

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

檳榔果實多元酚對 N-NITROSO GUVACOLINE 之生成及誘突變性影響
之研究

**Study on the formation and mutagenicity of N-nitrosoguvacoline
affected by areca fruit polyphenols**

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC- 89-2313-B-040-005

執行期間：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

個別型計畫：計畫主持人：王進崑

共同主持人：

E-mail: wck@mercury.csmc.edu.tw

處理方式：可立即對外提供參考

一年後可對外提供參考

兩年後可對外提供參考

(必要時，本會得展延發表時限)

執行單位：中山醫學大學營養學系

中華民國九十年十月五日

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、荖花、荖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.

計畫緣由與目的

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 Ca(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。

結果與討論

本研究結果顯示臺灣地區各地的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。

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。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。在 arecoline hydrobromide 與 sodium nitrite 之 nitrosation 反應中，當添加 *p*-nitrosophenol 之量為 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。由於 *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，可促進 NG 之生成。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。然而 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。

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。NG 具有抑制 CHO 細胞增生作用，當濃度為 0.1 ug/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。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。

參考文獻

- 王進崑、吳明娟. 1996. 荖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.
- 彭琴惠. 1995. 檳榔樹各部位植物鹼之分析及其亞硝胺的生成與突變性之探討. 碩士論文. 中山醫學院. 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., 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.

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.

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.

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

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.

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.

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