

中文摘要

本研究發現蜂膠組成因來源不同有很大的差異。蜂膠乙醇萃取液中酚類化合物含量以大陸地區之蜂膠較多，聚合型單寧則以巴西蜂膠產地含量最高，類黃酮與CAPE之含量則差異較大，含量分別介於0.22~12.52 mg/ml及0.21~5.59 mg/ml，市售蜂膠商品則以聚合型單寧及類黃酮含量較高。蜂膠乙醇萃取液所含之酚類化合物有70%是簡單酚類，其次為水解型單寧，而非單寧性黃烷含量低，除少數蜂膠原塊外，聚合型單寧含量並不高，而蜂膠水萃液中，主要為簡單酚類及非單寧性黃烷，其次為水解型單寧，而聚合型單寧含量最少。蜂膠酚類化合物之相對聚合度在84~133%之間，經膠體過濾層析及粒徑排除層析可知蜂膠分子量分佈相當集中，顯示蜂膠中酚類化合物分子之大小差異不大。本研究利用薄層層析區分蜂膠中之酚類化合物，並以亞麻油酸之氧化，評估其抗氧化能力，發現以 SPOT 5(Rf 0.32-0.39) 最具抗氧化性，其次為 SPOT 1(Rf 0.08-0.11)，由高效能液相層析之結果可知，蜂膠中具有抗氧化性的酚類物質，涵蓋高極性與中極性之物質，顯示蜂膠中可能含有數種以上具抗氧化性之酚類化合物。蜂膠揮發性成份分析結果中得知蜂膠之香味組成隨產地有很大差異性，而主要化合物揮發性物質是terpene類之化合物(如:alpha-pinene)所組成，而酚類化合物亦有貢獻。 關鍵字: 蜂膠、酚類化合物、抗氧化性、膠體過濾、高效能液相層析、薄層層析

Astract

Results showed that great difference among propolis of different regions. Ethanolic extract of propolis contained much higher levels of phenolics than the aqueous extract. The Chinese propolis were found pasundant in total phenolis. The content condensed tannin were higher in Brazil propolis than the others. The contents of flavonoids and CAPE varied in the range of 0.22-12.52mg/ml and 0.21-5.59mg/ml respectively. Commercial propolis exhibited high levels of condensed tannin and flavonoids. Simple phenols is the maior phenolics of propolis, followed by hydrolyzable tannin, non-tannin flavans and condensed tannin. Simple phenols and non-tannin flavans were also the major one of the aqueous extract of propolis ,followed by hydrolyzable tannin and condensed tannin. The relative polymerization of phenolics was in the range of 91-133%. The same results were also found by gel filtration in Sephadex LH-20 gel and size exclusion in HPLC.TLC was used to separate the phenolics of propolis, and linoleic acid was used to evaluate the antioxidative ability of separated ones. Results showed that spot 5($R_f=0.32-0.39$) exhibited great antioxidation, followed by spot 1($R_f=0.08-0.11$). The above separated spots were analyzed by HPLC. Each spot contained compounds of high and middle polarity. It seems that there were some antioxidative phenolics in propolis. In the volatile materials analysis, the volatile matters varied with different propolis sources. Terpene were the major volatile subjects. And phenolis were included in the volatile materials.

壹、前言

蜂膠中具有許多生理活性，例如：抗腫瘤、抗氧化、抗發炎、抗菌等功效(Pepljnjak et al.1982 ; Grunberger et al.1988 ; Cengarle et al.1998)，另外於食品應用上能提高其價值，例如延長保存期限、防腐、改變風味等(Lindenfelser , 1968 ; 蘇 , 1996 ; 陳 , 1992)。蜂膠之組成份已有一百五十幾種被確定(例如類黃酮、芳香族、醇類、醛酸 等)，而其中又以酚類化合物(polyphenolic compounds)為最主要。酚類化合物是植物中普遍存在之重要化學成分，此一種類之化合物最主要為帶有不同數目 OH 基結構之芳香環化合物，其衍生物種類相當多，並各含有不同之功效特徵，酚類化合物存在於食品中影響其風味色澤、營養價值等(Geldstein et al.,1963 ; Kumar et al.,1984)。酚類化合物之各類化合物，例如：單寧、類黃酮等，於蜂膠中含量的多寡及各成份所佔之比例與其表現之特性極為相關，市售之蜂膠商品及各產地蜂膠原塊之特性與其中有效成分之關聯性是非常值得探討。而不同的製作過程及萃取方式對於其有效成分是否有影響。本研究旨在觀察蜂膠中所含具生物活性之成分，及不同產地來源之成分差異，由成分分析結果進一步了解蜂膠所具生物功效之可能因素，探究蜂膠之特殊性質，進而明瞭蜂膠之組成及相關特性。

貳、文獻整理

一、蜂膠

蜂膠(propolis)一詞，原始名稱來自希臘文，pro(前衛之意)及 poleo(城市)兩字合起來為 propoleo，英文譯為(propolis)，即城堡之前衛(劉，1997;德永，1996)。

蜜蜂是一種超密度共棲形態的生物(每一蜂巢最多可容納 3-5 萬隻蜜蜂)，能在超高密度的環境中擺脫病毒與細菌的糾纏，蜂膠扮演著非常重要的角色。蜜蜂使用蜂膠來築巢，並且以蜂膠修補破洞，一個完整的蜂巢因為蜂膠可以防潮防風，並且對相當多種類的細菌都有很強的抗菌效果。在蜜蜂自外界飛回蜂巢進入蜂窩之前，身上的細菌就會被塗在入口的蜂膠殺死，所以蜂窩內部的衛生條件極佳(李，1993;劉，1997)。

蜂膠是蜜蜂從植物的芽苞、葉片、樹皮(例如白楊樹、樺樹、杉樹、柳樹下、七葉樹、橡樹及李子樹等)莖幹傷口上採集的黏性分泌物樹脂(劉，1997;李，1993 ; Markham et al.,1996 ; Viguera et al.,1993)。當蜜蜂採集花粉及樹脂時，會先用口器將樹脂弄溼，然後利用後腳的花粉囊帶回蜂巢，所以蜂膠的來源除了樹脂之外，還有蜜蜂的唾液成份、蜜蠟及花粉等。

常見膠源植物為樺木科、松科、柏科、楊柳科、漆樹科及橡膠樹、栗樹、白楊等植物。歐洲主要的膠源植物為白楊樹、樺樹、橡樹;在蘇

聯中部則以樺樹居多，美國以白楊、松樹；巴西則以尤加利樹為主(劉，1997；Block et al.,1992)。

(一)蜂膠之特性

蜂膠比重介於 1.112-1.136 之間，為不透明之固體，表面光滑或粗糙，呈棕紅色、棕褐色、黃褐色、灰褐色等顏色，蜂膠會隨溫度的變化呈現不同的顏色與硬度，溫度低於 15 時變硬、脆，30 時柔軟性及黏性增加，60 -70 時可溶成黏稠液體，100 以上開始溶化成液體(李，1993;劉 1997)。

(二)蜂膠的組成

蜂膠之成份大體為樹脂膠狀物質及揮發性油脂 55%、蜜蠟 30%、精油 10%、花粉 5 % 以及約 5 % 之類黃酮、有機酸、維生素與礦物質。蜂膠除了含上述主要成份外，目前已被分離鑑定出來的化合物尚包括：fatty acid、phenolic acid、aromatic aldehydes、alcohols、sesquiterpenes、napthalene 及 stilbene 衍生物與多量的 flavonoid aglycones(李，1993；Markham et al.,1996)。蜂膠的化學組成物質包括類黃酮、芳香族醇、醛類、酸及其衍生物、脂肪族酸，脂類、碳氫化合物、胺基酸、醣類等(Marcucci, 1995)。已確認之重要化合物有安息香酸(benzoic acid)及其酯類、香豆酸(coumaric acid)、咖啡酸(caffic acid)、金黃素(chrysic)、槲皮酮(querctin)、松樹素(pinobanksin)、高

良薑素(galangin)及咖啡酸酯(caffeic ester)等成份(Bankova et al.,1982 ; Bankova et al.,1987 ; Markham et al.,1996 ; Pepeljnjak et al.,1982 ; Ghisalberti et al.,1978)。蜂膠組成份十分複雜，已有超過 150 種化合物被確認，其中以多元酚類化合物為主要之物質(Greenaway et al., 1991)。

(三)蜂膠之功能

蜜蜂將採集之蜂膠塗抹於蜂巢中可保護、建造、修補、消毒及防腐等作用(李，1993；劉，1997；Markham et al.,1996)。其他之功能分述下：

1.抗癌作用

Grunberger 等(1988)發現蜂膠萃取液中新含的咖啡酸酯(CAPE)之活性成份對老鼠及人體所患之不同癌細胞(黑瘤和乳癌)都有殺害的作用。Frenkel 等(1993b)發現以 0.5 nmole 劑量之 CAPE 可抑制 50% 人體多核白血球之氧化物的釋出，再以較高劑量 (1-10 nmole)CAPE，即可抑制 CD-1 和老鼠之水腫及藥物的誘發作用，由此可知 CAPE 為一有效防治疾病之化合物，它具有強烈抗發炎及抑制氧化物的作用。

2.抗氧化作用

將蜂膠持續給予抗氧化作用異常之老鼠，可有效穩定其肝臟之

脂肪的過氧化作用(Okonenko,1986)。Pascual 等(1994)則發現蜂膠萃取液對於由黃嘌呤氧化反應產生超氧化物所形成的多種氧自由基都有相同之清除作用，而對於鹼氧自由基亦有清除作用。Han and Park(1996)探討蜂膠乙醇抽出物對於肉製品脂肪氧化之影響，結果以 0.4% EEP 所處理之香腸具有比以 0.28% 己二烯酸鉀處理者，有較長的保存期限。Cengarle 等(1998)以蜂膠乙醇抽出物對多元不飽和脂肪酸進行抗氧化性之研究發現，蜂膠具有比 α -tocopherol 更好的抗氧化效果。

3. 抗菌作用

Grange and Davey(1990)指出蜂膠對於球菌類及革蘭氏陽性桿菌屬(包括人體致病的一些結核桿菌)，皆具有抑制其生長之功效，然而對於革蘭氏陰性桿菌，則僅能抑制其活性，此抑制功能可能是蜂膠中多種高含量之類黃酮物質所致。Takaisi and Schilcher(1994)則發現，蜂膠抑制細菌生長的作用是在於截斷細胞的分裂。此外，蜂膠可使細菌的細胞質、細胞膜和細胞壁瓦解引起部份溶菌作用，並抑制細胞之蛋白質的合成(Kimoto,1996)。Pepeljnjak 等(1982)利用薄層色層分析更發現蜂膠中所含的高良薑素(galangin)之含量為抑制枯草桿菌活性作用的主要因素。

4. 抗原蟲作用

Higashi and Castro(1994)研究蜂膠萃取液之抗原蟲作用時，將蜂膠乙醇萃取液(100mg/ml)給予宿主 24 小時之後，發現血液中的錐蟲全被分解;同時在被感染之腹膜巨噬細胞及心肌細胞中給予蜂膠治療時，亦顯示蜂膠具有強烈抑制原蟲的作用。

5.消炎及促進傷口癒合之作用

Khayyal 等(1993)發現以蜂膠餵食腳水腫及以藥物誘發關節炎的愛爾蘭鼠，結果顯示蜂膠的劑量與抗發炎有顯著之相關性，且能抑制血小板凝集，並增加 eicosanoids 之合成。

6.蜂膠在食品中之應用

Kim 等(1997)探討添加蜂膠對於麵包保存期限及老化之影響，結果發現添加蜂膠可以抑制黴菌生長及減緩老化之現象。若於花生仁、柑桔、人參、蛋、魚類上，以噴灑、塗抹的方式形成薄膜，具有保鮮防腐的效果(Lindenfelser, 1968；蘇，1996；陳，1992)。

二、多酚化合物

(一)酚類化合物

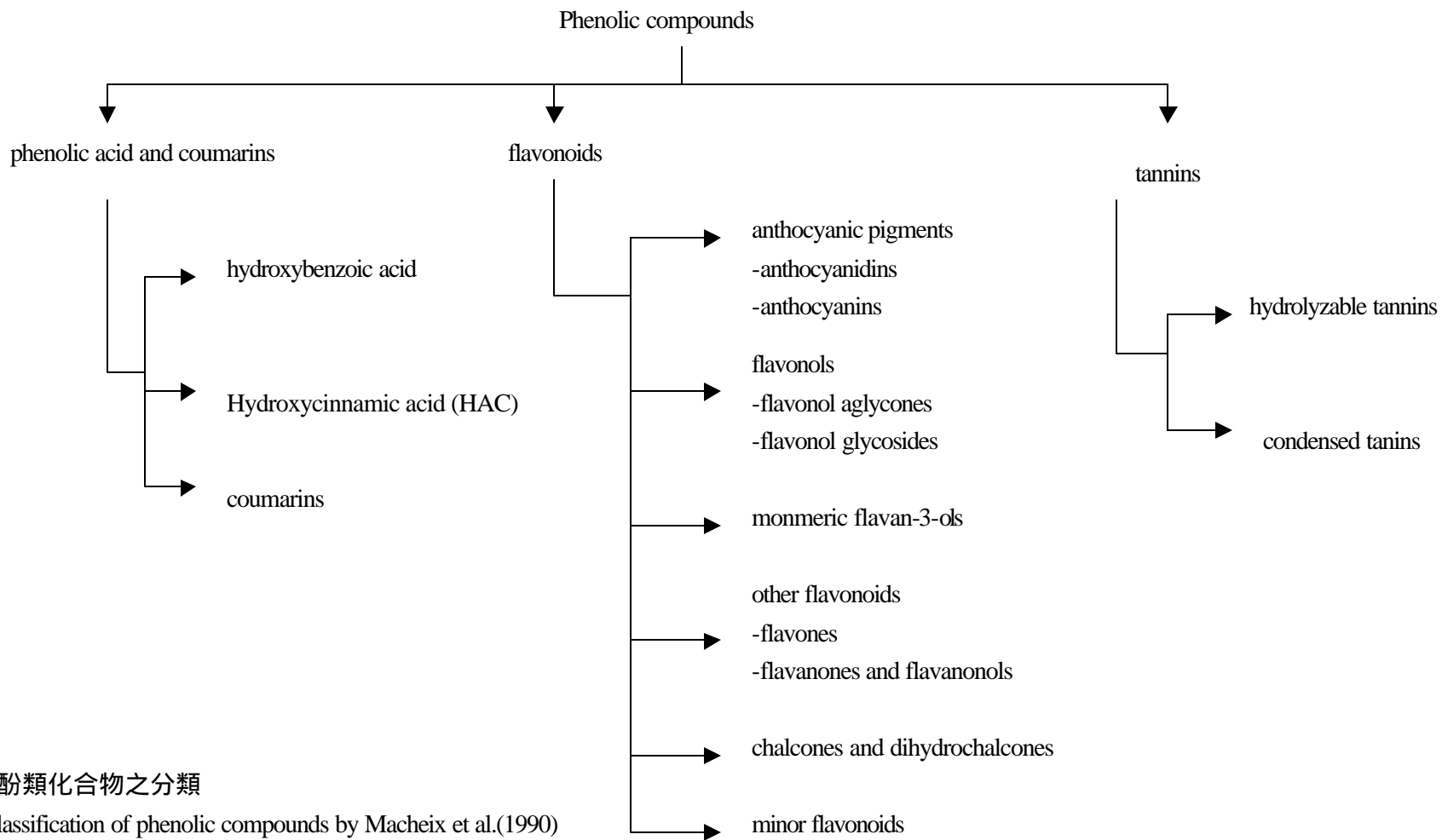
蜂膠含有豐富之多酚化合物(Greenaway et al., 1991)，而多酚化合物又是以 flavonoid aglycones，accompanied by phenolic acids and their esters，phenolic aldehydes，ketone 等為主 (Bankova and Marekov, 1984)。

1. 酚類化合物的分類

酚類化合物廣泛存在於植物中是極為重要的植物二級化學產物。其化學上的定義為結構中帶有一個或數個OH基的芳香環及其衍生物(ester methyl ethers, glycoside 等)(Harbone,1989)。酚類化合物種類甚多，學者對其的分類也不太相同。Ho(1992)將酚類化合物分成 simple phenols 和 phenolic acids , hydroxycinnamic acid 衍生物和 flavonoids 等三類(圖一)。Macheix et al. (1990)則將水果中的酚類化合物分為 phenolic acids 和 coumarins , flavonoids 及 tannins(圖二)。又 Sudhir 等(1987)將食物中酚類化合物分為 phenolic acids 和 coumarins (C₆ - C₁ 和 C₆ - C₃ 結構)及 flavonoids(包含 anthocyanidins ; C₆ - C₃ - C₁ 結構)二類。

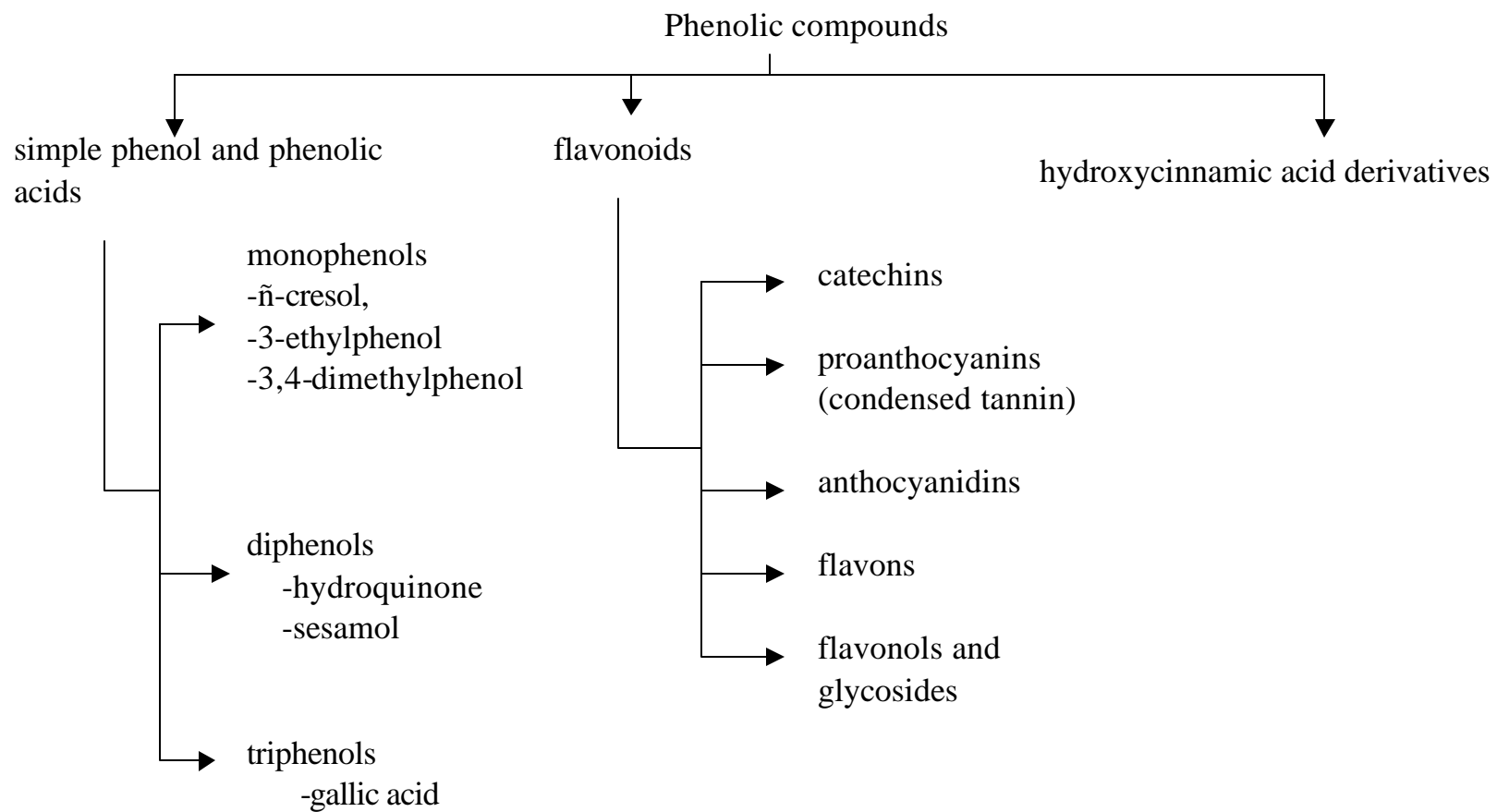
2. 酚類化合物的性質

Appel 等(1993)指出多元酚類化合物會受到酵素及金屬離子影響，產生氧化作用。甚至在 pH 值大於 9.5 的環境下，也會發生自氧化現象(Nair et al.,1996)。Makkar and Becker (1996) 則發現多元酚類化合物會受到溫度、 pH 值及儲存時間的影響，當 pH 值大於 9 以上，或置放 37 或 20 下，會隨著時間增加，而所測得



圖一、酚類化合物之分類

Fig 1. Classification of phenolic compounds by Macheix et al.(1990)



圖二、 酚類化合物之分類

Fig 2. Classification of phenolic compounds by Ho(1992)

的 tannic acid 量有減少的情形。Oszmianski 等(1996)在 (+)-catechin 氧化模式系統中發現,鐵離子的添加會促使 (+)-catechin 發生變化。此外,蔬果中多元酚類化合物對於風味、苦澀味及非酵素性褐變上扮演著重要角色。蔬果隨著成熟度增加,可溶性 tannins 減少且聚合程度增加,同時澀味降低(Goldstein et al.,1963)。非酵素性褐變的發生是 condensed tannin 經酸作用,將碳鍵打斷發生作用或是自動氧化所造成的(Haslam et al.,1994)。在農業應用上,增加植物中酚類化合物的含量,可有效減少了鳥類攝取,達到保護的作用(Ho, 1992)。然而食物中 tannins 含量,會與蛋白質形成可溶性或不可溶性物質,降低食物營養價值(Kumar et al.,1984)。

評估植物萃出物中酚類化合物含量多寡最常用的方法是藉由 total phenolic hydroxyl groups 與 phosphomolybdic-phosphotungstic reagent of Folin- Ciocalteu 作用利用會產生藍色物質的特性加以測定。在高濃度鹽酸的室溫環境下, formaldehyde 會與 phloroglucinol 及含有 undeactivated phloroglucinol nucleus 的化合物反應生成不可溶的縮合性衍生物。

此外,以 cinchonine sulphate 於 pH 7.0 - 8.0 的室溫下可使單寧 (tannins) 沉澱而加以定量。結合上述方法可分析植物萃出物中酚類化合物,如聚合型單寧 (condensed tannin)、水解型單寧

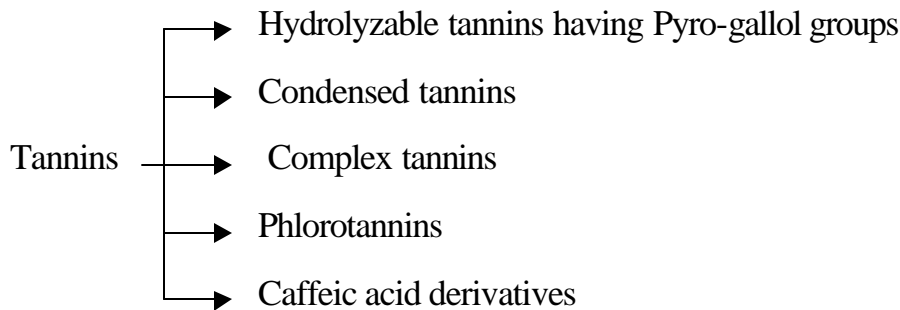
(hydrolyzable tannin)、非單寧黃烷 (non-tannin flavans) 及簡單酚類化合物 (simple phenolics) 的含量(Peri and Pompei,1971)。

3. 酚類化合物的生理活性

由於每人每天約自蔬菜攝取約 1g 的 flavonoids 類的成份(Yukiko et al.,1994), 多元酚類化合物具有許多對人體健康有益之功用, 如抗菌 (Sakanaka et al., 1996), 抗霉 (Smith and Banks, 1986)。抗氧化 (Wang and Lee, 1996 ; Wang and Wu, 1996), 抗癌 (Isao, 1990), 抗發炎 (Brasseur, 1989 ; Tubaro et al., 1989), 抗病毒 (Selway, 1986) 及保護血管 (Marcollet et al., 1969) 等作用。

(二)單寧的種類

單寧是一種分子量 500 - 3500 的酚類化合物聚合物, 它們廣佈於食物及植物中(Naczki et al.,1994), 植物中的單寧依化學結構可分成下列數種 (圖三 ; Okuda et al., 1991), 主要為水解型單寧和聚合型單寧。水果組織的單寧結構多為聚合型單寧, 而水解型單寧則多存於木質部及葉組織中(Joslyn, 1964)。



圖三、單寧依化學結構之分類

Fig.3 Classification of tannins by chemical structure (Okuda et al., 1991)

水解型單寧又分成 ellagitannin 和 gallotannin , ellagitannin 可經由酸水解成 ellagic acid、 gallic acid、 glucose , 而 gallotannin 可經由酸水解成 gallic acid , glucose , shikimic acid (Joslyn , 1964)。水解型單寧在極性溶液或潮溼環境中會緩慢地分解 , 但在有機溶劑中則較穩定 (Okuda et al.,1991)。

聚合型單寧為 flavan-3-ols 或 flavan-3,4-diols 聚合成之聚合物 Polymers(Roux,1972) , 又稱為 proanthocyanidins , 單寧聚合型的化學結構是複雜且未完全被了解的 , 通常某些植物來源的聚合型單寧是以傳統的沈澱法或以 polydextran gels 分離而來(Oh and Hoff,1979)。分子量估計在 500~3000 , 且只限於含有 2-6 個單體聚合成的單寧聚合物(Samuel and Callahan,1990)。

單寧聚合型在空氣中不是很穩定 , 會因氧化而使顏色轉為紫紅

色，若長時間放置於溶液中則會形成高分子量縮合單寧混合物的沉澱，稱為 phlo-baphenes 或 phlobatannins(Okuda et al.,1991)。

三、類黃酮化合物

類黃酮主要包括黃酮 (flavone)、黃酮醇(flavonol)。黃烷酮 (flavanonol)。類黃酮是兩個苯環將二個碳原子夾於其間，鍵結成之色素化合物總稱。

類黃酮是植物天然色素的衍生物，並且是一種具有活性的化合物。蜂膠中所含有之類黃酮亦具有捕獲自由基，保護脂質之能力 (Popeskovic et al., 1980)及防止易氧化物物質之氧化，如維生素 C 和酸敗(rancid)的發生(Ghisalberti, 1979)。

(一)類黃酮物質之化學性質

類黃酮物質為多酚類化合物，通常是以游離式醣 (aglycone)狀態存在植物活細胞中(郁，1999；Crozier et al., 1997；Henning et al., 1980)。而配醣體(glycoside)乃醣 結合糖基(sugar)而成，因此分析類黃物質之醣 時，須以酸或酵素加水解 (Gruyter et al.,1983 ； Harborne, 1965 ； Hollman et al., 1996)。

(二)類黃酮物質之功效

flavonol 及 flavone 為類黃酮物中具有抗氧化及清除自由基能力之物質(Shahidi et al., 1992)。類黃酮物質的抗氧化作用，包括去除自

由基及活性氧分子、利用螯合能力抑制金屬離子與蛋白質形成複合物以及還原氧化型維生素 E 或 C 以顯示其加成效果等機制。

四、研究目的

蜂膠中含有豐富的多元酚類化合物，一些相關之研究結果指出，多元酚類化合物及其衍生物已被證實具有特殊的生物活性，如抗菌、抗氧化、抗發炎、抗腫瘤等生理功效。

本研究之目的主要在於探討不同來源之蜂膠原料及各種市售蜂膠商品中，酚類化合物之組成與差異，並由成分分析之結果進一步了解蜂膠所具有之生物性功效的可能貢獻因素。

參、材料與方法

一、實驗材料

(一)蜂膠原塊

- 1.蜂膠原塊來源：蒙古、浙江、新疆、巴西及台灣等地區之蜂膠塊。
- 2.蜂膠原塊萃取液之製備：取不同產地之蜂膠原塊分別以蒸餾水與 95%乙醇(以樣品重量之 4 倍體積溶劑)於 37 °C 下放置 24 小時進行萃取，以獲致水萃取液及乙醇萃取液。

(二)市售蜂膠產品

- 1.市售蜂膠產品來源：收集市面上所販售之蜂膠商品包括精萃液、膠囊及噴液等，其產地包括日本、英國、紐西蘭、台灣、巴西及中國大陸等。
- 2.蜂膠膠囊產品之萃取：以 95%乙醇將膠囊中之內含物，於 37 °C 中萃取 30 分鐘，取得其萃取液。

(三)化學藥品

1.標準品

Benzoic acid：購自美國 Sigma 公司

Caffeic acid：購自美國 Sigma 公司

Caffeic acid phenethyl ester: 由彰化師範大學化學系李衍章教授合成提供。

(+) - Catechin : 購自美國 Sigma 公司

Cinnamic acid : 購自美國 Sigma 公司

Curcumin : 購自美國 Sigma 公司

Ellagic acid : 購自美國 Sigma 公司

(-) - Epicatechin : 購自美國 Sigma 公司

Gallic acid : 購自美國 Sigma 公司

Quercetin : 購自美國 Sigma 公司

Rutin : 購自美國 Sigma 公司

2. 一般試藥

Cinchonin sulfate : 購自美國 Sigma 公司

Formaldehyde : 購自美國 Fisher 公司

Iron(III)chloride : 購自德國 Merck 公司

Linoleic acid : 購自美國 Sigma 公司

Potassium ferricyanide : 購自美國 Sigma 公司

Sodium carbonate anhydrous : 購自德國 Merck 公司

Vanillin : 購自德國 Merck 公司

3. 溶劑

Acetic acid : 購自德國 Merck 公司

Acetone : 購自德國 Merck 公司

Acetonitrile：購自美國 Tedia 公司

Butanol：購自德國 Merck 公司

Chloroform：購自美國 Tedia 公司

Ethyl acetate：購自美國 Tedia 公司

Ethyl ester：購自德國 Merck 公司

Folin-Ciocalteu's phenol reagent：購自德國 Merck 公司

Glacial acetic acid：購自德國 Merck 公司

Hydrogen Chloride：購自德國 Merck 公司

Hydrochloric acid：購自美國 Tedia 公司

n-Hexene：購自德國 Merck 公司

Methanol：購自美國 Tedia 公司

Pentane：購自德國 Merck 公司

Silica gel：購自德國 Merck 公司

Tween 20：購自美國 Fisher 公司

95% 藥用酒精：購自台灣省菸酒公賣局

(四)儀器設備

1.分光光度計

Spectrophotometer, U-3000,Hitachi,Japan

Spectrophotometer, U-1100,Hitachi,Japan

2.高效液相層析儀(HPLC)

- (1) Pump, model LC 6200A, Hitachi, Japan
- (2) Photodiode array detector, model LC 4500, Hitachi, Japan
- (3) System control 801-SC, Jasco, Japan
- (4) Pump, model 880-PU, Jasco, Japan
- (5) Autosampler, 855-AS, Jasco, Japan
- (6) UV-Visible detector(紫外光-可見光), Jasco, Japan

3. 氣相層析質譜儀(GC-MS)

- (1) Gas chromatography, Autosystem, Varian, U.S.A,
- (2) Flame ionization detector (FID), model 1400, Varian, U.S.A
- (3) Gas chromatography mass(GC-MS) detector, 1800 HP, U.S.A

二、實驗方法

(一) 蜂膠中粗脂肪及蜂蠟含量之測定

1. 粗脂肪含量之測定

依據 CNS 國家公告之標準方法，精確稱取已成粉末狀之蜂膠檢體 2~10g，放入圓筒濾紙中，其上輕塞適量脫脂棉，置適當容器內於 100~105 烘箱中乾燥 2~3 小時(除去水分後)，於乾燥器放冷，將圓筒滾紙置入抽出管中，約加 1/2 燒瓶容量之乙醚，置於 60-70 (乙醚迴流速率每小時六次)水浴上，萃取至少 8 小時後，取出圓筒濾紙，接回冷凝管，再於水浴上加溫至燒瓶中之乙醚幾乎蒸乾，卸下燒瓶，置於水浴上繼續蒸乾乙醚，再將燒瓶外面擦拭乾淨後，置於 98~100 之烘箱中乾燥約 1 小時，移入乾燥器中放冷約 30 分

鐘後，稱重至恆量(恆量係指最初所示之最低重量)。

$$\text{粗脂肪之含量(\%)} = \frac{W - W_0}{S} \times 100\%$$

W：抽出粗脂肪經乾燥後連燒瓶之重量(g)

W₀：放有沸石燒瓶之重量(g)

S：檢體之重量(g)

2. 蜂蠟含量之測定

同上述條件將蜂膠原塊萃取至少 8 小時後，萃取液減壓濃縮(或以氮氣吹乾)，再以 100 ml 熱甲醇加入煮沸(隔水加熱)。待上層出現澄清液，瓶底有少量油脂，冷卻固化，蜂蠟溶於甲醇層，甲醇層再以濾紙過濾並以甲醇沖洗，置於 40 之烘箱中乾燥 1 小時至恆重，移入乾燥器中放冷約 30 分鐘後，稱重至恆量，

$$\text{蜂蠟含量} = \frac{W - W_0}{S} \times 100\%$$

W：抽出蜂蠟經乾燥後連燒瓶之重量(g)

W₀：放有沸石燒瓶之重量(g)

S：檢體之重量(g)

(二) 蜂膠中酚類化合物之特性

1. 蜂膠中酚類化合物之含量分析

(1) 總酚類化合物含量

參考 Julkunen-Tiitto (1985) 之方法，取萃取液 50 μl 加入 2 ml 水

及 1 ml 之 100 % Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 混合, 加入 5 ml 20 % sodium carbonate 水溶液後, 予以充份混合, 靜置 20 分鐘後測 735 nm 吸光值(A735)。以 gallic acid 作標準曲線, 樣品中總酚類化合物之含量則由 A735 求得 gallic acid 之量, 以每克樣品鮮重所含之 gallic acid equivalent 的毫克數表示。

(2) 聚合型單寧之測定

參考 Julkunen-Tiitto(1985)之方法, 取 0.1ml 萃取液加入 3ml 4% valin (W/V in methanol), 混合均勻, 加入 1 ml 濃鹽酸後再混合均勻, 靜置 20 min 後測 500 nm 吸光值(A500)。以(+)-catechin 作標準曲線, 樣品中聚合型單寧之含量由其 A500 求得(+)-catechin 之量, 以每克樣品鮮重所含之(+)-catechin equivalent 的毫克數表示。

(3) 無色花青素含量之測定

參考 Julkunen-Tiitto(1985)之方法, 取萃取液 100 μ l 加入 butanol-conc.HCl(95:5) 至 4 ml, 於 95-98 $^{\circ}$ C 下水解 2 小時, 取出冷卻後再以 butanol-conc.HCl 加至 4 ml, 靜置 20 min 後測 550 nm 吸光值 (A550)。以(+)-catechin 作標準曲線, 樣品中之無色花青素含量由其 A550 求得(+)-catechin 之量, 以每克樣品鮮重所含之(+)-catechin equivalent 的毫克數表示。

(4) 總類黃酮化合物含量

參考李(1986)等之方法，取 2 ml 萃取液加入 20 ml methanol 及 1ml 5 % AlCl_3 (W/V)，混合均勻，作用 30 分鐘後，測其 425 nm 吸收值(A425)，以 quercetin 作標準曲線，樣品中之總類黃酮化合物含量由 其 A425 求得 quercetin 之量，以每克樣品鮮重所含之 quercetin equivalent 的毫克數表示。

2. 蜂膠中酚類化合物相對聚合程度之測定(Butler et al., 1982)

(1)Anthocyanidin formation 之測定

依 Watterson and Bulter (1983)之方法，取 0.1 ml 樣本溶液，控制組加 7 ml 含 15% (V/V) 甲醇和 15% (v/v) 0.1N 醋酸之正丁醇，實驗組加入 7 ml 含 15% (V/V) 鹽酸之正丁醇。混合均勻後，於沸水中水浴 90 分鐘，待冷卻後測 550 nm 之吸光值。所測得之吸光值可反應出解離生成 flavan-3-ol 單體的濃度。

(2)Vanillin assay in glacial acetic

依 Bulter 等(1982)之方法，取 0.1ml 蜂膠樣品溶液，加入 1.4ml 醋酸，混合均勻後，取 0.5ml 稀釋液，加入 5 ml 包含 0.5 % (w/v) vanillin 及 4 % (v/v)鹽酸之冰醋酸，混合均勻後，於 30 水浴 5 分鐘後，測 510 nm 之吸光值。所測得之吸光值可反應出聚合分子的濃度。

多元酚類化合物相對聚合程度計算如下：

Absorbance of anthocyanidin formation / absorbance of vanillin assay in

glacial acetic acid×100 %

3. 各類酚類化合物之分佈情形

利用 cinchonine sulfate 可使單寧沉澱，formaldehyde 會與特定化合物反應生成不可溶之縮合性衍生物。Total phenolic hydroxyl groups 與 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 反應的特性，並依照 Peri and Pompei(1971)之方法(圖四)，取 5 ml 樣品粗萃液與 1 ml 0.1M FeCl₃ (in 0.1N HCl)及 1 ml 0.008M K₃Fe(CN)₆ 振盪混勻，靜置 10 分鐘，測 720 nm 吸光值，分別測定樣品中聚合型單寧、水解型單寧、簡單酚類化合物及非單寧性黃烷之含量。

4. 膠體過濾分析

(1)Sephadex LH-20 膠體過濾層析

參照 Strumeyer and Malin (1975)之方法，將充填預先以 95%酒精浸潤之 Sephadex LH-20 膠體(瑞典 Pharmacia 公司)的管柱(3 cm x 2.6 cm I.D.)，以 95%酒精沖提平衡之，將蜂膠萃取物注射後，以 1.6 ml/min 之 95%酒精沖提四小時，將不含聚合型單寧的酚類化合物沖提出，以波長 280 nm 偵測之，然後再以 50%丙酮(v/v)進行沖提六小時，得到聚合型單寧之酚類化合物，以波長 435 nm 檢測之。

(2)粒徑排除層析(Size exclusion chromatography)

蜂膠萃取物經適當稀釋之後，以 0.45 μm 之濾膜過濾，然後以粒

徑排除層析高效能液相層析進行分析，本研究使用之分離管為 PolyHydroxyethyl A RP-18 (250×9.4 mm I.D, 粒徑 5 μm, 德國 Merck 公司), 移動相溶液為 60%乙醇水溶液, 以 0.5 ml/min 60% 乙醇水溶液沖提之, 以波長 280 nm 偵測。

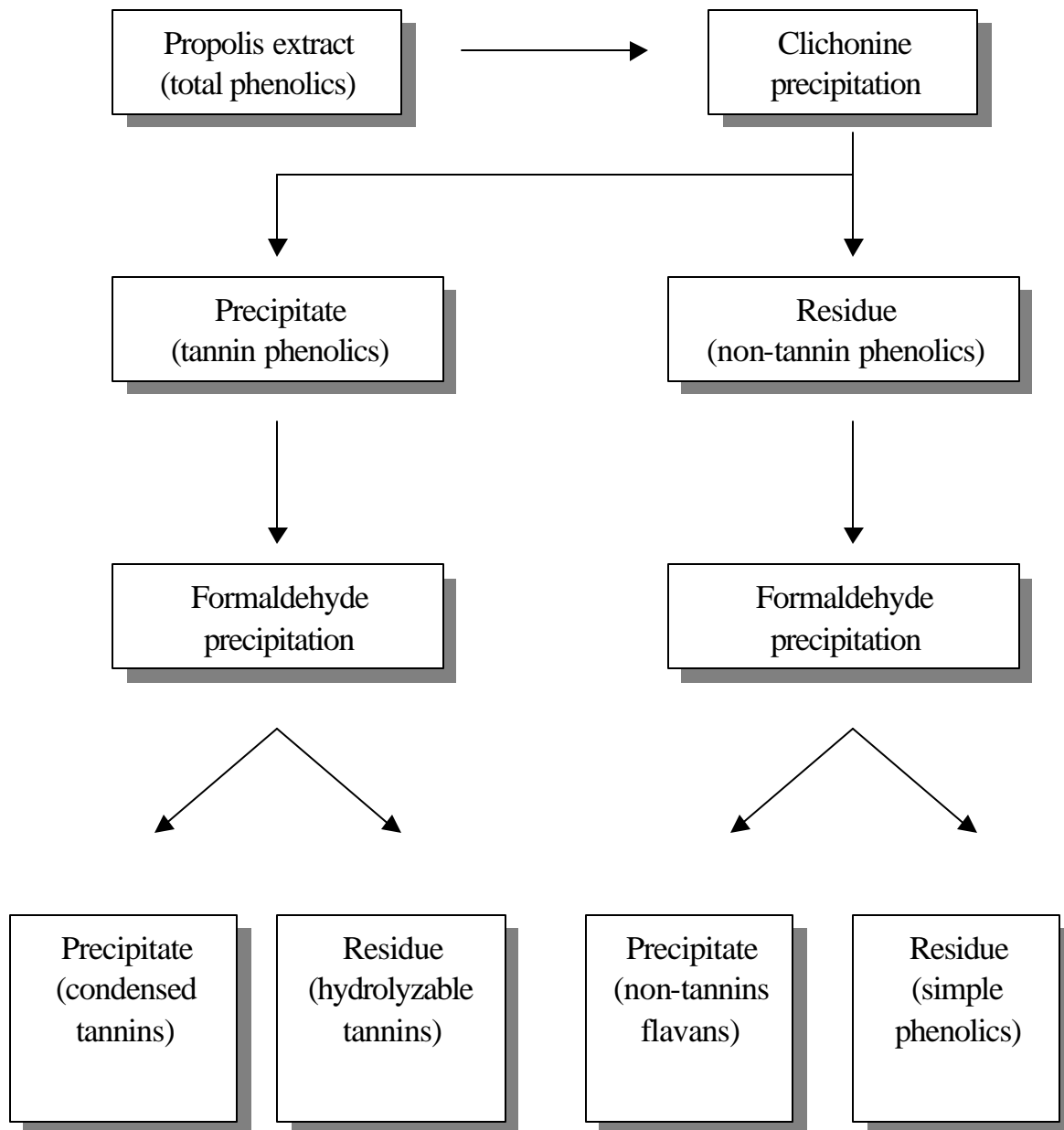
(三)蜂膠酚類化合物之薄層層析、抗氧化性測定與分析

1.薄層層析

採用王與孫(1993)之方法, 以螢光矽膠薄層層析片(0.2 mm,60 F254, Merck)進行分析, 展開溶液為 n-hexane : ethyl acetate: acetic acid = 70:29:1(v/v/v), 展開後之薄層層析片乾燥後, 於紫外燈(254 nm) 下觀察並作標記, 再分別刮下並溶於甲醇, 配製成適當的濃度(100 μg/ml)進行抗氧化性測試, 並利用高效能液相層析進行分析鑑定。

2.抗氧化性

參考 Lingnert 等(1979)之方法以等量的 linoleic acid 及 Tween 20 溶於 0.1M potassium phosphate buffer (pH.6.5), 並以均質機攪拌 10 秒後, 即製成 10 mM linoleic acid emulsion。將上述薄層層析分離所得之蜂膠粗萃液以甲醇溶解後, 取 200 μl 與 2 ml 10mM



圖四、蜂膠萃出物中酚類化合物之測定

Fig 4. Estimation of different phenolic groups in propolis extract

linoleic acid emulsion，混合均勻後，放置於 37 暗室中 15 小時。
於放置前後各取 0.2 ml 的 linoleic acid emulsion 與樣品之混合液溶
於 2ml 甲醇中，並加入 6ml 60% 甲醇，測 234 nm 下之吸光以測定
樣品對其共軛雙烯鍵產生的抑制效果。計算方法如下：抗氧化性以
A.O.A 值表示，A.O.A 值愈高表示樣品的抗氧化性愈強。

$$A.O.A.=\frac{A_{234}(c) - A_{234}}{A_{234}(c)}$$

A₂₃₄:含樣品之 linoleic acid emulsion 在 37 15 小時反應前
後 234 nm 下吸光值之差。

A₂₃₄(C):不含樣品之 linoleic acid emulsion 在 37 15 小時
反應前後 234 nm 下吸光值之差。

3. 高效能液相層析

蜂膠水萃取液或乙醇萃取液經適當稀釋之後，以 0.45 μm 之濾
膜過濾，然後進行高效能液相層析，移動相 A 溶液為 2.5 % glacial
acetic acid 之水溶液；B 溶液為 acetonitrile，起始為 100% A 溶液，
於 10 分鐘線性梯度轉換成 87% A 溶液，13 % 之 B 溶液，於 60 分
鐘線性梯度轉換成 60% A 溶液，40% 之 B 溶液，於 90 分鐘以線
性梯度轉換成 100% B 溶液，樣品注射量為 20μl，流速為 1.0
ml/min，檢測波長為 280 nm，分離管柱為 Lichrospher 100 RP-18
column，(250 mm x 4 mm I.D.，粒徑 5μm,德國 Merck 公司)。

(四)蜂膠中揮發性成份分析

1.揮發性成份之萃取

不同蜂膠樣品各取 10-20 公克，加 2500 ml 蒸餾水，以 Waring blender 打碎 3min，於室溫下靜置 30 min，然後分別使用 Likens-Nickerson apparatus 進行揮發性化合物之萃取。所使用的溶劑為 100 ml pentane/ether (1:1)，作為香氣萃取溶劑，總共萃取時間為 2 小時。萃取液使用 Kuderna-Danish concentrator 於 40 進行濃縮至大約 1 ml，萃取液於再以微量注射器吸取裝置至單邊封口之毛細管，於 35 水浴下加熱濃縮至體積不再明顯變化為止。濃縮收集得精油，分別以不同極性之氣相層析分離管柱作定性及定量分析。

2. 揮發性成分分析

取 0.2 μ l 的樣品注射至氣相層析儀(GC)及氣相層析質譜儀(GC-MS)中進行揮發性成分分析。揮發性化合物的定性及定量分析使用氣相層析儀及質譜儀。氣相層析儀為 Varian 3400 及 Varian 8100 autosampler，分離管柱為 DB-WAX 毛細管(30m \times 0.25 mm I.D.)，注射口溫度為 230，烘箱溫度設定為 40 維持 5 分鐘，然後昇溫至 210，昇溫速度為 2 /min，最後保持在 210 30 分鐘。積分器為訊華公司 Chem-Lab 個人電腦積分系統。檢出器為火燄離子化檢出器(FID)，其溫度設定為 250，另外也使用質譜儀為檢出器，質

譜儀檢出器為 HP 1800B GCD system ; 離子源溫度 : 200 ; 離子
化電壓 : 70 eV ; multiplier: 1459 V。

(五)統計分析

所有數據皆以 SAS 統計軟體之 ANOVA(analysis of variance)及皮
爾森係數(Pearson's correlation coefficients)程式進行統計分析。

肆、結果與討論

一、不同蜂膠產品之差異性

蜂膠為一天然的混合物，組成相當複雜，其中約含有 50-55%的樹脂膠狀物質、25-35%的蜂蠟、8-10%的精油、5%的花粉及其它成分如礦物質與各種有機物等(李，1993；Markham et al., 1996)。為瞭解不同蜂膠原料之差異性，本研究初步著手分析數種不同來源蜂膠塊的粗脂質及蜂蠟含量，如表一所示，臺灣的蜂膠粗脂質含量高達 71.6%，顯著地高於其它地區的蜂膠，其次為來自新疆的蜂膠塊(62.8%)，其餘各地區蜂膠的粗脂質含量均超過 50%。在蜂蠟含量方面，也以產自臺灣的蜂膠塊含量最高，達 32%，其次為浙江的蜂膠塊，蜂蠟含量為 28.9%，最低者為巴西-4 的蜂膠，其蜂蠟含量僅有 18.8%，遠低於文獻報導的 25-35%。由此可知蜂膠原料差異性極大。

二、酚類化合物之特性

(一) 酚類化合物之含量分析

酚類化合物為蜂膠中極為重要之天然成份，蜂膠所含的酚類化合物包含的範圍相當廣泛，包括有類黃酮、聚合型單寧、游離態的酚酸(phenolic acid)及其衍生之酯類化合物等等，多元酚類化合物一般相信與蜂膠的生物活性有相當重要的關係，如抗氧化性、抗癌性、抗菌性及消炎功能等，

表一、各種蜂膠原塊中粗脂肪及蜂臘含量

Table 1.Contents of crude fat and wax of propolis

Sample	Crude fat(%)	Wax(%)
No.1	55.18	24
No.2	62.85	25.6
No.3	59.5	25
No.4	71.6	32
No.5	50.2	28.9
No.6	52.6	18.8

No.1 浙江 No.2 新疆 No.3 巴西-3 No.4 台灣 No.5 浙江-2 No.6 巴西-4

故有必要針對蜂膠中酚類化合物特性進行探討，又因為蜂膠原塊間差異性極大，因此本研究將針對不同蜂膠之乙醇萃取液與水萃液，以及市售之各種蜂膠商品中酚類化合物之組成及特性進行分析，並利用相關性統計分析與分離技術尋求主要之貢獻因子。

1. 蜂膠之 95% 乙醇萃取液

如表二所示，不同產地之蜂膠塊 95% 乙醇萃取液，其總多元酚、聚合型單寧、總類黃酮及 CAPE 等含量有極為顯著的差異($p < 0.05$)，在總多元酚方面，以來自新疆及浙江-2 的蜂膠塊含量最高，分別為 93 mg/ml 及 90 mg/ml，蜂膠乙醇萃取液總多元酚含量最低者為來自巴西的蜂膠塊(巴西-1)，其總多元酚含量僅有 21 mg/ml。在聚合型單寧含量方面，來自巴西的蜂膠塊顯著高於其它地區的蜂膠塊(包括浙江-2 及臺灣)，即使是同樣來自巴西的蜂膠塊中其聚合型單寧含量也有極為明顯的差異，如巴西-1 的蜂膠塊，其總多元酚含量顯著低於其它蜂膠塊，但聚合型單寧含量則顯著高於其它地區的蜂膠塊，蜂膠中類黃酮含量方面，來自不同地區的蜂膠塊，其乙醇萃取液的類黃酮含量差異性極大，含量分佈的範圍相當廣，介於 0.22 ~ 12.52 mg/ml 之間，解(1999)以 80% 乙醇萃取中國大陸華南地區之蜂膠，發現其類黃酮含量為遠高於來自浙江的蜂膠塊，推測造成差異的主要原因是萃取及分析的方法不

同所致。CAPE 是蜂膠中所含的酯型衍生物中最主要的一種，蜂膠萃取液中 CAPE 的含量及其生物活性在相關的文獻中受到相當的重視(Guarini et al.,1992)，在表二可明顯看出，來自不同地區的蜂膠塊，其乙醇萃取液中 CAPE 含量的差異性極大，分佈範圍從 0.21~5.59 mg/ml，含量相差接近 30 倍，以來自蒙古及新疆的蜂膠塊含有較高量的 CAPE。

綜合上述可知蜂膠乙醇萃取液所含的酚類化合物，其總多元酚及其各種重要的組成，如聚合型單寧、類黃酮及 CAPE 等，均有極為顯著的差異。造成此種差異性的原因可能來自於蜜蜂品種、產膠植物及環境的差異等。

2. 蜂膠之水萃取液

蜂膠水萃取液也是市售蜂膠的主要商品之一，因此本研究亦探討不同產地的蜂膠塊水萃取物中總多元酚、聚合型單寧、總類黃酮及 CAPE 等含量，結果如表三所示。相較於 95% 乙醇萃取物，可溶於水中的總多元酚及聚合型單寧含量極低，其中巴西-1 的蜂膠水萃取液中的總多元酚含量高於其它的蜂膠塊，這個現象正好與乙醇萃取液中的趨勢相反，此可能是巴西-1 的蜂膠中含有較高比例的水溶性多元酚類化合物，諸如酚酸或簡單酚類，此結果也顯示出不同來源的蜂膠，其多元酚類化合物的組成變異性相

表二 蜂膠原塊乙醇萃取液中總多元酚、聚合型單寧、總類黃酮及 CAPE 含量

Table 2. Contents of total phenolics, condensed tannins total flavonoids and CAPE of the various ethanolic extract of propolis

sample	Content (mg / ml)			
	Total phenolics*	Condensed tannin**	Total flavonoids***	CAPE
OE-1	21.48±0.08 ^h	2.51±0.05 ^a	0.22 ±0.02 ^g	0.21
OE-2	46.57±0.58 ^g	1.31±0.03 ^c	7.05 ±0.04 ^c	0.26
OE-3	56.14±0.19 ^d	1.57±0.14 ^b	1.26 ±0.10 ^f	0.71
OE-4	53.19±1.20 ^e	1.34±0.05 ^c	2.11 ±0.05 ^e	1.46
OE-5	67.87±1.58 ^c	0.46±0.02 ^d	6.95 ±0.05 ^c	5.59
OE-6	92.97±2.98 ^a	0.56±0.03 ^d	11.47 ±0.29 ^b	5.47
OE-7	89.55±1.44 ^b	0.52±0.03 ^d	11.29 ±0.05 ^b	2.58
OE-8	49.52±1.23 ^f	0.50±0.05 ^d	4.56 ±0.12 ^d	2.11
OE-9	56.36±1.79 ^d	0.57±0.03 ^d	12.52 ±0.04 ^a	0.31

* mg gallic acid equivalent /ml

** mg catechin equivalent/ml

*** mg quercetin equivalent/ml

CAPE : caffeic acid phenethyl ester

OE-1: 巴西-1; OE-2: 巴西-2; OE-3: 巴西-3; OE-4: 巴西-4 ; OE-5: 蒙古 OE-6: 新疆 ; OE-7: 浙江-2 ; OE-8: 臺灣 ; OE-9: 浙江

Means within the same column sharing different superscript letters were significantly different(p<0.05)

當蜂膠水萃取液的總類黃酮含量低於乙醇萃取液，但巴西-1 與巴西-4 的蜂膠除外，此三者的水萃取液中的總類黃酮含量較乙醇萃取液高，可能與其類黃酮組成有關，(這幾種蜂膠之類黃酮可能有較高的比例以 glycoside 的形式存在，因此有較佳的水溶性)。目前已知的類黃酮物質超過 4000 種以上(Hollman et al., 1996)，而蜂膠中常見的類黃酮如 quercetin, kaempferol, chrysin, galangin 等。Markham 等(1996)指出不同地區的蜂膠，其類黃酮之組成有所不同，例如紐西蘭蜂膠所含的類黃酮主要為 pindembrin 及 pinobanksin 3-acetate，而巴西蜂膠所含的類黃酮主要為 dihydroflavonoids，中國大陸蜂膠所含的類黃酮以 flavones 及 flavonols 為主。因此，不僅不同地區的蜂膠其類黃酮之組成有所不同，以不同的溶劑萃取所得之類黃酮之組成亦有所不同，萃取溶劑與其所得類黃酮對生理活性的影響值得更進一步探討，蜂膠水萃取液之 CAPE 含量極低，如表三中所示，均低於 10 μ g/ml，原因可能是 CAPE 在水中的溶解度極低所致。

3.市售蜂膠產品

市售蜂膠液及膠囊等商品之總多元酚、聚合型單寧及總類黃酮含量如表四所示，市售蜂膠液及膠囊的總多元酚含量均低於本實驗中的蜂膠乙醇萃取液，但市售蜂膠液及膠囊之聚合型單寧及總

表三、蜂膠原塊之水萃取液中總多元酚、聚合型單寧、總類黃酮及 CAPE 含量

Table 3. Contents of total phenolics, condensed tannin , total flavonoids and CAPE of various aqueous extract of propolis

Sample	Content (mg / ml)			CAPE (μ g/ml)
	Total phenolics*	Condensed tannin**	Total flavonoids***	
OW-1	0.90±0.01 ^a	0.07±0.003 ^b	1.41±0.08 ^t	2.57
OW-2	0.74±0.05 ^b	0.05±0.002 ^c	10.82±0.11 ^a	4.55
OW-3	0.33±0.00 ^e	0.02±0.004 ^{ef}	1.05±0.01 ^g	1.29
OW-4	0.29±0.01 ^{gf}	0.09±0.003 ^a	7.96±0.01 ^b	8.56
OW-5	0.68±0.02 ^c	0.02±0.003 ^{ef}	2.49±0.01 ^d	1.92
OW-6	0.28±0.01 ^g	0.01±0.002 ^f	0.93±0.07 ^g	2.58
OW-7	0.32±0.00 ^{ef}	0.02±0.002 ^d	1.63±0.13 ^e	2.00
OW-8	0.34±0.01 ^e	0.02±0.001 ^{ef}	2.02±0.01 ^d	2.02
OW-9	0.38±0.00 ^d	0.02±0.003 ^{ed}	2.69±0.05 ^c	2.35

* mg gallic acid equivalent /ml

** mg catechin equivalent/ml

*** mg quercetin equivalent/ml

CAPE : caffeic acid phenethyl ester

OW-1: 巴西-1; OW-2: 巴西-2; OW-3: 巴西-3; OW-4: 巴西-4 ;OW-5: 蒙古 ;

OW-6: 新疆 ; OW-7: 浙江-2; OW-8: 臺灣 ; OW-9: 浙江

Means within the same column sharing different superscript letters were significantly different (p<0.05)

表四、市售蜂膠液中總多元酚、聚合型單寧、總類黃酮及 CAPE 含量

Table 4. Contents of total phenolics, condensed tannin, total flavonoids and CAPE of various commercial propolis products

Sample	Content (mg / ml)			
	Total phenolics*	Condensed tannin**	Total flavonoids***	CAPE
CL-1	0.31±0.02 ^l	0.07±0.01 ^g	0.22±0.02 ^m	0.01
CL-2	25.99±0.85 ^b	3.81±0.06 ^a	11.65±0.39 ^e	0.58
CL-3	19.84±3.86 ^c	2.85±0.10 ^b	17.63±0.31 ^b	0.95
CL-4	29.94±0.17 ^b	1.49±0.50 ^f	16.11±0.11 ^c	0.95
CL-5	20.68±1.98 ^c	2.62±0.05 ^{bc}	5.48±0.10 ^g	0.02
CL-6	11.11±1.29 ^d	2.66±0.07 ^{bc}	3.93±0.03 ^h	0.02
CL-7	29.53±1.71 ^b	3.92±0.15 ^a	14.64±0.19 ^d	0.12
CL-8	25.85±0.41 ^b	1.33±0.35 ^e	9.93±0.23 ^f	0.79
CL-9	41.15±2.07 ^a	2.14±0.76 ^{cd}	26.11±1.23 ^a	2.09
CS-1	1.07±0.03 ^f	0.52±0.05 ^f	2.35±0.91 ^j	0.002
CS-2	0.48±0.01 ^h	0.02±0.01 ⁱ	0.87±0.02 ^l	0.004
CS-3	1.43±0.05 ^e	0.02±0.01 ⁱ	2.97±0.34 ⁱ	0.007
CP-1	0.63±0.02 ^g	0.15±0.01 ^h	1.12±0.17 ^k	0.001
CP-2	0.31±0.02 ⁱ	0.06±0.01 ^f	0.24±0.17 ^m	0.001

* mg gallic acid equivalent /ml

** mg catechin equivalent/ml

*** mg quercetin equivalent/ml

CAPE : caffeic acid phenethyl ester

CL-1 Brasil 10% CL-2 森川 (日) CL-3 New Zealand CL-4 亞鼎 CL-5 Brasil

CL-6 佳蜂 (普通級) CL-7 佳蜂(高級) CL-8 佳蜂(不含酒精) CL-9 England

Solid capsule type of propolis product : CS-1 to CS-3

Solid powder of capsule propolis product: CP-1 and CP-2

Means within the same column sharing different superscript letters were significantly different (p<0.05)

總類黃酮含量則較高，推測其原因可能是萃取方法不同或有另加其它成份調配所致。又蜂膠液中各種酚類化合物含量皆顯著高於膠囊，此顯示蜂膠之膠囊相關製品純度不高，可能是添加其他成份或物質所致。而 CL-1 蜂膠液因為是噴劑產品，所以其中所含之酚類化合物含量極低。

(二)相對聚合度測定

由上述結果可知，不同蜂膠來源其酚類化合物含量有極大差異，蜂膠所含蜂膠酚類化合物為來自植物之二級代謝產物，經過蜜蜂之攜帶及代謝處理後所得，由表二、三及四中可知蜂膠中聚合型單寧含量極少，是否意味著蜂膠聚合性中之酚類化合物較少，因此本研究亦針對相對聚合度進行探討。乙醇萃取其酚類化合物之相對聚合度(relative polymerization)之分析結果如表五所示，不同產地的蜂膠中，以大陸的蜂膠的相對聚合度最高，為 132%，最低者則為浙江蜂膠，其相對聚合度為 84%。在市售蜂膠液及膠囊商品方面，所分析的樣品中其相對聚合度分佈的範圍介於 93% ~137% 之間，分佈範圍與蜂膠乙醇萃取液者類似，差異性並不顯著。另外分析市售蜂膠膠囊產品，其相對聚合度分佈的範圍介於 91% ~133% 之間，與蜂膠乙醇萃取液及市售蜂膠液比較，亦無明顯的差異。

表五、各種蜂膠產品中酚類化合物之相對聚合度

Table 5. Relative polymerization of phenolic compound from propolis products

Sample	A510 of vanillin assay	A550 of anthocyanidin formation	Relative* Polymerization (%)
OW-1	0.082 ± 0.0026	0.080 ± 0.0007	98
OW-2	0.091 ± 0.0007	0.086 ± 0.0040	95
OW-3	0.089 ± 0.0014	0.084 ± 0.0032	94
OW-4	0.084 ± 0.0030	0.106 ± 0.0038	126
OW-5	0.084 ± 0.0025	0.093 ± 0.0046	111
OW-6	0.079 ± 0.0013	0.082 ± 0.0010	104
OW-7	0.091 ± 0.0009	0.120 ± 0.0044	132
OW-8	0.090 ± 0.0019	0.111 ± 0.0023	123
OW-9	0.083 ± 0.0039	0.069 ± 0.0007	84
CL-1	0.088 ± 0.0026	0.093 ± 0.0031	106
CL-2	0.087 ± 0.0014	0.102 ± 0.0005	117
CL-3	0.084 ± 0.0011	0.081 ± 0.0016	96
CL-4	0.083 ± 0.0049	0.077 ± 0.0032	93
CL-5	0.083 ± 0.0007	0.084 ± 0.0045	101
CL-6	0.095 ± 0.0024	0.091 ± 0.0021	96
CL-7	0.085 ± 0.0042	0.079 ± 0.0003	93
CL-8	0.089 ± 0.0014	0.118 ± 0.0038	133
CL-9	0.082 ± 0.0045	0.085 ± 0.0051	104
CS-1	0.091 ± 0.0008	0.085 ± 0.0052	93
CS-2	0.086 ± 0.0044	0.089 ± 0.0019	103
CS-3	0.090 ± 0.0022	0.085 ± 0.0012	94
CP-1	0.086 ± 0.0016	0.082 ± 0.0080	95
CP-2	0.092 ± 0.0280	0.103 ± 0.0026	112

* : (A550 of anthocyanidin formation/ A510 vanillin assay in glacial acetic acid) ×100%

OE-5: 蒙古 ; OE-6: 新疆 ; OE-7: 浙江-2 ; OE-8: 臺灣; OE-9: 浙江 CL-1
 Brasil 10% CL-2 森川 (日) CL-3 New Zealand CL-4 亞鼎 CL-5 Brasil CL-6 佳蜂
 (普通級) CL-7 佳蜂(高級) CL-8 佳蜂(不含酒精) CL-9 England

(三)各類酚類化合物之分佈情形

從表二可知，蜂膠原塊中含有相當高量的酚類化合物(gallic acid 當量)，而其聚合型單寧含量並不高(catechin 當量)，這個結果看似與上述相對聚合度的分析結果是一致的，但因皆為相對值，故無法直接比較。由於酚類化合物經氧化縮合反應形成分子量較大的化合物，且相對於一般酚類化合物，單寧為聚合度較高之物質，由上述蜂膠之相對聚合度結果，可推估蜂膠中單寧的含量應該不高。為了更進一步驗證，本研究根據 Peri and Pompei(1971)之方法，分別測得蜂膠中各類酚類化合物之分佈情形(包括聚合型單寧、水解型單寧、非單寧性黃烷及簡單酚類等四類)。

由表六可知，蜂膠乙醇萃取液中所含的總酚類化合物，其主要組成分為簡單酚類，約佔總量的 70% 以上，其次為水解型單寧，再其次則為聚合型單寧，除了少數數種蜂膠原塊外，聚合型單寧所佔的含量比例並不高，且皆以非單寧性黃烷的含量最低。比較不同產地的蜂膠原塊，可知巴西-4 及巴西-2 者，之聚合型單寧及水解型單寧的含量顯著高於其它地區的蜂膠原塊，特別是相對於同樣來自巴西的巴西-1 及巴西-3 兩種蜂膠原塊。巴西-4 者，其簡單酚類的含量也顯著低於其它蜂膠原塊。中國大陸的蜂膠原塊中，以浙江蜂膠原塊含有較高比例的聚合型單寧及水解型單寧。

在蜂膠水萃取液方面，相對於蜂膠乙醇萃取液，其總酚類化合物含量極低，主要的組成分為簡單酚類及非單寧性黃烷，這點與蜂膠乙醇萃取液有相當大的差異，其次的成分為水解型單寧，而以聚合型單寧的含量最低，由此可知，簡單酚類及非單寧性黃烷具有較佳之水溶性。除了巴西-2 及蒙古的蜂膠水萃取液中含有聚合型單寧，其它的蜂膠水萃取液都沒有檢出聚合型單寧，如表七所示。比較來自不同產地的蜂膠原塊，發現巴西-2 之聚合型單寧的含量顯著高於其它蜂膠水萃取液，而其水解型單寧則沒有檢出。浙江蜂膠水萃取液中，含量最高者為非單寧性黃烷，其比例與水解型單寧及簡單酚類相近。

在市售蜂膠液及膠囊產品方面，分析結果類似蜂膠乙醇萃取液，其總酚類化合物之主要成分為簡單酚類，其次為水解型單寧與非單寧性黃烷，而以聚合型單寧的含量最低，結果如表八所示。市售蜂膠膠囊所含之總酚類化合物含量大約僅有市售蜂膠液的一半左右。

表六、蜂膠原塊乙醇萃取液中酚類化合物含量

Table 6. The contents of phenolics of ethanolic extract of propolis

sample	Content (mg catechin equivalent / ml extract)				
	Total Amout	Condensed Tannins	Hydrolyzable Tannins	Non-tannin Flavans	Simple Phenolics
OE-1	106.60 ±0.02 ^e	6.92 ±0.45 ^c	10.02 ±0.79 ^c	1.22 ±0.01 ^b	88.43 ±0.34 ^b
OE-2	105.78 ±0.31 ^f	7.72 ±2.21 ^c	12.57 ±2.01 ^c	1.14 ±0.00 ^c	84.35 ±0.07 ^c
OE-3	122.61 ±0.26 ^c	15.89 ±3.46 ^b	24.52 ±3.70 ^b	1.07 ±0.00 ^e	81.13 ±0.23 ^e
OE-4	114.90 ±0.12 ^d	10.54 ±4.28 ^b	11.33 ±4.06 ^c	1.29 ±0.01 ^a	91.74 ±0.34 ^a
OE-5	91.29 ±0.24 ^h	0.41 ±0.56 ^d	1.10 ±0.54 ^d	1.23 ±0.00 ^b	88.56 ±0.14 ^b
OE-6	126.94 ±0.30 ^b	24.39 ±3.46 ^a	18.77 ±4.02 ^b	1.11 ±0.01 ^d	82.68 ±0.68 ^d
OE-7	102.80 ±0.44 ^g	4.15 ±2.55 ^c	3.37 ±0.98 ^d	1.34 ±0.06 ^a	93.94 ±2.93 ^a
OE-8	121.64 ±0.18 ^c	14.23 ±1.46 ^a	16.35 ±2.02 ^b	1.61 ±0.01 ^d	89.45 ±0.58 ^d
OE-9	138.52 ±0.29 ^a	30.70 ±3.66 ^a	35.29 ±3.44 ^d	0.88 ±0.00 ^f	71.65 ±0.08 ^f

*: Total amout =condensed tannin + hydrolyzable tannins + non-tannin flavans + simple phenolics

OE-1: 巴西-1; OE-2: 巴西-2; OE-3: 巴西-3; OE-4: 巴西-4 OE-5: 蒙古 ; OE-6: 新疆 ; OE-7: 浙江-2; OE-8: 臺灣 ; OE-9: 浙江

Solid capsule type of propolis product : CS-1 to CS-3

Solid powder of capsule propolis product: CP-1 and CP-2

Means within the same column sharing different superscript letters were significantly different(p<0.05)

表七、蜂膠原塊水萃取液中酚類化合物含量

Table 7. The contents of phenolics of aqueous extract of propolis samples

Sample	Content (mg catechin equivalent / ml extract)				
	Total Amout ^a	Condensed Tannin	Hydrolyzable Tannins	Non-tannin Flavans	Simple Phenolics
OW-1	0.11 ±0.00 ^g	ND	0.16 ±0.05 ^f	0.50 ±0.06 ^h	1.35 ±0.04 ^d
OW-2	8.62 ±0.18 ^a	2.08 ±0.70 ^a	ND	1.14 ±0.01 ^c	5.67 ±0.02 ^a
OW-3	1.27 ±0.02 ^f	ND	0.38 ±0.02 ^d	0.62 ±0.00 ^g	1.23 ±0.01 ^f
OW-4	3.29 ±0.01 ^c	ND	0.97 ±0.02 ^b	1.31 ±0.02 ^b	1.11 ±0.01 ^g
OW-5	2.35 ±0.01 ^d	0.27 ±0.13 ^b	0.26 ±0.02 ^e	0.71 ±0.01 ^f	1.28 ±0.01 ^e
OW-6	1.41 ±0.01 ^e	ND	0.16 ±0.00 ^g	0.84 ±0.00 ^e	1.40 ±0.01 ^d
OW-7	3.49 ±0.01 ^b	ND	2.83 ±0.06 ^a	3.01 ±0.06 ^a	2.61 ±0.06 ^b
OW-8	2.42 ±0.02 ^d	ND	0.42 ±0.04 ^d	0.88 ±0.03 ^d	1.12 ±0.04 ^g
OW-9	1.41 ±0.01 ^e	ND	0.54 ±0.03 ^c	0.91 ±0.02 ^d	1.46 ±0.02 ^c

a: Total amout = condensed tannin + hydrolyzable tannins + non-tannin flavans + simple phenolics

OE-1: 巴西-1; OE-2: 巴西-2; OE-3: 巴西-3; OE-4: 巴西-4; OE-5: 蒙古 ; OE-6: 新疆 ; OE-7: 浙江-2; OE-8: 臺灣 ; OE-9: 浙江

Solid capsule type of propolis product : CS-1 to CS-3

Solid powder of capsule propolis product: CP-1 and CP-2

Means within the same column sharing different superscript letters were significantly different(p<0.05)

表八、市售蜂膠四種酚類之含量

Table 8. The contents of phenolics of commercial propolis samples

Sample	Content (mg catechin equivalent / ml extract)				
	Total ^a Amount	Condensed Tannin	Hydrolyzable Tannin	Non-tannin Flavans	Simple Phenolics
CL-1	1.2±0.02 ^k	0.16±0.01 ^l	0.03±0.01 ^m	0.09±0.02 ^k	0.92±0.05 ^j
CL-2	125.76±1.12 ^a	7.10±0.23 ^{ab}	12.80±0.25 ^e	5.66±0.05 ^f	100.2±1.08 ^a
CL-3	118.96±2.21 ^{bc}	5.49±0.13 ^d	24.91±0.52 ^a	13.44±0.55 ^b	75.11±1.12 ^e
CL-4	120.26±2.35 ^b	6.79±0.20 ^{bc}	11.93±0.35 ^f	17.77±0.50 ^a	83.77±2.10 ^d
CL-5	95.00±1.92 ^f	2.30±0.03 ^e	17.12±0.32 ^d	12.58±0.29 ^c	63.00±1.20 ^f
CL-6	122.44±1.85 ^b	7.59±0.35 ^a	20.24±0.60 ^c	6.18±0.15 ^e	88.44±3.20 ^{bc}
CL-7	116.5±1.10 ^c	6.49±0.25 ^c	21.45±0.51 ^b	1.33±0.03 ^h	87.23±2.15 ^{cd}
CL-8	99.45±1.25 ^e	1.55±0.07 ^f	5.01±0.11 ^g	2.20±0.10 ^g	90.69±2.20 ^{bc}
CL-9	110.29±1.90 ^d	5.47±0.31 ^d	3.28±0.12 ^j	9.12±0.23 ^d	92.42±1.95 ^b
CS-1	60.35±0.85 ^h	1.03±0.11 ^g	2.93±0.05 ^k	0.55±0.02 ⁱ	55.85±1.50 ^g
CS-2	59.15±0.92 ^h	0.13±0.02 ^{ij}	4.55±0.15 ^h	0.51±0.03 ^{ij}	53.95±1.75 ^g
CS-3	52.86±0.72 ⁱ	0.12±0.01 ^{ij}	3.06±0.20 ^{jk}	0.48±0.04 ^{ik}	49.20±1.53 ^h
CP-1	65.22±0.92 ^g	0.26±0.03 ^h	3.89±0.12 ⁱ	0.54±0.03 ^{ij}	60.53±1.05 ^f
CP-2	47.28±0.66 ^j	0.11±0.01 ^j	2.28±0.09 ^l	0.45±0.02 ^k	44.44±1.15 ⁱ

*: Total amount = condensed tannin + hydrolyzable tannins + non-tannin flavans + simple phenolics

CL-1 Brasil 10% CL-2 森川 (日) CL-3 New Zealand CL-4 亞鼎 CL-5 Brasil CL-6 佳蜂 (普通級) CL-7 佳蜂(高級) CL-8 佳蜂(不含酒精) CL-9 England

Solid capsule type of propolis product : CS-1 to CS-3

Solid powder of capsule propolis product: CP-1 and CP-2

Means within the same column sharing different superscript letters were significantly different(p<0.05)

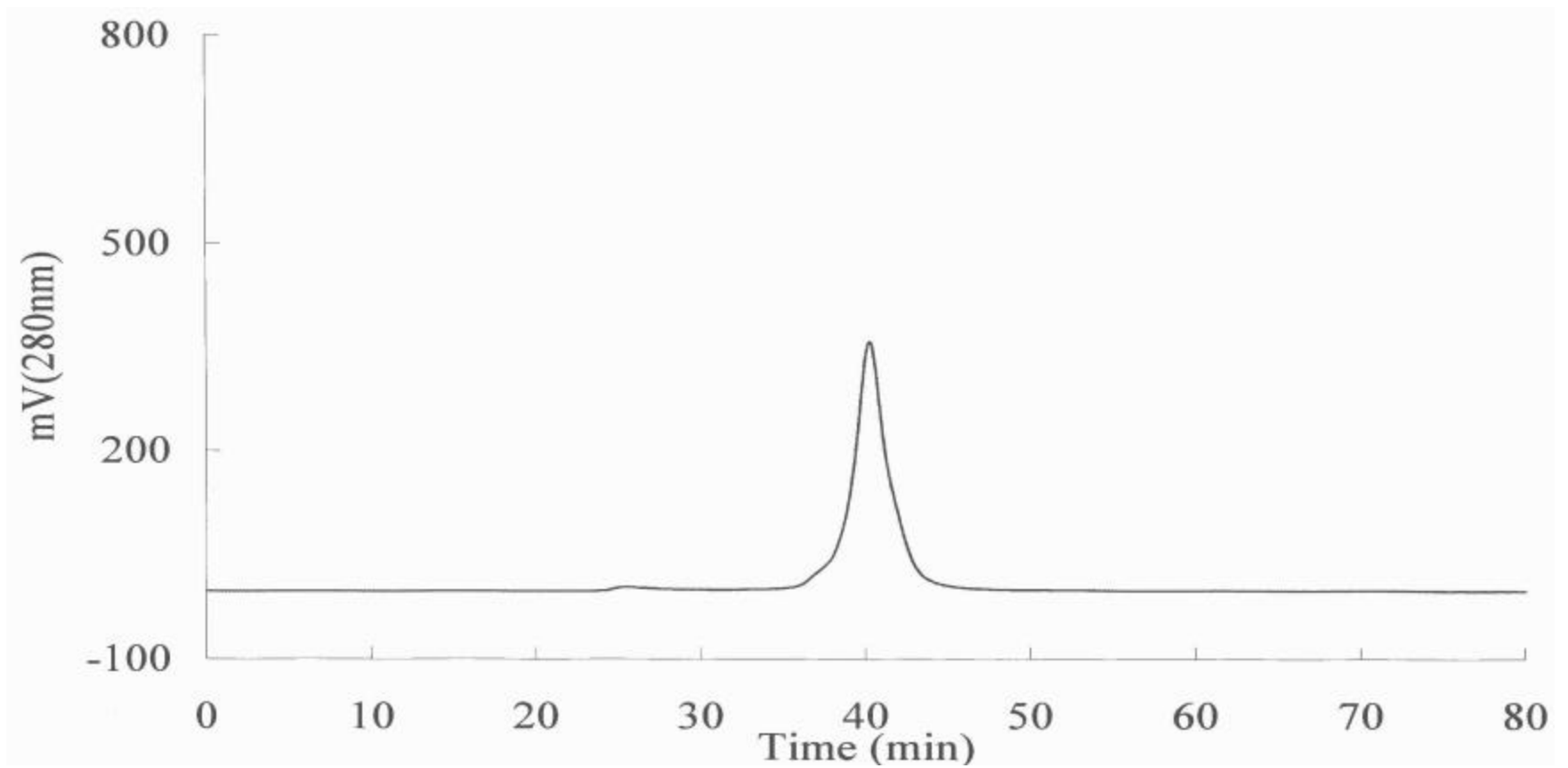
(四)膠體過濾分離

1.Sephadex LH-20 膠體過濾層析

本研究將樣品利用吸附性液相層析法，在波長 280 nm 下以充填 Sephadex LH-20 之管柱進行膠體過濾分離，Sephadex LH-20 膠體廣泛運用於單寧的分離及純化，尤其與含有多元苯環結構之物質(如聚合型單寧)有良好的吸附能力(Strumeyer and Malin, 1975)。圖五顯示蜂膠萃取物經 95 % 乙醇沖提後僅能收集到單一區分物，其所含之成分可能為分子量相近而且性質相近之物質，再經 50 % 之丙酮水溶液常時間沖提並未收集到任何區分物顯示蜂膠萃取物中以低分子量之成分比例較高，由此可知蜂膠中聚合型單寧成分極少，與之前所分析之結果及表五中相對聚合度之測定結果相符合，為確認上述分析結果進一步以粒徑排除層析加以鑑定。

2.粒徑排除層析(size-exclusion chromatography)

取浙江、蒙古及巴西之蜂膠乙醇萃取液，以 size-exclusion HPLC (SE-HPLC)分析其乙醇萃取液所含成分之分子量分佈，結果如圖六所示。由圖中可以發現浙江及蒙古蜂膠乙醇萃取液，其分子量分佈相當集中，只有單一波峰，兩者之分子量分佈類型也非常相似，而巴西蜂膠乙醇萃取液的分子量分佈範圍則略大於浙江與蒙古蜂膠乙醇萃取液，其中巴西-2 與巴西-4 的蜂膠乙醇萃取液，



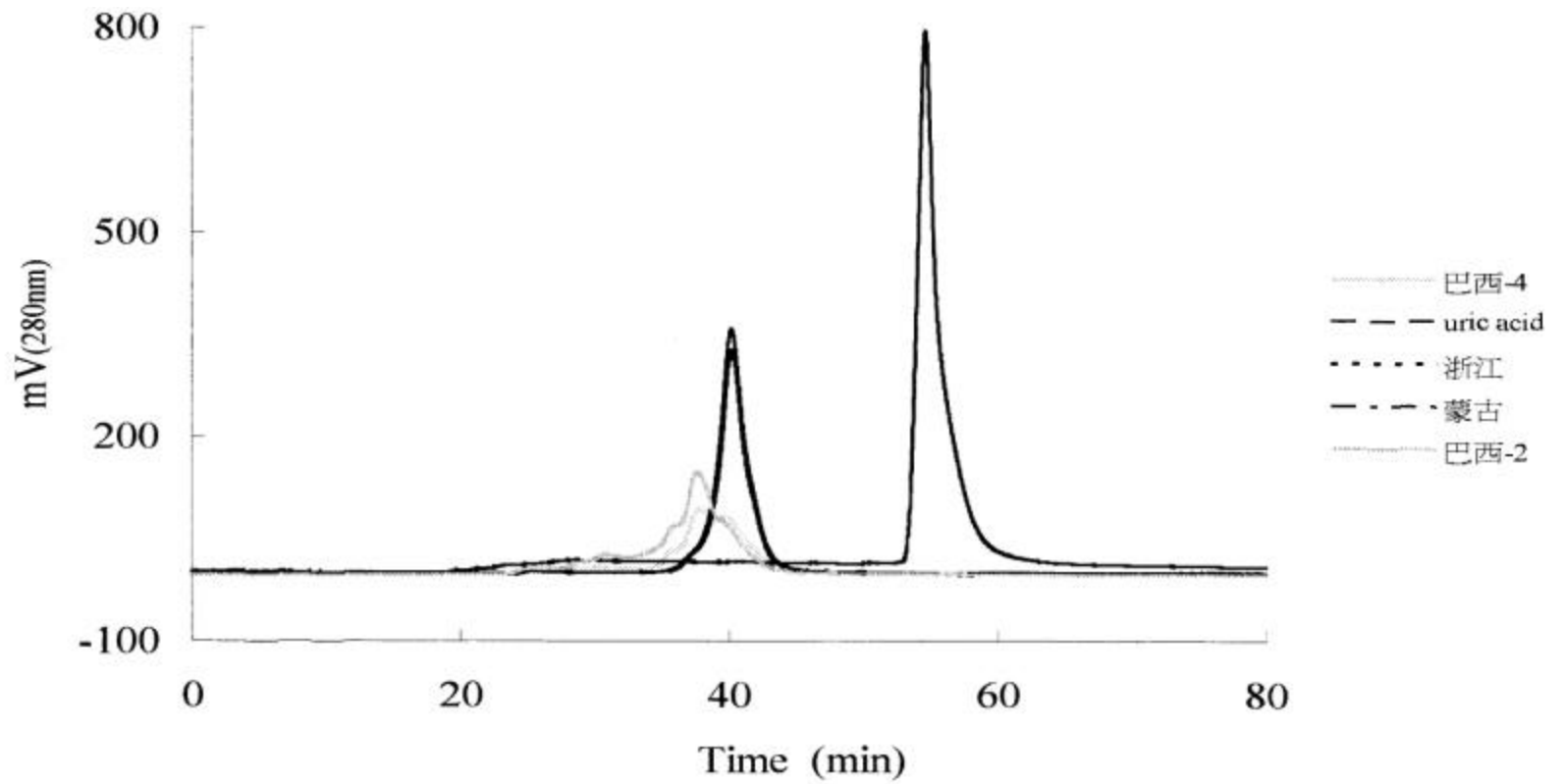
圖五、蜂膠原塊之 Sephadex LH-20 液相層析圖

Fig 5. Sephadex LH-20 high performace liquid chromatograms of propolis

其分子量分佈類型也很相似，從圖中可以發現來自相同地區的蜂膠，其乙醇萃取液的分子量分佈非常的相似，但來自不同區域的蜂膠則有所差異。推測為巴西-2 與巴西-4 的蜂膠乙醇萃取液，其分子量分佈範圍較浙江與蒙古蜂膠寬廣的原因，可能是其蜂膠乙醇萃取液中含有較高比例的聚合型單寧所致，如表二中所示，由於聚合型單寧的分子量較高，因而使巴西-2 與巴西-4 的蜂膠乙醇萃取液的分子量分佈範圍較廣。

三、高效能液相層析

由上述酚類化合物之含量分析產品，不同來源之蜂膠其酚類化合物之含量及相對比例，並不儘相同，為進一步瞭解其組成之差異，本研究將用高效能液相層析進行分析。蜂膠乙醇萃取液之層析結果如圖七所示，來自巴西的蜂膠其層析圖遠較來自中國大陸者(如浙江、蒙古、新疆等)單純。同樣來自巴西之巴西-2 者，滯留時間在 60-90 分鐘的成分明顯較其它巴西蜂膠多且複雜，此可以由表二中巴西-2 的高，總類黃酮含量得到證實，相對地，由此可知滯留時間介於 60-90 分鐘之物質以類黃酮為主。此外，來自中國大陸不同地區的蜂膠，其高效液相層析圖譜均相當類似。圖八為蜂膠水萃取液之高效液相層析圖，由圖可知蜂膠水萃取僅含有極性較高的成分，這些成分的滯留時間大都低於 50 分鐘，來自中國大陸地區的蜂膠，其水萃取液的高效液相層



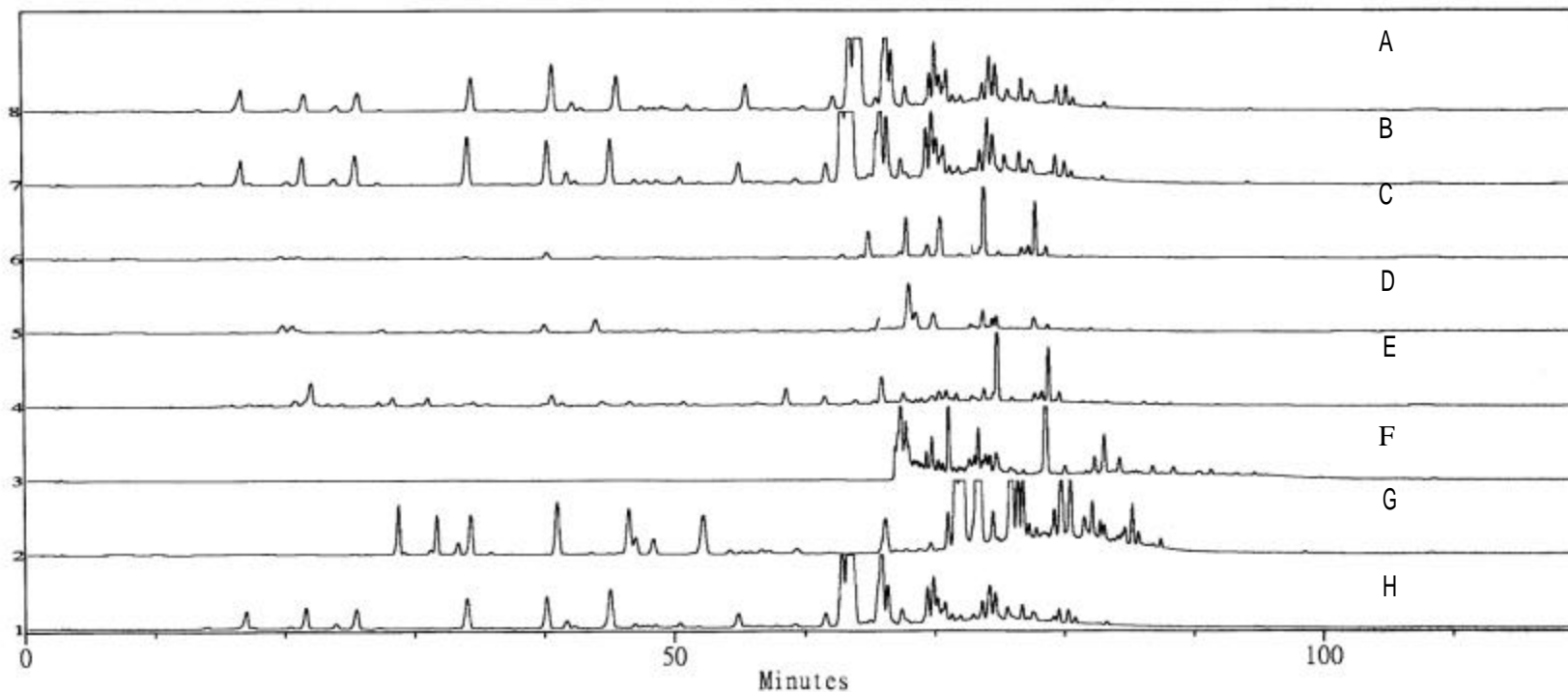
圖六、蜂膠粗萃物之粒徑排除高效液相層析圖

Fig6. High performace liquid chromatograms of various ethanolic extract of propolis

析圖譜均相當類似。但來自巴西的蜂膠，其水萃取液的高效液相層析圖譜差異則相當顯著，其中又以巴西-2 之水萃取液中所含的成分最多且複雜，其次為巴西-4，巴西-1 及巴西-3 之水萃取物的成分則非常簡單，這個現象亦可由表三中總類黃酮含量獲得證實。

圖九為市售蜂膠液之高效液相層析圖，NO.1 為稀釋之蜂膠噴液，其所含之蜂膠成分確實遠低於其它市售蜂膠液，NO.5 及 NO.6 中所含的成分較單純，其它市售蜂膠液之高效液相層析圖則均相當類似，此與表四分析所得的結果添加以印證。(NO.1 之總類黃酮含量極低(0.22mg/ml)，而 NO.5 及 NO.6 所含的總類黃酮含量(分別為 5.48 及 3.93mg/ml)也顯著低於其它市售蜂膠液)。

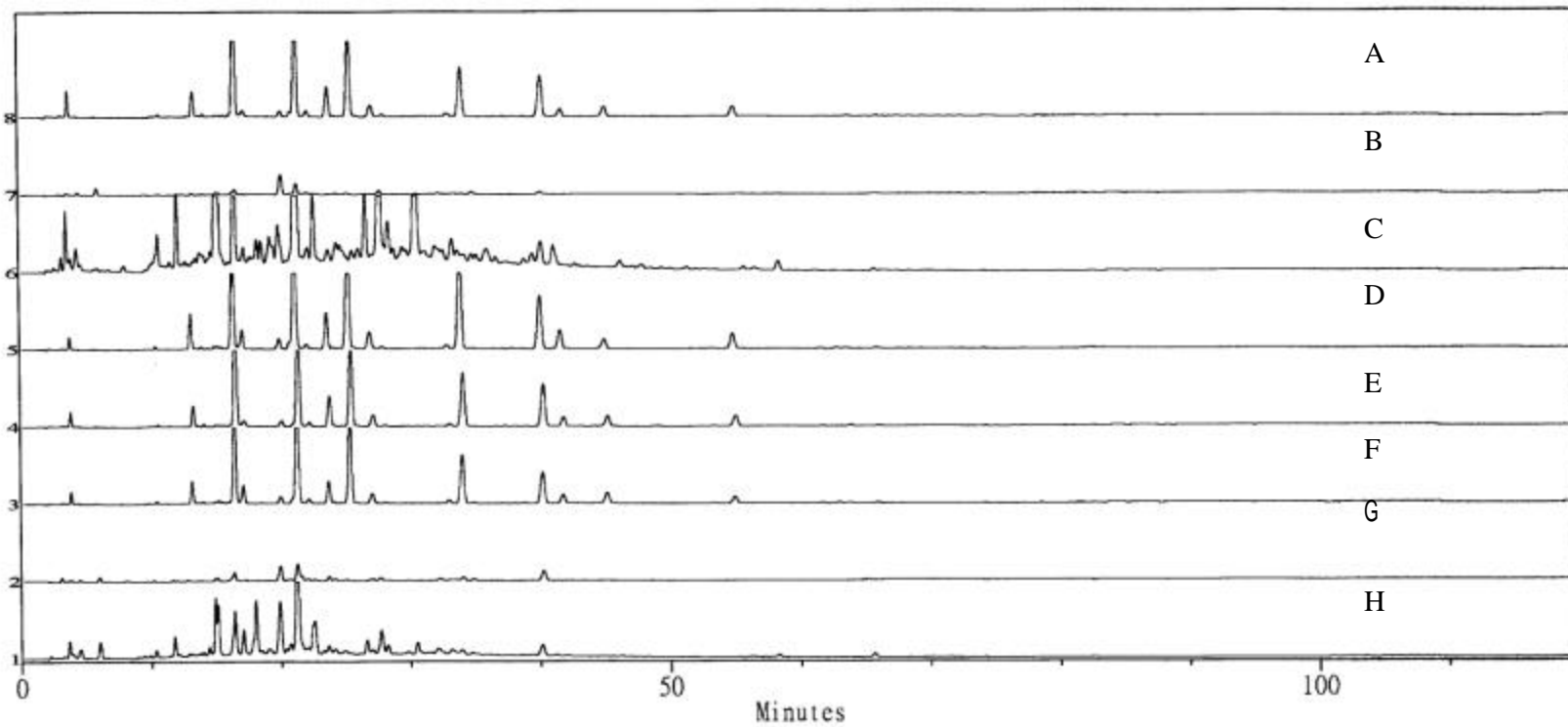
蜂膠的組成極為複雜，估計其所含有的成分高達 160 種以上，要針對高效液相層析圖譜中出現的成分一一加以鑑定實非易事，但經由蜂膠萃取液的高效液相層析圖，仍有助於瞭解其組成之複雜情形。更甚者，可作為功能性貢獻因子判斷之用，對於其它分析結果仍然可以彼此印證，已加強分析結果之可信度。



A: 新疆 (酒精萃稀釋 10倍) B: 浙江 (酒精萃稀釋 10倍) C: 巴西-1(酒精萃稀釋 10倍) D: 巴西-3(酒精萃稀釋 10倍)
 E: 巴西-4(酒精萃稀釋 10倍) F: 巴西-2(酒精萃稀釋 10倍) G: 浙江-2(酒精稀釋 10倍) H: 蒙古(酒精稀釋 10倍)

圖七、蜂膠原塊乙醇萃取物之高效液相層析圖

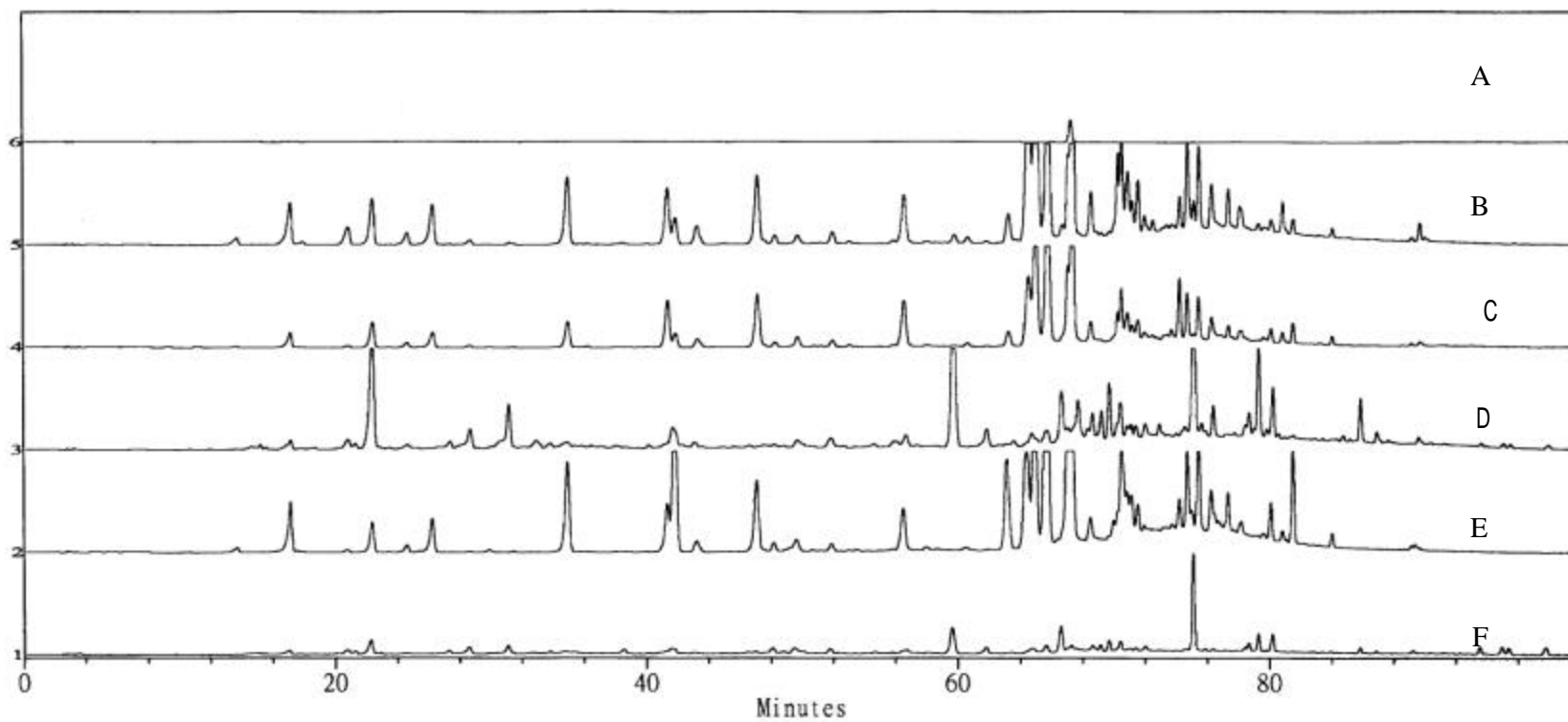
Fig 7. High performance liquid chromatography of various ethanolic extract of propolis sample



A: 巴西-4 水萃 B: 巴西-1 水萃 C: 新疆 水萃 D: 浙江-2 水萃
 E: 浙江 水萃 F: 巴西-2 水萃 G: 巴西-3 水萃 H: 蒙古 水萃

圖八、蜂膠原塊水萃取物之高效液相層析圖

Fig 8. High performance liquid chromatograms of various aqueous extract of propolis



A: Brasil 10% B: 亞鼎 C: 佳蜂(不含酒精) D: 佳蜂(高級) E: 紐西蘭 F: 佳蜂(普通)

圖九、市售蜂膠萃取物之高效液相層析圖

Fig 9. High performance liquid chromatograms of commercial liquid propolis

四、蜂膠酚類化合物之薄層層析、抗氧化性測定與分析

(一)薄層層析

為進一步瞭解蜂膠萃取液中具抗氧化性之酚類化合物，本試驗以簡單、快速之薄層層析法進行分離。取浙江、巴西及蒙古之蜂膠乙醇萃取液以矽膠薄層層析板加以展開之結果，經螢光照射後共發現有 Rf 值分別為 0.08-0.13、0.16-0.2、0.25-0.28、0.28-0.31、0.32-0.37 及 0.62-0.7 等六個酚類化合物區分點(表九)，在紫外燈下確認個別螢光帶後，將六個區分點加以刮取分離後，溶於甲醇進行抗氧化性之研究與高效能液相層析。

(二) 抗氧化性

本試驗以亞麻油酸為基質，用以評估蜂膠萃取液之抗氧化能力，亞麻油酸在脂質氧化過程中會形成共軛雙烯鍵 (conjugated double bond) 之構造，此物質於 234nm 波長有最大吸收，因此測量 234nm 吸光值後，再與控制組比較即可得到抗氧化活性。本研究發現無論浙江、巴西及蒙古之蜂膠原塊乙醇萃取液，經薄層層析分離所得之區分點，均以 spot 5 具最強之抗氧化性 (P < 0.05)，A.O.A 值可達 0.81-0.92，其中又以巴西蜂膠原塊乙醇萃取液 spot 5(Rf 0.32)的抗氧化活性最高，浙江及蒙古蜂膠原塊乙醇萃取液 spot 5(Rf 分別為 0.37

表九、矽膠薄層層析分離之蜂膠原塊乙醇萃取液酚類化合物及其抗氧化性
 Table 9. The antioxidative activities of phenolic spots separated from ethanol extracts of propolis

sample	Spot No.	Rf	A.O.A
A	1	0.08	0.20±0.05 ^c
	2	0.16	0.19±0.01 ^c
	3	0.28	0.37±0.03 ^b
	4	0.31	0.14±0.05 ^c
	5	0.37	0.83±0.01 ^{a*}
	6	0.7	--
B	1	0.11	0.68±0.01 ^b
	2	0.2	0.10±0.05 ^c
	3	0.26	0.09±0.03 ^c
	4	0.28	--
	5	0.32	0.92±0.02 ^{a*}
	6	0.37	0.11±0.07 ^c
C	1	0.08	0.55±0.01 ^b
	2	0.16	0.10±0.04 ^d
	3	0.25	0.35±0.04 ^c
	4	0.31	0.15±0.04 ^d
	5	0.39	0.81±0.03 ^{a*}
	6	0.62	0.01±0.02 ^e

A: 浙江 B: 巴西-4 C: 蒙古

A.O.A.: Antioxidative activity, was determined at the concentration of 100ul/ml and data are mean ± SD,(n=3)

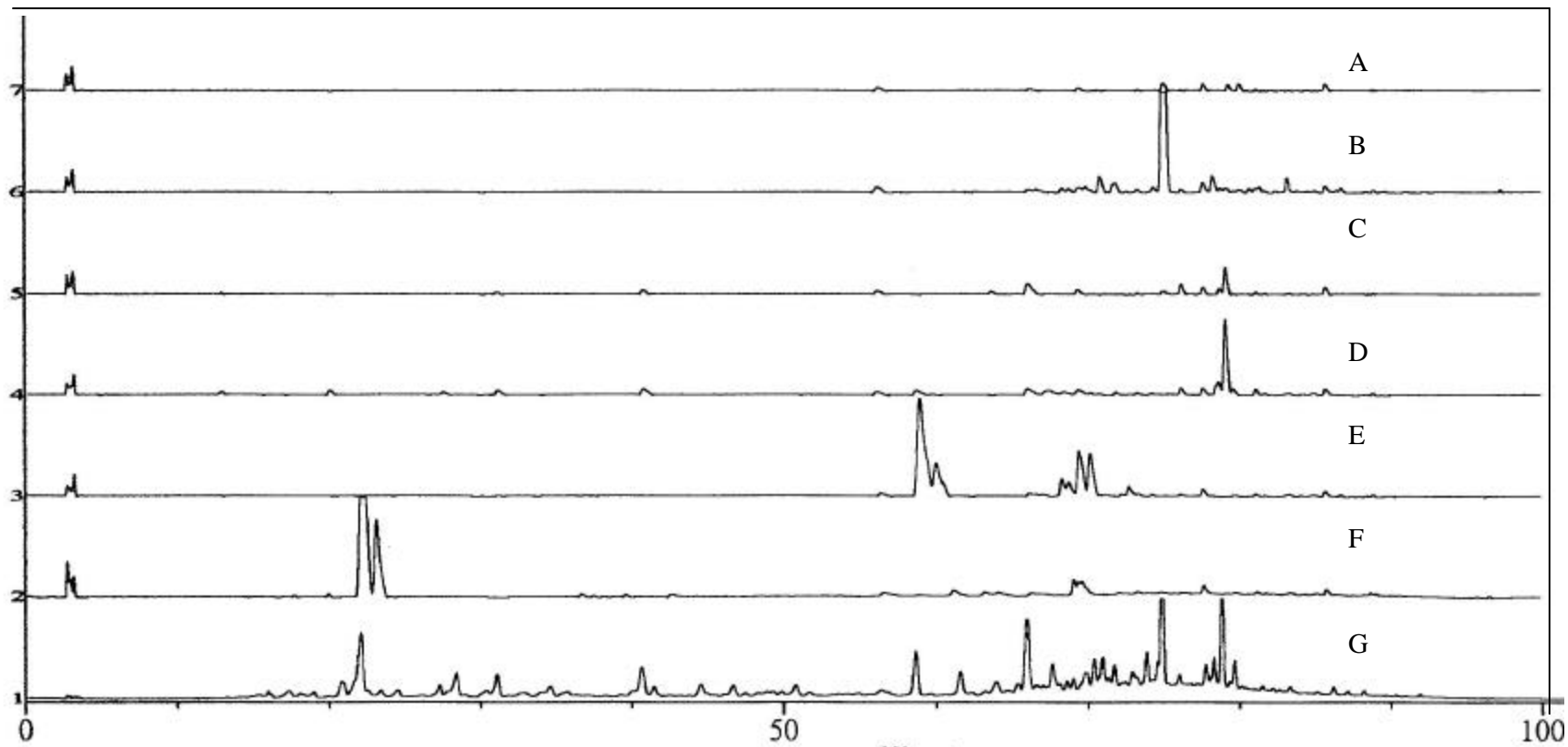
*Data within the same column bearing different superscript letters in the same group were significantly different(p<0.05)

及 0.39)的抗氧化活性稍低，A.O.A 值為 0.81 與 0.83(表九)。抗氧化力其次為 spot 1，其抗氧化活性達 0.55-0.68，但浙江蜂膠原塊萃取液之 spot 1 並未具有顯著之抗氧化活性。

(三)高效液相層析

將巴西蜂膠原塊乙醇萃取液經薄層層析法展開後，所獲之六個區分點刮取分離，然後以高效能液相層析儀進行分析。從圖十中可以明顯發現 spot 1 中主要為極性較高的成分，其在滯留時間 22-25 分鐘內有二個明顯的大波峰(peak)；spot 2 至 spot 6 所包含之成份的滯留時間則主要出現於 60-80 分鐘之間，與圖七之 HPLC 分析圖譜，於 60 至 80 分鐘出現波峰之成份較多的結果相似。浙江及蒙古之蜂膠原塊乙醇萃取液經薄層層析法展開後，其區分點經 HPLC 分析之圖譜所呈現的結果亦類似巴西之蜂膠原塊乙醇萃取液，亦即，spot 1 的極性較高，而 spot 2 至 spot 6 的成分極性都較低，其主要成分的滯留時間也都位於 60-80 分鐘的範圍內。以巴西之蜂膠原塊乙醇萃取液為例，其 spot 2 至 spot 6 的成分在 HPLC 圖譜中的滯留時間均不同，顯示其所含之成分並不同，而其抗氧化活性亦顯著不同，spot 2 至 spot 6 中僅有 spot 5 的成分具有顯著的抗氧化活性，其它的區分點所含有的成分則不具抗氧化活性。

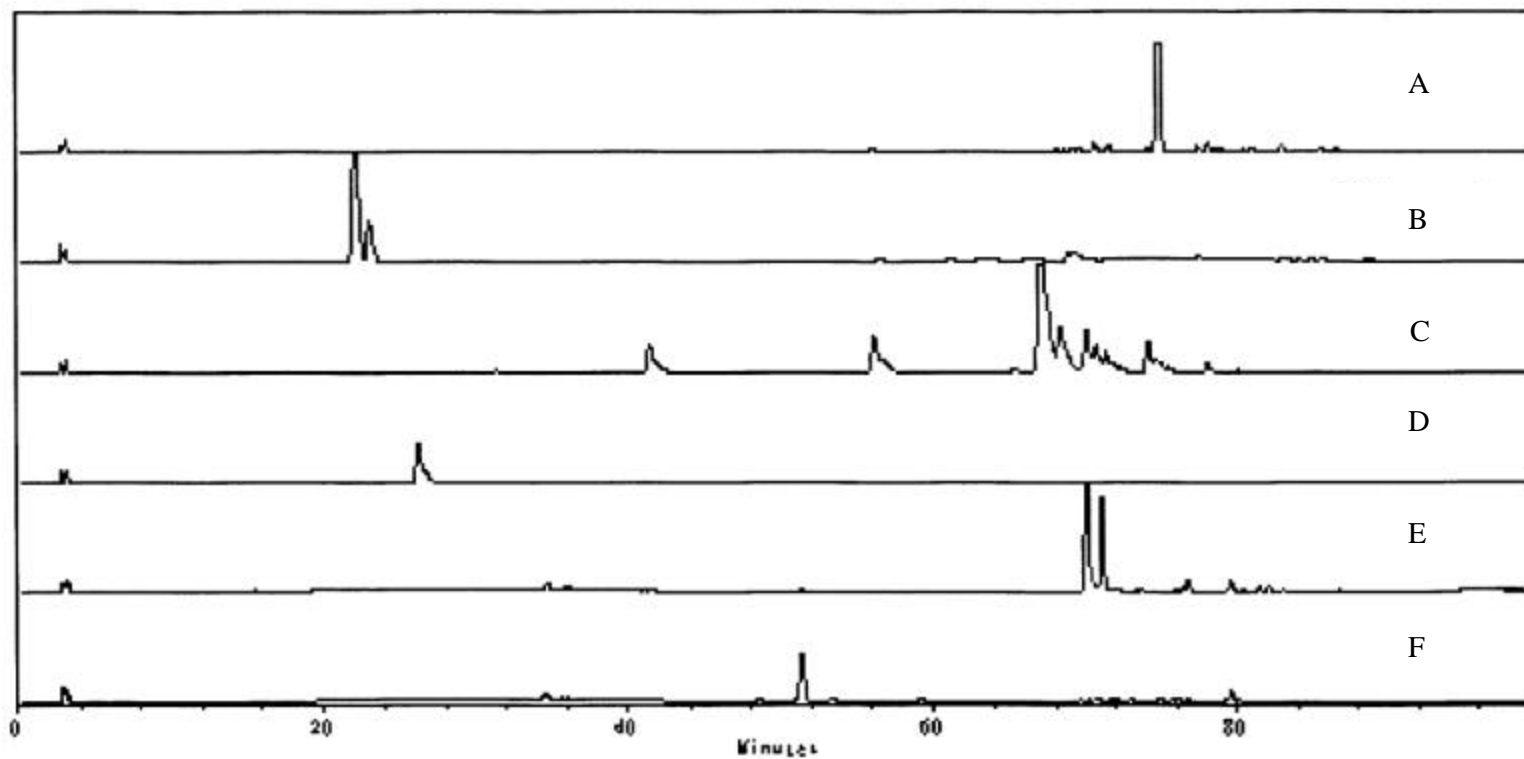
比較浙江、巴西及蒙古蜂膠乙醇萃取液以矽膠薄層層析板展開



A:spot 6 B:spot 5 C:spot 4 D:spot 3 E:spot 2 F:spot 1 G:巴西-4

圖十、蜂膠原塊經薄層層析分離物之高效液相層析圖

Fig 10. High performance liquid chromatography of TLC spot of propolis



A:巴西 spot5 B:巴西 spot1 C:浙江 spot5 D:浙江 spot1 E:蒙古 spot5 F:蒙古 spot1

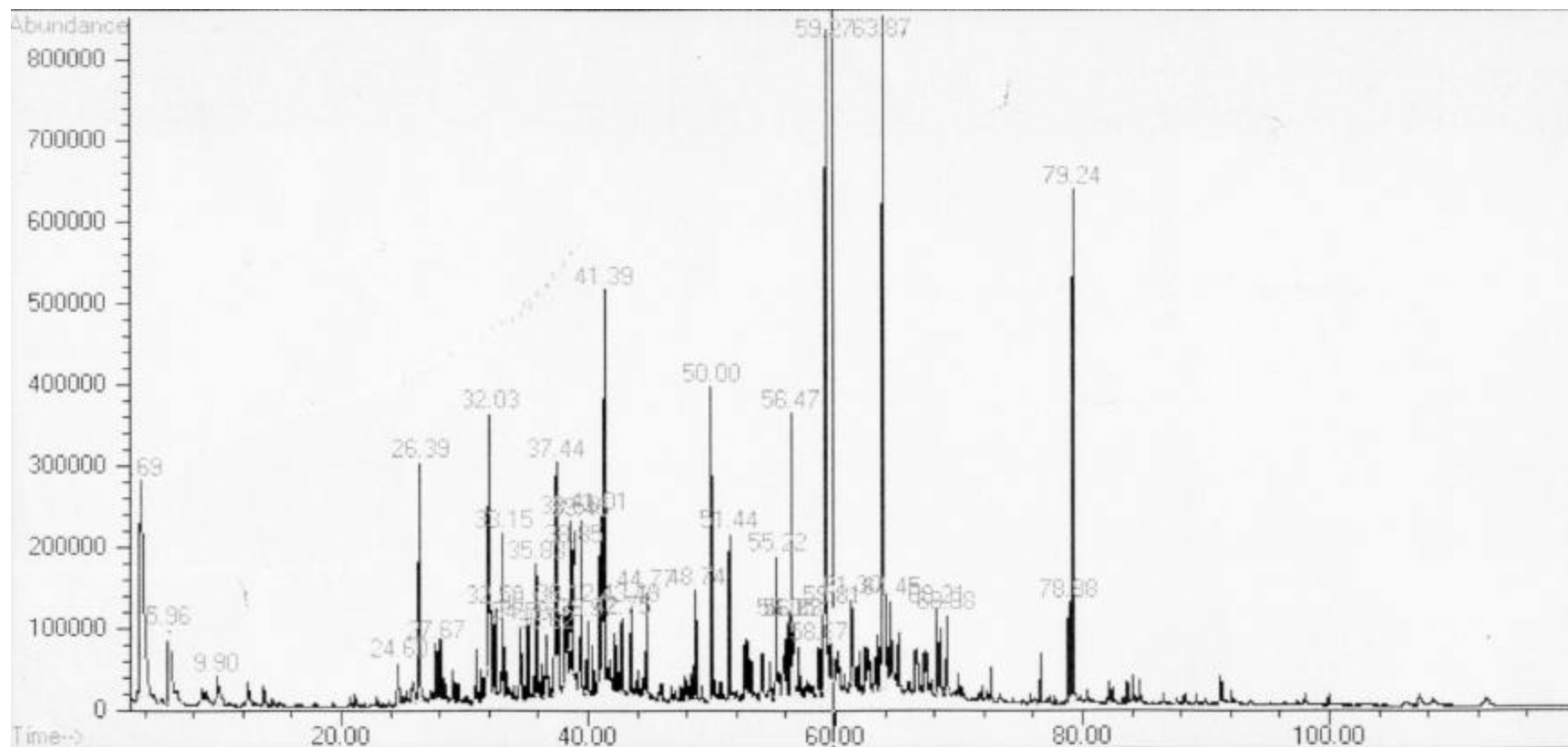
圖十一、各產地蜂膠原塊經薄層層析分離之高效液相層析圖

Fig 11. High performance liquid chromatography of TLC spot various of propolis

後，具有顯著抗氧化活性之 spot 1 及 spot 5 之區分點的 HPLC 層析圖 (如圖十一) 可知，這些可能具有抗氧化活性的成分，其滯留時間的分佈相當廣泛，涵蓋了極性較高(滯留時間較短)及極性較低(滯留時間較長)的範圍，顯示蜂膠中可能含有數種的具有抗氧化性之成分，而非單一成分，至於這些具抗氧化活性的成分的結構為何，則有待更進一步的分析及鑑定。另一方面，這些成分可能是賦予蜂膠具有抗氧化性的主要貢獻因子，因此若能進一步分析這些成份再蜂膠所佔之比例，將可推測蜂膠所具有的抗氧化能力。

五、酚類化合物於蜂膠中揮發性成份所扮演的之角色

蜂膠乙醇萃取液注射至氣相層析儀及以氣相層析儀質譜儀進行揮發性成份分析，經結構比對鑑定後，發現蜂膠中揮發性成份之結果可由表十中得知，蜂膠之香味組成非常複雜(如圖十二)，其揮發性物質主要為 terpene 類之化合物(例如：alpha-pinene，alpha-copanene，trans-Caryophyllene 等)，亦含少量之醇類(例如：phenol,2,6-bis(1,dimethylethyl)-4-methyl，Terpinen-4-ol 及 Myrtenol)，其次烷類、酸酯類及酮醛類含量極少(如附錄一)。



圖十二、蜂膠揮發性成份氣相層析圖

Fig 12. Gas chromatograms of volatile compounds of propolis

表十、蜂膠原塊之揮發性成份鑑定

Table 10. Identification of volatile compounds of propolis

Time	Match %	Compound Name
3.73	97	alpha-Pinene
26.32	99	alpha-Copaene
32.03	99	trans-Caryophyllene
33.15	93	Terpinen-4-ol
35.84	93	cis-alpha-Bisabolene
37.44	95	alpha-Copaene
38.55	99	beta-Selinene
38.85	96	alpha.-Gurjunene
38.94	99	alpha-selinene
39.45	99	alpha.-Muurolene
41.39	99	delta-cadinene (armoise-Maroc)
50.00	98	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-
51.44	97	AROMADENDRENE
56.47	93	(S)-4,4-Dimethyl-2-(4-methyl-3-cyclohexen-1-yl)-1,5-hexadiene
59.27	99	(-)-Spathulenol
63.45	96	7.beta.-(1-hydroxy-1-methylethyl)-4a.beta.-methyl-1a.beta.-decahydrocyclo
79.24	98	Benzyl benzoate

伍、結論

一、蜂膠為一組成份相當複雜之物質,不同產地蜂膠來源其成份含量有極大差異,粗脂含量介於 50%-63% 之間蜂膠以台灣含量最高(71.6%),浙江含量最少(50.2%),蜂蠟含量介於 19%-32%之間,以台灣含量最高(32%)而巴西 4 產地含量較少(18.8%),顯示蜂膠原塊中含豐富之粗脂肪及蜂蠟。

二、酚類化合物之含量分析方面,以不同產地之蜂膠塊乙醇萃取液而言,總多元酚方面以新疆、大陸產地含量較高,分別為 93mg/ml 及 90mg/ml,而巴西-1 之含量較低 21mg/ml,聚合型單寧則以巴西地區顯著高於其他地區之蜂膠塊,類黃酮之含量介於 0.22-12.52mg/ml 之間,CAPE 之含量為 0.21-5.59mg/ml,以蒙古、新疆地區有較高量的 CAPE,不同產地之蜂膠塊之酚類化合物含量差異極為顯著,此原因可能來自蜜蜂品種、產膠植物及環境之差異。

三、蜂膠水萃取液及市售商品中,可溶於水中的總多元酚及聚合型單寧含量極低,以巴西-1 的總多元酚含量較高,此現象顯示巴西 1 之蜂膠含有較高比例之水溶性多元酚類化合物,例如酚酸或簡單酚類,顯示不同萃取方式之條件下,其所萃得的酚類化合物之組

成不同。

四、蜂膠乙醇萃取液中所含之總酚類化合物,其主要組成分為簡單酚類,佔總量之 70% 以上,其次為水解型單寧、聚合型單寧,但非單寧性黃烷含量極低,但水萃液方面其總酚類化合物含量極低,主要組成為簡單酚類及非單寧性黃烷,顯示非單寧性黃烷具較佳之水溶性。

五、不同蜂膠來源其酚類化合物含量有極大差異,乙醇萃取液其酚類化合物之相對聚合度以大陸地 132% 最高,浙江 84% 最低,市售及膠囊商品介於 93%-137% 之間。顯示蜂膠中大分子之多元酚含量極少,大多是單體物質。

六、蜂膠萃取液經膠體過濾及粗徑排除層析分析顯示,蜂膠中聚合型單寧之含量極少,然其分子量分佈非常相似,巴西產地之蜂膠萃取液含有分子量大於浙江、蒙古等產地之酚類化合物,其原因可能為乙醇萃取液中含有較高比例之聚合型單寧所致。

七、巴西產地之蜂膠乙醇萃取液較中國大陸產地之蜂膠液成份單純,於滯留時間 60-90 分鐘間之成份複雜,推測其類黃酮含量較高所致,蜂膠水萃液僅含極性較高之成份,滯留時間低於 50 分鐘以巴西-2 之含量較多且複雜,其次為巴西-4、巴西-1、巴西-3。市

售蜂膠液中膠囊之相關製品所含之成份遠低於乙醇萃取液，顯示純度不高，可能添加其他成份或物質所致。

八、蜂膠萃取液經薄層層析展開所得之區分點於 spot 5 Rf(0.32-0.39) 確實具有顯著抗氧化性，其次為 spot-1 Rf(0.08-0.11)，經高效液相層析分析可知，蜂膠中主組成份極為複雜，顯示蜂膠中可能含有數種具抗氧化性之物質，而非單一成份。

九、蜂膠中揮發性成分分析之結果可知主要為 terpene 類之化合物(例如:alpha-pinene,alpha-copaene,trans-caryophyllene 等)，亦含少量之醇類（如:Terpinen-4-ol 及 Myrtenol, phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl，其中烷類、酸酯類及酮醛類化合物含量極少。

陸、參考文獻

王進崑和孫璐西 1993a 檳榔嚼塊中酚類化合物分析 . 中國農業化學會誌, 31(5):623-632.

王進崑和孫璐西 1993b 檳榔嚼塊之嚼汁中酚類化合物分析 . 食品科學, 20(5): 458-471.

吳梅桂 1997 檳榔嚼塊之除口臭及氧化特性之探討 中山醫學院營養科學研究所碩士論文, 台中.

李榮明 1993 蜂膠黃酮類之定量分析及日本粉褐蕨帖類成份之研究. 台北醫學院藥學研究所碩士論文.

郁凱衡 1999a. 酚類抗氧化劑(上)—合成類. 食品資訊 157:34-38.

郁凱衡 1999b. 酚類抗氧化劑(上)—天然類. 食品資訊 157:18-27.

陳譚 1992. 蜂膠在鴉蛋保鮮貯存中的應用試驗. 蜜蜂雜誌 8:5-6.

黃淑鈴及張為憲 (1986) 荖藤莖中主要抗氧化性成分之研究 中國農業化會誌 , 24(2): 199-201.

曾俊茂 1997 檳榔果實酚類化合物之除口臭效果及生理活性之探討 中山醫學院營養科學研究所碩士論文, 台中.

黃承宏 1994 各種茶葉及茶渣除口臭效果研究 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文, 台北.

劉增城 (1997), 蜜蜂如何採膠利用, 蠶蜂業專訊, p14-17.

德水勇治郎 (1996), 蜂膠可去除體內毒素, 青春出版社, 臺北市.

錢明賽 (1998), 蔬果中之抗氧化物質, 食品工業月刊, 30(8) : p21-33.

蕭鳳岐 (1996), 蜂膠生物效用, 食品資料, 122: p41- 45.

蘇旭儀 1996 檳榔嚼塊之水萃物與尼古丁毒性之研究 中山醫學院營養科學研究所碩士論文, 台中.

蘇晉慧 1997 N-nitrosoguvacoline 與檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物之毒性探討 中山醫學院營養科學研究所碩士論文, 台中.

蘇華 1996. 蜂膠在農產品防腐保鮮中的應用概況. 蜜蜂雜誌 12:5-6.

Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F. and Cormier, M., (1994) Comparison of the anti-herpes simplex. Virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. J. Nat. Pro.57(5) : 644-647.

Amoros, M., Simoes, C.M.O. and Girre, L., (1992) Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type1 in cell culture

- comparison with the activity of propolis. *J. Nat.Pro.* 12 (55):1732-1740.
- Appel, H. M. (1993) Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *J. Chem. Ecol.*, 19:1521-1552.
- Bankova, V. S., Christov, R. S., Tejera, A. D. (1998) Lingans and other constituents of propolis from Canary Islands. *Phytochem.* 49(5):411-415.
- Bankova, V., Christov, R., Stoev, G. and Popov, S. (1992) Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 607:150-153.
- Bankova, V.S., Popov, S.S. and Marekov, N.L. (1989) Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis *Phytochem.* 28: 871-873.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S. and Marekov, N. (1987) AGC/MS Study of the propolis phenolic constituents. *Z. Naturforsch.*42C:147-151.
- Bankova, V. and Marekov, N. (1984) Propolis - chemical composition and standardisation *Farmazia* 34,8-18.
- Bankova, V.S., Popov, S.S. and Marekov, N.L. (1983) A study on flavonoids of propolis. *J.Natural Prod.* 46:471-474.
- Bankova, V.S., Popov S.S. and Marekov N.L. (1982) High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *J. Chromatogr.* 242:135-143.
- Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S. and Namba, T. (1996) Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 665-657.

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

Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J.M. and Franklin, I. (1990) Antibiotic activity of natural products Propolis, *Microbios* 62, 19-22.

Bulter, L. G., Price, M. L., and Brotherton, J. E. (1982) Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.*, 30: 1087-1089.

Chen, J.H. and Ho, C.-T. (1997) Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2374-2378.

Christov, R. and Bankova, V., (1992) Gas chromatographic analysis of underivatized phenolic constituents from propolis using an electron-capture detector. *J. Chromatogr.* 623:182-185.

Castro, S.L. and Higashi, K.O. (1995) Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacol.* 46:55-58.

Dobrovolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma K., Shah S.A. Nagvi, S.A.H. and Dandiya, P.C. (1991) Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol* 35, 77-82.

Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A. and Naqvi, S.A.H.,

Dandiya, P.C.D. (1991) Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol.* 35:77-82.

Frankel, E. N., Kannr, J., German, J., B., Parks, E. and Kinsella, J. E. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, 341 : 454-456.

Frenkel, K., Wei, H., Bhimani, R., Ye, J. Zadunaisky, J.A., Huang, M.-T., Ferraro, 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 Research* 53, 1255-1261.

Fujimoto, T. (1992) Qualitative and quantitative characteristics of propolis and its products. *Honeybee Sci.* 13(4): 145-150.

Ghisalberti, E. (1979) Propolis: a review. *Bee World* 6, 59-84.

Ghisalberti, E.L., Jefferies, P.R., Lanteri, R. and Mathison, J. (1978) Constituents of propolis. *Experientia* 34:157-58.

Grang, J. M. and Davey, R.W. (1990) Antibacterial properties of propolis [bee glue]. *J. Royal Soc. Med.* 83,159-160

Grangc, J.M. and Davey, R.W. (1990) Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J.R.Soc. Med.* 83:159-160

Grange, J.M. and Davey, R.W. (1990) *J.Royal Soc. Medicine.* 83:159

Grange, J.M. and Davey, R.W. (1990) Antibacterial properties of propolis

[bee glue]. J. Royal Soc. Med. 83, 159-160.

Greenaway, W., May, J., Scaysbrook, T. and Whatley, F. R. (1991) Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*. 46c, 111-121

Greenaway, W., Scaysbrook, T. and Whatley, F.R. (1987) The analysis of bud exudate of *Populus X euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. *Proc. R. Soc. Lond.B* 232,249-272.

Greenaway, W., May, J., Scaysbrook, T. and Whatley, F.R. (1991) Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung* 46c, 111-121.

Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E.M., Efors, L., Caldwell, M., Estevez, V. and Nakanishi, K. (1998) preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*. 44, 230-232.

Grunberger, D., Ganerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E.M., Efors, L., Caldwell, M., Estevez, V. and Nakanishi, K. (1988) Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 44:230-32.

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

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M.C. (1985) Free radicals in biology and medicine. Oxford Univ. Press (clarendon).New York.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic ions in human disease and overview. In "Meth. Enzymo." (Packer, I,Ed), p. 1. Academic Press, New York.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. and Cross,C.E.(1992) Free radicals, antioxidant and human disease : where are we now? J. Lab. Clin.Med.,119 : 598-620.

Hansson, C., Ezzclarab, M. and Sterner, O. (1995) Oxidative activation of the proplis liaptenisoprenyl caffeate. Acta Derm. venereol. 75,34-36.

Harborne, J.B. (1965) Plant polyphenols X IV. Charaterization of flavonoid glycosides By acidic and enzymic hydrolysis. Phytochemistry. 4:107-120

Harvsteen, B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high phamacological potency.Biochem. Pharmacol. 32, 1141-1148.

Ho, C.T. (1992) Phenolic Compounds in Food : Phenolic Compounds in Food and There Effect on Health II (Antioxidants and Cancer Prevention)
Huang, M. T. and Ho C.T.(Eds) American Chemical Society, Washington, DC.

Hwang, L. S.; Wang, C.K.; Sheu, M. J., Kao, L. S. (1992) Phenolic compounds of Piper betle flower as flavoring and neuronal modulation aagents. In Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I; Ho, C.T., Lee, C.Y., Huang, M T., Eds.; ACS Symposium Series 506; American Chemical Society: Wanshington, DC, pp200-213

Hyang, M.-t., Ma, W., Yen, P., Xie, J.-g., Han, J., Frenkel, K., Grunberger, D.

arid Conney, A.H.(1996) Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa. *Carcinogenesis* 17:761-765.

Invanovska, N., Dimov, V., Pavlova, S., Bankova, V. and Popov, S. (1995) Immunomodulatory action of propolis. V. Anti-complementary activity of a water soluble derivative. *J.Ethnopharmacol.* 47, 135-143.

Julkunen-Tiitto, R. (1985) Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33. 213-217.

Julkunen-Tiitto, R. (1985) Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows : Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 33: 213-217

Khayyal, M.T., Elghazaly, M.A. and Elkhait, A.S. (1993) Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Drug Experi Clin. Research* 19, 197-203.

Khayyal, M.T., Elghazaly, M.A. and Elkhait, A.S. (1993) Mechanism involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Drug Experi. Clin. Research* 19,197-203

Laughton, M. J., Halliwell, B. Evans, P. J. and Houlst, J. R. S. (1989) Antioxidant and pro-oxidant action of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem. Pharmacol.*, 38 : 859-865

- Lindenfelser L.A. (1967) Antimicrobial activity of propolis, American Bee J. 107,90-92.
- Lindenfelser L.A.(1967) Antimicrobial activity of propolis. American Bee J.107, 90-92
- Lindenfelser, L.A. (1968) In vivo activity of propolis against Bacillus larvae.J. Invert. Path. 12:129-31.
- Lingnert, H., Vallentin, K. and Ericksson, CE (1979) Measurement of antioxidative effect in model system .J. Food Process. Preserv. 3, 87-103
- Macheix, J. J., Fleuriet, A. and Billot, J.(Eds) (1990) Fruit phenolics. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Maciejewice, W., Danicwski, M. and Mielniczuk, Z. (1984) Gas Chromatography-Mass Spectrometry investigation of propolis. analysis of phenolic acid and sugars. Chemia. Analityczna. 29:421-426.
- Maciejewice, W., Daniewski, M., Mielniczuk, Z. and Suprynowowica, Z. (1982) Gas Chromatography-Mass
- Marcuccl, MC., (1995) Propolis: chemical composition, biological
- Markham.K.R., Mitchell. K.A., Wilkins, A.L.,Daldy, J.A., and Lu, Y. (1996) HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in NEW Zealand propolis. Phytochemistry. 42(1):205-211
- Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F. and Thomas-Barberan, F.A. (1997) Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. J. Agric Food Chem. 45, 2824-2829.

Nair, j., Ohshima, H Nair, U. J. and Batsch, H. (1996) Endogenous formation of nitrosamines and oxidative DNA-damaging agents in tobacco users. *Crit Rev. Toxicol.*, 26(2):149-161

Natarajan, K., Singh, S., Burke Jr., T.R., Grunberger, D. and Aggarwal, B.B. (1996) Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93,9090-9095

Oszmianski ,J., Cheynier, V. and Moutounet, M. (1996) Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *Agric. Food Chem.*,44:1712-1715

Pepeljnjak, S. and Jalsenjak, I. (1984) Usage of propolis extract for preserving food against microbiological contamination. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*. 2:301-302.

Pepeljnjak, S., Jalscnjak, I. and Maysinger, D. (1981) Influence of microencapsulated propolis extract on *Bacillus Subtilis* Strain IP-5832. *Acta Pharm. Jugosl.* 31:27-32.

Pepeljnjak, S., Jalscnjak, I. and Maysinger, D. (1982a) Inhibition of growth and biosynthesis of ochratoxin A in *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077 by propolis extract. *Pharmazie*. 37(6):439-440.

Pepeljnjak, S., Jalsenjak, I. and Maysinger, D.(1985) Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus Subtilis*. *Pharmazie*. 40:122-123

Pepeljnnak, S., Jalsenjak, I. and Maysinger, D. (1982b) Growth inhibition of

Bacillus subtilis and composition of various propolis extracts. Pharmazie. 37(12):864-865.

Peri, C. and Pompei, C. (1971) Estimation of different phenolic groups in vegetable extracts. Phytochemistry 10,2187-2189

S.(1994) Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. Biosci. Biotech. Biochem. 58(5):945-946.

Spectrometry investigation of propolis. Analysis of B-Steroids. acta. Polon. Pharm. XXXIS Nr 4:277-279.

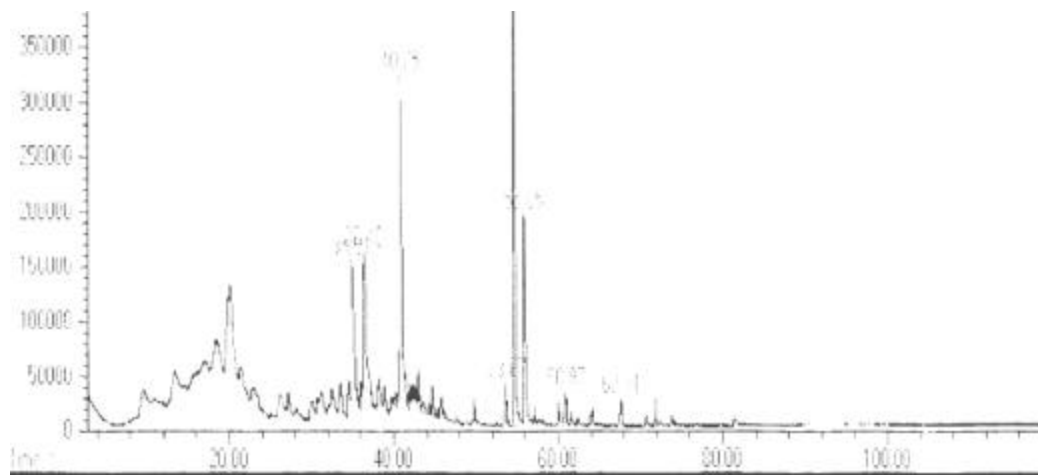
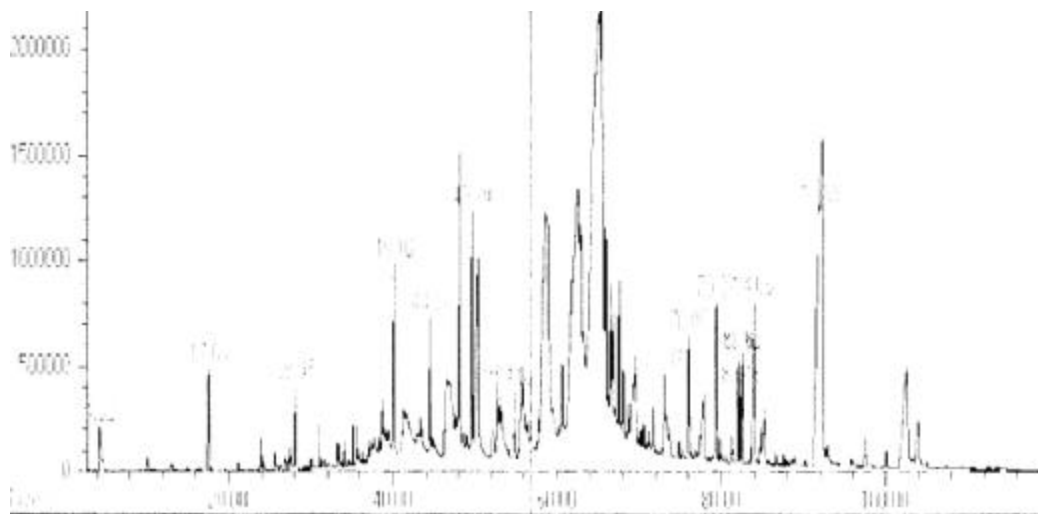
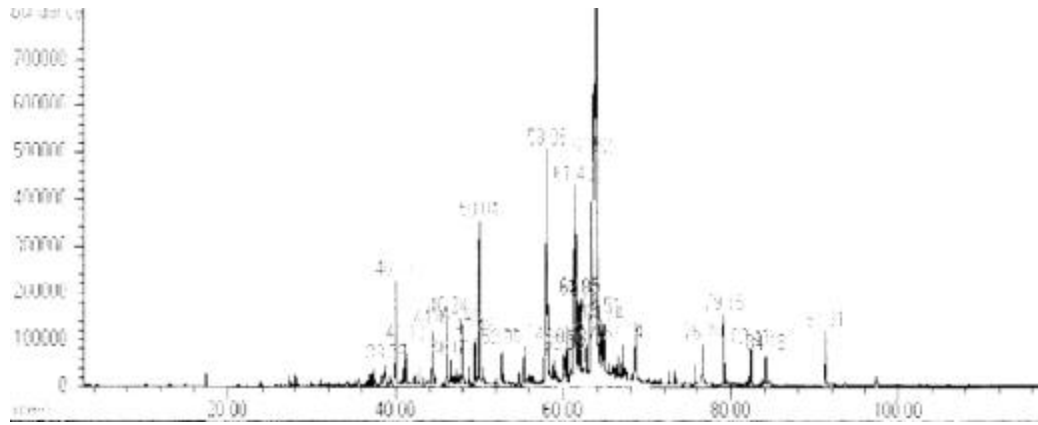
Viguera, C.G., Ferreres, F., and Barberan, F.A.T. (1993) Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. Z.Naturforsch. 48:731-735

Walker, P. and Crane, E. (1987) Constituents of propolis. Apidologie 18, 327-334

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

Wang, C. K. and Peng, C.-H. (1996) The mutagenicities of alkaloids N-nitrosoguvacoline from betel quid. Mutat. Research 360, 165-171.

Wang, C. K. and Wu, M. J. (1996) Separation of phenolics from Piper betle leaf and the effect on the mutagenicity of arecoline. J. Chin Agric. Chem. Soc. 34, 638-647.



附錄一、新疆、浙江、台灣之蜂膠原塊揮發性成份分析