

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

紅茶除口臭之研究 (3/3)

計畫編號：NSC88-2313-B-002-079

執行期間：87年8月1日至88年7月31日

主持人：孫璐西 國立台灣大學 食品科技研究所

壹、中文摘要

本計畫自十餘種台灣產天然植物中篩選出最具除口臭效果之荖葉，進行研究。首先探討不同萃取溶劑對荖葉萃出物除口臭效果之影響，接著將除臭效果最佳的溶劑萃取物予以區分，分析各區分物之除口臭效果及成分分析，此外亦建立口臭另一種成分三甲基胺偵測模式及探討荖葉溶劑萃出物對三甲基胺的抑制效果。

在本研究所選用的五種溶劑中(正己烷、乙酸乙酯、丙酮、乙醇及水)，以乙酸乙酯萃出物的除口臭效果最好(70%)；正己烷(59%)；丙酮(49%)及乙醇(51%)萃出物次之；最差的是水萃物只有27%。萃出物的總酚類含量和其除口臭效果並無良好相關性。分析萃出率時，以水萃物最高，為16.19%；正己烷為0.66%；乙酸乙酯為2.16%；丙酮為2.57%；乙醇為5.84%。因荖葉乙酸乙酯萃出物的除口臭效果最好，故採用乙酸乙酯來萃取荖葉進行以下的區分工作。

荖葉乙酸乙酯萃出物會隨著pH值的增加而除臭率增加，在pH為8.0時除臭率達100%；而在pH 6.0時，則僅有8%。

將荖葉乙酸乙酯萃出物利用製備型薄層層析板，以正己烷：乙酸乙酯：醋酸=70：29：1 (v/v/v)為展開溶劑分離可以得到八個區分物，其中以band 4及band 5的除口臭效果最佳，1mg band 4區分物除臭率為59%，1mg band 5區分物除臭率為42%。

將荖葉乙酸乙酯萃出物及利用薄層層析法分離得之區分物，進一步以高效能液相層析儀分析時發現，荖葉乙酸乙酯萃出物中出現了七個主要的化合物，而其中利用共層

析(co-chromatography)方式確定了丁香醇(eugenol)之存在，其他六個化合物需要進一步分離純化，才能加以鑑定。

在含氮臭氣物質三甲基胺的模式系統中，確定以40 ppm三甲基胺的濃度可以在氣相層析儀偵測到三甲基胺的存在，而且隨著三甲基胺濃度的增加，所偵測到的三甲基胺面積也會增加，而加入0.1 mL(濃度為50 mg/mL)荖葉乙酸乙酯萃出物時並不能抑制40 ppm三甲基胺的揮發。

關鍵詞：除口臭，荖葉，甲硫醇，三甲基胺。

貳、緣由與目的

口臭發生的原因很多，有包括消化食物發出的味道，例如食用洋蔥、大蒜等香辛物，口腔的疾病，身體的疾病等等。消除口臭的方法有很多，包括了勤刷牙漱口、以殺菌劑殺死口腔中造成口臭的微生物、利用芳香劑掩蓋臭味、以除口臭物質消除口臭。於是乎最近關於消除口臭的產品在日本陸續登場，這些產品包括有除臭口香糖，除臭清涼飲料，將除臭物質添加在糖果、糕餅中，以健康食品形式販賣，其中以除臭清涼飲料的市場最大，通常選來做為除臭的材料選擇有綠茶、烏龍茶、紅茶、蘑菇抽出物、澀柿、蘋果等植物抽出物。

除臭商品在日本的市場日漸有強大的趨勢，但在台灣只發現在少數清涼飲料中而已。本實驗室從事除口臭相關的研究主要偏重在茶葉，因此本論文即欲擴大尋找台灣產植物中是否尚有其他除臭效果佳的植物，並分析其除臭成分為何？經過篩選十幾種天然植物(包括川芎、紫蘇、山楂、竹茹、土芭樂茶、苦瓜茶等)之後，發現本省所產荖葉最

具除臭效果，故選擇茗葉為此實驗的材料進行除口臭方面的探討。

參、結果與討論

一、茗葉以不同極性溶劑萃取除口臭物質

(一) 萃取溶劑對茗葉萃出物除口臭效果之影響

本研究所選用的萃取溶劑包括有正己烷(n-hexane)、乙酸乙酯(ethyl acetate)、丙酮(acetone)、乙醇(ethanol)及水(water)，皆為我國食品法規准許使用之溶劑。萃取方法採用黃和張(1986)萃取茗藤莖精油的方法，為在 30 °C 下攪拌萃取 8 小時後過濾得濾液，最後再利用減壓濃縮去除溶劑得茗葉以不同極性溶劑萃取之萃出物，分別測得萃出率、總酚類含量及除臭率。結果發現，在除臭率上，以乙酸乙酯萃得的萃出物其除臭效果最好，除臭率為 $70 \pm 2\%$ ，正己烷次之為 $59 \pm 5\%$ ，乙醇與丙酮相近分別為 $51 \pm 5\%$ 及 $49 \pm 2\%$ ，而水萃物之除臭率最差，僅為 $27 \pm 2\%$ (見圖一)。

(二) 萃取溶劑對茗葉萃出物總酚類含量之影響

茗葉之各種溶劑萃出物之總酚類含量為：正己烷為 183.2 ± 8.1 (mg/g extract)、乙酸乙酯為 201.4 ± 5.7 (mg/g extract)、丙酮為 229.6 ± 6.8 (mg/g extract)、乙醇萃出物為 398.7 ± 2.4 (mg/g extract)、水萃物為 148.9 ± 3.6 (mg/g extract)，以乙醇所萃得之總酚類含量最高，與黃(1994)利用各種不同溶劑萃取綠茶所得到的結果有相同的趨勢。

(三) 萃取溶劑對茗葉萃出物萃出率之影響

茗葉以不同極性溶劑萃取時所得的萃出率不同，以水萃取時可得到最多的萃出物(萃出率為 $16.19 \pm 0.37\%$)，以正己烷萃出最少(萃出率為 $0.66 \pm 0.11\%$)，乙酸乙酯萃出率為 $2.16 \pm 0.45\%$ ，丙酮萃出率為 $2.57 \pm 0.27\%$ ，乙醇萃出率為 $5.84 \pm 0.81\%$ 。

(四) 茗葉乙酸乙酯萃出物的除臭性質探討

探討茗葉乙酸乙酯萃出物的除臭性質時，將討論兩個部分，第一部分探討不同劑量的萃出物有不同的除臭效果及若要達到 50% 的除臭效果時需要的劑量為何；分別取 1mg、2mg、3mg、4mg 及 5mg 萃出物，所得的除臭效果如圖二所示，有呈一正相關。4mg 的茗葉乙酸乙酯萃出物，其除臭效果可達 50% 左右。

第二個部分為探討在不同的 pH 值下其除臭率是否會有上升的趨勢。本研究結果發現如同安田與宇井(1992) 在覆盆子葉的情況一樣，其除臭率隨著 pH 值的提升皆有上升的趨勢，結果可見圖三。

二、茗葉與各種茶葉的除臭效果比較：

茗葉經初步篩選可知其具有除口臭的效果，但其除口臭的效果與其他已知具有除臭力的物質相較到底是如何，尚應加以瞭解。乃以本實驗室曾研究過以及曾被其他學者研究得最多的茶葉為比較對象。茶葉樣品選擇的是製自台茶十二號的不同發酵程度的茶葉(綠茶、包種茶、紅茶)。

(一) 以水為溶劑時茗葉及茶葉的萃出率及除臭率的比較

在萃出率方面，表一的結果顯示以水做為萃取溶劑時，綠茶所得的萃出率最高，其次是包種茶的，再其次是紅茶，而最差的則是茗葉。

在除臭率方面則是取水萃物的冷凍乾燥物 5mg 來做除臭率，結果如圖四所示，以紅茶的水萃物除臭率最高，其次是綠茶及包種茶，最差的是茗葉的水萃物。

(二) 以乙酸乙酯為溶劑時茗葉及茶葉的萃出率及除臭率的比較

當以乙酸乙酯為萃取溶劑時，所得結果如表一所示，在萃出率方面以綠茶及包種茶最高，而以紅茶及茗葉的萃出率最差。

在除臭效果方面，結果如圖五所示，以茗葉之除臭率最高。

三、荖葉乙酸乙酯萃出物之區分及區分物 除口臭效果之評估

(一)薄層層析法的結果

首先使用分析型的薄層層析片觀察荖葉乙酸乙酯萃出物的分離情形，結果在分析型的薄層層析片上可以看出具有八個點(包含原點)，其 Rf 值分別為 0.85、0.66、0.55、0.43、0.3、0.18、0.09 及 0(原點)。本研究以 eugenol 的標準品與荖葉樣品於薄層板上進行共層析(co-chromatograph)發現 eugenol 的 Rf 值為 0.66 與 spot 2 的位置相同。與文獻值相比對 spot 4 可能是 hydroxychavicol。由 Folin-Ciocalteu's reagent 之呈色結果看出 spot 3 及 spot 5 呈現藍色，推測二者可能是酚類化合物。

(二)分離成分的除臭率

由 TLC 分離得到之各成分物質進行其除臭率之測定結果如圖六所示，可很明顯的看出所得的成分中以 band 4(除臭率為 $59 \pm 2\%$)及 band 5(除臭率為 $42 \pm 3\%$)具有較大的除臭率，比其他成分的除臭率大很多，具有顯著的差異($p < 0.05$)。

四、荖葉之乙酸乙酯萃出物以製備型薄層

層析區分得之區分物之高效能液相層析

利用製備型薄層層析法分離荖葉乙酸乙酯萃出物時，將 eugenol 標準品點在薄層板上判斷的位置，結果發現 band 3 的位置與 eugenol 的位置相同，以此判斷 band 3 中具有 eugenol，當進一步利用高效能液相層析法分析 band 3 的圖譜中發現，在滯留時間為 19 分鐘時的物質經與標準品比對後確定此物質為 eugenol(丁香醇)，但當中還含有其他未知物，由於 band 3 乾燥物的除臭率很低(除臭率為 5%)，因此由此結果可推斷未知物及 eugenol 的除臭效果很差。

1mg 的 band 4 乾燥物其除臭率高達 59%，因此最令人感到有興趣的在於探討 band 4 所含的物質為何，經過高效能液相層析儀的分析發現，band 4 的物質中含有未知

物 A、B、E 及 F，其中又以未知物 A 的含量最多(大約佔 50%)，其次是未知物 B 的含量(大約佔 31%)，因此由此可知 band 4 中主要具有除臭效果的物質為未知物 A 及 B。將所得的圖譜進一步去作四次微分確定各化合物間的分離狀況，結果發現未知物 A 的四次微分物圖為呈現不對稱的微分圖，而未知物 B 的四次微分圖為對稱圖形，因此可知未知物 A 可能還含有些許的不純物而未知物 B 則為純物質，至於未知物中的 A 及 B 為哪一種物質，還有賴更進一步將未知物 A 及 B 分離純化後去作核磁共振光譜分析(簡稱 NMR)及紅外線光譜儀(簡稱 IR)確定這兩種化合物的結構及名稱。

五、含氮臭氣物質三甲基胺模式系統的建立

(一)三甲基胺的模式系統之建立

為了建立檢測三甲基胺的模式系統，首先參考安田(1992)用在甲硫醇的系統，同樣地將三甲基胺的標準品(原濃度為 1000 ppm)加入無水酒精稀釋至 40 ppm 之後，放入 1 mL 三甲基胺酒精溶液 40 ppm 於玻璃瓶中之後再加入 0.1 mL 除臭樣品(控制組加入溶劑)，最後放置於 37 °C 水浴下震盪 6 分鐘，之後再用氣閉針抽取 0.5 mL 的上部氣體(headspace)打入 GC 中去分析。首先必須找出三甲基胺的最佳分離條件，實驗結果發現，三甲基胺的濃度及抽取上部氣體的量都遠比甲硫醇要來的高出許多，原因為在此條件下才能偵測到三甲基胺的存在，可能由於三甲基胺的揮發性可能比甲硫醇來的低，所以必須要在高濃度下才有三甲基胺揮發出來。

由於三甲基胺是溶於無水酒精中，所以當在水浴中震盪下乙醇也就揮發出來。在氣相層析儀的分離上可檢測到二個波峰，第一個波峰面積較大者為乙醇的位置，而第二個波峰面積較小者為三甲基胺(TMA)的波峰。

(二)荖葉乙酸乙酯萃出物除去三甲基胺的效果

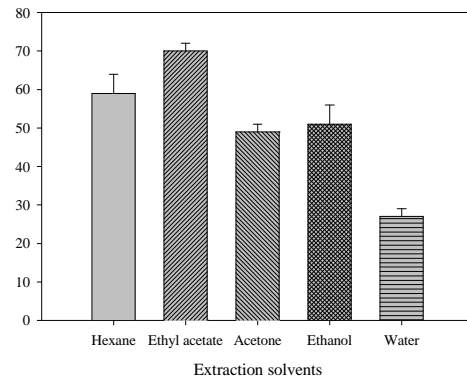
找到偵測三甲基胺的模式系統後於是將具有除去甲硫醇的荖葉乙酸乙酯萃出物於三甲基胺的模式中，進一步瞭解荖葉乙酸

乙酯萃出物是否也會抑制三甲基胺的揮發。取 0.1mL 荖葉乙酸乙酯萃出物(濃度為 50 mg/mL)添加於三甲基胺的模式系統中，結果經氣相層析儀分析之後發現，添加荖葉乙酸乙酯萃出物並不能抑制三甲基胺的揮發，結果見表二。

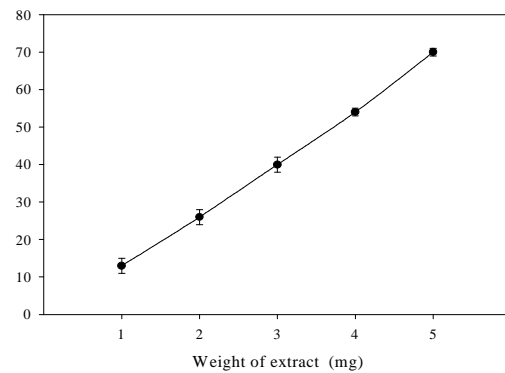
雖然加入荖葉乙酸乙酯萃出物並不能抑制三甲基胺之揮發，但文獻(川上等, 1996；田邊, 1996)指出綠茶萃出物及蘋果多酚皆可抑制三甲基胺的揮發，故推測若本模擬系統中添加紅茶或其他天然除口臭物質應可以抑制三甲基胺的揮發，但仍有待更進一步的證實。

肆、參考文獻

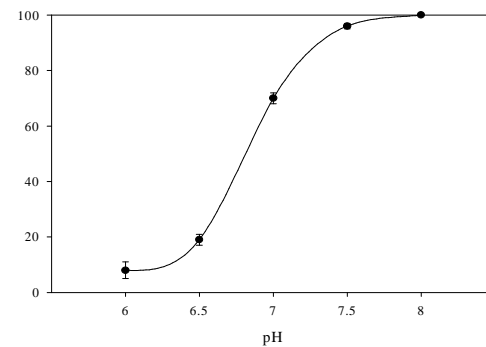
- 林志傑，1995，紅茶除口臭物質之萃取與區分，國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- 黃淑鈴和張為憲，1986，荖藤莖中主要抗氧化性成分之研究，中國農業化學會誌 24(2)：183-194。
- 黃丞宏，1994，各種茶葉除口臭效果之研究，國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- 川上正子、原征彥、南文雄，1996，綠茶抽出物 Polyphenone 在食品之應用(二)，食品工業 4.30：42-48。
- 田邊正行，1996，
食品利用消臭作用、
-抑制作用，New Food Industry 38(8)：42-48。
- 安田英之，1992，茶類消臭作用利用，食品工業 35：28-33。
- Julkunen-Titto, R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: methods for the analysis of certain phenolics. J. Agric. Food Chem. 33: 213-217.
- Loomis, W. D. and Battaile, J. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phyto. 5: 423-438.
- Patai, S. 1974. Chap. 17. Oxidation of thiols. In "The chemistry of the thiol group". John Wright & Sons Ltd.



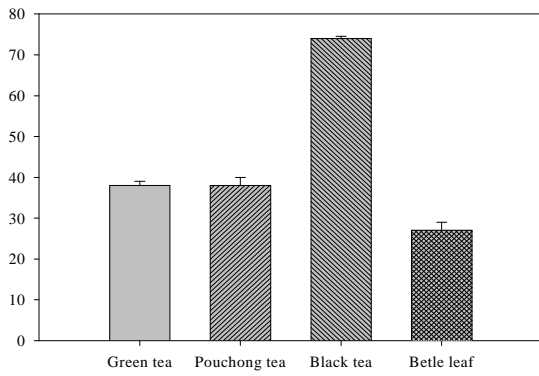
圖一 荖葉之不同溶劑萃出物的除口臭效果



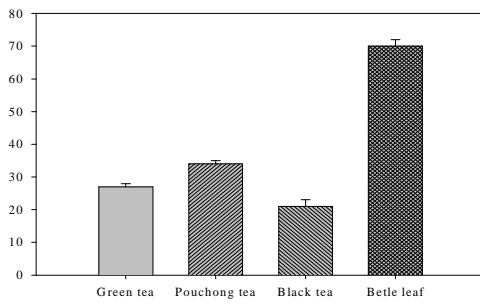
圖二 不同劑量的乙酸乙酯萃取物之除臭效果



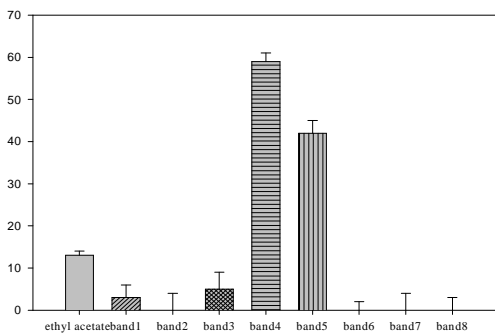
圖三 不同 pH 值下荖葉乙酸乙酯萃出物的除臭率



圖四 茶葉及荖葉以水萃取物之除臭率



圖五 茶葉及荖葉以乙酸乙酯萃取物之除臭率



圖六 製備型 TLC 片區分物之除臭率

表一 茶葉及荖葉以水或乙酸乙酯萃取時之萃出率

| Sample | Yield (%) | |
|--------------|-------------------------|------------------------|
| | Water Extract | Ethyl acetate extract |
| Green tea | 37.2 ± 2.1 ^a | 4.2 ± 0.1 ^a |
| Pouchong tea | 35.2 ± 1.1 ^a | 3.8 ± 0.1 ^a |
| Black tea | 31.0 ± 2.0 ^b | 1.7 ± 0.1 ^b |
| Betel leaf | 16.2 ± 3.4 ^c | 2.2 ± 0.5 ^b |

表二、三甲基胺積分面積的變化

| | Peak Area | | |
|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|
| | 1 st injection | 2 nd injection | Average |
| Control | 106,968 | 100,498 | 103,733 |
| 5mg betle leaf ethyl acetate extract | 116,900 | 118,676 | 117,788 |