

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫名稱：從茶葉中開發能強化及維持生理機能之有效成分與最佳製備條件。

計畫編號：

執行期間：88年9月1日至89年6月30日。

計畫類別：個別型。

主持人：周隆武

摘要

本研究的目的之一是要開發出最適當的製備條件，藉以改良茶葉中兒茶素類物質，使能強化並維持各種生理功能的效力。隨後便進行動物試驗模式，鑑定其生理活性。D型的半乳糖胺對老鼠引起的肝損害是一個簡單且已瞭解清楚的模式。D型的半乳糖胺所導致肝產生組織學上的損害正如同肝炎病毒所引起的症狀。將此一新製成品 palmitoyl-flavanols 進行保肝功能評估，顯示不僅具有顯著功效性外，這類純化製備方式亦值得開發與推廣。

關鍵詞：catechins, esterification, palmitoyl-flavanols, D-galactosamine。

前言

茶及其內所含成分之有效生理機能的研究，國外相關報導就有抗菌、抗病毒、抗炎、抗突變、抗氧化性，甚至有促進 T 淋巴球和 B 淋巴球以及 natural killer cells 的增生，並且還可以降低血中三酸甘油酯與膽固醇含量；而國內相關的研究，也持相似的觀點，對茶於抑制癌細胞增殖與轉移，以及其在抗氧化與抗炎之分子機轉上都有正面的報導。總括而言，茶的有效成分之功能性探討相當廣泛，且發表期刊的篇數與質量上，亦相當可觀。茶不僅擁有廣大消費市場外，其有效生理機能的宣導更是普及消費群，因此對於茶作為開發保健食品的原料，在眾多的健康食品市場中，可說是最具有開發與應用價值。

針對茶中有效成分的製造面來說，多以傳統沸水萃取後，再以氯仿去除咖啡因，以乙酸乙酯萃取出多酚類物質；方法雖可快速得到茶中有效成分，但過程中乙酸乙酯之有機溶劑不易揮發去除乾淨，導致茶中有效成分在濃縮食用後，不能完全的表現出其有效的生理機能，反而有凝聚有機溶劑的可能；為此擬改良、開發萃取茶葉中有效成分之最佳加工、製備條件（參見實驗大綱），藉酯化反應後產生的酯化物特性，與不必要的水溶性物質及有機溶劑分離，並在隨後所研發的製備方法中，得到改良加工後的產物--硬脂酸兒茶素酯（palmitoyl-flavanols）。

雖然文獻報導中對茶的生物活性諸多肯定，然而對於兒茶素類物質在人體消化吸收率偏低（61% 隨糞便流失，20% 隨尿液流失）及生體內會進一步代謝的情況下（如形成 glucuronic acid 和 sulphate 結合物以及兒茶素可能被代謝成為二次代謝產物），而使兒茶素類物質的生體利用率（bioavailability）大打折扣；本研究擬參酌 Perrissoud, D. 所發展之 3-palmitoyl-(+)-catechin 成功的高於 catechin 十倍的作用預防肝壞死的實驗結果，擬以對去沒食子酸之兒茶素類物質進行酯化，以促成酯化後的去沒食子酸兒茶素類物質以脂質消化吸收的方式，進入淋巴循環，提高其消化吸收率，並因受到脂質的代謝方式而延緩並避免遭到肝臟酵素直接代謝破壞，而失去其有效機能。是以利用如後圖實

驗大綱之研究策略，來改變並提高兒茶素類物質的生體利用率，以及預期發展出更具功能性且效期長的優良保健類食品。

材料與方法

本實驗材料主要是不發酵茶（綠茶），先對茶以熱水處理並過濾後（參見後圖實驗大綱），再以傳統氯仿、乙酸以酯等有機溶劑萃取茶中主要成分兒茶素類物質，從而去除大部份的礦物質與纖維素以及咖啡因等干擾成分，反覆冷凍乾燥濃縮數次後，先進行水解作用，以促成 degallated flavanols 的產生，以利下游實驗酯化產物品質的控制，利用簡單的沸點的差異，作第一次的分離步驟（Fractionation I），部份純化出的 degallated flavanols，接著進行硬脂酸對 degallated flavanols 之酯化反應，再考慮以經濟及便利因素，探討吸附層析管柱分離法、蒸餾法及凝固點分離法（Fractionation II）來進行硬脂酸、硬脂酸兒茶素酯和兒茶素類物質的分離，並藉此排除不必要的水溶性物質及有機溶劑。初步得到第一項純化加工後的產物為硬脂酸兒茶素酯（palmitoyl-flavanols），即為我們的主要產品。將硬脂酸兒茶素酯進一步進行去酯化反應，純化方法如 Fractionation II 之條件（Fractionation III），將可分離出純度極高且不含有機溶劑殘留的兒茶素類物質，此物質為純化加工後的第二項產物。

其功能性檢定擬以大鼠為動物模型，進行以 D-galactosamine 誘發老鼠肝損害的模型試驗，測定血液中 GOT、GPT 及 Bilirubin 的生化值。

結果與討論

過去 Perrissoud, D. 對商品化的 Catechin 進行酯化而得到的 3-palmitoyl-(+)-catechin，在相似的以 D-galactosamine 誘發老鼠肝損害的模型試驗上，發現可以更成功的比 catechin 高十倍的作用來預防肝壞死，成效顯著，產物雖然精純唯產量及製作成本較高。在比較其它的動物模型試驗上，如誘導老鼠發生酒精性脂肪肝上，3-palmitoyl-(+)-catechin 仍比商品化的 Catechin 預防效果上高。綜括而言，3-palmitoyl-(+)-catechin 之所以有較顯著的生理功能，目前被推測為酯化後的兒茶素類物質以脂質消化吸收的方式，進入淋巴循環，提高了消化吸收率，並因受到脂質的代謝方式而延緩並避免遭到肝臟酵素直接代謝破壞，因而可以延緩其有效機能。而對於不同的脂肪酸對兒茶素類物質所做的酯化物，如 3-heptyl-(+)-catechin 與 3-palmitoyl-(+)-catechin 一樣，亦能對 B 型肝炎患者提昇其免疫反應，唯效果上，3-palmitoyl-(+)-catechin 比 3-heptyl-(+)-catechin 有較優異的保護作用，但限於相關的實驗數據不多，目前都以 palmitate 為原料；這反應相關研究之不足，相對也表示這具備研究開發以不同油脂型態對兒茶素類物質進行酯化的發展潛力。

以硬脂酸作為本次實驗的主要飽和脂肪酸，是因為飽和脂肪酸很穩定並有成功的案例可循，未來亦將考量油脂的特性，進行不同長度的脂肪酸對兒茶素類物質之酯化反應，藉由兒茶素類物質之抗氧化特性，發展出不同油脂衍生物，以探討改良後油脂特性對保健功能的影響。本實驗室已成功發展出萃取茶葉中有效成分兒茶素類物質之最佳加工、製備條件（製程如圖一）。並得到第一項主要加工產品--硬脂酸兒茶素酯（palmitoyl-flavanols）。在進行儲藏試驗後發現安定性亦高。

功能評估則進行以 D-galactosamine 誘發老鼠肝損害的模型試驗；D-galactosamine 會造成肝小葉瀰散性的肝損壞並伴隨發炎現象，為被使用來模擬病毒所引起的肝損害現象，此與 CCl_4 、bromobenzene、dimethylnitrosamine 和 thioacetamide 等肝毒劑所引發的肝臟中央葉壞死並伴隨脂肪組織炎，但無肝發炎的現象完全不同；因為病毒極難存活在離體環境下，不但培養困難且又具危險性，故很難進行病毒感染試驗，故以 D-galactosamine 來模擬病毒誘發老鼠肝損害 是最佳的選擇；又 B 型肝炎病毒是引發肝癌的主要禍首，長期對國人存在極高的感染率與威脅性，而肝癌佔所有癌症患者比例亦有升高趨勢，實有必要進行此一動物實驗模型試驗，試驗其抗病毒及抗氧化能力，並依此模式來發展能預防與保護肝損害的保健類食品。兒茶素類物質透過最佳加工、製備條件後，可得到酯化與去酯化反應後之兒茶素類物質，將酯化反應後之兒茶素類物質進行功能性試驗，結果如表一，明顯可見酯化反應後之兒茶素類物質具有保肝效果，顯示這類純化製備方式值得開發與推廣。

參考文獻

1. Graham, H. N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med.*, 21: 334-350, 1992.
2. Yang, C. S. and Wang, Z. Y. Tea and cancer: a review. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85(13): 1038-1049, 1993.
3. Perrissoud, D., maignan, F. and Dumont, J. M. Antinecrotic effect of 3-palmitoyl-(+)-catechin against liver damage induced by galactosamine or ethanol in the rat. *Liver*. 5:55-63, 1985.
4. Sugiyama, K., He, P., Wada, S. and Tamaki, F. Green tea suppresses D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* 62: 609-611, 1998.
5. Ryle, P. R., Broillet, A., Perrissoud, D., Chakraborty, J. and Thomson, A. D. A comparative study of the effects of (+)-catechin and 3-palmitoyl-(+)-catechin on alcoholic fatty liver in the rat. *Alcohol Alcoholism*. 18:239-248, 1983.
6. Nicole, A., Fasel-Felley, J., Perrissoud, D. and Frei, P. C. Influence of palmitoyl-3-catechin and heptyl-3-catechin on the leucocyte migration inhibition test carried out in the presence of PPD and hepatitis B surface antigen. *Int. J. Immunopharmac.* 7(1): 87-92. 1985.

表一、D-galactosamine 腹腔處理之大白鼠，其血液 GPT、GOT 及 Bilirubin 測定。

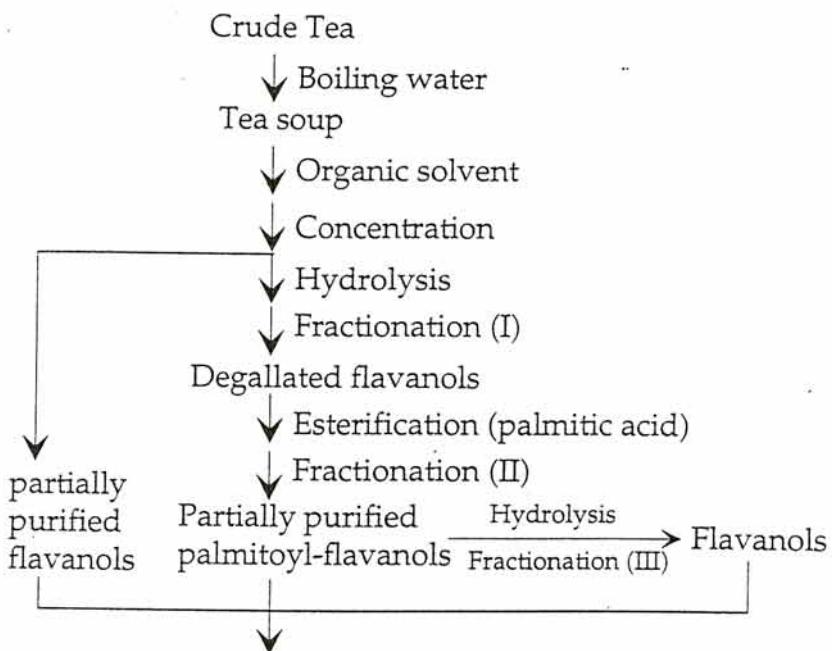
Treatment	n	Serum		
		GPT	GOT	Bilirubin
CK	10	219± 20.52 ^{b1,2}	628± 36.16 ^b	9.1± 1.12 ^b
PC	10	129± 25.28 ^a	185± 18.39 ^a	4.9± 0.56 ^a

1. Values are mean ± SD.

2. Values in the same column with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$.

圖一

Experimental Outline



- (1) The assessment of the above products on the suppression of D-galactosamine-induced liver injury in rats.
- (2) The assessment of the influences of above products on growth, antioxidative effect, and lipid metabolism in hamsters.
- (3) The assessment of the physiological effects of rats by the dose-dependent of the above products ingestion.