

# 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(2/3)

計劃編號： NSC 87-2313-B-002-18

執行期間： 86年 8月 1日至 87年 7月 31日

主持人： 孫璐西 國立臺灣大學食品科技研究所

### 一、中文摘要：

紅茶水萃取物中除臭物質的區分，先以氯仿清洗去除咖啡因，再以 methyl isobutyl ketone 萃取，得茶紅質、兒茶素及茶黃質粗萃取物，進而以 Sephadex LH 20 管柱層析法區分茶黃質之粗萃取物，得四種具除口臭效果較佳之區分物，經 HPLC 分析，發現四區分物中含大量的 gallic acid 及茶黃質(TF1、TF2、TF3 及 TF4)。目前以製備型 HPLC 純化，再經 LC-Mass 鑑定紅茶中除臭物質，確定為 gallic acid 及茶黃質(TF1、TF2、TF3 及 TF4)。

紅茶之除口臭物質隨其成分含量、pH 及作用時間之上升而增加其除臭效果。以酵素反應模式系統探討影響紅茶除口臭效果之各種因素，發現綠茶水萃物經多元酚氧化酵素(EC 1.14.18.1)反應後，兒茶素轉換為未知之微量物質，其除口臭率提高。

關鍵詞：紅茶，除臭，兒茶素，茶黃質，茶紅質

### 二、緣由與目的

茶原產自中國，是我國重要的經濟作物。有關茶對人體的生理功效自古便受到重視，最近的研究報告則指出茶葉具有抗菌性、防止蛀牙、抑制血壓上升、降低血膽固醇、抗腫瘤及抗氧化等生理活性。

本實驗室曾以台灣地區所生產的茶菁，台茶12號，所製成不同發酵程度之茶葉，結果發現紅茶中雖兒茶素含量甚低，但亦具有除臭效果，由此可知紅茶中除臭成分除了兒茶素之外尚有待証實的物質。

目前學者對茶葉萃出物之除口臭效果研究，大都以綠茶為對象，針對此實有必要深入探討。故本計畫擬用紅茶為對象，本年度擬探討 (1)紅茶除臭物各區分物之成分分析與鑑定(2)於模式系統中探討影響除臭效果之各種因素(3)推測紅茶除臭之作用機制。

### 三、實驗方法及材料

(一) 除口臭效果之測定 (Kita et al.,1990)

將 0.1 ml之待測樣品茶葉萃出液及 1.5ml 之 pH 7.5 磷酸鉀緩衝液 (由 0.1M 之  $K_2HPO_4$  及 0.1M 之  $KH_2PO_4$  配製而成) 置入 14 ml 樣品瓶中 (控制組之樣品瓶則只含磷酸緩衝液及萃取溶劑)，再加入甲硫醇標準品 1ml(濃度為 2  $\mu$ g/ml)，然後以附有矽膠墊片之螺旋瓶蓋栓緊後振盪 5秒鐘。將樣品瓶置於 37 水浴 6 分鐘，待氣、液相平衡後，以氣閉式注射針 (Hamilton,#1001) 抽取上部氣體 (head space)0.2ml 注入氣相層析儀，進行甲硫醇之定量分析，並計算除臭率。

除臭率 =  $(C-S)/C \times 100\%$

C：控制組甲硫醇之波峰面積

S：實驗組甲硫醇之波峰面積

甲硫醇 GC 定量分析條件如下：

分離管柱：1.8 m  $\times$  1/8 inch (id)

Teflon tube packed with 5%

polyphenylether 5 ring on Chromosorb WAW DMCS 80 100 mesh(日本 GI Science公司，東京)，注射器溫度：

90，管柱溫度：55，載流氣體：

氮氣，流速 20 ml/min，空氣流速：

100 ml/min, 氫氣流速: 75 ml/min, 檢測器: 火焰光度檢測器(FPD), 溫度 200。

(二) 多元酚類高效能液相層析 (Bailey and Hursten, 1991)

樣品之製備及處理: 紅茶萃出物或其區分物約 300mg 以 1.5 ml 原萃取溶劑溶解。

HPLC 分析條件:

分離管柱: Hypersil ODS (0.49 cm id × 25 cm), 5 μm particle size, 英國 Hichrom 公司, Berkshire)。沖提液: Solvent A: 2.0% acetic acid, solvent B: acetonitrile, 起始條件為 8% solvent B, 在 50 min 內線性增加至 31% B solvent。注射量: 20 μl, 流速: 1.5 ml/min, 檢測波長: 280 nm 或 460 nm

(三) Sephadex LH-20 管柱層析 (竹尾和大, 1972)

1. 樣品之製備及處理:

紅茶水萃取物經 Chloroform 清洗後, 再用 Methyl isobutyl ketone 萃取得有機層, 減壓濃縮去有機溶劑之萃出物, 以 35% 丙酮溶解後, 將之全部注入管柱進行層析。

2. 管柱層析條件:

玻璃管柱: 瑞典 Pharmacia 公司 (Uppsala), 2.5 cm(id) × 50 cm, 填充物: 瑞典 Pharmacia 公司, Sephadex LH-20, 充填高度 40 cm, 平衡溶液為 35% 丙酮, 沖提液: 35%(300ml) 至 60%(450ml) 梯度的丙酮水溶液, 流速: 2 ml/min, 檢測波長: 380 nm。

(四) 區分物質之高效能液相層析: 所用之方法同前述(二)。

#### 四、結果與討論

(一) 液相層析管柱區分及區分物除口臭效果之評估

將 MIBK 萃出物進行 Sephadex LH-20 管柱層析, 以 35% 丙酮水溶液為平衡液, 再以 35% 至 60%

梯度上升丙酮水溶液為沖提液, 得七種區分物(圖 1)。如圖 2 所示 Sephadex LH-20 液相層析區分物之除口臭率比較, 結果顯示此七種區分物以 V 之除口臭率 66.7% 最好, 依序為 VII (62.1%) > VI (59.3%) > II (51.3%) > IV (33.6%) > I (26.8%) > III (25.9%)。

(二) 紅茶除口臭物各區分物之成分分析

將 Sephadex LH-20 具較高之除口臭效果之區分物, 以高效能液相層析儀分析其成分, 比較 fraction II 與 gallic acid 標準品, 得知可能含有大量的 gallic acid, 再將 fraction II 與 gallic acid 標準品混合共同注射, 以高效能液相層析圖譜上顯現為單一波峰。

而 Sephadex LH-20 之 V、VI 及 VII 區分物以高效能液相層析儀分析其成分, fraction V 含有大量的茶黃質 TF1 及 TF2; fraction VI 則含有大量的茶黃質 TF2, 另外 TF3 及一未知物亦為重要的成分; 而茶黃質 TF4 則為 fraction VII 的主要成分, 因在 HPLC 中佔此區分物的大多數, 故其他微量物質在層析圖上難以顯現。此結果顯示對於紅茶的多元酚化合物, 以 Sephadex LH-20 為層析膠體, 用 35% 丙酮水溶液為平衡溶液及以 35% 梯度上升至 60% 丙酮水溶液為沖提液是良好的區分方法, 特別是對 gallic acid 及茶黃質 TF4; 而 gallic acid 之極性較大在沖提液加入 100 ml 時即被沖提下來, 茶黃質 TF4 因極性較小故在最後才被沖提下來。

由 sephadex LH-20 液相層析區分物中, 推測紅茶中主要具有除口臭效果之成分可能是 gallic acid 及茶黃質 TF1、TF2、TF3、TF4 或其他未知化合物, 有待後續實驗證明。

(三) 紅茶中除口臭物質之鑑定與基本性質探討：

1. 紅茶中除口臭物質之鑑定

將上述 Sephadex LH-20 液相層析所得之除臭效果較佳之 V、VI 及 VII 區分物，再以高效能液相層析製備型管柱區分，在檢測器末端將樣品分別收集，濃縮後再次進行高效能液相層析，重複三次以上至確定為純物質，將所得之純化物以液相層析質譜儀 (LC - Ms) 鑑定成分，確定從 Sephadex LH-20 各 fraction II 區分之物質確實是 gallic acid、TF1、TF2、TF3 及、TF4。

2. 影響紅茶成分除臭效果之因素

2.1 不同酸鹼值對紅茶成分之除臭效果影響

黃 (1994) 曾測定不同酸鹼值對紅茶及綠茶水萃液之除臭效果影響，發現紅茶及綠茶水萃液之除臭效果隨酸鹼值提高而增加，但不知紅茶中之除臭成分是否亦受酸鹼值影響，本實驗以紅茶之 MIBK 萃出物、茶黃質混合物 (購自 Sigma 公司) 及 gallic acid 標準品各 0.2 mg 為樣品，結果如圖 3 所示，紅茶之除臭成分之除臭效果確受酸鹼值之影響，pH 值愈高，除臭效果愈強。黃 (1994) 推測在鹼性條件下，多元酚的游離 -OH 基形成離子化狀態，游離化的多元酚易氧化成類的形式，而類化合物會與甲硫醇產生氧化還原反應，進而達到除甲硫醇的臭味，此反應機制尚待進一步證實。

2.2 紅茶成分之除臭能力及不同劑量的紅茶成分對除臭效果影響

將紅茶純化所得之純物質 gallic acid、四種茶黃質 (TF1、TF2、TF3 及 TF4)、EGCg 及未知物測其除臭能力，並比

較之；並各以 0.1 mg、0.2 mg、0.3 mg 及 0.4 mg 不同之劑量探討對除臭效果的影響，結果如圖 4，當測試樣品的用量在 0.1 mg 時，其除臭能力的次序為 EGCg > TF4 > gallic acid > TF2 > 未知物 > TF3 > T1，此七種分除臭物能力仍以 EGCg 為首。已知 EGCg > ECG > EC (Yasuda and Arakawa, 1995) 與本研究結果相吻合，由於此順序與兒茶素的抗氧化能力的次序相同，可能與兒茶素的結構有關，其中位於 5' 的 OH 基或許扮演重要角色，另 gallic acid 在兒茶素結構的存在亦與除臭能力有很大的關係，同理推測在茶黃質的結構上，gallic acid 的存在與否可能與除臭能力有關，其中 TF1 的結構上並不具 gallic acid，故 TF1 的除臭能力較差，而 TF4 具有二個 gallic acid，因此其除臭能力較強。由圖 5 可發現七種紅茶成分之除臭能力隨劑量之增加而上升，茶黃質 TF4 可能是分子量最大，其結構又具有二個 gallic acid，當參與反應的濃度增加而甲硫醇的濃度卻不增時，TF4 分子本身可能自行以氫鍵結合成分子團，不易與甲硫醇反應。

(四) 酵素反應模式系統中討論紅茶成分變化及除臭效果比較

1. 紅茶成分之除臭效果影響

為明瞭紅茶除臭成分之作用機制，將綠茶在冰水避光狀態萃出之未氧化兒茶素類，加入多元酚氧化酵素 (EC 1.14.18.1) 作用產生聚合度較高之酚類化合物，以模擬紅茶製造時兒茶素之變化，在反應時間 2 小時後，以 HPLC 分析其成分之變化。由 HPLC 層析圖顯示，綠茶

中的兒茶素 EGCg、EC 及 EGC 因酵素反應而消失，在酵素反應物之圖譜上皆無法識別出其存在位置，另外酵素反應物之圖譜在滯留時間 63 分鐘位置產生一新的未知波峰，尚待鑑定。

而四種兒茶素標準品 (EGCg、ECG、EC 及 EGC 各 0.25 mg) 混合物經多元酚氧化酵素反應 2 小時後，其中 EGCg 及 EC 幾乎完全被作用，於 HPLC 圖譜上消失，EGC 及 ECG 則尚存部分，但未發現 TF1、TF2、TF3 及 TF4 等茶黃質之存在，推測可能是酵素作用尚未聚合成一新的化合物，並且在聚合反應中參與酵素作用之受質並不僅此四兒茶素，亦或另需 cofactor 參與反應，且四種兒茶素參與酵素反應之比例不同，以 EGCg 及 EC 最多，EGC 及 ECG 較少。

## 2. 除口臭效果比較

表 1 結果顯示以綠茶為樣品加入多元酚氧化酵素時，其除口臭能力未因 EGCg 及 EGC 之量減少而減，卻因此增加除口能力，推測可能因產生新的未知成分而增加除口臭能力。但以兒茶素標準品之混合物為樣品經多元酚氧化酵素作用後，其除口臭能力卻因 EGCg 等被酵素作用分解後，無法再提供除臭能力。

## 五、參考文獻

黃丞宏.1994.各種茶葉除口臭效果之研究.國立台灣  
立台灣大學食品科技研究所碩士論文.

竹尾忠一 和 大 子.1972.紅茶 水色  
關 研究.(第1報)紅茶 含  
水溶性色素類 水色 關 分  
離.日食工誌.19:406-409.

Bailey ,R.G., and Hursten, H.1991.  
Comparative study of the reversed-  
phase high performance liquid  
chromatography of black tea liquors  
with special reference to thearubigins.  
J.Chromatography. 542:115-128.

Kita, N., Fujimoto, K., Nakajima, I.,  
Hayashi, R. and Shibuya, K. 1990.  
Screening test for deodorizing  
substances form marine algae and  
identification of phlorotannins as the  
effective ingredients in Eisenia. J. of  
Applied Phycology 2: 155-162.

Tonzetich, J. 1977.Production and origin of oral  
malodor: a review of mechanisms and  
methods of analysis. J. Periodontol.  
48(1): 13-20.

Tonzetich, J. and Carpenter, P. A. W.  
1971.Production of volatile sulphur  
compound from cysteine, cystine and  
methionine by human dental plaque.  
Archs. oral Biol. 16: 599-607.

Tonzetich, J. and Richter, V. J. 1964.  
Evaluation of volatile odoriferous  
components of saliva. Arch oral Biol. 9:  
39-45.

Wang, Z. Y., Huang, M. T., Ho, C. T. ,  
Chang, R., Ma, W., Ferraro, T., Reuhl,  
K. R., Yang, C. S. and Conney, A. H.  
1992. Inhibitory effect of green tea on  
the growth of established skin  
papilomas in mice. Cancer Research  
52:6657-6665.

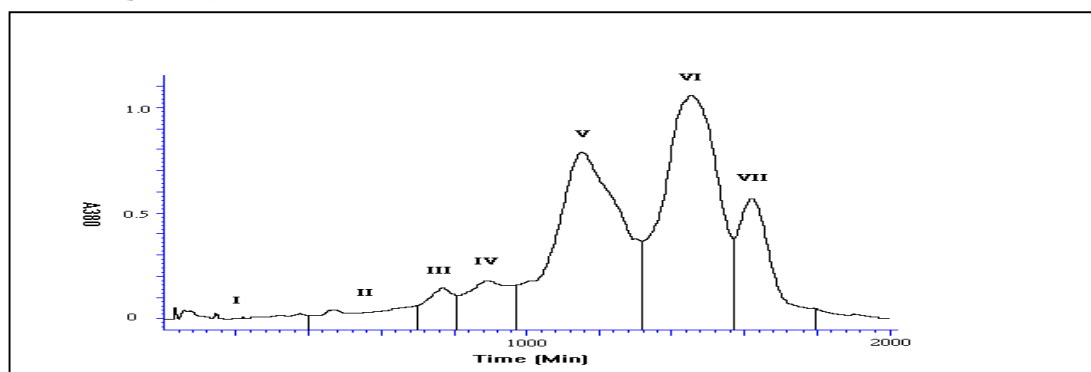


圖 1 紅茶 MIBK 萃出物之 Sephadex LH- 20 液相層析圖

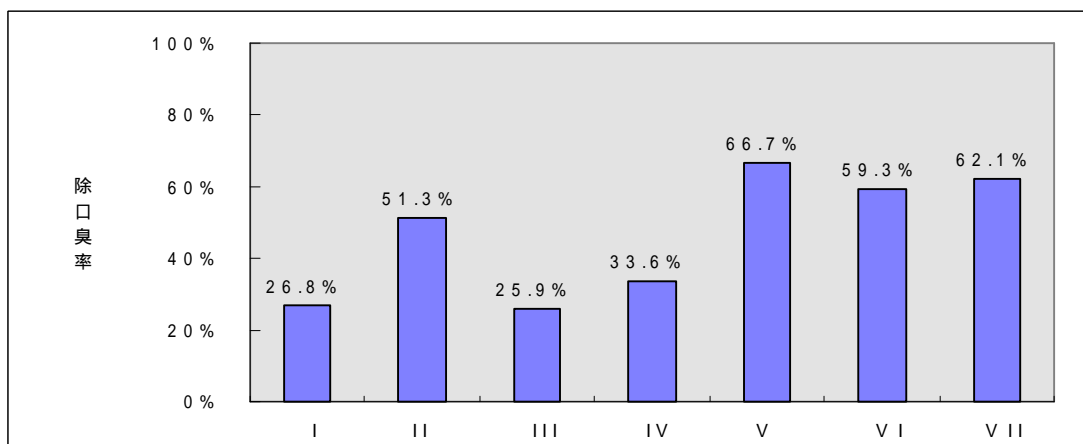


圖 2 Sephadex LH-20 液相層析區分物之除口臭比較

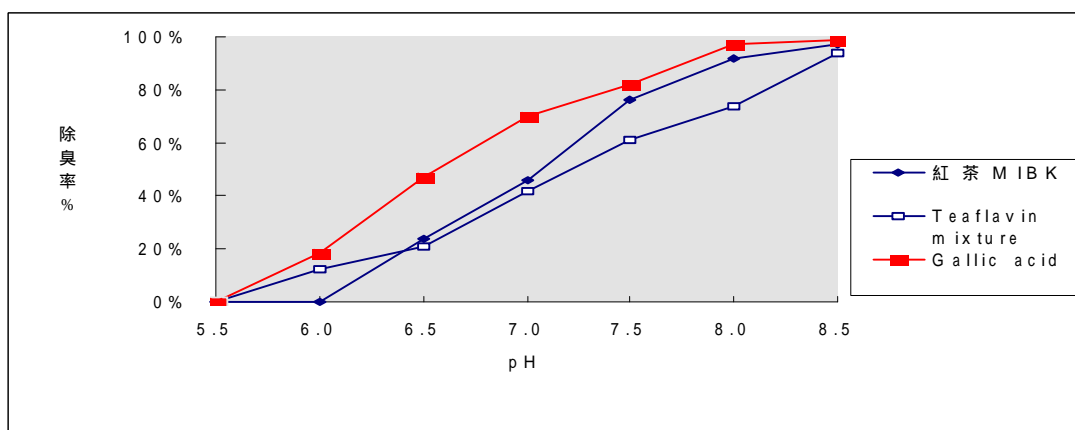


圖 3 : 多元酚類在不同 pH 條件下之除臭效果

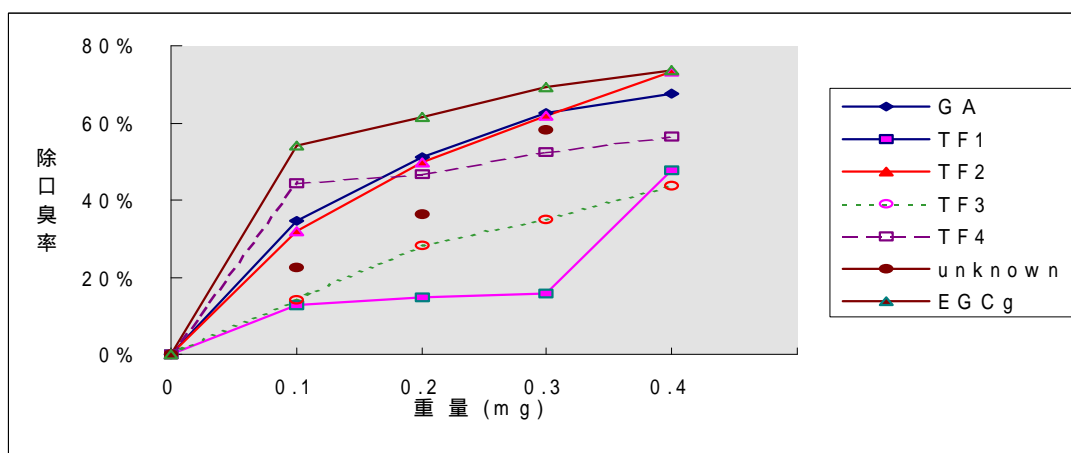


圖4 不同劑量的紅茶多元酚類化合物之除口臭效果

表1 酵素反應模式系統探討紅茶之除臭效果

模式	樣品	除口臭率	相對除臭比例
一	綠茶	62%	100%
	綠茶經多元酚氧化酵素作用之產物	78%	126%
二	四種兒茶素混合物	98%	100%
	四種兒茶素混合物經多元酚氧化酵素作用之產物	6.9%	7%