

R
008.8
4415

中山醫學院營養科學研究所
Graduate Institute of Nutritional Science
Chung Shan Medical and Dental College

碩士論文
Master Thesis

指導教授：王進崑 博士
Advisor: Chin-Kun Wang, Ph. D.

N-Nitrosoguvacoline 與檳榔果實酚類化合物
經鹼處理後之毒性探討
Studies on the toxicities of *N*-Nitrosoguvacoline and the
aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit
after alkaline treatment



研究生：蘇晉慧
Graduate Student: Chin-Hui Su

中華民國八十六年六月

June, 1997

中山醫學院圖書館



C046142

參考書恕不外借

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人年度第 2 學期在中山醫學院營養科學研究所
組 85 學年所撰 碩士學位論文。

論文名稱：N-nitrosoguvacoline 與檳榔果實酚類化合物經鹼處理後之毒性探討

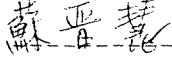
同意本國網路或
具科，本
不有學並重
同著委與製
意作員台發
財會灣行
產科學。
權學術
之技術
論路
文資及
提料科
要中技
，心網
授，路
予得連
國重線
家製，
圖成得
書電不
館子限
、資地
本料域
人權時
畢後間
業收與
學錄次
校於數
及該，
行單以
政位光
院之碟

同意本國網路或
具科，本
不有學並重
同著委與製
意作員台發
財會灣行
產科學。
權學術
之技術
論路
文資及
提料科
要中技
，心網
授，路
予得連
國重線
家製，
圖成得
書電不
館子限
、資地
本料域
人權時
畢後間
業收與
學錄次
校於數
及該，
行單以
政位光
院之碟

同意本國網路或
具科，本
不有學並重
同著委與製
意作員台發
財會灣行
產科學。
權學術
之技術
論路
文資及
提料科
要中技
，心網
授，路
予得連
國重線
家製，
圖成得
書電不
館子限
、資地
本料域
人權時
畢後間
業收與
學錄次
校於數
及該，
行單以
政位光
院之碟

上述授權內容均無須訂立、讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之錄、重製、及發行學術研究均無償。

指導教授姓名：王進崑

研究生簽名： 學號：R84304
(親筆正楷)

日期：民國 86 年 07 月 11 日

- 備註：1. 上述同意與不者，請再交論文一本予承辦人員。
2. 授權第二項，已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

本論文為中山醫學院授與碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審合格及口試通過。

口試委員

國立臺灣大學食品科技研究所
教授

孫璐西 博士

孫璐西

國立中興大學食品科學研究所
教授兼系所主任

顏國欽 博士

顏國欽

私立朝陽技術學院應用化學系
副教授

李瑜章 博士

李瑜章

私立中山醫學院營養學系
副教授

殷梅津 博士

殷梅津

私立中山醫學院營養學系
教授（本論文指導教授）

王進崑 博士

王進崑

中華民國八十六年六月二十六日

學生蘇晉慧論文題目為 *N*-nitrosoguvacoline 與檳榔果實酚類化合物經鹼處理後之毒性探討，其論文已經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：王進崑 博士

簽名：王進崑

中華民國八十六年六月

謝 誌

由衷感謝指導教授 王進崑博士兩年來的細心指導與教誨，使得無論在研究或待人處事上皆受益良多，並得以順利完成實驗及論文，在此致上最深的謝意。初稿完成，承蒙 孫璐西教授、 顏國欽教授、 李瑜章副教授及 殷梅津副教授撥冗批閱，並提供意見，使本論文更臻完美，謹此由衷感謝。

研究期間，感謝 徐成金教授在實驗儀器上的支援，使研究得以順利完成。此外，感謝實驗室旭儀學姐就在研究上的大力幫助，俊茂、秀君、梅桂學姐及永華的幫忙與配合，靜宜、美香、杏珠、哲誌、佩琳、振與、慧菁的支持與鼓勵，及實驗室中眾位可愛學弟妹們的協助，讓兩年的時光在快樂的氣氛中度過。

最後特別感謝父親、母親、哥哥、奶奶及其他親屬朋友的精神支持，在失意時給予的鼓勵與關懷，謹以此論文獻給親愛的你們。

蘇晉慧 謹誌於台中
中華民國八十六年七月

目 錄

頁次

表 次.....	I
圖 次.....	II
中文摘要.....	IV
英文摘要.....	VI
壹、前言.....	1
貳、文獻整理	
一、檳榔概述.....	2
二、檳榔嚼塊之組成.....	2
(一)檳榔果實.....	3
(二)其它配料.....	3
三、檳榔與口腔病變.....	4
四、檳榔嚼塊之毒性.....	5
五、檳榔咀嚼時生成之亞硝化產物.....	6
(一)亞硝化產物之誘突變性及致癌性.....	6
(二)影響亞硝化反應之因子.....	8
六、毒性探討.....	10
(一)細菌試驗.....	10
(二)細胞試驗.....	11
七、抗氧化性之評估.....	16
八、研究目的.....	17
參、材料與方法	
一、實驗材料.....	18

	頁次
(一)檳榔果實.....	18
(二)檳榔嚼塊.....	18
(三)菌種.....	18
(四)CHO (Chinese hamster ovary) cell line....	19
二、藥品.....	19
(一)細菌用藥.....	19
(二)細胞用藥.....	20
(三)分析用藥.....	20
三、儀器設備.....	21
(一)分光光譜儀.....	21
(二)高效能液相層析儀(HPLC).....	21
(三)位相差顯微鏡.....	21
(四)吸附性色層分析儀.....	21
(五)多點式電磁攪拌器.....	21
(六)菌落計數器.....	21
四、實驗流程.....	23
五、實驗方法.....	24
(一)N-nitrosoguvacoline (NG) 之合成、純 化與分析.....	24
(二)檳榔嚼汁之收集與前處理.....	25
(三)檳榔果實酚類化合物之萃取與鹼處 理.....	25
(四)抗氧化性之測定.....	26
(五)細菌試驗.....	27
(六)細胞試驗.....	28
六、統計分析.....	29
肆、結果與討論	

	頁次
一、 <i>N</i> -nitrosoguvacoline (NG) 之分離純化與含量測定.....	30
(一)NG 之合成、分離與純化.....	30
(二)檳榔嚼汁中 NG 之分析.....	33
二、 NG 之毒性.....	35
(一)細胞毒性.....	35
(二)姐妹染色分體交換(SCE)及染色體變異(CA).....	37
三、檳榔果實酚類化合物粗萃物對 NG 生成的影響.....	41
(一)酸鹼環境對 NG 生成之影響.....	41
(二)高量檳榔果實酚類化合物粗萃物對促進 NG 生成之探討.....	43
四、 <i>p</i> -Nitrosophenol 對 NG 生成之影響.....	45
(一) <i>p</i> -Nitrosophenol 之添加量對 NG 生成之影響.....	45
(二) <i>p</i> -Nitrosophenol 對 NG 生成之影響.....	46
(三) <i>p</i> -Nitrosophenol 安定性對 NG 生成之影響.....	54
五、檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後對 NG 生成之影響.....	56
六、檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後水層產物生物活性之探討.....	58
(一)抗氧化性.....	59
(二)誘突變性.....	61
(三)對誘突變劑之影響.....	62
(四)細胞毒性.....	69
(五)SCE 及 CA.....	69

	頁次
伍、結論.....	75
陸、參考文獻.....	78
柒、附錄.....	98

表 次

表 一、	嚼食檳榔者唾液中亞消胺化合物之含量.....	7
表 二、	染色體變異之分類.....	15
表 三、	臺灣各區不同種類檳榔嚼汁中 <i>N</i> -nitrosoguvacoline 含量.....	34
表 四、	<i>N</i> -nitrosoguvacoline 對中國倉鼠卵巢細胞之姊妹染色分體交換頻率之影響.....	40
表 五、	高量檳榔果實酚類化合物粗萃物對 <i>N</i> -nitrosoguvacoline 生成之影響.....	44
表 六、	<i>p</i> -Nitrosophenol 對 <i>N</i> -nitrosoguvacoline 生成之影響.....	48
表 七、	檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物的誘突變性.....	63
表 八、	檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物的誘突變性.....	64
表 九、	檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後水層產物對 MNNG 誘突變性的影響.....	65
表 十、	檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後水層產物對 IQ 誘突變性的影響.....	67
表 十一、	檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物對中國倉鼠卵巢細胞之姊妹染色分體交換頻率的影響.....	72
表 十二、	檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物對中國倉鼠卵巢細胞之染色體變異的影響.....	73

圖 次

圖 一、 檳榔果實植物鹼衍生之亞硝酸產物.....	7
圖 二、 <i>N</i> -Nitrosoguvacoline 之液相層析圖.....	31
圖 三、 <i>N</i> -Nitrosoguvacoline 及其異構物之高效能液相層 析圖.....	32
圖 四、 <i>N</i> -Nitrosoguvacoline 之紫外線光譜圖.....	32
圖 五、 <i>N</i> -Nitrosoguvacoline 對 CHO 細胞增生的影響....	36
圖 六、 <i>N</i> -nitrosoguvacoline 造成 CHO 細胞染色體變異.	38
圖 七、 <i>N</i> -nitrosoguvacoline 造成 CHO 細胞染色體變異 (gap)之情形.....	39
圖 八、 Arecoline hydrobromide, 亞硝酸鈉與檳榔果實 中酚類化合物粗萃物於 pH3, 7, 11 環境下亞 硝化反應後 <i>N</i> -nitrosoguvacoline 之生成量.....	42
圖 九、 <i>p</i> -Nitrosophenol 之添加對 <i>N</i> -nitrosoguvacoline 生成之影響.....	47
圖 十、 <i>p</i> -Nitrosophenol 與亞硝酸之反應機制.....	49
圖 十一、 Arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 以及 arecoline hydrobromid、sodium nitrite 與 <i>p</i> - nitrosophenol 分別反應不同時間之 <i>N</i> -nitro- soguvacoline 產量.....	51
圖 十二、 Arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 不 同之反應時間(天)產物的高效能液相層析 圖.....	52
圖 十三、 Arecoline hydrobromide、sodium nitrite 與 <i>p</i> -nitrosophenol 不同之反應時間(天)產物的 高效能液相層析圖.....	53
圖 十四、 Arecoline hydrobromide、sodium nitrite 與 <i>p</i> -nitrosophenol 不同之反應時間(天)產物的	

中文摘要

在臺灣各區所取得之檳榔嚼汁，其上清液與殘渣部份經分析結果發現，檳榔嚼汁上清液中皆未檢測到 NG，而殘渣部份則大多有檢測到，其中東部地區各種檳榔嚼汁殘渣部份皆有檢測到 NG，因此 NG 之含量會隨檳榔果實、萼花、萼葉及紅灰配料來源不同而有所差異。NG 對 *Salmonella typhimurium* TA98 及 TA100 具有誘突變性，且 NG 濃度達 1000 ug/ml 時，幾乎沒有 Chinese hamster ovary (CHO) 細胞存活，取 50% 以上存活率的劑量進行 sister chromatid exchange (SCE) 及 chromosome aberration (CA) 試驗發現，SCE 的發生頻率與 NG 劑量成正相關。而 NG 造成的 CA 以 gap 及 between arms 為主，故 NG 可能對 CHO 細胞具有基因毒性。此外，高量的檳榔果實酚類化合物粗萃物，會促進 NG 生成的原因，可能是檳榔果實中酚類化合物先與亞硝酸鹽生成一中間物，此中間物可促進 NG 的生成，由於 *p*-nitrosophenol 為酚與亞硝酸鹽極快生成之產物，過去許多研究發現，其存在有助於亞硝化反應之進行。由於檳榔果實中之酚類化合物組成極為複雜，更難以測定其 nitrosyl 酚類之類型。故本研究以商品 *p*-nitrosophenol 進行試驗，結果發現其對 NG 生成之影響與檳榔果實中之酚類化合物粗萃物有相同的趨勢，故大量檳榔果實酚類化合物粗萃物促進 NG 生成的原因，可能是在反應過程中生成 nitrosyl 酚類化合物所造成的。

此外，因為檳榔嚼塊中含有消石灰，且咀嚼檳榔時口腔的溫度為 37°C，故於檳榔果實酚類化合物粗萃物中加入 Ca(OH)₂，在 37°C 下加熱 30 分鐘後，取其水層產物，探討

其對 NG 生成之影響及其生物活性。結果發現，檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物不論有無 S9 存在，對 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100 並無誘突變性，但對誘突變物之影響方面，樣品對 MNNG 之誘突變性有促進的效果，然而 S9 存在時，對 IQ 之誘突變性反而有抑制作用。在細胞毒性方面，僅部份樣品在高劑量時，對細胞具有毒性，所有樣品皆不會使 SCE 的發生頻率增加，但會使細胞的染色體發生變異。

Abstract

Total amounts of NG in the supernatant of saliva of betel quid were not detected. The contents of NG in the sediment of saliva of betel quid were not correlated with the type of betel quid and the sources in Taiwan.

Cell (Chinese hamster cells) study showed that NG induced chromosome aberration and increased the frequencies of sister chromatid exchange.

High concentration of crude phenolic extract from areca fruit increased the formation of NG. *p*-Nitrosophenol promoted the generation of NG effectively and played an important role of intermediate on the formation of NG.

Antioxidative activities were found in the aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit after various alkaline treatments. The aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit after various alkaline treatment was found to promote the function of MNNG in the absence of S9. However, inhibitory effect on the mutagenicity of IQ were found. Cell study showed that the aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit after various alkaline treatments induced chromosome aberration and did not increase the frequencies of sister chromatid exchange.

壹、前言

熱帶地方，如印度、菲律賓、印尼、馬來西亞、泰國、中南半島、華南及臺灣等地自古代就有嚼食檳榔的習慣(黃, 1991)，檳榔果實有苦溫破滯、辛溫散邪、瀉胸中至高之氣，使之下行等之藥效(本草備要)。國內外有關嚼食檳榔的各種流行病學及病理學研究結果，一致指出嚼食檳榔對口腔組織有明顯不利的影響，且據農委會的估計，檳榔已成為台灣省第二大農作物，其消費人口急劇的增加，遍佈各階層，且年齡亦有下降的趨勢，因此隨檳榔所造成的各種問題必須加以重視。

Stich 等 (1986)分析臺灣花蓮地區檳榔嚼汁中的亞硝酸時，僅發現殘渣中含有高量的 NG (70.8 ng/ml)，且其濃度比印度檳榔嚼汁中的 NG (0.9-5.6 ng/ml)高出甚多，因此本研究擬將對臺灣北、中、南及東區，不同種類的檳榔嚼塊經嚼食後，嚼汁中上清液及殘渣部份之 NG 含量進行檢測。而 Wang and Peng(1996)發現，檳榔果實酚類化合物粗萃物，在低量時不會對 NG 之生成有影響，但高量(528 mg)則有促進的效果，故也將對高量的檳榔果實酚類化合物粗萃物，促進 NG 生成的原因作進一步的研究。此外，因為檳榔嚼塊中含有消石灰，且咀嚼檳榔時口腔的溫度為 37 °C，故於檳榔果實酚類化合物粗萃物中加入 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ，於 37 °C 下加熱 30 分鐘後，取其水層產物，探討檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後對於 NG 生成之影響及其生物活性。

貳、文獻整理

一、檳榔概述

檳榔為多年生常綠喬木，葉為羽狀複葉，每一幹有三、四穗，每一穗上結實三、四百顆。其為陽性樹種，對光的要求，因苗齡而異，在幼齡期要適當蔭蔽，成齡樹需充足的陽光。檳榔不耐高溫，也不能忍耐低的溫度或日溫差變化急劇的氣候，生長要求需在年平均溫度在 22 °C 以上，以 24~28 °C 最宜，檳榔產果年限長達 40~50 年，一般選取株齡 15 年以上、高產量、耐寒者作為母樹。目前生產檳榔的主要國家為印度、菲律賓、緬甸、斯里蘭卡和泰國。據雙冬地區老一輩的說法，臺灣檳榔最早是由荷蘭人由南洋引進的，而南洋正是檳榔的發源地。檳榔全身是「寶」，其果實、果皮、花、花苞均可入藥。果實對驅豬條蟲、姜片蟲等有顯著的療效。果皮可製成纖維隔板。花苞和花則作利尿和清涼用藥(陳, 1989)。

二、檳榔嚼塊之組成

熱帶地方，如印度、菲律賓、印尼、馬來西亞、泰國、中南半島、華南及臺灣等地從古代就有嚼食檳榔的習慣(黃, 1991)，但檳榔嚼塊的組成卻因地而異。在印度，用已塗抹石灰的荖葉包裹檳榔果實，此檳榔果實已先將外部粗纖維去除，再經浸漬、煮沸、乾燥的過程，另外加一些佐料或辛香料如：煙草、阿仙藥、丁香等物質(Raghavan and Baruah, 1958)。而臺灣則採用新鮮的檳榔果實，加上荖花(或荖葉)

以及不同的石灰配料所組成。

(一) 檳榔果實

果實含有許多植物鹼，是很好的收斂劑，有固齒殺菌、去水腫、除痰等功效。其果實為核果，以果形分：有圓形、卵形、倒卵形、心臟形、長橢圓形等，以卵圓形果為最好，果實大，果皮厚。果大核小味甘者稱之為「山檳榔」，果小核大味苦澀者稱為「豬檳榔」(陳,1989)。在本草備要中即提到檳榔果實有苦溫破滯、辛溫散邪、瀉胸中至高之氣，使之下行等之藥效，經一些研究發現，檳榔果實中除了含有多醣類、纖維、脂質、植物鹼外，尚含有豐富的多元酚類化合物 (Mathew and Govindarajan, 1964)，這些多元酚類化合物主要為 proanthocyanidins、leucocyanidin、(+)-catechin 及(-)-epicatechin 等 (Mathew, et al., 1969)。Stich 等(1983)發現檳榔果實之(+)-catechin 萃取物有降低人體尿中亞硝酸含量的作用。

(二) 其它配料

荖藤中存在有一種含量很高的酚類化合物 hydroxychavicol，它有很強的抗氧化性(Sethi and Aggarwal, 1956; 王和吳, 1996)，有助於抑制 arecoline 及煙草中致癌物之誘突變性的效果(Amonkar et al., 1989 ; 王和吳, 1996)。荖花中則含有 safrole (盧等, 1962)，但 safrole 經證實為肝癌之致癌物質，所以在 1960 年時已被美國列為禁用之食品添加物。石灰配料的成份則隨各家檳榔攤的不同而異，但其主要成份為消石灰及柑仔蜜；石灰的鹼性可以

中和檳榔果實的酸性與收斂性(Muir and Kirk, 1960)。柑仔蜜則因為含有(+)-catechin，所以也具有抗突變的效果(Nagabhushan and Bhide, 1988)。

三、檳榔與口腔病變

近年來，檳榔風吹遍臺灣，據農委會的估計，檳榔已成為台灣省的第二大農作物，同時消費人口也急遽的增加，檳榔族遍佈各階層，且年齡亦有下降的趨勢(王, 1993)。而第一次嚼食的原因多是因好奇，最後會變成習慣的原因，男性多是因為冬天可以保暖，女性則為其它理由(林, 1990)。國內外有關嚼食檳榔的各種流行病學及病理學研究結果，一致指出嚼食檳榔對口腔組織有明顯的不利影響，包括牙齒、牙周組織及口腔黏膜。尤其對口腔黏膜的危害更是嚴重，可能引發各種不同程度的黏膜組織變化，如白斑症(leukoplakia)及黏膜下纖維(oral submucous fibrosis; OSF)等癌前期病變(關, 1991)。口腔黏膜下纖維化可影響任何部位的口腔黏膜，甚至更達喉嚨及食道的慢性、隱襲性疾病，臨床表現為口腔黏膜僵硬而造成張口困難，組織病理學為口腔黏膜皮下局部積存膠原蛋白纖維(黃, 1991)。嚼食檳榔時，由於檳榔之纖維粗糙強韌，在口腔中反覆摩擦，造成慢性的機械刺激，需要纖維母細胞(fibroblast)製造膠原蛋白(collagen)來修補。而在檳榔中所含的 arecoline 或 arecaidine 會刺激纖維母細胞製造更多的膠原蛋白。此外，膠原蛋白異常堆積的另一原因，為黏膜病變處之膠原蛋白酶(collagenase)的活性下降，使分解膠原蛋

白的能力下降。這些新生的膠原蛋白絲，受到了檳榔中 tannins、(+)-catechin 的作用後會變得穩定而更不易被分解，如此反覆的過程使膠原蛋白越積越多，便造成纖維化(謝, 1993)。由此可知，口腔粘膜下纖維化可能與嚼食檳榔有著非常密切的關係。

四、檳榔嚼塊之毒性

從流行病學觀點而言，檳榔與口腔癌有密切的關係，而檳榔盛行的地區頰癌發生頻率也相當高(王, 1993)，王(1993)針對臺灣檳榔研究發現，臺灣檳榔雖無明顯的致癌性，但能促進口腔癌的形成。因檳榔與口腔癌有很高的相關性存在，Shirname 等(1983)取檳榔嚼塊、含有煙草的檳榔嚼塊、檳榔子及荖葉之水萃出物以 *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98 及 TA1538 進行誘突變試驗發現，檳榔嚼塊、含有煙草的檳榔嚼塊及檳榔子之水萃出物對 TA100 有誘突變性，且有 S9 混合物存在時，誘突變效果更強。然而，Bagwe 等(1990)利用 *Salmonella typhimurium* TA100 及 TA98，針對檳榔嚼塊之不同溶液的萃出物進行試驗發現，水萃出物、水和乙醇(1:1)萃出物和氯仿萃出物，不論 S9 混合物存在與否皆無誘突變性，但乙醇萃出物在沒有 S9 混合物存在時，對 TA 98 則有微弱的誘突變效果。蘇(1996)以檳榔嚼塊水萃出物研究發現，不會誘使 *Salmonella typhimurium* TA98 及 TA100 發生突變，但有抑制 CHO 細胞增生作用，同時，濃度為 100 ug/ml 時，會顯著提高姐妹染色分體交換頻率，顯示其對細胞可

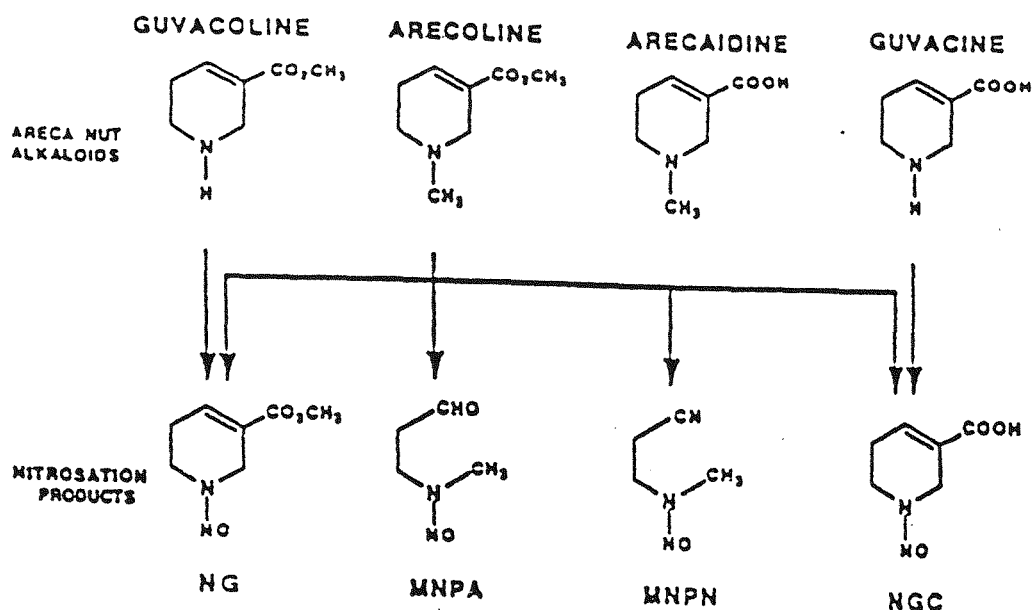
能具有基因毒性。

Jaju 等(1992)研究發現，檳榔嚼塊中不論有沒有煙草存在，皆會增加中國倉鼠卵巢細胞的姐妹染色分體互換(SCE)頻率，但有 S9 混合物存在時，則無顯著的影響，這可能是因為 S9 存在時的解毒效果所致。Maukherjee and Giri (1991)則發現檳榔嚼塊不但會造成 SCE 頻率增加，在高劑量時會使細胞週期明顯減慢，對骨髓細胞具有細胞毒性。Stich 等(1982)將荖花、荖葉、煙草及檳榔嚼塊給受試者咀嚼後，發現其唾液皆會造成 CHO 細胞染色體變異(染色分體斷裂、交換)，但此情況在不咀嚼檳榔嚼塊之受試者的唾液中卻不會出現。

五、檳榔咀嚼時生成之亞硝化產物

(一)亞硝化產物之誘突變性及致癌性

亞硝胺物質能造成 DNA 的突變，主要是因為亞硝胺使氮基發生甲基化 (alkyl group)，而使氮基失去識別能力並與錯誤的氮基配對(李, 1990)。檳榔果實中主要的植物鹼 arecoline 在亞硝化條件下會生成亞硝胺。Wenke and Hoffmann (1983)的 *in vitro* 實驗中，以 arecoline 和 sodium nitrite 進行亞硝化反應，結果生成至少四種亞硝胺，這四種亞硝胺後來在檳榔嚼食者的唾液中陸續被發現，它們為 *N*-nitrosoguvacoline (NG)、*N*-nitrosoguvacine (NGC)、3-(methylnitrosamino)-propionitrile (MNPN)、3-(methylnitrosamino)-propionaldehyde (MNPA) (圖一)，這些亞硝胺的含量如表一所示。



圖一、檳榔果實植物鹼衍生之亞硝酸產物

Fig. 1 Formation of areca-derived *N*-nitrosamines.

(Hoffmann et al., 1994)

表一、嚼食檳榔者唾液中亞硝酸化合物之含量

Table 1. Nitrosamines in the saliva of betel quid chewers (ng/ml) (Hoffmann et al., 1994)

Nitrosamine	BQ	BQT	Reference
MNPN	0.5-11.4	—	Prokopczyk et al. (1987b)
NG	0-5.9	0-7.1	Nair et al. (1985)
	2.2-9.5	4.3-44.5	Wenke et al. (1984a)
	0-103		Süch et al. (1986)
NGC	0-26.6	0-30.4	Nair et al. (1985)
NNN	n.d.	1.2-38	Wenke et al. (1984a)
	n.d.	1.6-14.7	Nair et al. (1985)
	—	6.4-12.9	Sipahimalani et al. (1984)
NNK		3-85.7	Bhide et al. (1986)
	n.d.	1.0-2.3	Wenke et al. (1984a)
		n.d.-14.3	Bhide et al. (1986)

Note. BQ, betel quid; BQT, betel quid with tobacco; n.d., not detected.

MNPN 如塗抹在粘膜細胞表面或進行皮下注射，會誘發大白鼠 (rat)及小白鼠 (mice)發生食道癌、舌癌及鼻咽癌，所以 MNPN 是具有器官專一性的致癌物 (Wenke et al., 1984; Prokopczyk et al., 1987; 1991)。

由於 MNPA 裂解會產生醛類與烷基化合物，其中醛類是具有高度反應性的物質，會降低人類上皮細胞的存活，並將硫醇 (thiol)耗盡，造成各種 DNA 的傷害 (Grafstrom et al., 1986; 1989; Sundqvist et al., 1989)。動物實驗發現，將 MNPA 注射到 F344 rats 體內，會誘發肺癌、鼻癌與其它癌症的產生 (Nishikawa et al., 1992)。

Rao 等人 (1977)發現，NG 在 S9 存在下對 *Salmonella typhiumrium* TA1535 具誘突變性。Wang and Peng (1996)也發現 NG 對 *Salmonella typhiumrium* TA98 及 TA100 皆具有微弱誘突變性。但在飲水中加入 150 ppm 以下的 NG，並不會使 Sprague-Dawley rats 致癌 (Lijinsky and Taylor, 1976)；但會使 F344 rats 發生胰臟癌 (Rivenson et al., 1988)。Stich 等 (1986)分析臺灣花蓮地區檳榔嚼汁中的亞硝酸時，僅發現殘渣中含有高量的 NG (70.8 ng/ml)，且其濃度比印度檳榔嚼汁中的 NG (0.9-5.6 ng/ml)高出甚多，而且當檳榔嚼塊中加入消石灰時，NG 含量會顯著的增加。由於本省檳榔嚼塊類型很多，且成份極為複雜，為了解 NG 的含量情形為何？本研究將針對臺灣北、中、南及東區，不同種類的檳榔嚼塊經嚼食後，嚼汁中上清液及殘渣部份之 NG 含量進行檢測。

(二)影響亞硝化反應之因子

許多研究證實，亞硝化物質 (*N*-nitroso compounds)常在實驗動物(Mirvish, 1975; Ohshima et al., 1982)及人體(Ohshima and Bartsch, 1981)中出現。 *In vitro* 實驗發現酚類化合物會影響二級胺發生 *N*-nitrosation 的反應速率(Bogovski et al., 1972; Gray and Dugan, 1975; Kawabata et al., 1979)；phenols 在 *C*-nitrosation 過程中所生成的 *C*-nitroso derivatives，在 pH 5 時有催化 pyrrolidine 與 morpholine 之亞硝化反應(Davies and McWeeny, 1977; Davies et al., 1978; Davies et al., 1980)，此外，在較大的 pH 值範圍內，對 diethylamine 的 *N*-nitrosation 產物 *N*-nitrosodiethylamine (NDEA)的生成也有催化效果。自然界中的酚類化合物，對 NDEA 的生成是抑制或催化作用，主要視這些酚類化合物的結構而定(Walker et al., 1979; Pignatelli et al., 1980; Walker et al., 1982)。Resorcinol, catechin, phenol 及 *p*-nitrosophenol 被發現對 proline 的亞硝化反應具有催化作用，其催化效果之順序為 resorcinol > *p*-nitrosophenol > catechin > phenol \geq guaiacol；而 chlorogenic acid 則具有抑制作用(Pignatelli et al., 1982)。

Resocinol 之所以有催化作用，主要是因為其與 nitrite 反應生成 *C*-nitroso derivatives，才具有催化 *N*-nitrosation 的作用。而 catechin 因為具有 resocinol 部份的結構，所以也具有催化作用(Pignatelli et al., 1982)。*p*-nitrosophenol 的催化作用，是因為其與 nitrite 生成的 *p*-nitrosophenol derivatives，具有促進 *N*-nitrosation 的效果(Walker et al., 1979)。由於酚類化合物容易被亞硝酸氧化成 quinones，而具有抑制 nitrosation 的作用。但無論是促進或抑制效果，

反應環境之酸鹼情形及酚類化合物的濃度皆有所影響 (Pignatelli et al., 1982)。

Wu 等(1993)以綠茶、紅茶及烏龍茶等七種茶進行實驗發現，此七種茶皆會抑制 *N*-nitrosomorpholine (NMOR) 的生成，且抑制效果與茶中 polyphenol (特別是 catechin derivatives) 含量有正相關性，且用餐後喝茶比用餐前喝茶有更好的抑制效果。Nagabhushan 等(1989)將茗葉中的酚類化合物 hydroxychavicol 及 eugenol 分離出來發現，hydroxychavicol 在 pH 3.6、30 °C 的情況下，會妨礙 nitrosation 反應；且 Mulky 等(1987)也發現，如將苯環上之氫氧基 acetylation，將會使這類分子的抗亞硝化反應的活性消失，所以苯環上之氫氧基對抗亞硝化反應扮演著一個很重要的角色。

Wang and Peng(1996)發現檳榔果實酚類化合物粗萃物，在低量時不會對 NG 之生成有影響，但高量(528 mg)則有促進的效果，因此，本研究將針對高量的檳榔果實酚類化合物粗萃物，為何會促進 NG 的生成進行探討。

六、 毒性探討

(一)細菌試驗

在 1960 年代末期及 1970 年初期，Ames 發表了兩組以 base pair substitution 及 frameshift mutation 為作用機制之菌系與測試方法，由於此法不但有一般微生物系統之快速、經濟的優點，對制變及致癌物質的預測準確性更高達



90 % (McCann and Ames, 1976; Purchase et al., 1976; Brusick, 1993)。其原理為 *S. trphimurium his⁻* mutants 受到誘突變物時會返突變成為 *his* prototrophy (Ames, 1971; Josephy, 1989)。而導致 base pair substitution 主要是在 histidine 生合成酵素上的 *hisG46* 產生突變 (Hartman et al., 1986)，frameshift mutation 則是在 histidinol dehydrogenase 的 *hisD3052* 產生突變 (Ames et al., 1973)。在 1973 年時，Ames 發表出一種以老鼠肝臟酵素(S9)來模擬生物體內代謝活化作用之反應的方法；而為了提高偵測方法的敏感性，則在以 base pair substitution 及 frameshift mutation 為作用機制的菌系中植入 *pkM101* plasmid，而產生了一般所知的 TA98 (frameshift) 及 TA100 (base pair substitution) (McCann et al., 1975)。測試後若返突的菌落數為自然突變者的兩倍以上，且樣品誘導的突變菌落數與樣品劑量成正相關時，則表示此樣品可能具有誘突變性。

(二) 細胞試驗

1. 姐妹染色分體互換(sister chromatid exchange ; SCE)

細胞受到物理或化學性物質，如紫外線和食物中多酚環類芳香氫等作用，會導致細胞姐妹染色分體發生互換(sister chromatid exchange; SCE)的現象，產生姐妹染色分體發生互換的機轉很多，包括重組修補(recombination repair)，DNA 在損害處複製的改變(replication bypass model)，或是鄰近兩條複製鏈的非同步 DNA 合成等，儘管確實的機轉還不能確定，但一般認為姐妹染色分體交換代表 DNA 受傷，由於許

多誘突變劑(mutagens)以及大部份的致癌劑(carcinogens)都會破壞 DNA，並會增加 SCE 發生的頻率，因此姐妹染色分體互換為一種靈敏度極高的遺傳毒性偵測法。

姐妹染色分體互換(SCE)是讓 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd)進入細胞核內，因為 BrdUrd 的化學結構與細胞胸腺嘧啶(thymidine)相似，所以在進行 DNA 複製時，BrdUrd 便進入 DNA 中。當染色體以 BrdUrd 取代胸腺嘧啶(thymidine)進行第一次 DNA 複製後，每一條染色分體的雙股中會有一股含有 BrdUrd，但細胞若繼續以 BrdUrd 取代胸腺嘧啶進行第二次 DNA 複製後，則同一條染色體的兩條染色分體中，會有一條染色分體的一股 DNA 有 BrdUrd，而另一條染色分體則兩股 DNA 皆為 BrdUrd，此種染色體以染核酸的螢光染色劑 Hoechst 33258 處理，使 Hoechst 33258 與 DNA 結合，再以紫外光照射，紫外光會使得染色體上 DNA 產生光解，而含有 BrdUrd 的 DNA 比不含 BrdUrd 的 DNA 更易被紫外光分解，經 Giemsa 染色後，兩股 DNA 皆為 BrdUrd 的染色分體比一股 DNA 有 BrdUrd 的染色分體顏色來的淺。經由姐妹染色分體的顏色差即可在一般光學顯微鏡下計數姐妹染色分體互換的頻率(Dean and Danford, 1984)。

2. 染色體變異(chromosome aberration)

染色體變異是指染色體構造發生變化，可在顯微鏡下觀察，其可能由於單一染色分體之染色物質的遺

失而完全斷裂，而遺失的部份在分裂中期時可能以斷片(fragments)存在。斷裂的染色分體亦可能重組而形成單純或複雜的結構變化。大部份的染色體變異由於遺失重要的基因訊息或無法正常進行有絲分裂而死亡，但細胞如染色體移位和小部份遺失則能正常分裂而存活下來。一般染色體變異可分為下列幾種(Dean and Danford, 1984)：

I. 染色體型(chromosome type)：染色體之兩條染色分體在同一位置產生變異，包括：i. 間隙(gap or a chromatic lesion; g)：間隙比染色分體直徑短。ii. 染色體斷裂(chromosome break or terminal deletion; c)：在複製後的分裂中期被發現，有時斷裂之殘片無法被發現。iii. 交換(exchange)：又分為(1)兩個染色體間交換(interchange between chromosomes; c/c)，形成雙中心節(dicentric)(2)同一染色體間交換(interchange within a chromosome; c/c)，形成環狀變異(ring)。








II. 染色分體型(chromatid-type)：除孤立染色分體斷裂(isochromatid breaks)外，通常只指單一條染色分體變異，包括：i. 間隙(gap; g)：間隙比染色分體直徑小。ii. 染色分體斷裂(chromatid break; c)：斷裂部份大於染色分體直徑；iii. 孤立染色分體斷裂(isochromatid break; su)。iv. 交換(exchange)：染色分體斷裂後又重新組合而成，構造可能相當複雜：(1)兩個染色體間交換，可分對稱和非對稱兩種，(2)同一染色體間交換(interchange within a chromosome; c/c)，可分單臂和雙臂，(3)孤立染色體/染色分體間交換

(isochromatid/chromatid interchange; i/c)。

由於 NG 有微弱之誘突變性誘突變性及致癌性，故本實驗將針對 NG 之 SCE 及 CA 做進一步之研究。

表二 染色體變異之分類

Table 2 Classifications of chromosome aberration (Dean and Danford, 1984)

<i>Aberration type</i>	<i>Diagram</i>	<i>Comment</i>
A. CHROMOSOME TYPE		
(1) Gap (G) or achromatic lesion		Involving both chromatids of a chromosome at identical loci. Chromosome region distal to the gap is aligned with the proximal region. Non-staining region is not greater than the diameter of a chromatid.
(2) Chromosome break (C) or terminal deletion		Involving only one chromosome and, as with all chromosome-type aberrations occurring in the unreplicated (G ₁ or G ₀) chromosome but seen at metaphase in the replicated state. The centric part of the deleted chromosome may not be identified. In most cells these cannot be distinguished from isochromatid breaks so both are referred to as isolocus breaks.
(3) Exchange		Involving two or more lesions in same or different chromosome(s)
(a) Interchange (between chromosomes; C/C)		From an exchange between two chromosomes in G ₁ . The fragment is part of the exchange and should not be scored as a separate event.
	Dicentric with accompanying fragment	
(b) Interchange (within a chromosome; C/C)		The fragment is part of the exchange and should not be scored as a separate event. One fragment should be allocated to each ring (or dicentric) and the remaining fragments classified as isolocus deletions.
(i) between arms (inter-arm intrachange)		
	Centric ring with accompanying fragment	
(ii) within an arm (intra-arm interchange)		The centric part of this exchange may not be identified. Small acentric rings are called 'double minutes' or 'interstitial deletions'.
	Acentric ring	
B. CHROMATID-TYPE		
(1) Gap (g)		Usually involve only one chromatid of each chromosome except for isochromatid breaks. Non-staining region not greater than diameter of a chromatid.
(2) Chromatid break (c) or deletion		Non-staining region greater than diameter of a chromatid.
	Aligned fragment	

七、抗氧化性之評估

活性氧($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$)是一般代謝過程中產生的副產物，它會攻擊生物體中的分子，導致細胞或組織的傷害。活性氧和自由基在致癌的過程當中扮演著重要的角色(Cerutti, 1985)。過氧化氫會促使小白鼠產生皮膚癌(Slaga et al., 1982)。超氧離子則會造成 CHO 細胞的 DNA 單股斷裂(Cunningham et al, 1987)。

抗氧化劑是一種可抑制脂質過氧化的物質，如 butylated hydroxytoluene (BHT)，butylated hydroxyanisole (BHA)，Propyl gallate，Vitamin E，rosemary extracts 及 flavonoid 等 (Wurtzen, 1990; Stich, 1991)。許多研究發現，flavonoid 可使心血管疾病所導致的死亡降低，且攝取高量(25.9 mg)的 flavonoid 可使冠狀動脈疾病發生的頻率比低攝量低 68% (Hertog et al., 1993)，而 quercetin 和其它的 polyphenolic flavonoids 也顯示出可抑制 LDL 的氧化及對細胞的傷害(De Whalley et al., 1990)。

茶中含有許多的酚類化合物，如(-)-epicatechin (EC)，(-)-epigallocatechin gallate (EGC)，(-)-epicatechin gallate (ECg)及(-)-epigallocatechin gallate (EGCg) (蘇等, 1991)，茶除具有抗氧化性外(Satoshi and Hara, 1990)，亦有抗突變性(Kada et al., 1985; Jain et al., 1989; Yen and Chen, 1994)。由於檳榔果實中含有多量的酚類化合物，其酚類化合物粗萃物亦具有抗氧化及抗突變性(Wang and Lee, 1996)，但由於檳榔嚼塊中含有消石灰，因此，本研究亦將針對檳榔果實中酚類化合物粗萃物經鹼處理後，其產物之抗氧化及抗突變性進行探討，以了解酚類化合物經鹼($Ca(OH)_2$)處理後生

物活性之變化。

八、 研究目的

Stich 等(1986)分析本省花蓮地區檳榔嚼塊嚼汁中的亞硝酸胺，結果發現僅殘渣部份含有高量之 *N*-nitrosoguvacoline (70.8 ng/ml)，其濃度遠高於印度地區，因此擬針對本省北、中、南及東區之各種不同檳榔嚼塊(紅灰、白灰和雙子星)之檳榔嚼汁進行分析，分別測定其上清液及殘渣部份 *N*-nitrosoguvacoline 的含量，同時亦針對 *N*-nitrosoguvacoline 之細胞毒性進行探討。

由於本研究室(Wang and Peng, 1996)發現高量(528mg)之檳榔果實酚類化合物粗萃物對 *N*-nitrosoguvacoline 生成有促進的效果，所以亦針對其促進 *N*-nitrosoguvacoline 生成之機制進行探討。又因本省檳榔嚼塊中含有鹼性的消石灰，故將取得檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼($\text{Ca}(\text{OH})_2$)處理後之產物，分別進行抗氧化性、突變性、細胞毒性、姐妹染色分體交換及染色體變異等試驗，以了解鹼性物質對酚類化合物生物活性之影響。

參、材料與方法

一、實驗材料

(一) 檳榔果實

1. 來源：摘自本校校園中之檳榔樹。
2. 時間：民國八十五年八月。
3. 檳榔果實酚類化合物粗萃物之製備：將檳榔果實洗淨之後，新鮮檳榔果實與 80% acetone 水溶液混合 (1:10; W/V)，以破碎機破碎，再以紗布及濾紙過濾，所得濾液經減壓濃縮去除溶劑，即得酚類化合物粗萃物，粗萃物進行實驗前，置於 0°C 下儲存備用，產率為 9-10%。

(二) 檳榔嚼塊

1. 來源：全省各地之檳榔攤。
2. 時間：民國八十五年八月至民國八十六年一月。
3. 檳榔嚼汁之來源：將來自本省各地(新竹、臺中、高雄、屏東、花蓮)檳榔攤所購得之檳榔嚼塊，請當地人嚼食後，取得嚼汁(含吐出的渣)。

(三) 菌種

Salmonella typhimurium TA98 及 TA100 由美國加州大學 Berkeley 生化系 Ames 博士提供，承蒙中興大學食科所顏國欽教授及霧峰臺灣省藥物毒物試驗所游碧瑋老師及王雲鶴先生贈予。

(四) CHO (Chinese hamster ovary) cell line

承蒙中山醫學院王治中老師贈予。

二、藥品

(一) 細菌用藥

Bacto-agar : 購自美國 Difco 公司

d-Biotine : 購自美國 Sigma 公司

Citric acid monohydrate : 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 heptahydrate : 購自德國 Merck 公司, GR 級

Nutrient agar : 購自美國 Difco 公司

Nutrient broth No.2 : 購自美國 Difco 公司

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate : 購自美國 Sigma 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

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

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

(二) 細胞用藥

Acetic acid :購自德國 Merck 公司
Bromodeoxyuridine :購自美國 Sigma 公司
Colcemid :購自美國 Gibco 公司
Foetal bovine serum (FBS) :購自美國 Gibco 公司
Giemsa stain :購自德國 Merck 公司
McCoy's 5A :購自美國 Gibco 公司
Methanol :購自美國 Tedia 公司
Phosphate-buffered saline (D-PBS) :購自美國 Gibco
公司
Trisodium citrate :購自美國 Sigma 公司
Trypsin-EDTA :購自美國 Sigma 公司

(三) 分析用藥

Acetonitrile :購自美國 Tedia 公司
Benzene :購自日本林純公司
Ethyl acetate :購自美國 Tedia 公司
Ether :購自美國 Tedia 公司

Isopropanol : 購自 Fisher 公司
Methanol : 購自美國 Tedia 公司
Sodium azide : 購自美國 Sigma 公司

三、 儀器設備

(一) 分光光譜儀

Spectrophotometer U-1100, Hitachi, Japan

(二) 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

(三) 位相差顯微鏡

Phase contrast microscope: Diophot TMD, Nikon, Japan

(四) 吸附性色層分析儀

1. Pump: model tris, Isco, U. S. A.
2. UV/VIS detector: model OA-6, Isco, U. S. A.
3. Fractional collector: model retriever 500, Isco, U. S. A.

(五) 多點式電磁攪拌器

Variomag, Germany

(六) 菌落計數器

560 Suntex, Taiwan

五、實驗方法

(一) N-nitrosoguvacoline (NG) 之合成、純化與分析

1. NG 之合成

參考 Wenke and Hoffmann (1983) 之方法。將 40g 的 arecoline hydrobromide 和 117g 的 sodium nitrite 溶於 300ml 的去離子水中，連續攪拌七天，每天以 6 N 鹽酸溶液調整 pH 值至 4-5，七天後，以飽合碳酸鉀溶液調至弱鹼性(pH 7.5)，用氯仿連續萃取數次，最後一次氯仿萃取後之水層加入氯化鈉至飽和，再以氯仿萃取，所得之氯仿萃取液以無水硫酸鈉除去殘餘的水，並濃縮至乾，然後以 150ml 的甲醇溶解，並加入 18ml 的 Iodomethane，於室溫下攪拌至乾，再加入乙醚溶解並過濾之，將濾液濃縮至乾，即得 NG 粗產物產率約為 6-7%。

2. NG 之純化

取 NG 粗產物經充填 silica gel 之管柱(36 × 2.5 (ID) cm ; in hexane/ethyl acetate (1:1))，以 hexane/ethyl acetate (1:1) 之沖提液以 0.5ml/min 之流速沖提分離之，檢測波長為 254nm。

3. NG 之分析

參考 Wang and Peng(1996) 之方法，以高效能液相層析法分析 NG 的含量。使用之分離管柱為 LiChrospher 100 RP-18 (24.4 cm × 4 mm I. D.，粒徑 5 μ m，

德國 Merck 公司產品)，移動相為 100%之 A 溶液(去離子水)在四十分鐘內以線性梯度轉換為 40% B 溶液(100%氘甲烷)，接著在十分鐘內仍以線性梯度再轉換為 100% A 溶液，流速為 1 ml/min，檢測波長為 254 nm。滯留時間約 25.23 及 25.57 分鐘出現 NG 異構物(isomers)，其紫外光譜可知 NG 在 220 nm 有最大吸光值。

(二) 檳榔嚼汁之收集與前處理

1. 檳榔嚼汁之收集

參考 Stich 等(1986)之方法。將原料(二)3. 取得之嚼汁，收集後存放在等量含有 sodium azide (NaN_3) (3.25 mg/ml)之 citrate/ phosphate (pH4.5)緩衝溶液中，離心 3 分鐘後，將上清液及殘渣分開，於 -80°C 下儲存備用。

2. NG 分析之前處理

於室溫中解凍、記錄 pH 值，上清液解凍後加入氯化鈉使其達飽和，殘渣則以剪刀剪碎。兩者分別先以氯仿萃取，最後一次取其水層，用氯化鈉使之飽和，再以氯仿萃取，氯仿萃出物以無水硫酸鈉除去多餘的水，然後減壓濃縮至乾，濃縮產物以 acetonitrile 溶解過濾，濾液適當濃縮後，進行 NG 之分析。

(三) 檳榔果實酚類化合物之萃取與鹼處理

1. 酚類化合物粗萃物之製備

參考原料(一)3.之方法。

2. 酚類化合物粗萃物之鹼處理

取檳榔果實酚類化合物粗萃物 1 g，溶於 64 ml isopropanol / H₂O(1:1)，以 Ca(OH)₂ 將 pH 值分別調至 8、10、12，在 100 °C 及 37 °C 下迴流反應 30 分鐘，再連續以 ethyl acetate, amyl alcohol/benzene (1:1), benzene 及 ethyl ether 去除有機物後，所得之水層物質即為酚類化合物粗萃物經鹼處理後之產物。在 37 °C pH8、10、12 產率分別為 27.93%、17.98%、41.52%，100 °C pH8、10、12 產率則分別為 4.03%、18.5%、31.72%。

(四) 抗氧化性之測定

參考 Lingnert 等(1979)之方法。將等量之 linoleic acid、Tween 20 溶於 0.1 M potassium phosphate buffer (pH6.5) 中，均質使成 10 mM 之 linoleic acid emulsion。將(三) 2. 之產物溶於水並配製成各種濃度，取 200 μ l 跟 2 ml 10 mM 之 linoleic acid emulsion 混合均勻，置於 37 °C 暗室中 15 小時。取 15 小時前後之溶液溶於 2 ml 的甲醇中，並加入 6 ml 60% 甲醇，於 234 nm 下測其吸光值。所測得之樣品對共軛雙烯鍵的抑制效果，抗氧化性以 A.O.A. 值表示，A.O.A. 值越高表示樣品的抗氧化性越好。 $A.O.A. = [\Delta A_{234}(C) - \Delta A_{234}] / \Delta A_{234}(C)$ 。 $\Delta A_{234}(C)$ ：不含樣品之 linoleic acid emulsion(對照組)在 37 °C，15 小時反應前後 234nm 下吸光值之差。 ΔA_{234} ：含樣品之 linoleic acid

emulsion(實驗組)在 37 °C，15 小時反應前後 234nm 下吸光值之差。

(五) 細菌試驗

參考 Maron and Ames (1983)之方法，以 *Salmonella typhimurium* TA98 及 TA100 兩種菌株進行實驗。

1. 毒性試驗

以有無 S9 兩組進行之，無 S9 者以緩衝溶液替代，控制組同樣以緩衝溶液替代樣品。取 0.1 ml 樣品與 0.5 ml 的 S9 溶液混合，於 37 °C 下水浴二十分鐘，加入 9.2 ml 無菌水，再以無菌水稀釋 1000 倍，取 1 ml 稀釋液至培養皿中，倒入 nutrient agar，37 °C 下培養 48 小時以後，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

分為有無加入 S9 兩組進行之，無 S9 者以緩衝溶液替代，控制組同樣以緩衝溶液替代樣品。取 0.1 ml 樣品與 0.5 ml 的 S9 溶液混合，於 37 °C 下水浴二十分鐘，加入 2 ml molten top agar，倒入含有已凝固之 glucose minimal agar plate 之培養皿上，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 and Lee(1996)之方法。將需 S9 活化

之 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]-quinoline (IQ)其濃度為 0.5 ug/plate (TA98)及 0.5ug/plate (TA100)及不需 S9 活化之 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MN-NG) 其濃度為 10 ug /plate 標準誘突變物，溶於 DMSO 中，分別針對 TA98 及 TA100 進行實驗，無 S9 者以緩衝溶液替代，控制組同樣以緩衝溶液替代樣品及標準誘突變物。取 0.1 ml 樣品、0.1 ml 標準誘突變物、0.5 ml S9 溶液和 0.1 ml 菌液混合，於 37°C 下水浴二十分鐘，加入 2 ml molten top agar，倒入已凝固之 glucose minimal agar plate 上，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越小，表示樣品之抗突變性越強 (Francis et al., 1989)。

(六) 細胞試驗

參考 Dean 和 Danford (1984)之方法。將中國倉鼠卵巢細胞，培養於含有 10 % FBS 血清之 McCoy's 5A 培養基中，分別進行毒性、姐妹染色分體交換及染色體變異之試驗，控制組以 PBS (不含鈣、鎂離子) 取代樣品。

1. 毒性試驗

種一百個細胞於 5ml 培養基中，於 37°C，5% CO₂ 培養 24 小時後，加入 0.1 ml 不同濃度的樣品溶液，培養 24 小時後，去除原來之培養基，加入新的培養基培養，於七天後以甲醇固定細胞，以 10% Giensa stain 染色，計算含有 50 個細胞以上之細胞群

落，以存活率在控制組 50%以上之濃度進行 SCE 及染色體變異 (chromosomal aberration ;CA) 試驗。

2.SCE 及 CA 試驗

將二十萬個細胞種於 10 ml 培養基中，於 37 °C，5% CO₂ 培養 24 小時後，加入 0.2 ml 不同濃度之樣品溶液及 0.1 ml 之 10 μ M BrdUrd，培養 24 小時後，進行收細胞實驗，於收細胞前 1.5 小時加入 0.1 μ g 之 colcemid，經由一連串之實驗過程及染色，取 90 個停留在第二複製中期 (metaphase) 的染色體，以顯微鏡觀察其 SCE 頻率和 CA 之情形與數目。

六、統計分析

以 SAS 統計軟體之 ANOVA (analysis of variance) 進行實驗數據的分析，處理組間之差異，比較則利用 Duncan's New Multiple Range Test (n=3, p < 0.05) 行之。

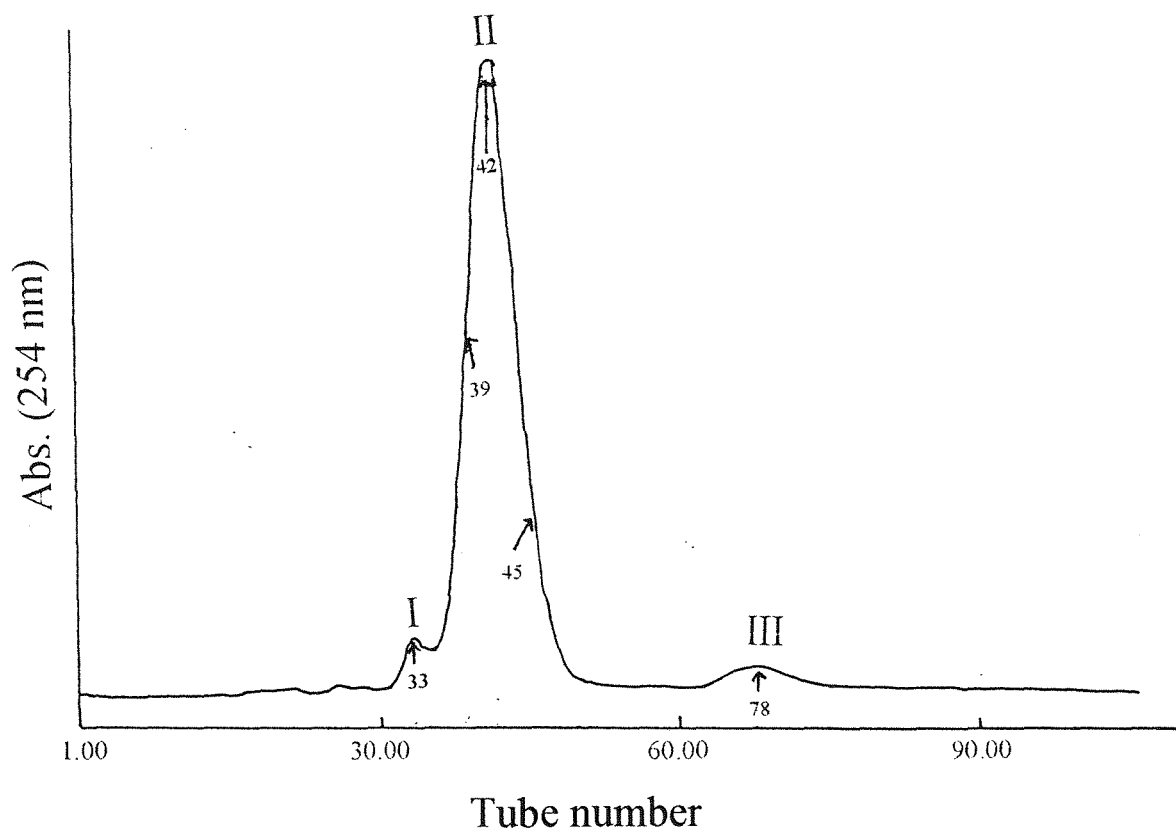
肆、結果與討論

一、*N*-nitrosoguvacoline (NG) 之分離純化與含量測定

Stich 等(1986)分析本省花蓮地區的檳榔嚼汁時，發現僅在殘渣部份含有高量之 NG (70 ng/ml)，其濃度遠比印度檳榔嚼汁中的 NG (0.9-5.6 ng/ml) 高出許多，由於本省之檳榔嚼塊種類種多，且成份複雜。故本研究擬分析本省北、東、南及中區各種檳榔嚼汁中 NG 的含量。

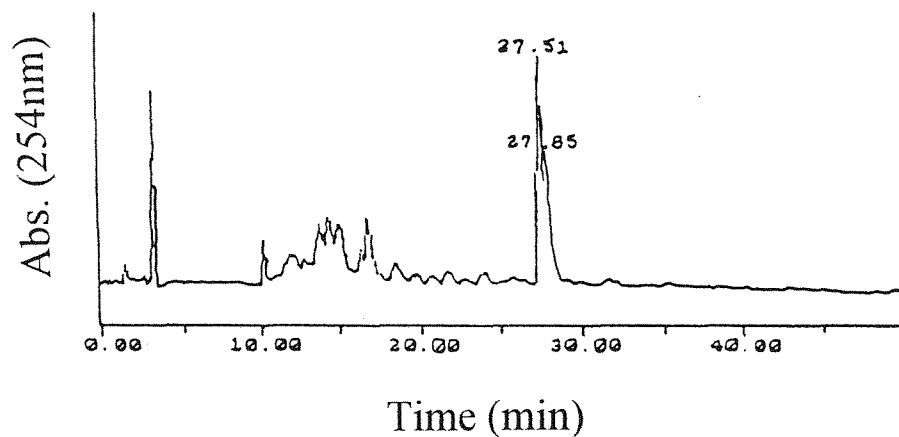
(一) NG 之合成、分離與純化

由於 NG 並無商品，因此本研究室自行合成並純化 NG，Wang and Peng (1996) 之方法，以商品之 arecoline hydrobromide 與亞硝酸鈉進行亞硝化反應，所得之粗產物以吸附性液相層析法分離純化之，檢測波長為 254 nm，以此法所獲得之 NG 有較高的產量。由液相層析圖(圖二)可知會有 fraction I、fraction II 及 fraction III 出現。由於 NG 為一極性較低之物質，故推測 fraction I 或 fraction II 為 NG，為進一步確認，分別自 fraction I 取得一收集管(33)，fraction II 取得三收集管(39, 42, 45) 及 fraction III 取得一收集管(78)，先以薄層層析法(彭, 1995) 來偵測，結果在 254nm 紫外光下可發現 33、39、42、45 管中皆有 NG 存在，其中 a 管尚有其它物質，而 39、42、45 管中則僅有 NG，故知 fraction II 為 NG。所得之區分物經減壓濃縮後，再以高效能液相層析進行確認，結果顯示，滯留時間在 27.51 及 27.85 分鐘出現 NG 及其異構物 (isomers) (圖三)，其紫外線光譜圖在 220 nm 有最大吸光值 (圖四)，此結果與



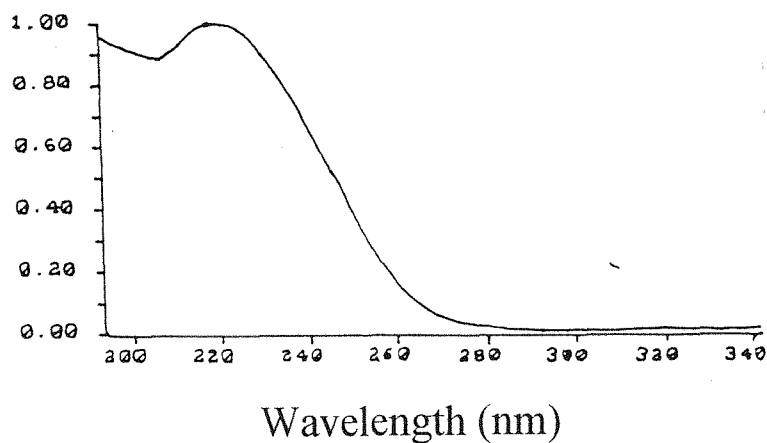
圖二、 Arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 反應產物
之液相層析圖

Fig. 2 Liquid chromatogram of product from the reaction of
arecoline hydrobromide and sodium nitrite by adsorp-
tion on silica gel



圖三、 *N*-Nitrosoguvacoline 及其異構物之高效能液相層析圖

Fig. 3 High performance liquid chromatogram of *N*-nitrosoguvacoline and its isomer



圖四、 *N*-Nitrosoguvacoline 之紫外線光譜圖

Fig. 4 UV-spectra of *N*-nitrosoguvacoline

Wang and Peng (1996)及 Wenke 和 Hoffmann (1983)之發現是一致的，故可知所得之區分物確實是 NG。

(二) 檳榔嚼汁中 NG 之分析

由表三可知，不論北、中、南及東區，檳榔嚼汁之上清液皆無法檢測到 NG，在殘渣部份，中部僅有白灰檳榔嚼汁中有 NG(4.56 ng/ml)存在，南部則在紅灰檳榔嚼汁(1.90 ng/ml)及白灰檳榔嚼汁中(5.18 ng/ml)有 NG 存在，而東部則在紅灰檳榔嚼汁(2.63 ng/ml)、白灰檳榔嚼汁(0.36 ng/ml)及雙子星檳榔嚼汁中(0.56 ng/ml)皆有 NG 存在。綜合以上結果可知，檳榔嚼汁的上清液中皆無 NG 存在，殘渣部份，白灰檳榔嚼汁中幾乎皆有 NG 存在，但紅灰檳榔嚼汁僅有南、東部含有 NG，而雙子星檳榔嚼汁中只有東部才有，因此可發現，NG 含量隨區域及嚼塊種類地方的不同而有所差異，這可能是因為檳榔果實的來源不同，且各家檳榔攤所使用的配料各有不同，如紅灰的製法各有其配方，荖花、荖葉之成份因產地而異，因此造成各地之各種檳榔的 NG 生成量有所不同。

Nair 等(1996)發現，咀嚼含有煙草之檳榔嚼塊會促進口腔中内生性 nitrosation 的發生，此種習慣與癌症有相關性。Stich 等(1986)分析本省花蓮地區的檳榔嚼汁時，發現僅在殘渣部份含有高量之 NG (70 ng/ml)，而未發現其他報導之亞硝酸胺(NGC, MNPN, MNPA)，本研究室之結果與 Stich 等(1986)之發現是類似的，因此臺灣發生口腔癌的比率低於印度或其它有嚼食檳榔的國家，可能是因為僅生成 NG，而 NG 與口腔癌之低相關性所致。

表三、臺灣各區不同種類檳榔嚼汁中 *N*-nitrosoguvacoline
含量

Table 3. The content of *N*-nitrosoguvacoline in the saliva of
Taiwanese betel quid

Saliva	No. of samples	pH range	NG (ng/ml saliva)
Supernatant (North Taiwan)			
Red lime	8	6.49-7.72	nd
White lime	8	6.18-7.14	nd
Double star	8	6.7-8.23	nd
Sediment (North Taiwan)			
Red lime	8	5.7-7.9	nd
White lime	8	5.7-9.93	nd
Double star	8	6.24-6.9	nd(one,17.67)
Supernatant (Central Taiwan)			
Red lime	8	6.24-7.53	nd
White lime	8	6.02-7.03	nd
Double star	8	6.6-8.04	nd
Sediment (Central Taiwan)			
Red lime	8	5.62-7.31	nd
White lime	8	5.57-7.65	4.56(0-18.61)
Double star	8	5.95-6.31	nd
Supernatant (South Taiwan)			
Red lime	8	5.96-7.93	nd
White lime	8	6.08-8.9	nd
Double star	8	6.68-7.97	nd
Sediment (South Taiwan)			
Red lime	8	6.3-8.27	1.90(0-7.67)
White lime	8	6.07-8.52	5.18(0-19.76)
Double star	8	6.13-7.93	nd (one,8.43)
Supernatant (East Taiwan)			
Red lime	8	6.97-7.88	nd
White lime	8	7.17-7.85	nd
Double star	8	5.46-6.6	nd
Ssediment (East Taiwan)			
Red lime	8	6.13-7.26	2.63(0-12.24)
White lime	8	6.26-6.97	0.36(0-1.76)
Double star	8	5.37-6.2	0.56(0-2.84)

nd, no data

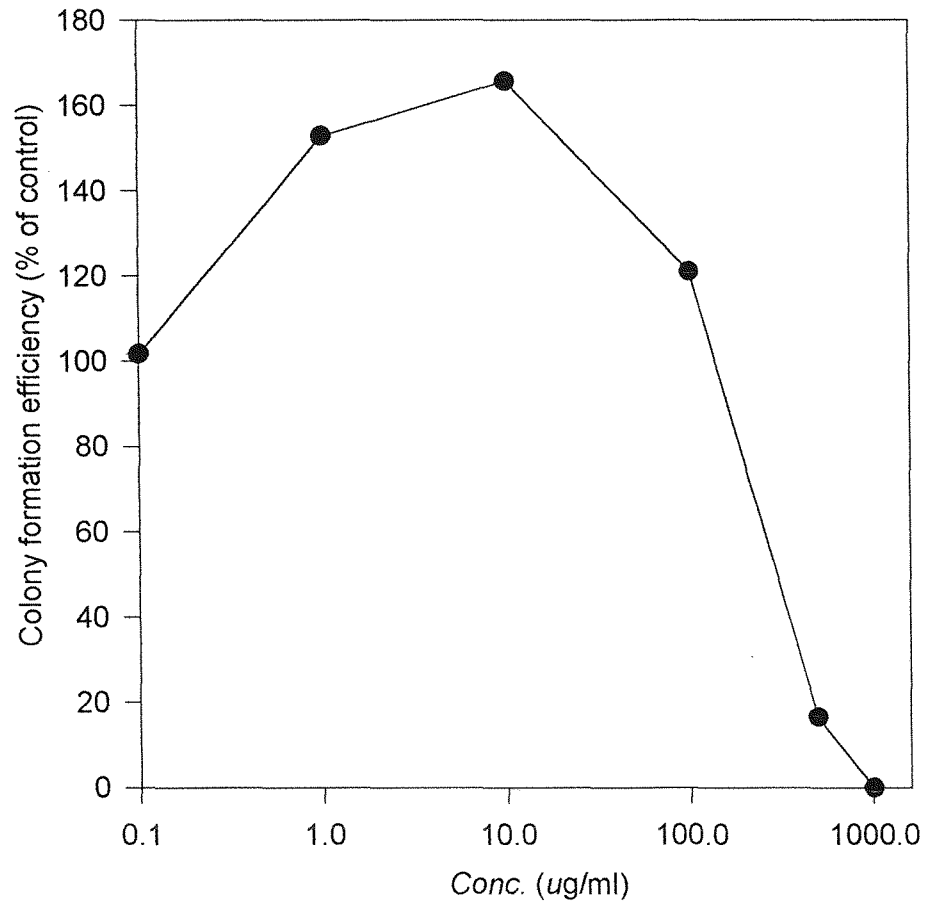
二、NG 之毒性

Arecoline 是檳榔果實中含量最豐富的植物鹼，它具有細胞毒性(Wary and Sharan, 1991)，可能也對 Swiss 大白鼠有致癌性(Bhide et al., 1984)。檳榔嚼塊中的 arecoline 經過 nitrosation 作用後，可產生亞硝酸胺，例如：MNPN、MNPA、NG 和 NGC (Wenke and Hoffmann, 1983)，而 MNPN、NG 和 NGC 已在咀嚼檳榔者的唾液中被分析出(Nair et al 1985；Prokopczyk et al., 1987)，因本省檳榔嚼汁中殘渣部份僅有 NG 存在，故以合成之 NG 進行細胞毒性、姐妹染色分體交換及染色體變異試驗。

(一) 細胞毒性

本研究使用中國倉鼠卵巢細胞探討 NG 之毒性。在細胞存活試驗中若樣品使細胞存活率低於控制組之 50% 以下，表示該濃度對細胞已有毒性。結果顯示，當 NG 濃度高達 500 $\mu\text{g/ml}$ 時，細胞數降為控制組之 18%，且濃度達 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，會使細胞全部死亡(圖五)，由此可知，NG 在高濃度下對細胞具有毒性。

Rivenson 等(1988)發現，NG 對 F344 rats 有微弱的致癌性，但在飲水中(劑量為 4.4 mole/animal)給 Sprague-Dawley rats 時，卻沒有致癌性。Nix 等(1979)發現，NG 對頰粘膜上皮細胞有微弱的誘突變性。本研究室亦已發現，NG 對 *Salmonella typhimurium* TA100 具有微弱之誘突變性(Wang and Peng, 1996)。與本實驗在濃度高達 500



圖五、*N*-Nitrosoguvacoline 對 CHO 細胞增生的影響
Fig. 5 Plating efficiency assay of *N*-nitrosoguvacoline in CHO cells

ug/ml 時，對細胞之毒性有相似之處。但 NG 是如何影響細胞的生長？其原因則有待進一步的探討。

(二) 姐妹染色分體交換(SCE)及染色體變異(CA)

許多研究發現，CHO 細胞曝露在致癌物中，會導致 SCE 的增加，且呈 dose-dependent 效應，尤其會改變 DNA 鹽基(base)的物質較易引發 SCE 的產生。而一些能直接破壞 DNA 鏈的物質如幅射線、重金屬等，較不能引發 SCE 的增加，但較易引發染色體變異的產生(劉等, 1993)。因此 SCE 及 CA 為探討誘突變劑及致癌劑之適當指標。

結果顯示，NG 會使 CHO 細胞之染色分體產生 between arms(圖六)及 gap(圖七)的情形發生，與對照組比較時，以有顯著之基因毒性存在(因對照組中並無染色分體之 between arms 情形)。此外，SCE 發生的頻率會隨濃度的增加而提高，當濃度為 0.1 ug/ml 時，SCE 發生的頻率已經顯著地大於控制組 ($p < 0.05$; 表四)。

來自尼古丁之亞硝胺 4-(metylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-buranone (NNK)是一種致癌物，會導致大白鼠、小白鼠及倉鼠產生腫瘤，而 NNK 致癌的主要因為，NNK 會與細胞中之 DNA 產生鍵結，NNK 經過酵素代謝過後，會使 V79 細胞 SCE 頻率有 dose-dependent 的現象 (Zimonjic et al., 1989)，Alaoui-Jamali 等(1991)也發現，NNK 在有 vitamin A 存在下，可以使 V79 細胞 SCE 及單股 DNA 斷裂頻率下降，由此可知，亞硝胺對細胞造成傷害主要是因為其造成 DNA 斷裂或與之鍵結所致，NG 為一種亞硝胺，且由本實驗結果顯示，NG 可能也具有相似的傷



圖六、 *N*-nitrosoguvacoline 造成 CHO 細胞染色體變異
(between arms)之情形

Fig. 6 The chromosome aberration (between arms of chroma-
tid) in CHO cells induced by *N*-nitrosoguvacoline



圖七、 *N*-nitrosoguvacoline 造成 CHO 細胞染色體變異(gap)
之情形

Fig. 7 The chromosome aberration (gap of chromatid) in CHO
cells induced by *N*-nitrosoguvacoline

表四、 *N*-nitrosoguvacoline 對中國倉鼠卵巢細胞之姊妹染色體交換頻率之影響

Table 4. Sister-chromatid exchange (SCE) frequencies of CHO cells exposure to *N*-nitrosoguvacoline

<i>Conc.</i> (<i>ug/ml</i>)	SCEs/metaphase*
Control	7.25 ± 0.16 ^c
0.01	7.08 ± 0.34 ^c
0.1	8.35 ± 0.59 ^b
1	8.41 ± 0.38 ^b
10	9.27 ± 0.72 ^b
100	10.91 ± 0.66 ^a

*Data are means ± SD of three plates

Data bearing different superscript letters were significantly different ($p < 0.05$)

害。

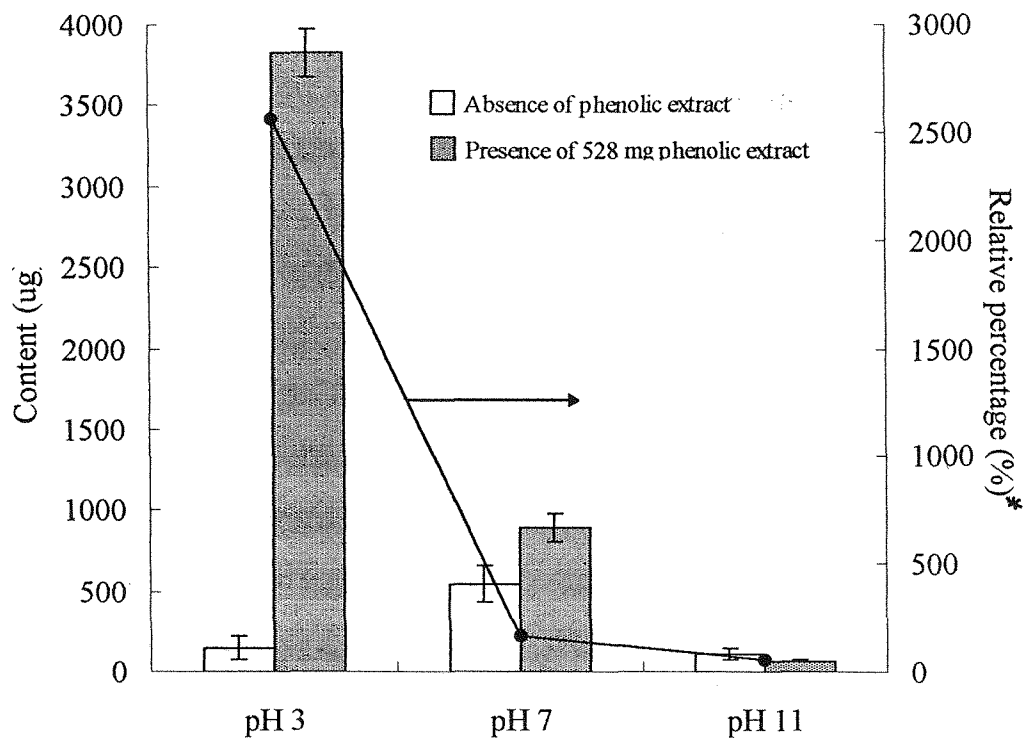
若比對 Wang and Peng (1996)之研究結果可發現，NG 不論對細胞或細菌皆有相同趨勢，因而可更確認 NG 是具有基因毒性的。

三、 檳榔果實酚類化合物粗萃物對 NG 生成的影響

由於 NG 為本省檳榔嚼汁中僅被發現之亞硝酸(Stich et al., 1986)，且 Wang and Peng (1996)發現，高量(528 mg)的檳榔果實酚類化合物粗萃物對 NG 生成有促進效果，故將針對其促進生成之作用作進一步探討，又因本省檳榔嚼塊中有消石灰存在，所以本研究擬先針對酸鹼值對 NG 生成的影響進行探討。

(一) 酸鹼環境對 NG 生成之影響

由於亞硝化反應之進行深受反應過程酸鹼環境之影響，因此本研究以酸性(pH 3, 仿胃部)、中性(pH 7, 仿唾液)及鹼性(pH 11, 仿消石灰)等酸鹼環境探討 NG 之生成，結果如圖八所示，有高量(528 mg)的檳榔果實酚類化合物粗萃物存在時，以 pH 3 生成之 NG 量為最多，pH 7 次之，pH 11 的生成量為最少，但如與 Wang and Peng (1996)的結果加以比較則可發現，有粗萃物存在時，在 pH 3 緩衝液環境下 NG 的生成量，約為無粗萃物存在時之 28 倍，而 pH 7 條件下則為 2 倍，此原因可能是因為在酸性條件 (pH1.0-4.5)下，比較有利於 phenol 的 nitrosation 發生(Challis, 1973)，進而有利亞硝酸胺之生成(Kodama et al., 1976)；



圖八、 Arecoline hydrobromide, 亞硝酸鈉與檳榔果實中酚類化合物粗萃物於 pH3, 7, 11 環境下亞硝化反應後 *N*-nitrosoguvacoline 之生成量

Fig. 8 The contents of *N*-nitrosoguvacoline after the nitrosation of arecoline hydrobromide, sodium nitrite in the absence or presence of crude phenolic extract from areca fruit under pH3, 7, 11 conditions

* [(The contents generated after the nitrosation in the presence of crude phenolic extract from areca fruit / (the contents generated after the nitrosation in the absence of crude phenolic extract from areca fruit))] × 100%

Steenkamp et al., 1989 ; Wary and Sharan, 1992), 由此結果可推測 nitrosation 之反應可能因酚類化合物粗萃物存在而較易進行。

(二) 高量檳榔果實酚類化合物粗萃物對促進 NG 生成之探討

由上述可知，酚類化合物粗萃物在酸性環境下(pH 3), 產生 NG 的量最多，但因本省檳榔嚼塊中攙有消石灰，經嚼食後其 pH 值約在 7-10 間，故探討酚類化合物粗萃物對促進 NG 之生成仍以 pH 7 的條件來進行。

Challis (1973)發現，有 phenol 存在時，phenol 與 nitrite 的反應速率遠快於 nitrite 與 amine 反應生成二級胺的速率。此外，有催化劑的存在會促進產量的增加。因此，檳榔果實酚類化合物粗萃物促進 NG 生成的原因可能有兩個，(1) phenol 扮演一個催化劑的角色，(2) 在反應的過程中 phenol 和 sodium nitrite 形成一中間產物，此中間產物有利於 NG 的生成。依此兩種原因，故將實驗分成兩大方向進行，(1) sodium nitrite 與 arecoline hydrobromide 先一起反應，反應經過一、二及三天後，再添加粗萃物反應三、二及一天，當整個反應時間為四天時，終止反應，進行 NG 生成量測定，看 phenol 是否扮演催化劑的角色；(2) sodium nitrite 與檳榔果實酚類化合物粗萃物先一起反應，反應經過一、二及三天後，再添加 arecoline hydrobromide 反應三、二及一天，當整個反應時間為四天時，終止反應，進行 NG 生成量測定，看是否因中間產物的生成而使 NG 生成量增加。由表五的結果可知，第一組反應之 NG 生成量有

表五、高量檳榔果實酚類化合物粗萃物對 *N*-nitrosoguvacoline 生成之影響

Table 5. Effect of high levels of crude phenolic extract from areca fruit on the formation of *N*-nitrosoguvacoline

Interval of addition (days)	<i>N</i> -nitrosoguvacoline (μg)	
	Are+NaNO ₂ (initial)	Phe+NaNO ₂ (initial)
	Phe (addition)	Are (addition)
0	892.21 \pm 83.31 ^c	892.21 \pm 83.31 ^a
1	1344.13 \pm 157.65 ^b	614.85 \pm 61.93 ^b
2	1970.43 \pm 30.59 ^a	339.83 \pm 18.81 ^c
3	1781.72 \pm 180.74 ^a	239.82 \pm 44.78 ^d
Control	219.75 \pm 71.27 ^d	219.75 \pm 71.27 ^e

Values were expressed as mean \pm SD (n=3)

Are means arecoline hydrobromide

Phe means crude phenolic extract from areca fruit

Control means reaction of sodium nitrite and arecoline hydrobromide for 4 days

0 means reaction of sodium nitrite, arecoline hydrobromide and crude phenolic extract for 4 days

1, 2, 3 means phe (Are) was added into the reacting mixture of Are + NaNO₂ (or phe + NaNO₂) after the incubation of Are + NaNO₂ for 1, 2, 3 days

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

隨粗萃物慢添加而有越多的趨勢，此顯示酚類化合物粗萃物並非扮演催化劑之角色，而第二組 NG 的生成量則越來越少，但如與圖十一的 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 反應所得的結果來比較，NG 生成量同樣也是有增加的趨勢，依此兩個結果推測，在反應過程中，檳榔果實酚類化合物粗萃物的加入，可能在極短時間內與 nitrite 生成一中間產物，此中間產物有利於 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 之 nitrosation 反應。

四、*p*-Nitrosophenol 對 NG 生成之影響

Challis (1973) 研究顯示，雖然 phenol 會促進 nitrosodiethylamine 生成，但要視 phenol 和 nitrite 之間相關的濃度而定。phenol 會以很快的速度和 nitrite 反應生成 *p*-nitrosophenol，而 *p*-nitrosophenol derivative 可能是一個比 phenol 本身更具有 nitrosation 反應的物質。由三、(二)可知，檳榔果實酚類化合物粗萃物與 sodium nitrite 反應生成 nitrosyl 酚類化合物會促進 NG 生成，但因檳榔果實中酚類化合物組成極為複雜，難以測定其 nitrosyl 酚類化合物，為了更進一步探討，故本研究以商品 *p*-nitrosophenol 進行試驗，探討 *p*-nitrosophenol 是如何促進 NG 生成，首先，探討 *p*-nitrosophenol 在何種濃度下對 NG 有最大的促進效果。

(一)*p*-Nitrosophenol 之添加量對 NG 生成之影響

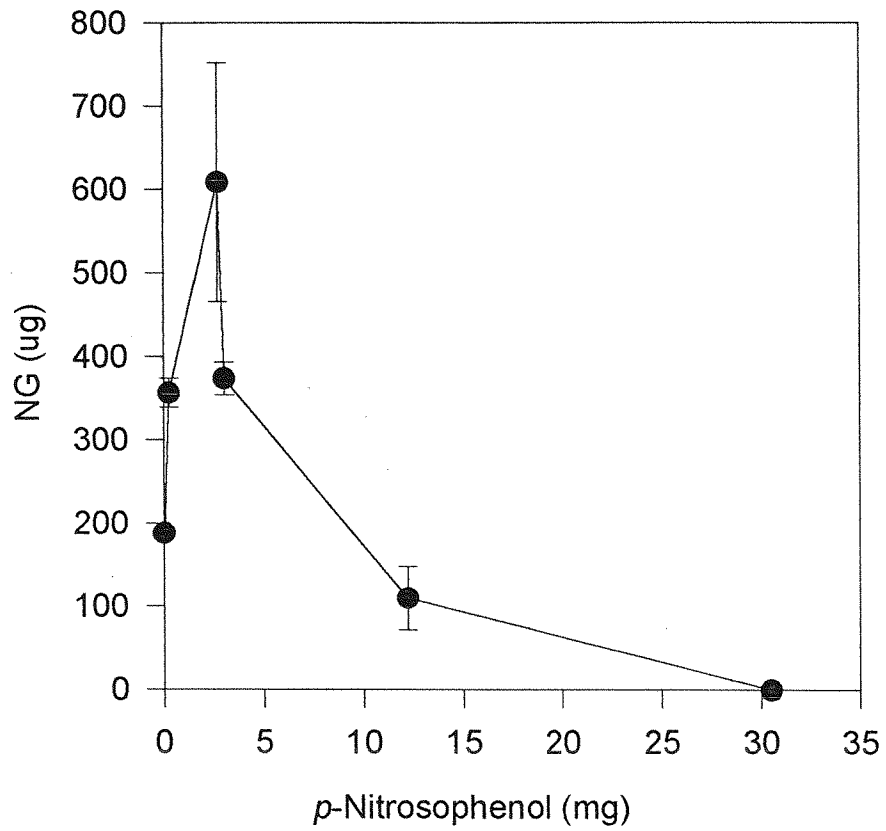
依照 Wang and Peng (1996) 的方法，以 sodium nitrite

的莫耳數為主，換算成 *p*-nitrosophenol 的克數進行實驗，結果(圖九)發現，當 *p*-nitrosophenol 的添加量為 2.74 mg (2.2×10^{-2} mmol) 時，對 NG 生成量有最大的促進效果，但其促進的效果並沒有檳榔果實酚類化合物粗萃物來的好，可能是因為粗萃物中含的酚類化合物種類極多，而其中有些酚類化合物的促進 NG 生成之效果比 *p*-nitrosophenol 好，故使得其促進 NG 生成的效果比 *p*-nitrosophenol 來的高。且發現添加量愈多時，對 NG 生成則有抑制的效果，這可能是因為大量的 *p*-nitrosophenol 存在時，對 nitrosation 反應反而有抑制作用，或生成之 NG 又轉化成其他成份所致。

(二) *p*-Nitrosophenol 對 NG 生成之影響

依照三、(二)的方法進行實驗，結果(表六)發現，*p*-nitrosophenol 越慢添加時，NG 生成量隨之增加，arecoline hydrobromide 後加時，而 NG 生成量同樣會隨 arecoline hydrobromide 愈慢添加有愈少之趨勢，而此結果所呈現出之趨勢與粗萃物之影響相似，故可進一步推測，檳榔果實酚類化合物粗萃物與 sodium nitrite 進行反應時，很可能是生成一種 nitrosyl 酚類化合物，而進一步促進 NG 的生成。Walker 等(1979)指出 *p*-nitrosophenol 與 nitrite 反應，nitrite 提供 NO 至 *p*-nitrosophenol 而生成另一產物，此產物和胺類物質反應時，會將來自 nitrite 之 NO 送出，而使 nitrosation 的反應在短時間內完成(圖十)。

為進一步確認 nitrosyl 酚類化合物為 NG 生成量之重要中間產物，我們分別以 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 以及 arecoline hydrobromide、sodium nitrite 與 *p*-



圖九、 *p*-Nitrosophenol 之添加對 *N*-nitrosoguvacoline 生成之影響

Fig. 9 Effect of additional *p*-nitrosophenol on the formation of *N*-nitrosoguvacoline under pH7 condition

表六、 *p*-Nitrosophenol 對 *N*-nitrosoguvacoline 生成之影響
 Table 6. Effect of *p*-nitrosophenol (2.74 mg) on the formation of *N*-nitrosoguvacoline under pH 7 condition

Interval of addition (days)	<i>N</i> -nitrosoguvacoline (ug)	
	Are+NaNO ₂ (initial)	<i>p</i> -phe+NaNO ₂ (initial)
	<i>p</i> -phe (addition)	Are (addition)
0	608.36 ± 143.48 ^d	608.36 ± 143.48 ^a
1	1022.01 ± 35.66 ^c	456.89 ± 121.81 ^a
2	2502.80 ± 90.60 ^a	214.01 ± 78.23 ^b
3	2033.88 ± 184.78 ^b	42.28 ± 2.73 ^c
Control	219.75 ± 71.27 ^e	219.75 ± 71.27 ^b

Values were expressed as mean ± SD (n=3)

Are means arecoline hydrobromide

p-Phe means *p*-nitrosophenol

Control means reaction of sodium nitrite and arecoline hydrobromide for 4 days

0 means reaction of sodium nitrite, arecoline hydrobromide and *p*-nitrosophenol for 4 days

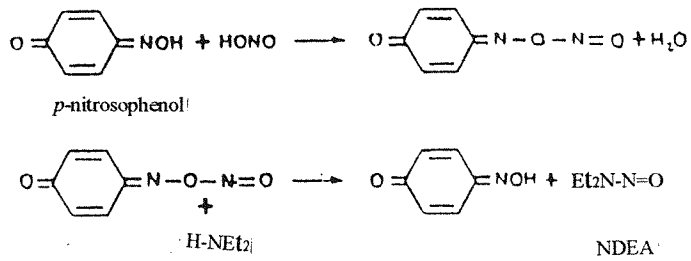
1, 2, 3 means *p*-Phe (Are) were added into the mixture of Are+ NaNO₂ (or *p*-Phe +NaNO₂) after the incubation of Are+ NaNO₂ for 1, 2, 3 days

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

Arecoline hydrobromide = 0.375 g (1.59 mmol)

Sodium nitrite = 0.153 g (2.22 mmol)

p-Nitrosophenol = 2.74 mg (2.2×10^{-2} mmol)

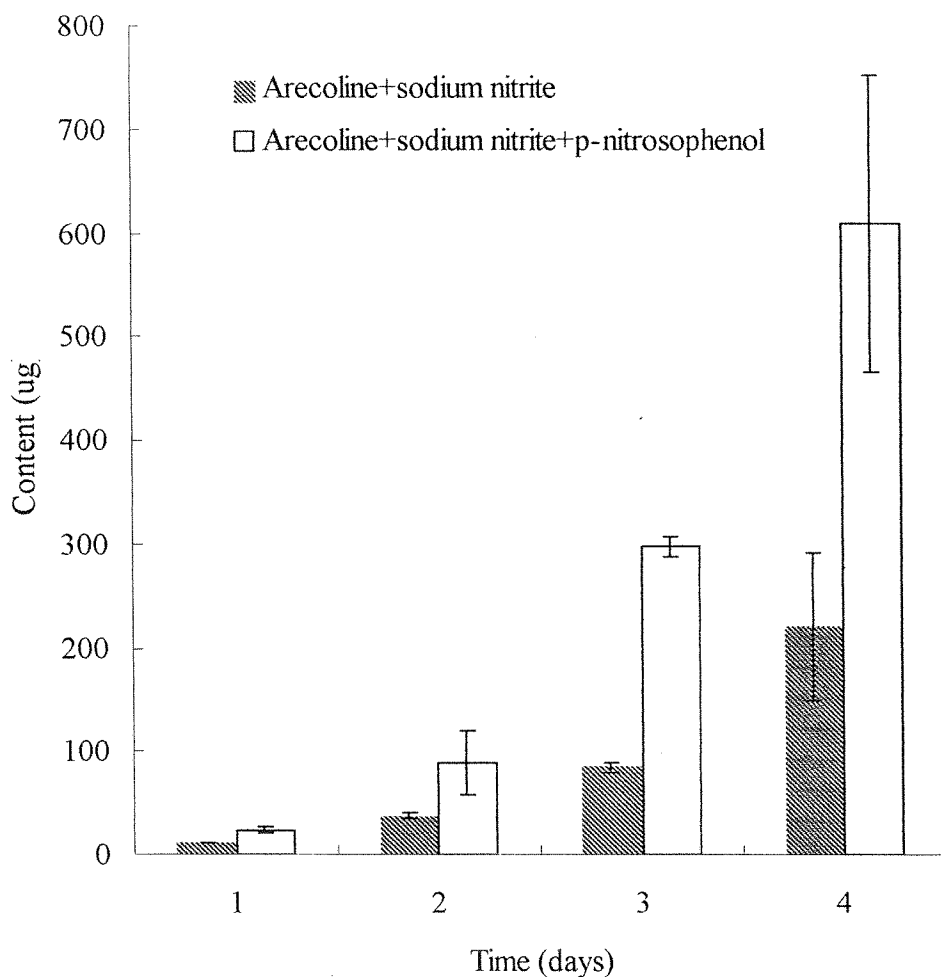


圖十、 *p*-Nitrosophenol 與亞硝酸之反應機制

Fig. 10 A mechanism of reaction of *p*-nitrosophenol and sodium nitrite (Walker et al., 1979)

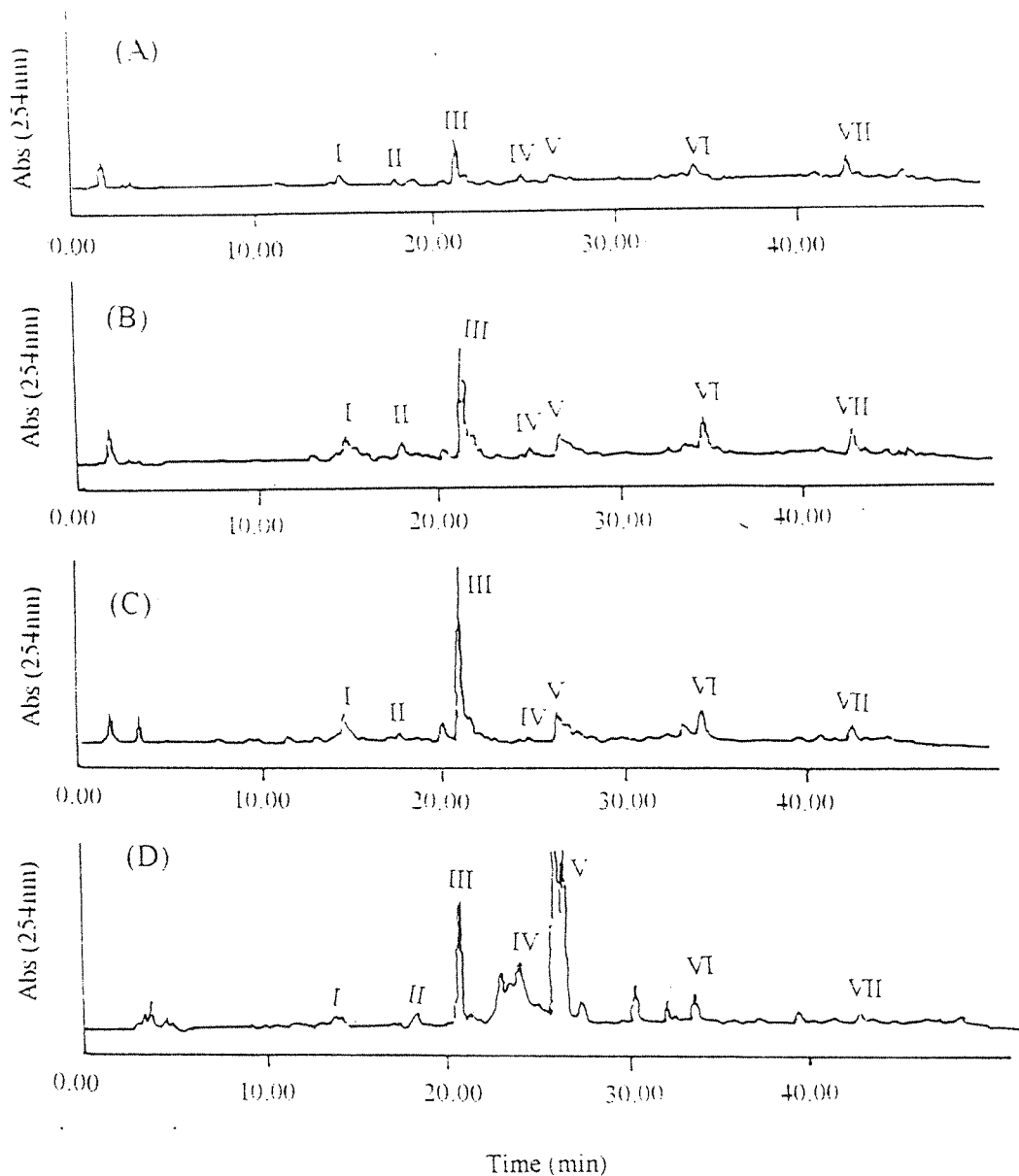
nitrosophenol 分別反應一天、兩天、三天及四天，測定其 NG 生成量，結果如圖十一所示，有 *p*-nitrosophenol 存在時，其 NG 含量遠高於 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 兩者之反應組，且反應時間越久有添加 *p*-nitrosophenol 者之 NG 產量高出許多。我們亦可由此二組反應產物之高效能液相層析圖發現，由圖十二(A)、(B)、(C)、(D) 可知，當 arecoline hydrobromide 及 sodium nitrite 反應時，除了 peak III 及 peak V 有隨時間增加而有變大的趨勢以外，其餘在 254 nm 有吸收之物質皆有隨時間增加而減少(以波峰面積之比例計算之)，由 arecoline hydrobromide、sodium nitrite 及 *p*-nitrosophenol 一起反應之層析圖(圖十三)可知，在 254 nm 有吸收之其他非 NG 物質相較於 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 之反應結果(圖十二)含量有明顯的減少，其中又以 peak VI 及 VII 減少的最明顯。因此可以證實，檳榔果實酚類化合物粗萃物促進 NG 生成的原因，可能是因為中間產物 nitrosyl 酚類化合物的生成所致，或是此化合物會促使 NG 合成過程中的一些中間物變成 NG，因而促使 NG 的生成量增加。

此外我們在表五及表六發現 *p*-nitrosophenol (crude phenolic extract) 後加的這組中，*p*-nitrosophenol (crude phenolic extract) 與 arecoline hydrobromide 及 sodium nitrite 已反應兩天、三天之混合物再一起反應二、一天，NG 生成量顯著提高，我們認為可能是此一 nitrosyl 酚類化合物會使 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 已反應兩天、三天之混合物中的一些中間物變成 NG，因為我們在 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 在不同反應天數(一、二、三及四天)之產物的高效能液相層析圖(圖十二)、



圖十一、 Arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 以及 arecoline hydrobromide 、 sodium nitrite 與 *p*-nitrosophenol 分別反應不同時間之 *N*-nitrosoguvacoline 產量

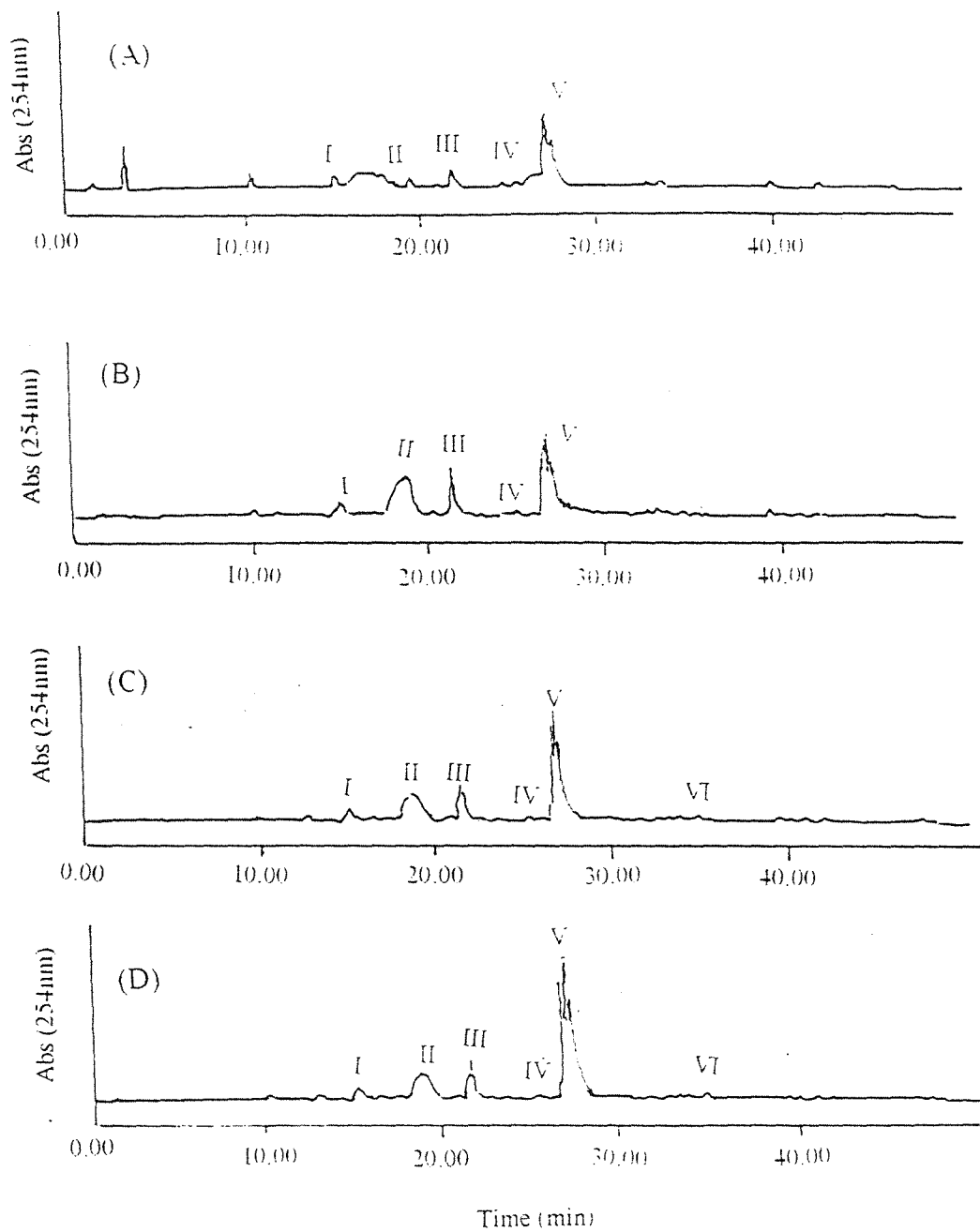
Fig. 11 The contents of *N*-nitrosoguvacoline generated by the mixture of arecoline hydrobromide and sodium nitrite and mixture of arecoline hydrobromid, sodium nitrite and *p*-nitrosophenol for various time under pH 7 condition



圖十二、 Arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 不同之反應時間(天)產物
 的高效能液相層析圖

Fig. 12 High performance liquid chromatogram of products obtained from the
 reaction of arecoline hydrobromide and sodium nitrite for various time

A, B, C and D mean reaction of sodium nitrite and arecoline hydrobromide for 1, 2, 3
 and 4 days



圖十三、 Arecoline hydrobromide、sodium nitrite 與 *p*-nitrosophenol 不同之反應時間(天)產物的高效能液相層析圖

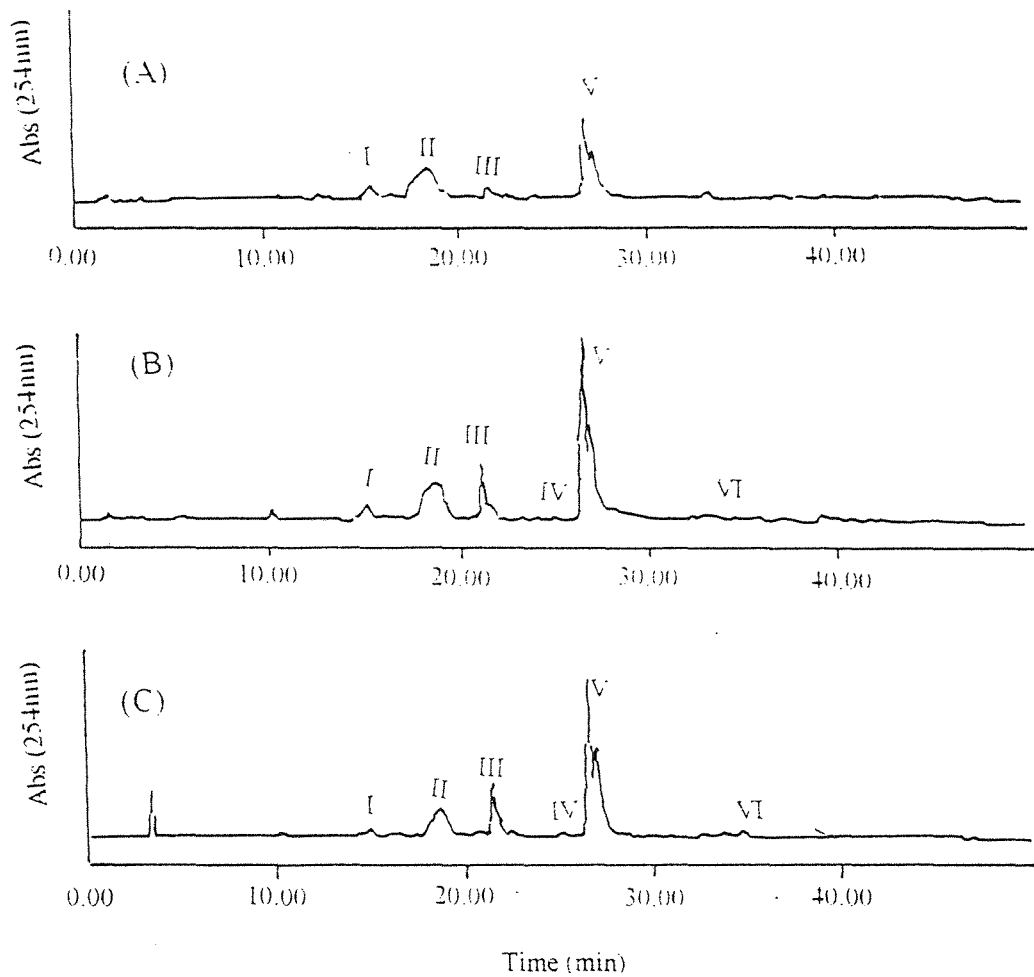
Fig. 13 High performance liquid chromatogram of products obtained from the reaction of arecoline hydrobromide, sodium nitrite and *p*-nitrosophenol for various time

A, B, C and D mean reaction of sodium nitrite, arecoline hydrobromide and *p*-nitrosophenol for 1, 2, 3 and 4 days

以及加入 *p*-nitrosophenol 與 arecoline hydrobromide 及 sodium nitrite 已反應一天、兩天、三天之混合物再一起反應三、二、一天之產物的高效能液相層析圖(圖十四)，相互比較可發現，當 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 反應一天後(圖十二(A))，其在 254 nm 有吸收之物質與 NG 含量皆少於此兩者反應四天(圖十一(D))的量，而由圖十二(D)與圖十四(A)則可發現，圖十四(A)在 254 nm 有吸收之物質除 NG 外波峰吸收皆少於圖十二(D)者，其中又以圖十四(A)中之 peak IV、peak VI 及 peak VII 減少得最明顯，同樣地，我們發現圖十二(B)中，在 254 nm 有吸光之物質的波峰吸收皆較圖十二(A)高，若再配合比較圖十四(B)、圖十二(B)及圖十二(D)之結果，可發現 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 反應一天後，在 254 nm 有吸收之非 NG 物質，當 *p*-nitrosophenol 加入再反應三天後大多都不存在。同樣地，由圖十二(C)、圖十二(D)及圖十四(C)亦有相同之發現，由此可推論，arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 反應一天、二天或三天後加入 *p*-nitrosophenol 一起反應可以使 NG 之生成量較三者一起反應四天者高，這可能是 nitrosyl 酚類化合物會促使 NG 合成過程中所產生的一些非 NG 中間物變成 NG。

(三) *p*-Nitrosophenol 安定性對 NG 生成之影響

因為 arecoline hydrobromide 先與 sodium nitrite 反應一、二、三天後，依序加入 *p*-nitrosophenol，其 NG 生成量會隨時間越慢添加而有增加的趨勢，但其產量最高時卻是在 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 反應兩天之



圖十四、 Arecoline hydrobromide、sodium nitrite 反應數天再加入 *p*-nitrosophenol 進行反應的高效能液相層析圖

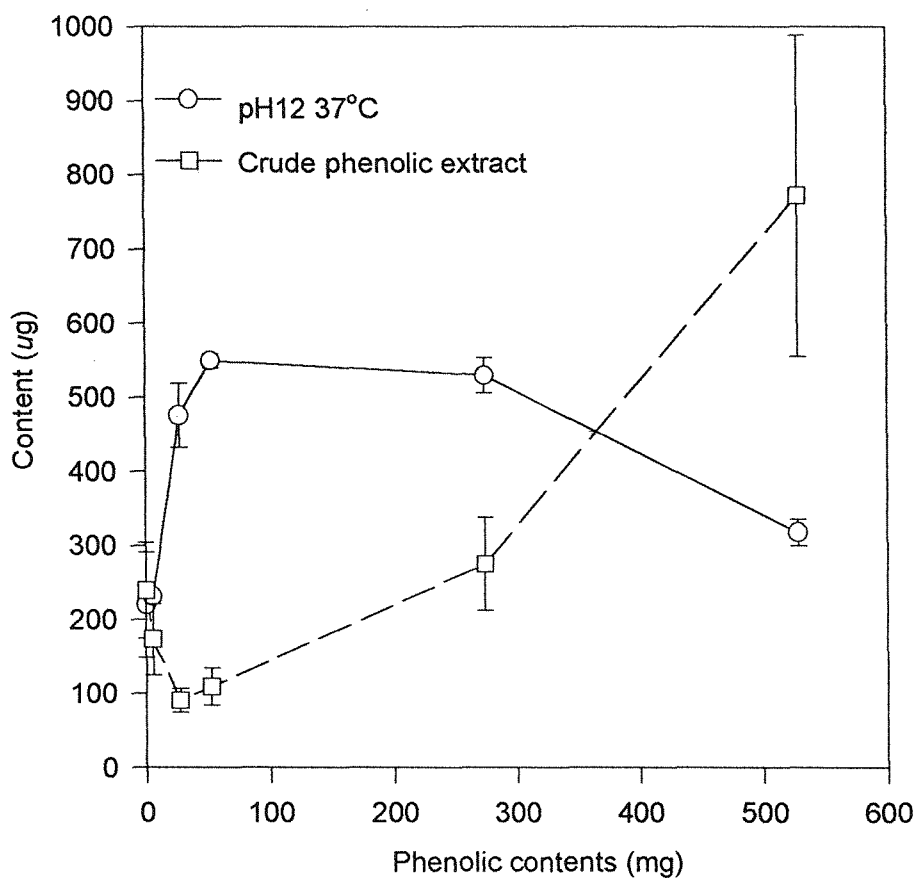
Fig. 14 High performance liquid chromatogram of products obtained from the reaction of *p*-nitrosophenol were added into the mixture of Arecoline hydrobromide and sodium nitrite for various time

A, B and C mean *p*-nitrosophenol were added into the mixture of Arecolin hydrobromide and sodium nitrite after the incubation of Arecolin hydrobromide and sodium nitrite for 1, 2, 3 days

混合物在加入 *p*-nitrosophenol 反應兩天後，故推測是否因 *p*-nitrosophenol 本身安定性不夠所造成的，因而先將 *p*-nitrosophenol 置於反應系統中一、二、三天後，再同時加入 arecoline hydrobromide 及 sodium nitrite 進行反應，與圖十之 arecoline hydrobromide、sodium nitrite 及 *p*-nitrosophenol 這組當控制組比較發現，*p*-nitrosophenol 在反應經過三天後再加入 sodium nitrite 與 arecoline hydrobromide 反應，其 NG 生成量與控制組僅反應一天的量相似(data not show)，因此可確定 *p*-nitrosophenol 是一安定性之物質，故在 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 反應兩天之混合物再加入 *p*-nitrosophenol 反應兩天後有最高產量無關。

五、檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後對 NG 生成之影響

因為本省檳榔嚼塊中含有消石灰，且咀嚼檳榔時口腔的溫度為 37℃，故於檳榔果實酚類化合物粗萃物中加入 Ca(OH)₂，在 37℃ 下加熱 30 分鐘後，取其水層產物，探討檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後對於 NG 生成之影響。結果如圖十五所示，NG 的生成隨經鹼處理後之產物劑量(0-75 mg)的增加而有提高的趨勢，但添加量在 75-280 mg 間對 NG 生成量並無增加之作用，甚至添加量達 528 mg 時，反而使 NG 生成量減少。與 Wang and Peng (1996) 檳榔果實酚類化合物粗萃物對 NG 生成之影響互相比較時，可以明顯的發現，經鹼處理後之產物，在劑量低於 300



圖十五、檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物 (Ca(OH)₂, pH12, 37 °C, 30 min) 對 *N*-nitrosoguvacoline 生成之影響

Fig. 15 Effect of the aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment (Ca(OH)₂, pH12, 37 °C, 30 min) on the formation of *N*-nitrosoguvacoline

□ Data from the crude phenolic extract of areca fruit were obtained from Wang and Peng (1996)

mg 時，其 NG 之生成量，比檳榔果實酚類化合物粗萃物高出許多，但如達到 528 mg 時，經鹼處理者 NG 產量則低了許多。Constable 等(1996)針對茶包進行研究發現，其萃出物不但有抗突變性、抗氧化性，同時也可抑制 nitro-sation 反應的發生，而 Wu 等(1993)探索發現，中國茶不論是 *in vivo* 或 *in vitro* 皆有抑制 *N*-nitrosation 的效果，因茶的酚類化合物在發酵過程會產生氧化反應，而檳榔果實酚類化合物粗萃物在經鹼處理的過程中，同樣也是一種氧化作用，所以檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層物質可能也應有同樣之效果。但為何經鹼處理後在低劑量時，會使 NG 產量明顯增高，而高劑量，反而使 NG 生成減少，是否是結構上發生變化所致有待更進一步的探討。

六、檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後水層產物生物活性之探討

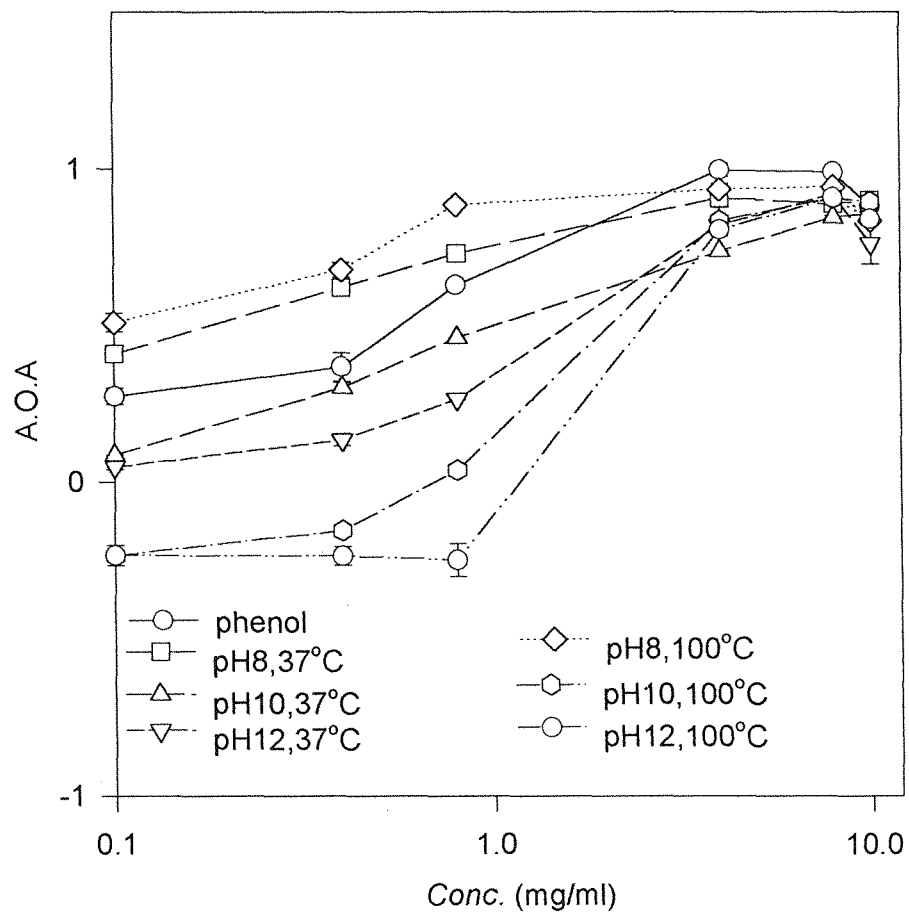
近幾年，茶已被發現具有抗氧化性(Yen and Chen, 1995)、抗突變性(Kada et al., 1985; Yen and Chen, 1994; 1995)和抗癌性(Katiyar et al., 1992)。Kada 等(1985)研究發現，綠茶中有抗突變的物質為 epigallocatechin gallate (EGCG)，Katiyar 等(1992)也發現茶葉中含有豐富的酚類化合物。由於檳榔果實中含有多量的酚類化合物，本研究室已發現檳榔果實酚類化合物粗萃物及其區分物具有抗氧化性及抗突變效果(Wang and Lee, 1996)，但本省檳榔嚼塊多會加入消石灰且吳(1997)及曾(1997)已發現檳榔果實

酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物具有除口臭效果，但不知其生物活性為何？故本研究擬將針對檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理(氫氧化鈣)後之水層產物，進行抗氧化評估，再利用細菌系統的突變性試驗、細胞增生試驗、姊妹染色分體交換及染色體變異來探討其生物活性。

(一)抗氧化性

檳榔果實酚類化合物粗萃物經各種不同條件鹼處理後水層產物，在高劑量時對亞麻油酸之氧化皆有抑制效果，且呈 dose-dependent 的效應(圖十六)。當濃度為 0.1 mg/ml 時，抗氧化效果以 pH8 100 °C 處理組最好，依次依序為 pH8 37 °C、粗萃物、pH10 37 °C 及 pH12 37 °C，而 pH10 100 °C 及 pH12 100 °C 處理組則無抗氧化的效果，甚至有促氧化的作用；pH10 100 °C 處理組之濃度必須在 0.8 mg/ml 以上時，才有抗氧化性存在，pH12 100 °C 則須在 4 mg/ml 時才有抗氧化性；當濃度 ≤ 1 mg/ml 時，pH8 100 °C 處理組最具有抗氧化效果；而所有樣品在濃度 ≥ 2 mg/ml 時，對亞麻油酸之氧化抑制已高達 70 % 以上，其中又以粗萃物的效果最好。

Mathew 等(1969)發現檳榔果實中酚類化合物為不同聚合程度的 proanthocyanidin、單體(+)-catechin、(+)-leucocyanidin 及(-)-epicatechin，而(+)-catechin 已被發現具有抗氧化性(Nagabhushan and Bhide, 1988)，Yen and Chen (1995)以不同發效程度的茶進行抗氧化試驗發現，半發酵茶(烏龍茶)抗氧化的效果最好，可抑制 73.6 % linoleic acid



圖十六、檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後水層產物之抗氧化性

Fig. 16 Antioxidative activities of the aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment

的過氧化情形，接下來分別為未發酵茶及發酵茶。茶在發效過程中，其酚類化合物有不同的氧化聚合程度，而本實驗中檳榔果實酚類化合物粗萃物經不同條件鹼處理後，其酚類化合物同樣也產生不同的氧化聚合反應，或許因為此原因，而使得經不同處理所得產物之抗氧化性有所不同。一些研究發現(Yen and Chen, 1995; Wang and Lee, 1996)，抗氧化性與抗突變性有相關性存在，因此本研究將繼續探討檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後水層產物是否有同樣有抗突變性存在。

(二)誘突變性

口腔癌是印度主要的癌症之一，約佔所有癌症的 40%，這與當地人嗜嚼含有煙草的檳榔嚼塊有關(Shirname et al., 1983)，Shirname 等(1983)發現，檳榔嚼塊、含煙草檳榔嚼塊及檳榔子之水草物對 *Salmonella typhimurium* TA100 皆有誘突變性存在，檳榔中主要之植物鹼 arecoline 及 arecaidine 對 *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98 及 TA1538 皆有誘突變性。但蘇(1996)則發現，不論有無添加 S9 之檳榔嚼塊水草取物皆不會誘使 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100 發生突變。臺灣罹患口腔癌的比例低於其它有嚼食檳榔的國家，可能是因本省檳榔嚼塊習用新鮮檳榔果實或是加入之配料(荖花、荖葉及消石灰)不同於其它國家的檳榔嚼塊，過去本研究室已針對檳榔果實酚類化合物之生物活性加以探討，但消石灰對酚類化合物粗萃物生物活性之影響卻未曾了解，因此本研

究將先針對檳榔果實之酚類化合物粗萃物經鹼處理後水層產物，以 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100 進行誘突變性探討。

結果如表七與表八所示，不論有無 S9 存在，*Salmonella typhimurium* TA98、TA100 之返突變菌落與自然返突變菌落數的比值均沒有大於或等於二，且返突變菌落數與樣品添加量亦無正相關，顯示樣品並無誘突變性。

Wang and Lee (1996)以檳榔果實酚類化合物粗萃物及其 condensed tannin, noncondensed tannin 區分物進行研究發現，皆不會引發 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100 的誘突變，同時可對誘突變物引發的突變效果加以抑制，尤其在 S9 存在下抑制效果更好。楊(1991)亦發現蒸餾水、95%乙醇或氯仿萃取檳榔果實，所得之萃取物，不論在有無 S9 添加下，對 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100 皆無誘突變性。本研究結果與上述結果相符，此顯示檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後，雖然已有氧化聚合的反應發生(曾, 1997)，但仍不具有誘突變性。

(三) 對誘突變劑之影響

因上述結果可知，檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物不具誘突變性，故繼續探討其對誘突變劑之影響。本研究首先採用不須 S9 之標準誘突變劑 MNNG(亞硝酸誘突變物)進行試驗(Mandell and Greenberg, 1960)。表九為檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水

表七、 檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物的誘突變性

Table 7. Mutagenic activities of the aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment in *Salmonella typhimurium* TA98

Amount per plate (mg)	His ⁺ revertant count per plate	
	-S9	+S9
pH8 37 °C		
Spontaneous revertants	42 ± 6	36 ± 2
0.001	36 ± 6	46 ± 13
0.1	40 ± 3	49 ± 1
1	37 ± 3	54 ± 6
5	42 ± 4	39 ± 1
pH8 100 °C		
Spontaneous revertants	35 ± 1	61 ± 7
0.001	42 ± 3	67 ± 4
0.1	37 ± 3	57 ± 5
1	33 ± 0	49 ± 1
5	30 ± 2	52 ± 2
pH10 37 °C		
Spontaneous revertants	33 ± 2	36 ± 2
0.001	39 ± 5	46 ± 13
0.1	45 ± 6	50 ± 1
1	43 ± 2	54 ± 6
5	45 ± 3	39 ± 1
pH10 100 °C		
Spontaneous revertants	39 ± 4	53 ± 6
0.001	44 ± 4	52 ± 1
0.1	51 ± 1	42 ± 2
1	41 ± 0	44 ± 7
5	38 ± 2	47 ± 4
pH12 37 °C		
Spontaneous revertants	36 ± 8	36 ± 2
0.001	32 ± 8	46 ± 13
0.1	31 ± 2	50 ± 1
1	36 ± 7	54 ± 7
5	35 ± 2	39 ± 1
pH12 100 °C		
Spontaneous revertants	34 ± 1	40 ± 3
0.001	37 ± 2	47 ± 2
0.1	37 ± 6	43 ± 5
1	32 ± 3	57 ± 0
5	35 ± 1	45 ± 2

表八、 檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物的誘突變性

Table 8. Mutagenic activities of the aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment in *Salmonella typhimurium* TA100

Amount per plate (mg)	His ⁺ revertant count per plate	
	-S9	+S9
pH8 37 °C		
Spontaneous revertants	196 ± 13	185 ± 1
0.001	199 ± 1	201 ± 6
0.1	196 ± 11	197 ± 13
1	189 ± 7	190 ± 6
5	187 ± 5	168 ± 11
pH8 100 °C		
Spontaneous revertants	211 ± 13	181 ± 18
0.001	178 ± 4	203 ± 14
0.1	206 ± 35	184 ± 19
1	198 ± 8	198 ± 7
5	212 ± 7	212 ± 7
pH10 37 °C		
Spontaneous revertants	176 ± 14	145 ± 0
0.001	177 ± 13	148 ± 1
0.1	200 ± 8	158 ± 11
1	162 ± 11	145 ± 4
5	216 ± 22	176 ± 4
pH10 100 °C		
Spontaneous revertants	222 ± 13	206 ± 11
0.001	212 ± 1	226 ± 8
0.1	232 ± 1	223 ± 1
1	218 ± 1	217 ± 5
5	192 ± 6	204 ± 4
pH12 37 °C		
Spontaneous revertants	174 ± 11	125 ± 7
0.001	178 ± 21	141 ± 6
0.1	174 ± 3	141 ± 3
1	196 ± 13	154 ± 15
5	197 ± 23	174 ± 10
pH12 100 °C		
Spontaneous revertants	212 ± 3	175 ± 14
0.001	292 ± 18	189 ± 9
0.1	205 ± 0	180 ± 10
1	188 ± 14	163 ± 4
5	201 ± 4	186 ± 3

表九、檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後水層產物
對 MNNG 誘突變性的影響

Table 9. Effect of the aqueous phase from crude phenolic
extract of areca fruit after alkaline treatment on the
activity of MNNG toward *Salmonella typhimurium*
TA 100 in the absence of S9 mixture

Amount per plate (mg)	His ⁺ revertant count per plate
pH8 37 °C	
Control	1578 ± 80
0.001	1707 ± 85
0.1	1772 ± 2
1	2349 ± 0
5	2788 ± 6
pH8 100 °C	
Control	1642 ± 10
0.001	1268 ± 76
0.1	2134 ± 135
1	2847 ± 105
5	4167 ± 392
pH10 37 °C	
Control	1601 ± 125
0.001	1954 ± 78
0.1	2217 ± 135
1	2924 ± 98
5	6297 ± 147
pH10 100 °C	
Control	1670 ± 88
0.001	1328 ± 118
0.1	1272 ± 75
1	2335 ± 128
5	2612 ± 184
pH12 37 °C	
Control	1630 ± 8
0.001	1638 ± 122
0.1	1597 ± 3
1	1592 ± 34
5	3639 ± 275
pH12 100 °C	
Control	1621 ± 59
0.001	1947 ± 9
0.1	1822 ± 30
1	2501 ± 30
5	3374 ± 166

層產物對 MNNG 誘突變性之影響，結果顯示，所有處理組在較高量時，皆會誘使 MNNG 的誘突變性增加。接著採用經 S9 代謝後對 *Salmonella typhimurium* TA98 及 TA100 具有高度誘突變性的標準誘突變劑 IQ(熱衍生誘突變物)進行試驗(Naga et al., 1981; Smith et al., 1992)。由表十可知，pH8 37°C、pH8 100°C、pH10 37°C、pH12 37°C 及 pH12 100°C 處理組在高量(5mg/plate)時，對於 IQ 誘發 TA98 之突變有抑制效果，其中 pH8 37°C、pH8 100°C 及 pH12 37°C 處理組具有 50% 以上之抑制能力；而 pH10 100°C 處理組則無抑制效果。此外，pH8 37°C、pH8 100°C 及 pH12 100°C 處理組在高量(5mg/plate)時，對於 IQ 誘發 TA100 之突變有抑制效果，而 pH10 37°C、pH10 100°C 及 pH12 37°C 處理組則無抑制效果，綜合此六種樣品對 IQ 誘發 TA98 及 TA100 發生突變之影響可知，pH8 37°C、pH8 100°C 及 pH12 100°C 三者對 IQ 誘發 TA98 及 TA100 之突變皆有抑制的效果，pH10 100°C 則對此二者皆無抑制效果。因此可知，檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物未經酵素代謝前，對於 MNNG 類之誘突變劑有促進其突變的效果，但經過酵素代謝後，大部份產物對誘突變劑具有抑制作用。

Wang and Lee (1996) 發現，檳榔果實酚類化合物粗萃物及其 condensed tannin 及 non-condensed tannin 區分物，皆可對誘突變劑 MNNG 及 IQ 引發之突變加以抑制。由於綠茶萃取物含有多量之酚類化合物(Yang and Wnag, 1993)，Constable 等(1996)發現速食茶包、綠茶、紅茶及

表十、 檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後水層產物
對 IQ 誘突變性的影響

Table 10. Effect of the aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment on the activity of IQ toward *Salmonella typhimurium* strains of TA98 and TA100 in the presence of S9 mixture

Amount per plate (mg)	His ⁺ revertant count per plate	
	TA 98	TA 100
pH8 37 °C		
Control	3197 ± 98	818 ± 63
0.001	2729 ± 47	754 ± 106
0.1	3188 ± 11	801 ± 9
1	2535 ± 95	778 ± 22
5	705 ± 86	364 ± 20
pH8 100 °C		
Control	3197 ± 98	810 ± 66
0.001	2114 ± 231	947 ± 7
0.1	2616 ± 40	819 ± 6
1	2251 ± 244	346 ± 20
5	426 ± 2	207 ± 10
pH10 37 °C		
Control	3197 ± 98	668 ± 41
0.001	2015 ± 120	765 ± 13
0.1	2614 ± 14	920 ± 98
1	2340 ± 99	804 ± 28
5	1593 ± 103	799 ± 27
pH10 100 °C		
Control	2952 ± 227	820 ± 21
0.001	3393 ± 96	1091 ± 50
0.1	3298 ± 31	1271 ± 48
1	3578 ± 224	996 ± 9
5	2708 ± 19	725 ± 1
pH12 37 °C		
Control	3197 ± 98	677 ± 21
0.001	1750 ± 0	694 ± 79
0.1	1874 ± 138	656 ± 20
1	217 ± 3	864 ± 25
5	45 ± 1	645 ± 4
pH12 100 °C		
Control	3197 ± 98	863 ± 83
0.001	2092 ± 8	941 ± 21
0.1	2279 ± 120	905 ± 23
1	1861 ± 45	973 ± 27
5	1811 ± 53	136 ± 1

lime leaves 對於須經 S9 代謝後始對 *Salmonella typhimurium*TA98 具有誘突變性的標準誘突變劑(MeIQ, IQ, PhIP 及 2-NP), 皆具有抑制作用, 且抑制效果隨劑量增加而提高。一些 *in vitro* 試驗顯示, 當茶萃取物加入 microsomes 後, 可以抑制 arylhydrocarbon hydroxylase, 7-ethoxycoumarin-O-deethylase 及 7-ethoxy-resorufin diethylase 的活性(Wang et al., 1989), 而造成 methoxyresorufin, ethoxyresorufin 及 pebtoxyresorufin 的 O-dealkylation 反應下降(Bu-Abbas et al., 1994)。因此本實驗中, 有些樣品對需 S9 代謝後始對 *Salmonella typhimurium*TA98 及 TA100 具有誘突變性的標準誘突變劑 IQ 有明顯的抑制效果, 故 S9 可能扮演著一個重要的角色。Yen and Chen (1995)針對不同種類發酵的茶對誘突變劑進行研究發現, 其對 IQ 皆有抑制效果, 且發酵茶(紅茶)對 IQ 的抑制效果是所有茶中最好的, 因此可之茶之發酵情形對其抗誘突變劑的效果是有所影響, 而茶發效為氧化反應, 檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理的過成也為氧化反應, 因此, 其結果與本實驗結果是相似的, 可知檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物誘突變劑, 雖對 MNNG 有促進效果, 但因人體為具有酵素之生物體, 而 IQ 有 S9 存在時並非皆有誘突變性, 因此可知如人體中如有檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物及 IQ 同時存在時, 經過人體內的酵素解毒後, 並非皆對人體有誘突變效果的。而本研究結果發現, 檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物具有抗氧化性, 但並非皆有抗突變性, 因此推測此二者間無相關性存在, 與 Wang and Lee (1996)之推論不同, 可

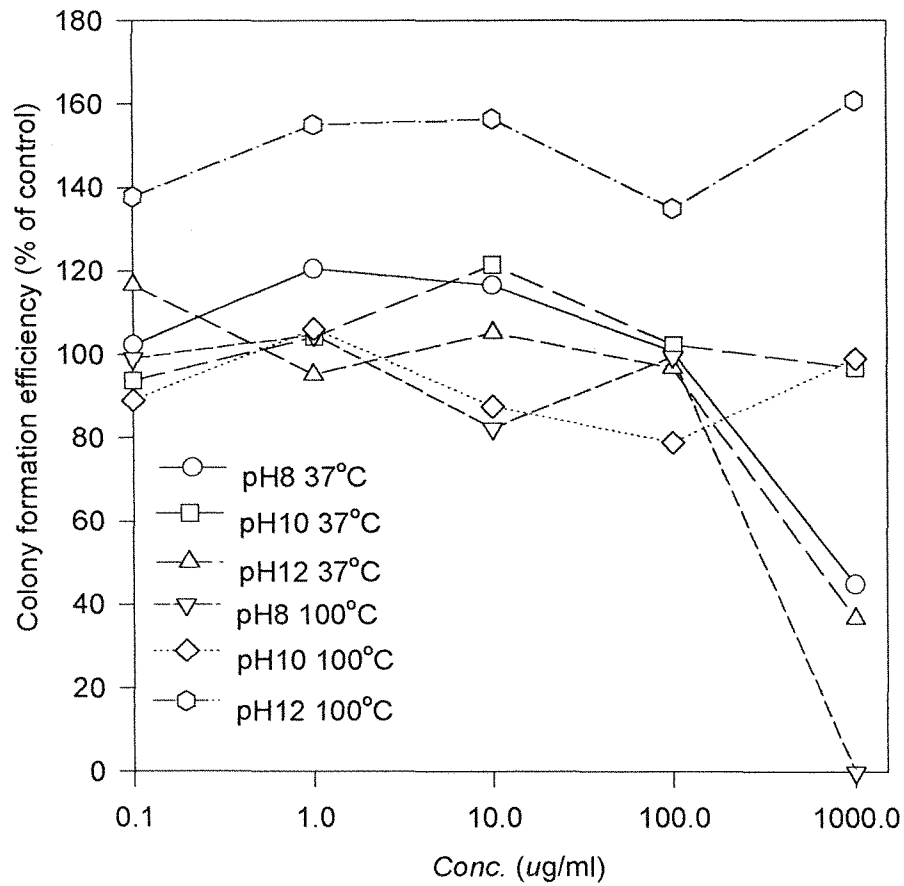
檳榔酚類化合物粗萃物經鹼處理後其含有之物質發生改變，已非原來之物質，因此抗氧化性及抗突變性之間的關係，因而改變。

(四)細胞毒性

本研究以檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物對 CHO 細胞進行細胞毒性試驗。如樣品使細胞之存活率低於控制組的 50%以下，表示該濃度對樣品具有細胞毒性。結果顯示，當濃度高達 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，pH8 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH12 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 pH8 100 $^{\circ}\text{C}$ 時，對細胞已具有毒性，而其它樣品對細胞則無明顯的毒性存在(圖十七)。

Wheatley 等(1996)以檳榔果實粗萃物、arecoline 及 catechin 對人體細胞 Hela S3 進行研究發現，樣品高量時對 Hela S3 細胞皆具有毒性。Wang and Lee (1996)發現，檳榔果實酚類化合物粗萃物當其濃度為(100 $\mu\text{g/ml}$)時，對 CHO 細胞已具有抑制細胞增生的效果。Sundqvist and Grafstrom (1992)也發現，當檳榔果實粗萃物濃度為 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 時，對人類頰粘膜上皮細胞(human buccal epithelial cells)有毒性存在，此結果與本研究結果相似，因此可知，部份檳榔酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物在高濃度時，會造成細胞死亡，而這是何種機轉，則有待進一步探討。

(五)SCE 及 CA



圖十七、 檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之產物對 CHO 細胞增生的影響

Fig. 17 Plating efficiency assay of the aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment in CHO cells

1. SCE

結果如表十一所示，檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物對於 SCE 發生的頻率皆無顯著差異，此結果與 Wang and Lee (1996)之發現相似，由此可知，檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物並不會增加 CHO 細胞產生 SCE 之頻率。Umezawa 等(1981)將檳榔子以乙酸乙酯萃取所得之萃取物對人類淋巴細胞進行 SCE 也試驗發現並不會有明顯增加的趨勢，而這些結果與本實驗結果亦相符。如將此結果與六、(二)結果比較可發現，檳榔酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物既不會對 *Salmonella typhimurium* TA98 及 TA100 有誘突變性，也不會使 CHO 細胞 SCE 頻率增加，但是否對染色體結構有所影響則要更進一步探討。

2. CA

由表十二可知，檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物，會使 aberrant metaphase (%)有增加的趨勢，其中又以 pH10 37 °C、pH12 100 °C處理組增加得最明顯，雖然部份樣品的 CA 不明顯，但其在各種不同樣品時所導致的 aberration 形態卻是不相同的(附錄圖)。

劉等(1993)發現改變 DNA 鹽基(base)的物質較易引發 SCE 的產生。而一些能直接破壞 DNA 鏈的物質

表十一、檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物對中國倉鼠卵巢細胞之姐妹染色分體交換頻率的影響

Table 11. Sister-Chromatid exchange (SCE) frequencies of CHO cells exposure to the aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment

Conc. (μ g/ml)	SCEs/metaphase
pH8 37 °C	
Control	9.47 \pm 0.46 a
0.1	9.29 \pm 0.45 a
1	8.98 \pm 0.18 a
10	9.41 \pm 0.28 a
100	8.78 \pm 0.55 a
pH8 100 °C	
Control	9.47 \pm 0.46 a
0.1	8.76 \pm 0.31 a
1	8.66 \pm 0.62 a
10	8.99 \pm 0.88 a
100	8.61 \pm 0.33 a
pH10 37 °C	
Control	9.47 \pm 0.46 a
0.1	9.58 \pm 0.08 a
1	9.14 \pm 0.28 a
10	9.04 \pm 0.69 a
100	9.89 \pm 0.53 a
1000	9.51 \pm 0.42 a
pH10 100 °C	
Control	9.47 \pm 0.46 a
0.1	9.82 \pm 0.64 a
1	9.84 \pm 0.73 a
10	10.24 \pm 0.11 a
100	9.58 \pm 0.36 a
1000	9.95 \pm 0.82 a
pH12 37 °C	
Control	9.47 \pm 0.46 a
0.1	9.01 \pm 0.79 a
1	8.81 \pm 0.44 a
10	9.30 \pm 0.76 a
100	8.66 \pm 0.46 a
pH12 100 °C	
Control	9.47 \pm 0.46 a
0.1	9.64 \pm 0.56 a
1	9.34 \pm 0.19 a
10	9.59 \pm 0.33 a
100	9.56 \pm 0.37 a
1000	9.58 \pm 0.53 a

Data are means \pm SD of three plates

Data vearing different superscript letters were signigicantly different ($p < 0.05$)

表十二、檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物對中國倉鼠卵巢細胞之染色體變異的影響

Table 12. Chromosome aberrations induced by treatment of CHO cells with the aqueous phase from crude phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment

Dose (μ g/ml)	Type of aberrations (%)			Aberrant metaphases (%)
	Gaps	Breaks	Exchanges	
pH8 37 °C				
Control	2	0	0	2
0.1	3	0	0	3
1	0	0	3	3
10	0	3	0	3
100	3	7	3	13
pH8 100 °C				
Control	2	0	0	2
0.1	0	0	1	1
1	0	2	0	2
10	7	0	0	7
100	5	0	0	5
pH10 37 °C				
Control	2	0	0	2
0.1	10	0	0	10
1	10	4	1	15
10	10	6	0	16
100	13	4	1	18
1000	10	6	0	16
pH10 100 °C				
Control	2	0	0	2
0.1	1	2	0	3
1	3	5	0	8
10	7	0	0	7
100	0	0	6	6
1000	2	2	2	6
pH12 37 °C				
Control	2	0	0	2
0.1	10	0	0	10
1	3	7	0	10
10	5	2	3	10
100	3	7	3	13
pH12 100 °C				
Control	2	0	0	2
0.1	7	7	0	14
1	10	4	2	16
10	6	2	6	14
100	7	3	3	13
1000	5	5	5	15

如幅射線、重金屬等，則較不能引發 SCE 的增加，但較易引發染色體變異的產生。Patel 等(1994)以 DMSO 萃取 pan masala(一種印度檳榔嚼塊)進行研究發現，其會促進 CHO 細胞 CA 發生頻率增加，而 Sharan and Wary(1992)對檳榔子之水、乙酸(1%)、鹽酸(0.1N)及乙醇萃取物進行研究亦發現，其皆會導致 Hep 2 細胞 unscheduled DNA synthesis 的發生，綜合以上結果可知，檳榔子之萃取物皆會促使細胞結構發生改變，但並不會促使細胞之 SCE 頻率增加，此顯示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可能直接表現在 DNA 鏈的破壞上。但 Wang and Lee (1996)與蘇(1996)卻發現檳榔果實酚類化合物粗萃物及檳榔嚼塊水萃取物並未使 CA 發生變化，可能原因有三，一、是檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後已發生變化，可能直接攻擊 DNA 造成傷害。二、完整之檳榔嚼塊發生 CA 之變異，可能是嚼塊中有其他成份具有保護作用。三、檳榔果實酚類化合物受到鹼性之影響可能是漸進的(部份是原來之酚類化合物，部份是已發生氧化變異)，而非我們所採取之迴流處理的檳榔，以致有此結果。

伍、結論

- 一、本省北、東、南及中區各種檳榔嚼汁之上清液皆無 NG 存在，但殘渣部份則顯示出，白灰檳榔嚼汁中皆有 NG 存在，紅灰檳榔嚼汁中則僅有南部、東部的檳榔嚼汁中才含有，而雙子星檳榔嚼汁只有東部才有，顯示 NG 的生成量隨地方及嚼塊種類的不同而異。
- 二、NG 具有抑制 CHO 細胞增生作用，當濃度為 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 時，SCE 發生的頻率會顯著的提高，且會使 CHO 細胞之染色分體有 between arms 及 gap 產生，顯示 NG 具有基因毒性。
- 三、高量(528 mg)的檳榔果實酚類化合物粗萃物存在時，以 pH 3 生成之 NG 量為最多，pH 7 次之，pH 11 的生成量為最少，顯示在酸性條件下，比較有利於 phenol 對 nitrosation 反應之促進作用。
- 四、酚類化合物粗萃物對促進 NG 之生成並非扮演催化劑之角色，在反應過程中，檳榔果實酚類化合物粗萃物的加入，可能在極短時間內生成一中間產物，此中間產物有利於 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 之 nitrosation 反應，而促進 NG 之生成。

- 五、當 *p*-Nitrosophenol 之添加量為 2.74 mg (2.2×10^{-2} mmol) (pH 7 condition) 時，對 NG 生成量有最大的促進效果，但大量的 *p*-nitrosophenol 存在時，對 nitrosation 反應反而有抑制作用。
- 六、*p*-Nitrosophenol 對 NG 之生成影響與粗萃物之影響相似，故知檳榔果實酚類化合物粗萃物與 sodium nitrite 可生成 nitrosyl 酚類化合物，其可促進 NG 之生成。
- 七、將檳榔果實酚類化合物粗萃物或 *p*-nitrosophenol 加入 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 反應一天、二天及三天之混合物中再反應三、二、一天，其 NG 之生成量顯著地高於三者一起反應四天，可能是生成之 nitrosyl 酚類化合物再將 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 反應生成 NG 過程中之中間物轉化成 NG 所致。
- 八、NG 生成量隨檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物劑量的增加有提高的趨勢，但高劑量時反而使 NG 之生成量減少，是否是結構發生變化所造成的影響，有待更進一步的探討。

- 九、 檳榔果實酚類化合物粗萃物經各種不同條件鹼處理後水層產物，高量時有抗氧化性，不論有無 S9 存在，對 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100 並無誘突變性，但對誘突變物之影響方面，樣品對 MNNG 之誘突變性有促進的效果，然而 S9 存在時，對 IQ 之誘突變性反而有抑制作用。
- 十、 檳榔酚類化合物粗萃物經鹼處理後之水層產物，僅部份樣品高量時，對細胞具有毒性，樣品皆不會增加 SCE 發生的頻率，但會造成染色體發生變異。

陸、參考文獻

王東堯. 1993. 談「口腔檳榔癌」. 防癌雜誌, 18: 26-27.

王東堯、靳應台、陳宏安、林立民. 1992. 台灣市售檳榔在金田鼠頰囊袋之致癌性研究. 中華牙誌, 11: 155-162.

王進崑. 1995. 檳榔嚼塊替代品之研究. 興農雜誌, 311: 32-34.

王進崑、吳明娟. 1996. 茗葉中酚類化合物之分離及對 arecoline 誘突變性之影響. 中國農業化學會誌. 34: 638-647.

吳梅桂. 1997. 檳榔嚼塊去除口臭及抗氧化特性之探討. 碩士論文. 中山醫學院. 台中.

李國鏞. 1990. 基礎分子生物學. 5.5 化學, 物理, 生物因素均可以導致突變, 試討論之. p.170. 九州圖書文物有限公司. 臺北.

林瑞雄. 1990. 臺灣地區嚼檳榔之初步流行病學調查. 中華民國牙醫學會雜誌, 9: 24-30.

陳榮明. 1989. 檳榔、胡椒、椰子栽培法. 第一章 檳榔栽培法, p.1-65. 五洲出版社. 臺北.

黃湧澧. 1990. 南臺灣口腔粘膜下纖維化(癌前期病灶)之研究. 中華民國牙醫學會雜誌, 9: 27-35.

黃稱奇. 1991. 嚼檳榔與癌症. 防癌雜誌, 12: 23-28.

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. 碩士論文. 中山醫學院. 台中.

彭琴惠. 1995. 檳榔樹各部位植物鹼之分析及其亞硝酸胺的生成與突變性之探討. 碩士論文. 中山醫學院. 台中.

楊震南. 1991. 檳榔嚼塊抽出物之抗菌性與誘突變性. 碩士論文. 臺灣大學. 台北.

劉紹興、陳明宏、林春蓮及徐尚為. 1993. 姐妹染色體交換在分子流行病學之應用(上). 國防醫學, 16(3): 263-270.

盧盛德、黃科士、林麗令及李憶理. 1962. 臺灣產荖藤 *Piper betel* Linn. 未熟果之精油. 臺灣藥學雜誌, 14(1): 12-16.

謝天渝. 1993. 有關嚼食檳榔引起口腔癌之最新研究. 防癌雜誌, 18: 29-32.

關學婉. 1991. 「檳榔與口腔病變」導論. 中華民國牙醫學會雜誌, 9: 23-30.

蘇正德、蔡文騰、張基煌及蘇女淳. 1991. 茶湯與茶渣之兒茶酚含量及抗氧化性之調查研究. 食品科學, 18: 234-238.

蘇旭儀. 1996. 檳榔嚼塊水萃取物與尼古丁毒性之研究. 碩士畢業論文. 中山醫學院營養科學研究所. 台中.

Alaoui-Jamali, M. A., Belanger, P. M., Rossignol, G. and Castonguay, A. 1991. Metabolism, Sister chromatid exchanges, and DNA single-strand breaks induced by 4-(metylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-buranone and their modulation by vitamin A *in vitro*. Cancer Research, 51: 3946-3950.

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.

Ames, B. N., Durston, W. E., Tamasaki, E. and Lee, F. D. 1973. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 70: 2281-2286.

Amonkar, A. J., Padma, P. R. and Bhide, S. V. 1989.

protective effect of hydroxychavicol, a phenolic component of betel leaf against the tobacco-specific carcinogens. *Mutat. Res.* 210: 249-253.

Bagwe, A. N., Ganu, U. K., Gokhale, S. V. and Bhisey, T. A. 1990. Evaluation of the mutagenicity of 'pan masala', a chewing substitute widely used in India. *Mutat. Res.*, 241: 349-354.

Bhide, S. V., Gothoskar, S. V. and Shivapurkar, N. M. 1984. Arecoline tumorigenicity in Swiss strain mice on normal and vitamin B deficient diet. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 107; 169-171.

Bogovski, P., Castegnaro, M., Pignatelli, B., and Walker, E. A. 1972. The inhibiting effect of tannins in the formation of nitrosamines, In: *N-Nitroso Compounds. Analysis and Formation*, (IARC Scientific Publications No. 3), Bogovski, P., Preussmann, T., and Walker, E. A., Eds., PP. 127-129, International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Brusick, D. 1993. Genetic toxicology, In: *Principles and methods of toxicology*. 3rd ed., Hayes, A. W., Eds., pp.545-560, Raven Press, New York.

Bu-Abbas, A., Clifford, M. N., Walker, R. and Ioannides, C.

1994. Marked antimutagenic potential of aqueous green tea extracts: mechanism of action. *Mutagenesis*. 9: 325-331.

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

Challis, B. C. 1973. Rapid nitrosation of phenols and its implications for health hazards from dietary nitrites. *Nature*, 244: 466.

Constable, A., Varga, N., Richoz, J. and Stadler, R. H. 1996. Antimutagenicity and catechin content of soluble instant teas. *Mutagenesis*, 11: 189-194.

Cunningham, M. L., Peak, J. G. and Peak, M. J. 1987. Single-strand DNA breaks in rodent and human cells produced by superoxide anion or its reduction products. *Mutat. Res.*, 184: 217-222.

Davies, R. and McWeeny, D. J. 1977. Catalytic effect of nitrosophenols on N-nitrosamine formation. *Nature*, 266: 657-658.

Davies, R., Dennis, M. J., Massey, R. C., and McWeeny, D. J., 1978. Some effects of phenol- and thiol- nitrosation on N-nitrosamine formation, In: *Environmental Aspects of N-*

Nitroso Compounds, (IARC Scientific Publications No. 19), Walker, E. A., Castegnaro, M., Grieciute, L. and Lyle, R. E., Eds., pp.183-197, International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Davies, R., Massey, R. C., and McWeeny, D. J. 1980. The catalysis of the N-nitrosation of secondary amines by nitrosophenols, *Food Chem.*, 6: 115-122.

De Whalley, C. V., Rankin, S. M., Hoult, R. S., Jessup, W. and Leake, D. S. 1990. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 39: 1743-1750.

Dean, B. J. and Danford, N. 1984. Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In: *The mutagenicity testing a practical approach*, Venitt, S. and Parry, J. M., Eds., pp.187-232, IRL press, Oxford, Washington DC.

Francis, A. T., Shetty, T. K. and Bhattacharya, R. K. 1989. Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B1; *in vitro* effect of plant flavonoids, *Mutat. Res.* 222: 393-401.

Grafstom, T. C., Edman., C. C., Sundqvist, K., Liu, Y.,

Hybbinette, S. S., Nicotera, P. and Dypbukt, J. M. 1989. Cultured human bronchial cells as a model system in lung toxicology and carcinogenesis: implications from studies with acrolein. *ATLA*, 16: 231-243.

Grafstrom, R. C., Willey, J. C., Sundqvist, K. and Harris, C. C. 1986. Pathobiological effects of tobacco smoke-related aldehydes in cultured human bronchial epithelial cells. In: *Mechanisms of Tobacco Carcinogenesis*, Banbuty Report 23, Hoffmann, D. and Harris, C. C., Eds., pp. 273-285, Cold Spring Harbor, NY.

Gray, J. I., and Dugan, L. R. 1975. Inhibition of *N*-nitrosamine formation in model food systems, *J. Food Sci.*, 40: 981-984.

Hartman, P. E., Ames, B. N., Roth, J. R., Barnes, W. M., and Levin, D. E. 1986. Target sequences for mutagenesis in *Salmonella* histidine-requiring mutants. *Environ. Mutagen*, 8: 631-641.

Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. and Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, 342: 1007-1011.

Hoffmann, D., Brunnemann, K. D., Prokopczyk, B. and

Djordjevic, M. V. 1994. Tobacco-specific *N*-nitrosamines and areca-derived *N*-nitrosamines: chemistry, Biochemistry, carcinogenicity and relevance to humans. *J. Toxic. and Environ. Health*, 41: 1-52.

Jain, A. K., Kaneko, S. Matsuzaki, U. M., Hara, Y. and Tomita, I. 1989. Crude tea extracts decrease the mutagenic activity of *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine *in vitro* and in intragastric tract of rats. *Mutat. Res.*, 210: 1-8.

Jaju, R. J., Patel, R. K., Bakshi, W. R., Trivedi, A. H., Dave, B. J. and Adhvaryu, S. G. 1992. Chromosome damaging effects of pan masala. *Cancer Letter*, 65: 221-226.

Josephy, P. D. 1989. New developments in the Ames assay: high-sensitivity detection of mutagenic arylamines. *BioEssays*, 11: 108-112.

Kada, T. K., Kaneko, S., Matsuzaki, T. M. and Hara, Y. 1985. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens: A case of green tea factor. *Mutat. Res.*, 150: 127-132.

Katiyar, S. K., Agarwal, R., Wood, G. S. and Mukhtar, H. 1992. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-acetate-caused tumor promotion in 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene-initiated

SENCAR mouse skin by a polyphenolic fraction isolated from green tea. *Cancer Res.*, 52: 6890-6897.

Kawabata, T., Ohshima, H., Uibu, J., Nakamura, M., Matsui, M., and Hamano, M. 1979. Occurrence formation and precursors of N-nitroso compounds in Japanese diet. In: *Naturally Occurring Carcinogens Mutagens and Modulators of Carcinogenesis*, Miller, E. C., et al., Eds., pp. 195-209, Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo/Univ, Park Press, Baltimore.

Kodama, F., Umeda, M. and Tsutsui, Y. 1976. Mutagenic effect of sodium nitrite on cultured mouse cells. *Mutat. Res.*, 40: 119-220.

Lijinsky, W. and Taylor, H. W. 1976. Carcinogenicity test of two unsaturated derivates of *N*-nitropiperidine in Sprague-Dawley rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 57: 1315-1317.

Lingnert, H., Vallentin, K. and Eriksson, C. E. 1979. Measurement of antioxidative effect in model system. *J. Food Proc. and Pres.* 3: 87-103.

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.

Maron, D. M. and Ames, B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.

Mathew, A. G. and Govindarajan, V. S. 1964. Polyphenolic substances of areca nut II. Changes during maturation and ripening. *Phytochem*, 3: 657-665.

Mathew, A. G., Parpia, H. A. B. and Govindarajan, V. S. 1969. The nature of the complex proanthocyanidins. *Phytochem*, 8: 1543-1547.

Maukherjee, A. and Giri, A. K. 1991. Sister chromatid exchange induced by 'pan masala' (a betel quid ingredient) in male mice in vivo. *Food Chem. Toxic.*, 29: 401-403.

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(3): 950-954.

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. U. S. A.*, 72: 979-983.

Mirvish, S. S. 1975. Formation of N-nitroso compounds:

chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31: 325-351.

Muir, C. S. and Kirk, R. 1960. Betel, tobacco, and cancer of the mouth. *Brit. J. Cancer*, 14:597-608.

Mulky, M., Amonkar, A. J., K`Souza, A. V. and Bhide, S. V. 1987. Antimutagenicity of curcumins and related compounds: the structural requirements for the antimutagenicity of curcumins. *Ind. Drugs*, 25: 91-95.

Nagabhushan, M. and Bhide, S. V. 1988. Antimutagenicity of catechin against environmental mutagens. *Mutagenesis*, 3: 293-298.

Nagabhushan, M., Amonkar, A. J., Nair, U. J., D`Souza, A. V. and Bhide, S. V. 1989. Hydroxychavicol: a new anti-nitrosating phenolic compound from betel leaf. *Mutagenesis*, 4: 200-204.

Nair, J., Ohshima, H., Friesen, M., Croisy, A., Bhide, S. V. and Bartsch, H. 1985. Tobacco-specific and betel nut-specific *N*-nitrosocompounds : occurrence in saliva and urine of betel nut quid chewers and formation *in vitro* by nitrosation of betel quid. *Carcinogenesis*, 6: 265-303.

Nair, J., Ohshima, H., Nair, U. J. and Bartsch, H. 1996. Endogenous formation of nitrosamines and oxidative DNA-damaging agents in tobacco users. *Critical Reviews in Toxicology*, 26: 149-161.

Naga, M., Fujita, Y., Wakabayashi, K. and Sugimura, Y. 1981. Effect of methyl substitution on mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, isolated from broiled sardine. *Carcinogenesis*, 2: 1147-1149.

Nishikawa, A., Prokopczyk, B., Rivenson, A., Zang, E. and Hoffmann, D. 1992. A study of betel quid carcinogenicity of 3-(methylnitrosamine)-propionaldehyde in F344 rats. *Carcinogenesis*, 13: 369-372.

Nix, C. E., Brewen, B., Wilkerson, R., Lijinsky, W. and Epler, J. L. 1979. Effects of *N*-nitrosopiperidine substitutions on mutagenicity in *prosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 67: 27-38.

Ohshima, H., Bereziat, J. D., and Bartsch, H. 1982. Monitoring *N*-nitrosamino acids excreted in the urine and feces of rats as an index of endogenous nitrosation, *Carcinogenesis*, 3: 115-120.

Ohshima, H. and Bartsch, H. 1981. Quantitative estimation of

endogenous nitrosation in man by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. *Cancer Res.*, 41: 3658-3662.

Patel, R. K., Jaju, R. J., Bakshi, S. R., Trivedi, A. H., Dave, B. J. and Adhvaty, S. G. 1994. Pan masala-a genotoxic menace. *Cancer Research*, 320: 245-249.

Pignatelli, B., Berezat, J. C., Descotes, G. and Bartsch, H. 1982. Catalysis of nitrosation *in vitro* and *in vivo* in rats by catechin and resorcinol and inhibition by chlorogenic acid. *Carcinogenesis*, 9: 1045-1049.

Pignatelli, B., Friesen, M., and Walker, E. A., 1980. The role of phenols catalysis of nitrosamine formation, In: N-Nitroso Compounds: Analysis, Formation and Occurrence (IARC) Scientific Publications No. 31), Walker, E. A., Gričič, L., Castegnaro, M., and Borzsonyi, M., Eds., pp. 95-109, International Agency for Research on Cancer. Lyon.

Prokopczky, B., Bertinato, P. and Hoffmann, D. 1988. Cyanoethylation of DNA *in vivo* by 3-(methylnitrosamino)-propionitrile, an areca-derived carcinogen. *Cancer Res.*, 48: 6780-6784.

Prokopczky, B., Rivinson, A. and Hoffmann, K. 1991. A study of betel quid carcinogenesis IX. Comparative carcinogenicity

of 3-(methylnitrosamino)propionitrile and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone upon local application to mouse skin and rat oral mucosa. *Cancer Lett.*, 60: 153-157.

Prokopczyk, B., Rivnson, A., Bertinato, P., Brunnemann, K. D. and Hoffmann, D. 1987. 3-(methylnitrosamino)propionitrile: Occurrence in saliva of betel quid chewers, carcinogenicity, and DNA methylation in F344 rats. *Cancer Res.*, 47: 467-471.

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.

Raghavan, V. and Baruan, H. K. 1958. Areca nut : India's popular masticatory-history, chemistry and utilization. *Econ. Bot.*, 12: 315-345.

Rao, T. k., Hardigree, A. A., Young, J. A., Lijinsky, W. and Epler, J. L. 1977. Mutagenicity of N-nitrosopiperidines with the *Salmonella typhimurium* / microsomal activation system. *Mutat. Res.*, 56: 131-145.

Rivnson, A., Hoffmann, D., Prokopczyk, B., Amin, S. and Hecht, S. S. 1988. Induction of lung and exocrine pancreas

tumors in F344 rats by tobacco-specific and areca-derived *N*-nitrosamines. *Cancer Res.* 48: 6912-6917.

Rivenson, A., Hoffmann, D., Prokopczyk, B., Amin, S. and Hecht, S. S. 1988. Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and areca-derived *N*-nitrosamines. *Cancer Res.*, 56: 131-145.

Satoshi, S. and Hara, T. 1990. Antioxidative activity of tea catechins. *Fragrance J.*, Nov: 24-30.

Sethi, S. C. and Aggarwal, J. S. 1956. A new antioxidant from betel leaf. *J. Sci. Ind. Res. (India)*, 15B: 34-38.

Sharan, R. N. and Wary, K. K. 1992. Study of unscheduled DNA synthesis following exposure of human cells to arecoline and extracts of betel nut *in vitro*. *Mutat. Res.*, 278: 271-276.

Shenoy, N. R. and Choughuley, S. U. 1989. Effect of certain plant phenolics on nitrosamine formation. *J. Agric. Food Chem.*, 37: 721-725.

Shirname, L. P., Menon, M. M., Nair, J. and Bhide, S. V. 1983. Correlation of mutagenicity and tumorigenicity of betel quid and its ingredients. *Nutr. & Cancer*, 5: 87-91.

Slaga, T. J., Klein-Szanto, A. J. P., Triplett, L. L., Yotti, L. P. and Trosko, J. E. 1982. Skin tumor promoting ability of benzoylperoxide, a widely used free radical-generating compound. *Science*, 213: 1023-1025.

Smith, C., Payne, B., Doolittle, D. J., Debnath, A. K., Lawlor, T. and Hansch, C. 1992. Mutagenic activity of a synthetic and Naturally occurring heterocyclic amines in *Salmonella*. *Mutat. Res.*, 279: 61-73.

Steenkamp, H. J., Jaskiewicz, K., Louwrens, H. K. and De Wet Marais, C. 1989. Relationship between histology and gastric juice pH and nitrite in a south African population at high risk for gastric cancer. *Cancer J.*, 2: 292-295.

Stich, H. F. 1991. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. *Mutat. Res.*, 259: 307-324.

Stich, H. F., Ohshima, H., Pignatelli, B., Michelon, J. and Bartsch, H. 1983. Inhibitory effect of betel nut extracts on endogenous nitrosation in humans. *J. Natl. Cancer Inst.*, 70: 1047-1050.

Stich, H. F., Rosin, M. P. and Brunnemann, K. D. 1986. Oral lesion, genotoxicity and nitrosamines in betel quid chewers with no obvious increase in oral cancer risk. *Cancer Letters*.

31: 15-25.

Stich, H. F. and Stich, W. 1982. Chromosome-damaging activity of saliva of betel nut and tobacco chewers. *Cancer Lett.*, 15: 193-202.

Sundqvist, K. and Grafstom, R. C. 1992. Effects of areca nut on growth, differentiation and formation of DNA damage in cultured human buccal epithelial cells. *Int. J. Cancer*, 52: 305-310.

Sundqvist, K., Liu, Y., Nair, J., Bartsch, H., Arvidson, R. C. and Grafstom, R. C. 1989. Cytotoxic and genotoxic effects of areca nut-related compounds in cultured human buccal epithelial cells. *Cancer Res.*, 49: 5294-5298.

Umezawa, K., Fujie, S., Sawamura, M., Matsushima, T., Katoh, Y., Tanaka, M. and Takayama, S. 1981. Morphological transformation, sister chromatid exchange and mutagenesis assay of betel constituents. *Toxicol. Lett.*, 8: 1-2, 17-22.

Walker, E. A., Pignatelli, B. and Castegnaro, M. 1979. Catalytic effect of *p*-nitrosophenol on the nitrosation of diethylamine. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 393-396.

Walker, E. A., Pignatelli, B. and Friesen, M. 1982. The role of

phenols in catalysis of nitrosamine formation. J. Sci. Food Agric., 33: 81-88.

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.

Wang, C. K. and Peng, C. H. 1996. The mutagenicities of alkaloids and *N*-nitrosoguvacoline from betel quid. Mutat. Res., 360: 165-171.

Wang, Z. T., Cheng, S. J., Zhou, Z. C., Athar, M., Khan, W., Bickers, D. R. and Mukhtar, H. 1989. Antimutagenic activity of green tea polyphenols. Mutat. Res., 223: 273-285.

Wary, K. K. and Sharan, R. N. 1992. Cytotoxic and cytostatic effects of arecoline and sodium nitrite on human cells *in vitro*. Int. J. Cancer, 47: 396-400.

Wenke, G. and Hoffmann, D. 1983. A study of betel quid carcinogenesis. 1. On the *in vitro* N-nitrosation of arecoline. Carcinogenesis, 4: 169-172.

Wenke, G., Brunnemann, K. K., Hoffmann, D. and Bhide, S. V. 1984. A study of betel quid carcinogenesis IV. Analysis of the saliva of betel chewers: A preliminary report. J. Cancer

Res. Clin. Oncol., 108:110-113.

Wheatley, D. N., Carre, A. B., Stowers, J. M. and Lamb, J. 1996. Areca nut extract, arecoline, and catechin: 1. toxic actions on human and mouse cultures ameliorated by antioxidants. *In vitro Toxicology*, 9: 101-108.

Wu, Y. N., Wang H. Z., Li, J. S. and Han, C. 1993. The inhibitory effect of Chinese tea and its polyphenols on *in vitro* and *in vivo* N-nitrosation. *Biomed. & Envir. Sci.*, 6: 237-258.

Wurtzen, G. 1990. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemical: antioxidants. *Food Chem.*, 28: 743-745.

Yang, C. S. and Wang, Z. Y. 1993. Tea and cancer. *J. Natl Cancer Inst.*, 85: 1038-1049.

Yen, G. C. and Chen, H. Y. 1994. Comparison of antimutagenic effect of various tea extracts (green, oolong, pouchong and black tea). *J. Food Prot.*, 57: 54-58.

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.

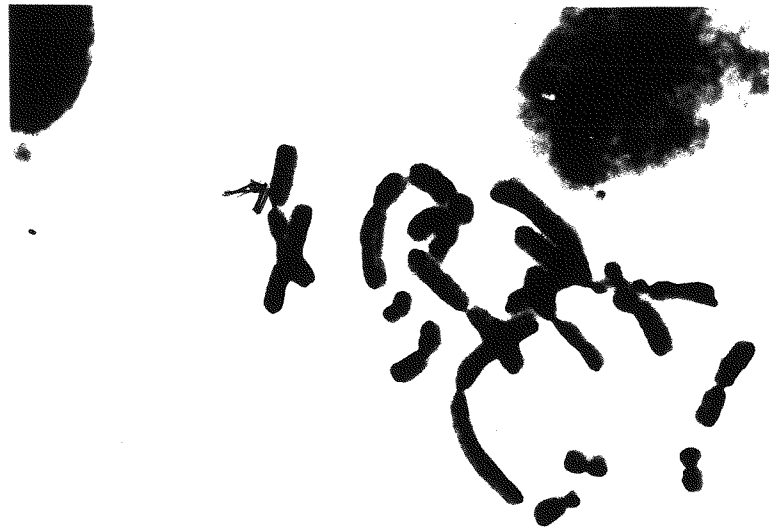
Zimonjic, D., Popescu, N. C. and Dipaolo, J. A. 1989. Induction of sister chromatid exchanges by tobacco-specific nitrosamine 4-(metylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-buranone in human and hamster cells. *Carcinogenesis*, 10(4): 753-755.

柒、附錄



圖一、檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物
(Ca(OH)₂, pH8, 37 °C, 30 min)造成 CHO 細胞染色
體變異(exchange)之情形

Fig. 1 The chromosome aberration (exchange of chromosome)
in CHO cells induced by the aqueous phase from crude
phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment
(Ca(OH)₂, pH8, 37 °C, 30 min)



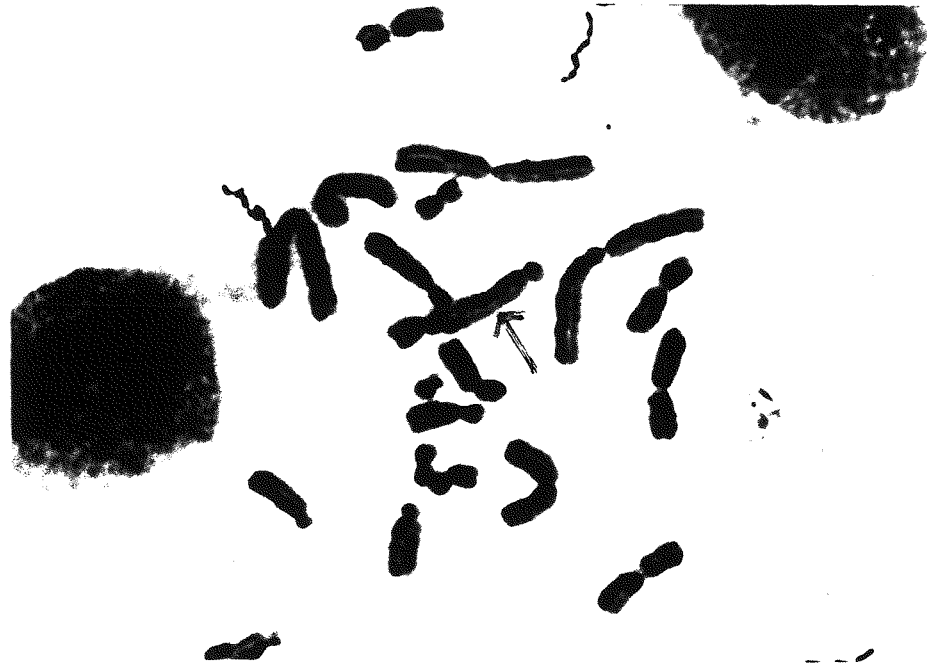
圖二、 檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物
(Ca(OH)₂, pH8, 100 °C, 30 min)造成 CHO 細胞染
色體變異(exchange)之情形

Fig. 2 The chromosome aberration (exchange of chromosome)
in CHO cells induced by the aqueous phase from crude
phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment
(Ca(OH)₂, pH8, 100 °C, 30 min)



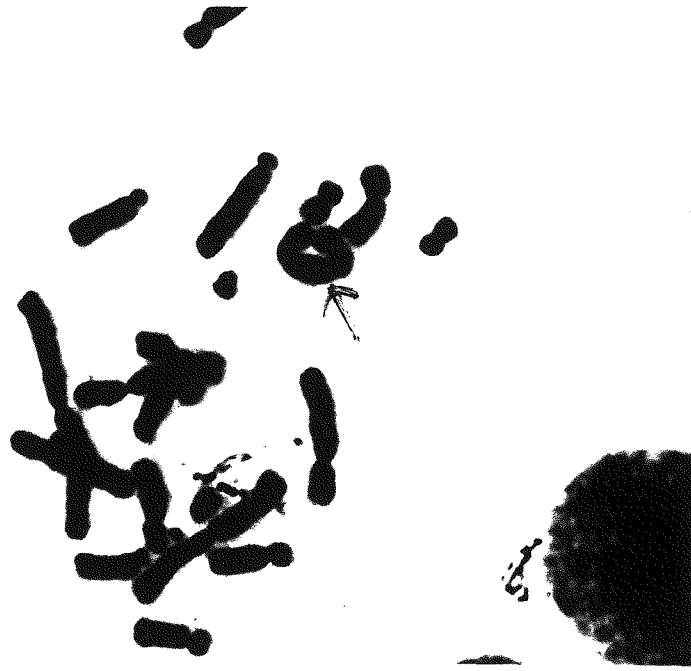
圖三、檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物
(Ca(OH)₂, pH10, 37 °C, 30 min)造成 CHO 細胞染
色體變異(exchange)之情形

Fig. 3 The chromosome aberration (exchange of chromosome)
in CHO cells induced by the aqueous phase from crude
phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment
(Ca(OH)₂, pH10, 37 °C, 30 min)



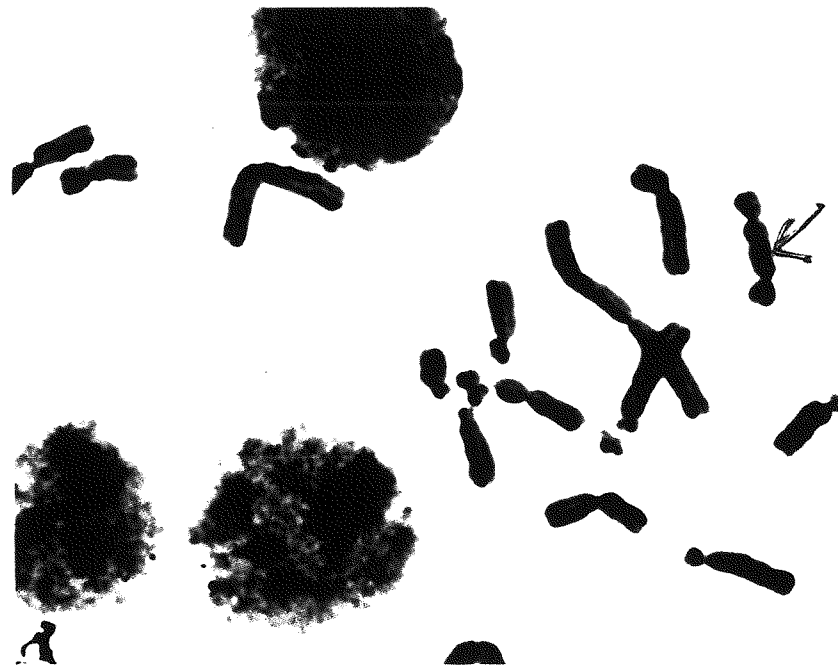
圖四、 檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物
($\text{Ca}(\text{OH})_2$, pH10, 100°C , 30 min)造成 CHO 細胞染
色體變異(exchange)之情形

Fig. 4 The chromosome aberration (exchange of chromosome)
in CHO cells induced by the aqueous phase from crude
phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment
($\text{Ca}(\text{OH})_2$, pH10, 100°C , 30 min)



圖五、 檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物
($\text{Ca}(\text{OH})_2$, pH12, 37°C , 30 min)造成 CHO 細胞染色
體變異(exchange)之情形

Fig. 5 The chromosome aberration (exchange of chromosome)
in CHO cells induced by the aqueous phase from crude
phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment
($\text{Ca}(\text{OH})_2$, pH12, 37°C , 30 min)



圖六、 檳榔果實酚類化合物粗萃物經鹼處理之水層產物
(Ca(OH)₂, pH12, 100 °C, 30 min)造成 CHO 細胞染
色體變異(exchange)之情形

Fig. 6 The chromosome aberration (exchange of chromosome)
in CHO cells induced by the aqueous phase from crude
phenolic extract of areca fruit after alkaline treatment
(Ca(OH)₂, pH12, 100 °C, 30 min)