劑之影響

2-amino-3-methylimidazo(4,5-f)quinoline (IQ)為異環吡嗪類致突變劑, 其在酵素代謝活化過程中於異環吡嗪基處會進行 N-hydroxylation 作用, 進而形成 N-O-acyl 衍生物而使其具致突變性(Aeschbacher et al., 1991)。因此, 本研究利用此誘突變劑來觀察蜂膠經由 S9 代謝後是否依然具有抑制突變的能力。

表八之結果顯示，無論是蜂膠水萃取液或蜂膠乙醇萃取液皆具有抑制突變的能力，且蜂膠乙醇萃取液之抑制效果較水萃組為佳。由 Alldrick 等(1986)的研究中亦可證實 flavonoids, 如 quercetin 及 myricetin 等皆可抑制由需 S9 活化之誘突變劑 IQ 所誘發之突變。由 Lee 等(1994)以 TA98 測試 19 種常見 flavonoids 抑制 IQ 之誘突變作用的研究中亦發現，當 flavonoids 上帶有一個或多個下列之條件：(1) C4 keto group, (2) aglycone, (3) C2 及 C3 上帶有雙鍵, (4) C2 上具 phenyl group 及(5) 於 C4', C5 及 C7 上帶有-OH 基，則其對 IQ 所誘發突變有較強的抑制力。上述之 flavonoids 可能經由 (1)直接抑制由 cytochrome p-450 所活化之 *o*-deethylase 的活性，進而降低具突變性之 N-hydroxy-IQ 的產生；(2) 降低初期由 IQ 及 DNA 代謝生成之誘突變產物等機制而抑制了產生突變的機率(Shan et al., 1986； Synderwine et al., 1988)。

綜合表七及表八之結果可知，蜂膠萃取液無論是否經由酵素代謝均具有抑制由誘突變劑所誘發突變的能力。此一結果顯示蜂膠經酵素代謝後仍具活性。許多針對 MNNG 及 aflatoxinB₁ 的研究中發現，維生素(Bhattacharya et al., 1987; Shetty et al., 1988) 微量元素(Francis et al., 1988; 1988)及含硫胺氨基酸(Shetty et al., 1988)中亦有類似的抗誘突變性表現。故富含多種成份之蜂膠萃取液，其功能性的表現除了由蜂膠之主要成份 ~ flavonoids 所成就之外，亦可能經由蜂膠

表七、蜂膠乙醇及水萃取物對 MNNG 誘突變性之影響

Table 7. Effect of the ethanolic and aqueous extract of propolis on the activity of MNNG toward *Salmonella typhimurium* TA100 and TA102 in the absence of S9

Amount per plate (mg)	His ⁺ revertant per plate	
	TA100	TA102
EtOH		
Control*	3962±218 ^{a**}	1275±96 ^a
0.01	3726±173 ^a	1103±135 ^{ab}
1.1	3334±53 ^b	994±12 ^b
2	324±10 ^c	668±83 ^c
ddH ₂ O		
Control	2069±95 ^a	2136±17 ^a
0.01	1517±110 ^b	1597±219 ^b
0.05	1462±31 ^b	1412±57 ^{bc}
0.1	1487±181 ^b	1253±128 ^c

*The control number was determined without sample.

**Data within the same column bearing different superscript letters in the

same group were significantly different (p<0.05)

表八、蜂膠乙醇及水萃取物對 IQ 誘突變性之影響

Table 8. Effect of the ethanolic and aqueous extract of propolis on the activity of IQ toward *Salmonella typhimurium* TA98,TA100 and TA102 in the presence of S9

Amount per plate (mg)	His ⁺ revertant per plate		
	TA98	TA100	TA102
EtOH			
Control*	872±49 ^{a**}	1414±56 ^a	707±31 ^a
0.02	768±47 ^b	1441±54 ^a	624±69 ^a
2.1	80±2 ^c	369±4 ^b	468±20 ^b
3	41±4 ^c	315±1 ^b	450±75 ^b
ddH ₂ O			
Control	1231±32 ^a	1319±29 ^{ab}	609±25 ^a
0.01	1048±15 ^b		1232±47 ^{bc}
	511±31 ^b		
0.05	975±69 ^b	1410±65 ^a	488±33 ^b
0.1	867±26 ^c	1154±88 ^c	477±40 ^b

*The control number was determined without sample.

**Data within the same column bearing different superscript letters in the same group were significantly different (p<0.05)

中其它成份，如維生素及微量元素等以不同之作用機制相互調節而成。

Alldrick 等(1989)指出，quercetin 與 rutin 於抑制熱衍生誘突變物能力上，在 *in vitro* 及 *in vivo* 所表現的結果不同，可能是因腸道對於 flavonoids 的利用性不同所致。因此，若欲探討蜂膠對人體所造成的影響，有必要再進一步進行活體試驗才能將問題釐清。

II、人體試驗

酚類化合物依是否能提供營養之論點分為可萃取及不可萃取兩大類。可萃取之酚類化合物包含低、中分子量之酚類物質(可被水、甲醇及丙酮水溶液等溶劑萃出)、部分之 hydrolyzable tannins 及 proanthocyanidins。不可萃取之酚類化合物則為高分子量物質及與膳食纖維或蛋白質結合而無法溶解之酚類物質。(Bravo et al., 1994; Saura-Calixto et al., 1996)。

可萃取之 polyphenols 或可溶之 phenolics 中，aglycones 與 free simple phenolic compounds, flavonoids(quercetin, genistein)及 phenolic acids 能直接於小腸粘膜處被吸收(Jung

et al., 1983; Wolfram et al., 1995; King et al., 1996; Manach et al., 1997)。哺乳動物因缺乏 β -glycosidase 而無法直接利用以 glycosides 型式存在之酚類化合物(Williams et al., 1964; Griffiths et al., 1982; Hackett et al., 1986) , 需經由腸道菌叢的發酵作用將其水解為相對之 aglycones 型式才能加以吸收(Hollman et al., 1995; King et al., 1996; Hollman et al., 1997)。

因此酚類化合物於活體中代謝的情形相當複雜，除了酚類化合物本身的結構特性外，腸道中菌叢的生長狀況及其他飲食成份皆會影響酚類化合物於腸道的消化及吸收作用。而蜂膠為一成份繁雜混合物，除了具有主要活性表現之酚類化合物外，仍存在多種已知及未知之物質。故欲探索蜂膠於活體中的真實狀況，有必要再作進一步的研究。

in vitro 之抗氧化及抗誘突變試驗中均證實蜂膠乙醇萃取液具有良好的效果。Chopra 等(1995)對 rats 所作的研究中亦發現，蜂膠乙醇萃取液能有效降低 Doxorubicin(一種抗癌藥物，然其卻有因產生過多自由基而致 cardiomyopathy 的副作用)所誘發之脂質過氧化傷害，並降低血漿中 creatine phosphokinase 及 aspartate aminotransferase 等酵素的濃度(此二酵素於 Doxorubicin 所誘發之心臟疾病中濃度顯著提升)。由於蜂膠液已為市售之熱門商品，因此本研究不再進行動物試驗，而直接進入人體試驗，以觀察經由人體之消化、代謝及吸收後，蜂膠所呈現出來之功效。

由於早期動脈硬化過程中泡沫細胞(foam cell)的形成與血漿中低密度脂蛋白(low density lipoprotein; LDL)之氧化敏感度及膽固醇濃度有密切的關係，加上免疫能力的提升是預防疾病及保健的重要關鍵，影響人體之健康狀態甚巨。因此本研究分別觀察蜂膠於抗氧化系統、血脂調整及免疫狀態上之功效。

表九為受測者之基本資料，此 26 位受試者均屬輕度工作者、無補充其他營養補充劑、無酗酒、無嗜飲濃茶或咖啡的習慣、無濫用藥物且無其他嚴重疾病。本研究受試者平均 BMI 約為 21，依衛生署所公佈以 $BMI=22 \times \text{身高}^2$ (公尺)² 為國人理想體重標準來看，受試者之平均 BMI 位於理想範圍內。

表九、受試者的基本資料

Table 9. The characteristics of the subjects supplemented with propolis

Characteristics	Man (n=13)	Female (n=13)
Age	21±1	21±3
Height (cm)	174.13±4.9	161.25±4.8
Weight (kg)	68.44±5.42	53.11±7.5
Body mass index (kg / m ²)	22.61±2.15	20.37±2.28

Values are mean±SD

(一) 人體抗氧化性之表現

1. 血漿中抗氧化物質之含量

表十為血漿中總酚類化合物及其他抗氧化物質之含量，結果顯示，服用蜂膠後，血漿中之抗氧化物質含量皆有上升的趨勢，其中總酚類化合物及維生素 C 之含量於蜂膠服用後第四個星期有顯著性的增加，而硫醇含量則於第一個星期即有顯著性的提高。許多研究指出蜂膠中含有豐富之 flavonoids, flavonoids 可減低維生素 E 的消耗，進而增加 LDL 之抗氧化性(Salah et al., 1995 ; Viana et al., 1996) , 且 flavonoids 可作用於細胞膜之水層與脂質層介面間, 具有清除水相自由基及控制過氧化自由基之發生(Saija et al., 1995)。Frie 等(1990)指出，血漿水相溶液中的維生素 C 可清除水溶性過氧化自由基，有效保護脂蛋白避免其受氧化傷害，且維生素 C 亦可協助脂蛋白中的生育醇再生。Siow 等(1999)亦指出維生素 C 能抑制由氧化 LDL 所誘發之 apoptosis 現象，進而保護血管平滑肌細胞，預防斑塊的生成。

由本研究之結果可知，服用蜂膠後，血漿中總酚類化合物含量顯著增加，且具抗氧化性之維生素 C 含量亦顯著地被提高。此顯示蜂膠中酚類物質之存在有利於抗氧化維生素之保留，因此可能有利於後續之生理保護作用。正常人血漿中約含有 500 μ mole/L 之硫醇，其中多為帶有-SH 基之蛋

表十、受試者血漿中總酚類化合物及其他抗氧化物質之含量
 Table 10. The contents of total phenolics and other antioxidants in the plasma of subjects

	Time		
	Week 0	Week 1	Week 4
Total phenolics (mg/ml)*	2.8±0.21 ^{b**}	2.93±0.52 ^b	3.18±0.25 ^a
Vitamin A (µg/dl)	52.16±13.33 ^a	51.34±12.02 ^a	52.58±12.02 ^a
Vitamin C (mg/dl)	2.04±0.05 ^b	2.03±0.08 ^b	2.18±0.17 ^a
Vitamin E (mg/dl)	0.80±0.22 ^a	0.79±0.23 ^a	0.85±0.17 ^a
Thiol (µM)	495.4±60.2 ^b	532.8±69.8 ^a	546.7±53.1 ^a

Values are mean±SD

* mg gallic acid equivalent/ml plasma

** Values within the same row sharing the different superscript letters were significantly different.

白質，並以 albumin 為主(Pepper et al., 1995)，而 albumin 分子上所帶之-SH 基可清除多種自由基。由於硫醇含量亦可作為生理氧化狀態指標，故由本研究結果可知，蜂膠可能具有抗氧化之作用。然而蜂膠為一成份複雜之混合物，酚類化合物是否為其抗氧化之主要物質，仍需要進一步加以確認。

2.血漿抗氧化狀態之表現

近年來有多項研究指出，粥狀動脈硬化的誘發與自由基的作用、脂質過氧化及 LDL 氧化皆有相關性(Jurgen et al., 1987; Steinberg et al., 1989; Esterbauer et al., 1989)。因此本研究觀察血漿中抗氧化物質抑制由 H_2O_2 所誘發之 myoglobin 氧化傷害、MDA 的生成量以及 LDL 之氧化延滯性來觀察血漿之抗氧化表現。表十一為血漿中總抗氧化狀態的表現及 MDA 之生成量測定，由表可知，於試驗期間受測者血漿抑制 H_2O_2 傷害 myoglobin 的能力被顯著地提高，但其脂質過氧化程度則無變化。Lin 等(1998)指出，蜂膠乙醇萃取物能有效抑制因酒精所引起之脂質過氧化，卻無法降低正常狀態下所造成之脂質過氧化狀態。故可能是這 26 位受測者皆為健康且年齡較低之自願者，體內並無異常之氧化壓力，因此最終氧化狀態便無顯著改變。

為進一步了解蜂膠之實際抗氧化表現，本研究利用銅離子誘發 LDL 氧化，觀察 LDL 在氧化過程中，延滯期的

表十一、受試者之總抗氧化狀態、脂質過氧化物含量及 LDL 氧化延滯期變化

Table 11. Total antioxidant status, lipid peroxidation and lag time for the LDL oxidation of the subject supplemented with propolis

	Time		
	Week 0	Week 1	Week 4
Antioxidant capacity (%)	36.12±3.73 ^{c*}	40.23±3.13 ^b	45.27±2.78 ^a
MDA (μmole/L)	1.80±0.29 ^a	2.08±0.80 ^a	2.16±0.54 ^a
LDL (min)	55.82±2.52 ^c	57.22±2.11 ^b	59.04±2.21 ^a

Values are mean±SD

*Values within the same row sharing different superscript letters were significantly different.

變化情形。由表十二可知，蜂膠萃取物在 *in vitro* 下能有效的延遲 LDL 氧化，且隨所使用蜂膠劑量的增加，LDL 氧化延滯時間亦跟著延長；Nardini 等(1995)指出，caffeic acid 能抑制由銅離子及 AAPH 所誘發之 LDL 氧化。而，De Whalley 等(1990)亦發現，一些 flavonoids (包括 quercetin)於 *in vitro* 系統中，能經由抑制過氧化氫的生成及保護存於 LDL 中之維生素 E 等方式抑制了由 macrophage 所誘發之 LDL 氧化。

由表十一可知，蜂膠經由人體吸收代謝後，亦可增長 LDL 之氧化延滯期，且於服用蜂膠後一個星期即有顯著差異。由此可知，蜂膠經人體攝食後仍保有其抗氧化性；然而比較 *in vitro* 及 *in vivo* 之 LDL 氧化延滯時間，卻發現蜂膠之抗氧化性於 *in vitro* 下較佳，此結果與甘草及紅茶抑制 LDL 氧化的結果相似 (Fuhrman et al., 1997; Cherubini et al., 1999)，這可能與經人體攝取後之生物利用率有關。

(二) 血脂調整之評估

LDL 於體內的作用為運送膽固醇至組織細胞中。因 LDL-cholesterol 為導致血管硬化之脂質沉積物的主要來源，故 LDL 為誘發動脈粥狀硬化的危險因子之一，而如何降低 LDL-cholesterol 則為預防動脈粥狀硬化之重要課題。

表十二、LDL 氧化延滯期之變化

Table 12. Lag time for LDL oxidation *in vitro*

Conc.($\mu\text{g/ml}$)	Lag time (min.)
Control	74.4
0.2	91.8
0.5	114.5
1.0	167.1
2.0	285.4

高密度脂蛋白(high density lipoprotein; HDL)會與血漿中游離的膽固醇及周邊組織代謝的膽固醇結合，經由 lecithin cholesterol acyltransferase(LCAT)的作用形成膽固醇酯(cholesterol ester; CE)及成熟的 HDL，而後送至肝臟代謝。此外，HDL 亦會降低 LDL 的氧化，減少動脈粥狀硬化發生的機率(Bierman et al., 1988; Groff et al., 1990)。流行病學研究指出，男性之 HDL-cholesterol 濃度每升高 1mg/dL，即可降低 2~3%冠狀動脈心臟病的罹患率；女性則可降低 3~4%的冠狀動脈心臟病罹患率(Lipid Research Clinics Program, 1984)，故 HDL-cholesterol 的濃度為冠狀動脈硬化罹患率的預測因子之一。此外，LDL-cholesterol/HDL-cholesterol 的比值亦可作為評估粥狀硬化症罹患率的指標(Stehle et al., 1988)。

一些水溶性的 polyphenols 及 condensed tannins 皆可促進脂質的排泄。動物試驗發現，餵食 grape tannins (Tebib et al., 1994; Tebib et al., 1994; Martin et al., 1997), tannic acid (Yugarani et al., 1993)及 catechins(Muramatsu et al.,1986)皆可降低血漿中之 LDL-cholesterol 含量，並提高 HDL-cholesterol 含量。而此現象可能與 polyphenols 能提升 reverse-cholesterol transport 及減少小腸對膽固醇的吸收和增加膽汁分泌所致 (Regerat et al., 1992; Tebib et al., 1994)。Lin 等(1997)之動物

實驗指出，蜂膠乙醇萃取物能降低血漿中 GOT、GPT 及三酸甘油酯(TG)的濃度且能降低肝臟中 TG 之含量，故推測蜂膠能清除血漿及肝中脂質的堆積，降低酒精對肝臟的傷害。然而，Jonathan 等(1998)所進行的人體試驗卻發現，大豆製品中的 isoflavonoids 無法有效地調整血脂。表十三顯示，攝取蜂膠後總膽固醇、LDL-膽固醇及 HDL-膽固醇含量顯著地被提高，然而 LDL-cholesterol/HDL-cholesterol 的比值卻未有顯著性變化。故蜂膠之服用，對血脂之調整可能並無顯著的影響。此結果除了與本研究所採用之蜂膠劑量、服用時間有關外，受測者年齡層較低且健康狀況佳以及蜂膠於體內之生物利用率亦有所影響。因此關於血脂調整方面，有必要針對高血脂個體進一步地加以探討。

(三) 免疫功能之探討

負責細胞性免疫的 T 細胞及製造抗體(體液免疫)的 B 細胞為兩種主要的淋巴細胞。而 T 細胞可分為許多次族群(subset)，其中以帶有 CD4 及 CD8 標記的 T 細胞最為重要。活化後的 CD4⁺T 細胞可釋放各種淋巴激素，激發巨噬細胞及其他白血球前來執行免疫吞噬的工作，為主司「輔助」或「誘導」免疫反應(T_H)的細胞。CD8⁺T 細胞受到抗原刺激後會大量增殖為毒殺性 T 細胞(T_C)，直接以接觸目標細胞、分泌穿孔蛋白 (perforin)來摧毀細胞。故本研究以

表十三、受試者血漿中脂質的含量

Table 13. Plasma lipids of the subjects supplemented with propolis

	Time		
	Week 0	Week 1	Week 4
TG (mg/dl)	74.24±49.31 ^{a**}	70.23±31.28 ^a	70.20±34.14 ^a
TC (mg/dl)	170.3±35.96 ^b	176±39.71 ^{ab}	181.2±43.84 ^a
LDL-C (mg/dl)	89.31±24.75 ^b	97.35±22.52 ^{ab}	101.42±21.15 ^a
HDL-C (mg/dl)	66.66±16.42 ^c	71.95±16.76 ^b	76.04±17.74 ^a
L/H [*]	1.34±0.24 ^a	1.36±0.2 ^a	1.35±0.19 ^a

Values are mean±SD

*The ratio of LDL-cholesterol to HDL-cholesterol

**Values within the same row sharing the different superscript letters were significantly different.

觀察總T細胞 CD4 CD8 及 B 細胞之含量百分比及 CD4/CD8 之比值，探討蜂膠對免疫功能的影響。

由表十四可知，受測者於服用蜂膠期間，B cell、CD4、CD4/CD8 皆有上升的趨勢，但其於統計上則未有顯著之差異性。Schwartz 等(1982)的 *in vitro* 研究發現，quercetin 能有效抑制 CD8⁺T 細胞的生成。Kimoto 等(1998)的動物實驗亦指出，由巴西蜂膠中萃取所得之 artepillin C (3, 5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid)對腫瘤細胞具有毒殺作用，並能增加CD₄的數目及提高 CD₄/CD₈ 的比值 松等(1992)亦提及每日服用 30 毫升蜂膠可增加淋巴球中的 T 細胞及 NK 細胞。然而本試驗中並未見顯著之變化，可能與此 26 位受測者皆為健康之年輕人，因本身之健康狀態極佳，無法於短期內看出蜂膠對其之影響或一個月之試驗期仍不足以觀察免疫能力之調整所致。此外，亦可能是所服用之劑量尚未達增強免疫力之最低劑量。

由上述蜂膠之血脂調整及免疫狀態研究結果可知，若欲深入研究蜂膠對人體所造成的影響，有必要將受試者之年齡層擴大並將試驗期加長，方能更實際地看出蜂膠之功效。

表十四、受試者於補充蜂膠前後的免疫狀態

Table 14. Immunol status of the subjects supplemented with propolis

	Time		
	Week 0	Week 1	Week 4
B cell (% of lymphocyte)	13.68±5.74	13.76±5.28	14.23±5.63
Total T cell (% of lymphocyte)	66.4±6.79	66.15±6.04	66.29±6.59
CD ₄ (% of Total T cell)	45.85±10.13	46.9±7.04	47.26±8.46
CD ₈ (% of Total T cell)	43.63±7	43.44±6.52	43.33±6.59
CD ₄ / CD ₈	1.11±0.4	1.12±0.31	1.14±0.38

Values are mean±SD

伍、結論

- 一、由蜂膠原塊萃取液之固形物含量比較可知，乙醇較能將蜂膠原塊中之成份萃取出來。
- 二、整體而言，無論為蜂膠水萃取液或蜂膠乙醇萃取液，其所含之固形物含量愈高者，多具有較佳抑制亞麻油酸氧化之能力。
- 三、本研究收集台灣、中國大陸及台灣三地等 9 種之蜂膠原塊，不論所使用之溶劑為乙醇或去離子水均以中國大陸之蜂膠萃取液具有較佳之抗氧化性。
- 四、蜂膠水萃取液及乙醇萃取液皆可清除過氧化氫、DPPH 自由基、超氧陰離子及氫氧自由基等活性氧並能螯合亞鐵離子，且清除活性氧能力與所使用之蜂膠劑量成正相關。此外，蜂膠乙醇萃取液所表現之抗氧化性較水萃取液佳。這可能是乙醇較易將蜂膠中之有效成份萃取出來。
- 五、蜂膠乙醇萃取液及水萃取液均可抑制 t-BuOOH, MNNG 及 IQ 對 TA98, TA100 及 TA102 之誘突變性，且其抑制能力亦與所使用之蜂膠劑量成正相關性。此外，亦如蜂膠所表現之抗氧化性，蜂膠乙醇萃取液所表現之抑制誘突變能力較水萃取者佳。

- 六、蜂膠乙醇萃取液能增加總抗氧化力並延緩 LDL 氧化，可能是蜂膠中所含之有效成份與血漿中其他抗氧化因子共同作用所致。然而此作用機制有待進一步研究。
- 七、蜂膠乙醇萃取液對 LDL-膽固醇與 HDL-膽固醇之比值則無差異性，因此蜂膠可能對血脂之調整仍有待更進一步之評估。
- 八、蜂膠乙醇萃取液對受試者之免疫功能並無影響，可能是受測族群均為健康之年輕自願者，其身體狀態較佳，無法於短時間內即具變化所致或一個月之試驗期仍不足以觀察免疫能力之調整，綜合本研究之結果，若欲深入研究蜂膠對人體之影響，有必要將受試者之年齡層擴大並將試驗期加長。

陸、參考文獻

白坂龍曠, 石塚忠生編著(1999), 蜂膠療效小百科, 林瑞玉譯, 世茂出版社.

吳梅桂 (1997)檳榔嚼塊去除口臭及其氧化特性之探討. 中山醫學院營養科學研究所 碩士論文.

岡田真著(1999), 蜂膠治療癌症, 林芸譯, 智慧大學出版社.

陳惠英(1996)茶葉萃取物之抗突變性及抗氧化特性. 國立中興大學食品科研究所. 博士畢業論文. 台中.

陳慧英 (1999)蜂膠酒精萃取物對自由基之清除作用以及對肝癌細胞生長之抑制作用. 台灣大學生化學研究所 碩士論文.

解玉軫 (1999)不同種類蜂膠之組成分分析及抗生特性研究. 大葉大學食品工程研究所 碩士論文.

Ames, B. N. (1971) The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. *In* CHEMICAL MUTAGENS, PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION, Vol. 1, Hollaender, A., Ed., pp. 267-271, Plenum press, New York, pp. 267-271.

Ames, B. N. (1989) Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutation Res.* 214: 41-46.

Arnao, M. B., Casas, J. L., del Rio, J. A., Acosta, M. and Garcia-Canovas, F.(1990) An enzymatic colorimetric method for measuring narigin using 2, 2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) in the presence of peroxidase. *Anal. Biochem.* 185: 335-338.

Afanas' EV, I. G., Dorozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A. and Potapovitch, A. I. (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38(11): 1763-1769.

Arnaud, J., Fortis, I., Blachier, S., Kia, D. and Favier A. (1991) Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic high-performances lipid chromatography. *J. Chromatography* 572: 103-116

Alldrick, A. J., Flynn, J. and Rowland, I. R. (1986) Effect of plant-derived flavonoids and polyphenolic acids on the mutagens from cooked food. *Mutation Res.* 163: 225-232.

Aeschbacher, H. U. and Turesky, R. J. (1991) Mammalian cell mutagenicity and metabolism of heterocyclic aromatic amines. *Mutation Res.* 259: 235-250.

Berry Halliwell (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet* 344: 721-724

Brusick, D. (1993) Genetic toxicology. *In* PRINCIPLES AND METHODS OF TOXICOLOGY. 3rd ed., Hayes, A. W., Eds., pp.545-560, Raven press, New York.

Brasseur, T. (1989) Anti-inflammatory properties of flavonoids. *J. Pharm. Belg.* 44, 235-241.

Bravo, L., Abia, R. and Saura-Calixto F. (1994) Polyphenols as dietary fiber associated compounds: comparative study on in vivo. and in vitro. properties. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1481-1487.

Bankova, V., Boudourova-Krasteva G., Popov S., Sforcin, J. M. and S. R. Cunha Funari. (1998) Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie* 29: 361-367

Bierman, E. and Chait, A. (1988) Nutrition and diet in relation to hyperlipidemia and atherosclerosis. *In* MODERN NUTRITION IN HEALTH AND DISEASE. Shils, M and Young, V eds., pp.1285-1297. Philadelphia: Lee & Febiger.

Bankova, V. G., Dyulgerov, A., Popov, S., Evstatieva, L.,

Kuleva, L., Pureb, O., and Zamjansan, Z. (1992) Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie* 23: 79-85

Bhattacharya, R. K., Francis, A. R. and Schetty, T. K. (1987) Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B₁: *in vitro* effect vitamins. *Mutation Res.* 188: 121-128.

Biaglow, J. E., Jacobson, B. E., and Nygaard, O. F. (1977) Metabolic reduction of 4-nitroquinoline N-oxide and other radical-producing drugs to oxygen-reactive intermediates. *Cancer Res.* 37(9): 3306-3313

Butacer, R. G. and Van Noorden, C. J. F.(1989)The involvement of superoxide anions in the nitroblue tetrazolium chloride reduction mediated by NADH and phenazine methosulfate. *Anal. Biochem.* 176: 170-174

Cerutti, P. (1985) Prooxidant states and tumor promotion, *Science* 227: 375-381.

Curnutte, J. T. and Babior, B. M. (1987) Chronic granulomatous disease. *Adv. Hum. Genet.* 16: 229-297

Cizmarik, J. and Lahitova, N. (1998) Antimutagenicity of propolis. *Pharmazie* 53: 46-47.

Chen, H., Pellet, L. J., Andersen, H. J., and Tappel, A. L.(1993) Protection by vitamin E, selenium, and β -carotene against oxidative damage in rat liver slices and homogenate. *Free Rad. Biol.& Med.* 14: 473-482

Chopra S., Pillai, K. K., Husain, S. Z. and Giri, D. K. (1995) Propolis protects against doxorubicin-induced myocardial pathology in rats. *Experimental and Mol. Pathol.* 62: 190-198.

Chen Y., Zheng R., Jia Z. and Ju Y. (1990) Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 9: 19-21.

Draper, H. H. and Hadley, M. (1990) Malondialdehyde

determination as index of lipid peroxidation. Meth. Enzymol. 186: 421-431

Dinis, T. C. P., Maderia, V. M. C. and Almeida, L. M.(1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Arch. Biochem. Biophys. 315: 161-169.

Deschner, E. E., Ruperto, J. Wong, G. and Newmark, H. L. (1991) Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. Carcinogenesis 7: 1193-1196.

Debiaggi M., Tateo F., Pagani L., Luini M. and Romero E. (1990) Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. Microbiologica (Italy) 13: 207-213.

Erben-Russ, M., Bors, W. and Saran, M. (1987) Reactions of linoleic and peroxy radicals with phenolic antioxidants- a pulse radiolysis study. Int. J. Rad. Biol. 52: 393-412

Epe, B., Hegler, J. and Wild, D. (1990) Identification of ultimate DNA damaging oxygen species, Environ. Health Perspect. 88: 111-115.

Esterbauer, H., Striegl, G. and Puhl, H. (1989) Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. Free Rad. Res. Comms. 6: 67-75.

Fridovich, I. and Picker, S. D.(1984) On the mechanism of production of superoxide radical by reaction mixtures containing NADH, phenazine methosulfate, and nitroblue tetrazolium. Arch. Biochem. Biophys. 228(1): 155-158

Francis, A. R., Schetty, T. K. and Bhattacharya, R. K. (1988) Effect of certain trace elements on the mutagenicity of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. Toxicol. Lett. 42: 193-198.

Francis, A. R., Shetty, T. K. and Bhattacharya, R. K. (1988) Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin

- B₁: *in vitro* effect of trace elements. *Mutation Res.* 199: 85-93.
- Francis, A. R., Shetty, T. K. and Bhattacharya, R. K. (1989) Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 10(10): 1953-1955.
- Frei, B., Stocker, R., England, L. and Ames, B. N. (1990) Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv. Exp. Med. Biol.* 264: 155-163.
- Frankel, K., Wei, H., Bhimani, R., Zadunaisky, J. A., Ferraro, T., Huang, M. T. Conney, A. H. and Grunberger, D. (1993) Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res.* 53: 1255-1261.
- Griffiths L A.(1982) Mammalian metabolism of flavonoids. *In*THE FLAVONOIDS: ADVANCES IN RESEARCH . Harborne J. B., Mabry T. J., eds., pp.681-718, London: Chapman and Hall.
- Gutteridge, J. M. C. (1993) Free radicals in disease process: A complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Comm.* 19: 141-158.
- Grange, J. M. and Davey, R. W. (1990) Antibacterial properties of propolis. *J. R. Soc. Med.* 83: 159-160.
- Groff, J. L., Gropper, S. S. and Hunt, S. M. (1990) Lipids. *In* ADVANCED NUTRITION AND HUMAN METABOLISM. pp.113-153, West Publishing company, USA.
- Gryglewski, R. J. and Robak, J.(1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37(5): 837-841
- Hackett A. M. (1986) The metabolism of flavonoid compounds in mammals. *In* PLANT FLAVONOIDS IN BIOLOGY AND MEDICINE: BIOCHEMICAL, PHARMACOLOGICAL, STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS. Cody V, Middleton, E., Harborne, J. B., eds., pp.177-197, New York: Liss, A. R., Inc.

Halliwell, B. (1993) The role of oxygen radicals I human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*. 23: 118-126

Havsteen, B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32: 1141-1148.

Harborne, J.B. (1989) Plant phenolics. *In* METHOD IN PLANT BIOCHEMISTRY, Harborne, J. B. Ed., pp.1-28, Academic press, London, UK.

Ho, C. T. (1992) Phenolic compounds in food *In* PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD AND THEIR EFFECTS ON HEALTH II (ANTIOXIDANTS AND CANCER PREVENTION), Hung, M. T. and Ho, C.T. Eds., pp.2-7, American Chemical Society, Washington, DC.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1989) Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press.

Hertog M. G. L., Hollman P. C. H. and Katan M.B. (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2379-2383.

Hertog M. G. L., Hollman P. C. H. and van de Putte B. (1993) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea infusions, wine, and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1242-1246.

Harish, Z., Rubinstein, A., Golodner, M., Elmaliah, M., and Mizrachi, Y. (1997) Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs under Exp. Clin. Res.* 23: 89-96

Hollman P. C. H., de Vries J. H. M. and van Leeuwen S. D. (1995) Absorption of dietary quercetin glycoside and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1276-1282.

Isao, T. (1990) Preventive effect of tea on cancer. *Fragrance J.* 11: 51-54.

Igor B. Afanas' Ev, Ddorozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A. and Potapovitch, A. I. (1989) Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of Rutin and Quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology* 38(11): 1763-1769.

Jung, H. J. G. and Fahey, G. C. (1983) Effects of phenolic monomers on rats performance and metabolism. *J. Nutr.* 113: 546-556.

Jurgens, G., Hoff, H. F., Chisolm, GMIII and Esterbauer, H. (1987) Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation characterization and pathophysiological implications. *Chem. Phys. Lipids* 45: 315-336.

Kada, T. (1984) Desmutagens and bioantimutagens: their action mechanisms and possible role in the modulation of dose-mutation relationships. *In* PROBLEMS OF THRESHOLD IN CHEMICAL MUTAGENESIS. Tazima, Y., Kondo, S. and Kuroda, Y. (eds), pp.73-82, The Environmental Mutagen Society of Japan, Mishima.

Kimoto T., Arai S., Kohguchi M., Aga M., Nomura Y., Micallef M. J., Kurimoto M. and Mito K. 1998, Apoptosis and supression o tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev.* 22(6): 506-515.

King, R. A., Broadbent, J. L. and Head, R. J. (1996) Absorption of the soy isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.* 126: 176-182.

Krol, W., Czuba, Z., Scheller, S., Gabrys, J., Grabiec, S. and Shani, J. (1990) Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochem. Int.* 21(4): 593-597.

Kurechi, T., Kikugawa, K. and Kato, T. (1980) Studies on the anti-oxidants (XIII): hydrogen-donating capability of

anti-oxidants to DPPH. Chem. Pharm. Bull. 28: 2089-2093.
Krol, W., Scheller, S., Shani, J., Pietsz, G. and Czuba, Z. (1993) Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel-Forschung* 43: 607-609.

Kato, T., Takahashi, S. and Kikugawa, K. (1991) Loss of heterocyclic amine mutagens by in soluble hemicellulose fiber and high molecular weight soluble polyphenolics of coffee. *Mutation Res.* 246: 169-178.

Lipid research clinics program (1984) The lipid research conics coronary primary prevention trial results: 1. Reduction in incidence of coronary heart disease. *J. A. M. A.* 251: 351-364.

Lin S. C., Chung C. Y., Chiang C. L. and Hsu S. H. (1998) The influence of propolis ethanol extract on liver microsomal enzymes and glutathione after chronic alcohol administration. *Am. J. Chin. Med.* 27(1): 83-93.

Liochev S. I. and Fridovich I. (1994) The role of O_2^- in the production of $\cdot OH$: *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* 16: 29-33.

Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F., Schwiers, E. A. and Ames, B. N. (1992) A new *Salmonella* tester strain (TA102) with AT-base pairs at site of mutation detects oxidative mutagens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 7445-7449.

Lin S. C., Lin Y. H., Chen C. F., Chung C. Y. and Hsu S. H. (1997) The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanolic extract on chronic alcohol-induced liver injuries. *Am. J. Chin. Med.* 25(3-4): 325-332.

Maly, F. E. (1990) The B-lymphocyte: a newly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Rad. Res. Commun.* 8: 143-148

Marcucci, M. C. (1995) Propolis: chemical composition, biological preoperties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83-99

McCann, J. and Ames, B. N. (1976) Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella / microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. Proc. Natl. Acad. Sci.USA 73: 950-954.

Mirzoeva, O. K. and Calder, P. C. (1996) The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. Prost. Leuko Essent. Fatty Acids 55: 441-449

Muramatsu, K., Fukuyu, M. and Hara, Y. (1986) Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol 32: 613-622.

Mandell, J. D. and Greenberg, J. (1960) A new chemical mutagen for bacteria: 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3: 575-579.

Merino, N., Gonzalez, R. Gonzalez, A. and Ramirez, D. (1996) Histopathological evaluation on the effect of red propolis on liver damage induced by CCl₄ in rats. Arch. Med. Res. 27(3): 285-289.

Martin-Carron N., Garia-Alonso A., Goni I. and Saura-Calixto F. (1997) Nutritional and physiological properties of grape pomace as a potential food ingredient. Am. J. Enol. Vitic. 48: 328-32.

Morel I., Lescoat G., Cillard P. and Cillard J. (1994) Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. Methods in Enzymology 234: 437-455.

Meresta, L. and Meresta, T. (1985) Antibacterial activity of flavonoid compounds of propolis , occurring in flora in poland. Med. Weter 41: 489-492.

Manach, C., Morand, C., and Demigne, C. (1997) Bio-availability of rutin and quercetin in rats. FEBS Lett.409: 12-16.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Miller, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status

in premature neonates. Clin. Sci. 84: 407-412.

Meier, B., Radeke, H., Selle, S., Raspe, H. H. Resch, K. and Habermehl, G. G. (1990) Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to treatment with synovial fluids from patients suffering from arthritis. Free Rad. Res. Commun. 8: 149-160

McCann, J., Spingarn, N. W., Kobori., J. and Ames, B. N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 979-983.

Niki, E. (1992) Active oxygens and free radicals in biology. J. Jpn. Oil Chem. Soc. 41(9): 768-773.

Nakayama. T., Kodama M. and Nagata C. (1984) Generation of hydrogen peroxide and superoxide and superoxide anion radical from cigarette smoke. Gann 75(2): 95-98.

Pepper, J. R. and Gutteridge, J. M. C. (1995) Blood cardio-plegia increase plasma iron overload and the thiol levels during cardiopulmonary bypass. Ann. Thorac. Surg. 60: 1735-1740.

Purchase, I. F. H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J. A., Anderson, D., Lefevre, P. A. and Westwood, F. R. (1976) Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use. Nature 264: 624-627.

Poyer, J. L., McCay, P. B., Lai, E. K., Ganzen, E. G. and Davis, E. R. (1980) Confirmation of assignment of the trichloromethyl radical spin adduct detected by spin trapping during C-carbon tetrachloride metabolism *in vitro* and *in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94: 1154-59.

Quinlan, G. J., Evans, T. W. and Gutteridge J. M. C. (1994) Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. Free Radic. Res. 20: 289-298.

Riddles, P. W., Blakeley, R. L., and Zerner, B. (1979) Ellman's reagent: 5, 5' -dithiobis (2- nitrobenzoic acid)- a reexamination

Anal. Biochem. 94: 75-81

Rao, C. V., Desai, D., Simi, B., Kulkarni, N., Amin, S. and Reddy, B. S. (1993) Inhibitory effects of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res.* 53: 4182-4188.

Robak, Jadwiga and Gryglewski, R. J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology* 37(5): 837-841.

Regerat F., Remesy C. and Tixier O (1992) Effects of condensed tannins and pectin on cecal fermentations and lipid metabolism in the rat. *Bull Liaison Groupe Polyphenols* 16: 201-204.

Rinkus, S. J. and Taylor, R. T. (1990) Analysis of hydrogen peroxide in freshly prepared coffees. *Food Chem. Toxicol.* 28:323-331.

Selway, J. W. T.(1986) Antiviral activity of flavones and flavans. *In PLANT FLAVONOIDS IN BIOLOGY AND MEDICINE*, Cody, V., Middleton, E. Jr. and Harborne, J. B. Ed., pp.521-536, Alan Liss, New York.

Simic, M. G. (1994) DNA markers of oxidative process *in vivo*: Relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Cancer Res.* 54: 1918s-1923s.

Saul, R. L. and Ames, B. N. (1986) Background levels of DNA damage in the population. *Basic Life Sci.* 38: 529-535.

Stich, H. F. and Anders, F. (1989) The involvement of reactive oxygen species in oral cancers of betel quid / tobacco chewers, *Mutation Res.* 214: 47-61.

Sakanaka, S., Aizawa, M., Kin, M. and Yamamoto, T. (1996) Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 745-749.

Sugihara, N., Arakawa, T., Ohnishi, M. and Furuno, K. (1999) Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metalinduced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linolenic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 1313-1323.

Shan, G. M. and Bhattacharya, R. K. (1986) Modulation by plant flavonoids and related phenolics of microsome catalyzed adduct formation between benzo[a]pyrene and DNA. *Chem. Biol. Int.* 59: 1-15.

Saura-Calixto F., and Bravo, L. (1996) Intestinal degradation of polyphenols. *In* DIETARY FIBER AND FORMATION IN THE COLON. Malkki, Y., Cummings. J. H., eds., pp.87-92, COST Action 92. Luxembourg: Office for official publications of the European communities, 87-92.

Sudhir, S. D., Cheryan, M. and Sulnkhe, D. K.(1987) Tannin analysis of food products. *CRC Critical Review in Food Science and Nutrition* 24: 401-444.

Shi, X., Dalal, N. S. and Jain, A. C. (1991) Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem. Toxicol.* 29: 1-6.

Shetty, T. K., Francis, A. R. and Bhattacharya, R. K. (1988) Modifying role of vitamins on the mutagenic action of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 9: 1513-1515.

Shetty, T. K., Francis, A. R. and Bhattacharya, R. K. (1988) Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B₁: *in vitro*. effect of sulphurcontaining amino acids. *Mutation Res.* 222: 403-407.

Shimada. K., Fujikawa. K., Yahara, K. and Nakamura, T. (1992) Antioxidative properties of xanthane on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40: 945-948.

Stehle, G., Hinohara, S. and Gross, K. (1988) Influence of a alcohol consumption, smoking , and exercise habits on blood

lipoprotein concentrations in 9256 healthy Japanese adults. *In* ENDEMIC DISEASES AND RISK FACTORS FOR ATHEROSCLEROSIS IN THE FAR EAST, Schettler G, ed., pp.13-25, Springer Verlag, Berlin.

Serafini, M., Maiani, G. and Anna Ferro-Luzzi (1998) Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J. Nutr.* 128: 1003-1007

Sudina, G., Mirzoeva, O., Puskareva, M., Korshunova, G., Sumbatyan, N. and Varfolomeev, S. (1993) Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FESB Lett.* 329: 21-24.

Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P. and C. Rice- Evans. (1995) Polyphenolic flavonols scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 322: 339-346.

Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. and Witztum, J. L. (1989) Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl. J. Med.* 320: 915-924.

Siow, R. C. M., Richards, J. P., Pedley, K. C., Leake, D. S. and Mann, L. G. (1999) Vitamin C protects human vascular smooth muscle cells against apoptosis induced by moderately oxidized LDL containing high levels of lipid hydroperoxides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 2387-2394.

Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Maruzullo, D., Bonina, F. and Castelli, F. (1995) Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biochemembranes. *Free Radic. Biol. Med.* 19: 481-486.

Schwartz, A., Sutton, S. L. and Middleton, E. J. (1982) Quercetin inhibition of the induction and function of cytotoxic T lymphocytes. *Immunopharmacology* 4(2): 125-138.

Scheller, S., Wilczok, T., Imielski S., Krol, W., Gabrys, J. and Shani, J. (1990) Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *Int. J. Rad. Biol.* 57: 461-465.

Synderwine, E. G., Wirth, P. J., Roller, P. P., Adamson, R. H., Sato, S. and Thorgeirsson, S. S. (1988) Mutagenicity and *in vitro* covalent DNA binding of 2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4, 5-*f*]quinoline. *Carcinogenesis* 9: 411-418.

Tebib, K., Bitri L., Besancon P. and Rouanet J.-M. (1994) Polymeric grape seed tannins prevent plasma cholesterol changes in high-cholesterol-fed rats. *Food Chem.* 49: 403-406.

Tebib K., Besancon P. and Rouanet J.-M. (1994) Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases, and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *J. Nutr.* 124: 2451-2457.

Taffe, B. G., Takahashi, N., Kensler, T. W. and Mason, R. P. (1987) Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 262: 12143-12149.

Takahama, U., Youngman, R. J. and Elstner, E. F. (1984) Transformation of quercetin by singlet oxygen generated by photosensitized reaction. *Photobiochem. and Photobiophys.* 7: 175-181.

Viana, M., Barbas, C., Bonet, B., Bonet, M. V., Castro, M., Fraile, M. V. and Herrera, E. (1996) *In vitro* effects of flavonoid-rich extract on LDL oxidation. *Arteriosclerosis* 123: 83-91.

Volpert, R. and Elstner E. F. (1993) Biochemical activities of propolis extracts. I. Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C. J. Biosci.* 48(11-12): 851-857.

Verma, A. K, Johnson, J. A., Gould, M. N. and Tanner, M. A. (1988) Inhibition of 7, 12-Dimethylbenz(*a*)anthracene and *N*-Nitrosomethylurea induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* 48: 5754-5788.

Van Acker, S. A. B. E., Van den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L.,

Griffioen, D. H., van Bennekom, W. P., van der Vijgh, W. J. F. and Bast, A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 331-342.

Williams R. T. (1964) Metabolism of phenolics in animals. *In* BIOCHEMISTRY OF PHENOLIC COMPOUNDS. Harborne J. B., ed., pp.205-248, Academic Press. London.

Wang, H., Cao, G. and Prior, R. L. (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45:304-309.

Wang, C. K. and Lee, W. H. (1996) Separation, characteristics and biological activities of phenolics in areca fruit. *J. of Agric. Food Chem.* 44: 2014-2019

William, R. B. and Michael, W. P. (1994) Antioxidant nutrients and protection from free radicals. *Nutritional Toxicology* p19-48.

Witztum J. L., and Steinberg D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 88: 1785-1792.

Wolffram, S., Weber, T., Grenacher, B. and Scharrer E.(1995) A Na⁺-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. *J. Nutr.* 125: 1300-1308.

Yen, G. C. and Chen, H. Y. (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43: 27-32.

Yuting, C., Rongligang, Z., Zhongjian, J. and Yong, J. (1990) Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 9: 145-150.

Yugarani, T., Tan, B. K. H. and Das, N. P. (1993) The effects of tannic acid on serum and liver lipids of RAIF and RICO rats fed on high fat diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 104: 339-343.

Zannoni, V., Lynch, M., Glodstein S., and Sato, P. (1974) A

rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissue. *Biochem. Med.* 11: 41-48