

嘉南藥理大學109年度 研究計畫成果報告

計畫名稱：東山咖啡樹葉保健品開發

■重點(整合型)研究計畫

遇見造咖，東山再起

☐與業界廠商合作之研究計畫

執行期間：109年5月13日至12月31日

總計畫主持人：王柏森

本（子）計畫主持人：王柏森

中華民國110年2月22日

(一) 摘要

本試驗將咖啡樹葉以40℃、80℃、120℃烘乾24小時，萃取，分別得到CL40、CL80、CL120咖啡樹葉水萃取物，由結果得知，CL40抑制自由基效果較佳，是由於 CL40樣品的總多酚類化合物與還原力含量較高，但是 CL40、CL80、CL120並不皆具有螯合亞鐵離子之活性，我們認為 CL40、CL80、CL120皆具有抗氧化活性，CL120雖然總多酚類化合物與還原力化合物含量較低，但在較高的溫度乾燥下，似乎也不減少其胺基酸成分，由此可知，咖啡葉可以進一步開發為健康飲料的材料。。



(二)介紹

咖啡是全世界最主要的飲料之一。全世界每年消耗約700萬噸咖啡豆，如果以杯為單位，一年全世界喝掉約為4000億杯咖啡。咖啡樹屬於茜草科多年生常綠灌木，是一種園藝性多年生的經濟作物。而目前咖啡樹主要是利用果實種子製成咖啡生豆，進一步烘烤成為一般市售棕黑色咖啡豆。但是在蘇丹，咖啡樹葉被用來製作成茶飲品已有200多年的歷史。而與傳統山茶樹葉相比，咖啡樹葉茶中的咖啡因含量較低，而多酚類抗氧化化學成分含量較高。此外，咖啡樹葉含有許多不同的植物活性物質，包括生物鹼（咖啡因caffeine，松果鹼trigonelline，腺嘌呤7-葡萄糖基adenine-7-glucosyl，可可鹼theobromine，7-甲基黃嘌呤7-methylxanthine），類黃酮（花青素anthocyanins，槲皮素葡萄糖苷quercetin glucoside，槲皮素quercetin，異槲皮鹼isoquercitrine，蘆丁rutin，山奈酚kaempferol），萜類化合物（山梨醇kahweol，咖啡甾醇cafestol，16-O-甲基咖啡酚16-O-methyl cafestol），單寧酸（芒果苷mangiferin，異芒果苷isomangiferin），酚酸（咖啡酸caffeic acid，綠原酸chlorogenic acid，對香豆酸p-coumaric acid，阿魏酸ferulic acid，芥子酸sinapic acid）和兒茶素（兒茶素catechin，表兒茶素epicatechin），其中大多數具有生物活性。這已引起全球許多消費者的注意，許多研究因此探討咖啡

樹葉是否能成為一種健康飲料的材料。

目前已經知道，自由基（free radicals）、活性氧（reactive oxygen species）和脂質過氧化作用（lipid peroxidation）與人類疾病的發展，包括老化、癌症和心血管疾病等有密切關係。正常生理代謝過程中會產生自由基與活性氧。在健康狀況下，身體之抗氧化系統會與自由基相抗衡，以維持氧化壓力平衡之生理狀況。當平衡遭到破壞時，活性氧與自由基便會累積過量，進而攻擊細胞組織、細胞膜及基因核苷酸，而造成細胞變異、傷害，且隨著年齡增加，體內抗氧化防禦系統也跟著降低，因而出現疾病或衰老現象。而諸多的研究證實，各類植物中存在多種型式的天然抗氧化物質，可以有效降低氧化傷害，進而減少疾病發生機率。

由於咖啡樹葉的保健作用，受到消費者重視，但是目前市面上有關咖啡樹葉的相關保健產品非常少見，造成消費者使用不便。因此本研究將進行不同溫度對咖啡樹葉進行乾燥24小時，並分析咖啡樹葉不同加工方法如何影響生物活性成分含量。進而開發咖啡樹葉相關保健產品，作為消費者養生保健之應用，並進而增加產學合作效能。

(三)研究方法

一、實驗材料

咖啡樹葉採收自台南市東山區咖啡樹

二、實驗方法

咖啡樹葉以40℃、80℃、120℃烘乾，再以粉碎機粉碎，分別秤樣品50g，倒入500ml 之燒瓶中，加入1000ml 去離子水，熱水煮沸，分別加熱10分鐘處理，初步過濾以10000rpm 離心30分鐘，所得濾渣再以同樣條件萃取。收集二次之濾液混和，進行真空減壓濃縮，再冷凍乾燥得到萃取物之粉末，磨粉備用。樣本分別命名為CL40、CL80、CL120。

2. 抗氧化性分析

2.1 還原力測定

取不同濃度 CL40、CL80、CL120之樣品各0.5ml，加入0.5ml 0.2M pH 6.6 phosphate buffer 及0.5ml 1% 赤血鹽 (potassium ferricyanide)，於50℃ 水浴20分鐘後快速冷卻，再加入0.5ml 10% trichloroacetic acid (TCA) 溶液，混合後以3000rpm 離心10min，取其上清液 1ml，並加入1.4ml 蒸餾水及0.1ml 0.1% ferric chloride 溶液混合均勻，於10分鐘反應後以分光光度計測定 700nm 之吸光值，並以 ascorbic acid 作為樣品的對照組。吸光值愈高表示還

原力愈強。

2.2 清除1,1-二苯基-2-苦味基團 (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH) 能力之測定

取不同濃度 CL40、CL80、CL120之樣品各 2ml，加入0.5ml 新鮮配製之 10mM DPPH - MeOH 溶液，經均勻混合後反應30分鐘，以分光光度計測其517nm 之吸光值，並以 ascorbic acid 作為樣品的對照組。吸光值愈低表示捕捉能力愈強。

2.3 螯合亞鐵離子之測定

取不同濃度 CL40、CL80、CL120之樣品各0.5ml，加入 1.85ml 甲醇及 0.05ml 2mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，經30秒作用後再加入0.1ml 5 mM ferrozine，在室溫下反應10 分鐘後立即以分光光度計測其在562nm 的吸光值，並以 EDTA 作為樣品的對照組。吸光值愈低表示螯合金屬離子之能力愈強。

3. 抗氧化成分總多酚類 (Total phenolic acid) 含量測定

取不同濃度 CL40、CL80、CL120之樣品濃度，以微量吸管吸取 0.1 ml 至試管中，加入2ml 2% Na_2CO_3 溶液，2分鐘後再加入0.1ml 50% Folin-Ciocalteu reagent 溶液混合均勻於室溫下反應 30分鐘，以分光光度計在750nm 下測定吸光值。以 gallic acid 作為標準曲線的迴歸方程式中，計算樣品總酚類化合物含量。

4. 總胺基酸分析

取0.1 g CL40、CL80、CL120之樣品濃度並加入 10 mL 6 N HCl
密封加熱 120℃ 分解 24 小時，使用胺基酸分析儀分析胺基酸含
量。



(四)結果

a. 咖啡樹葉水萃物 CL40、CL80、CL120製備

咖啡樹葉採收自台南市東山區咖啡樹，咖啡樹葉以40℃、80℃、120℃烘乾24小時，再以粉碎機粉碎，分別秤粉末樣品50g，倒入1000ml 之燒杯中，加入500ml 去離子水，熱水煮沸10分鐘處理，初步過濾後，以10000rpm 離心30分鐘，所得濾渣再以同樣條件萃取。收集二次之濾液混和，進行真空減壓濃縮，再冷凍乾燥得到咖啡樹葉水萃物，磨粉備用。樣本分別命名為CL40、CL80、CL120。

b. 咖啡樹葉水萃物抗氧化總多酚類含量測定

取不同濃度 CL40、CL80、CL120之樣品濃度，以 Folin-Ciocalteu reagent 溶液混合均勻於室溫下反應 30分鐘，以 gallic acid 作為標準曲線的迴歸方程式中，計算 CL40、CL80、CL120樣品總多酚類化合物含量分別為12.3mg/g、10.8mg/g、7.6mg/g。由上述結果可知，樣品乾燥溫度會影響水萃物總多酚類化合物含量，乾燥溫度越高，總多酚類化合物損失越大，造成水萃物總多酚類化合物含量減少。

c. 咖啡樹葉水萃物還原力測定

取不同濃度 CL40、CL80、CL120之樣品濃度，以赤血鹽 (potassium ferricyanide) 和樣本反應呈色，以 ascorbic acid 作為標準曲線的迴歸方程式中，計算CL40、CL80、CL120樣品還原力含量分別為14.6mg/g、7.2mg/g、3.4mg/g。由上述結果可知，樣品乾燥溫度會影響水萃物還原力含量，乾燥溫度越高，總還原力損失越大，造成水萃物還原力含量減少。

d. 咖啡樹葉水萃物清除 DPPH 自由基能力之測定

取不同濃度 CL40、CL80、CL120之樣品進行抑制 DPPH 自由基反應，在50~200ug/ml 濃度下，CL40可以抑制18%、36%、48%自由基，CL80可以抑制12%、28%、38%自由基，CL120可以抑制8%、16%、28%自由基。由上述結果可知，CL40抑制自由基效果較佳，這可能是

由於樣品的總多酚類化合物與還原力含量較高，造成水萃物抑制自由基效果較佳。

e. 咖啡樹葉水萃物螯合亞鐵離子之測定

取不同濃度 CL40、CL80、CL120之樣品，處理 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，經30秒作用後再加入 ferrozine，並以 EDTA 作為樣品的對照組。在 10~200ug/ml 濃度下，CL40、CL80、CL120，皆無明顯螯合亞鐵離子之活性。

f. 咖啡樹葉水萃物總胺基酸分析之測定

取0.1 g CL40、CL80、CL120之樣品濃度並加入 10 mL 6 N HCl 密封加熱 120°C 分解 24 小時，使用胺基酸分析儀分析胺基酸含量。結果顯示天門冬醯胺 (Asparagine)、絲胺酸 (Serine)、賴胺酸 (Lysine)、脯胺酸 (Proline) 為咖啡樹葉水萃物之主要胺基酸，且含量在 CL40、CL80、CL120之樣品間並無明顯差異。



（五）結論

由上述試驗可以得知，CL40、CL80、CL120皆具有抗氧化之活性，但並非與螯合亞鐵離子活性相關，CL120在較高的溫度乾燥下，似乎減少其抗氧化成分，但是以胺基酸分析來看，不同溫度乾燥下，影響胺基酸含量不明顯。



(六)參考文獻

1. Richheimer, S. L., Bernart, M. W., King, G. A., Kent, M. C. and Bailey D. T. 1996. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 507-514.
2. Wanasundara, P. K. J. P. D., Shahidi, F. and Shukla, V. K. S. S. 1997. Endogenous antioxidants from oilseeds and edible oils. *Food Rev. Int.* 13: 225-292.
3. Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27:969-978.
4. Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiku, M. and Kawakishi, S. (1988). Chemical studies on novel rice hull antioxidants. I. Isolation, fractionation, and partial characterization. *J. Agric. Food Chem.* 36: 732-737.
5. Campa, C., Mondolot, L., Rakotondravao, A., Bidel, L. P., Gargadenec, A., Couturon, E., Davis, A. P. (2012). A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: Biological implications and uses. *Annals of Botany*, 110(3), 595–613.
6. Júnior, A. P. D., Shimizu, M. M., Moura, Jullyana Cristina, Silva,

- Magalhães, Catharino, R. R., Ramos, R. A., Mazzafera, P. (2012). Looking for the physiological role of anthocyanins in the leaves of *coffea arabica*. *Photochemistry and Photobiology*, 88(4), 928–937.
7. Talamond, P., Mondolot, L., Gargadennec, A., de Kochko, A., Hamon, S., Fruchier, A., & Campa, C. (2008). First report on mangiferin (C-glucosyl-xanthone) isolated from leaves of a wild coffee plant, *Coffea pseudozanguebariae* (Rubiaceae). *Acta Botanica Gallica*, 155(4), 513–519.
8. Khare, P., & Shanker, K. (2016). Mangiferin: A review of sources and interventions for biological activities. *BioFactors*, 42(5), 504–514.
9. Chen, W. P., & Wu, L. D. (2014). Chlorogenic acid suppresses interleukin-1 β -induced inflammatory mediators in human chondrocytes. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(12), 8797–8801.
10. Wang, J., Li, J., Liu, J., Xu, M., Tong, X., & Wang, J. (2016). Chlorogenic acid prevents isoproterenol-induced DNA damage in vascular smooth muscle cells. *Molecular Medicine Reports*, 14(5), 4063–4068.

11. Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Annals of Botany*, 98(1), 33–40.
12. Trevisan, M. T. S., de Almeida, R. F., Soto, G., Virginio, E. D., Ulrich, C. M., & Owen, R. W. (2016). Quantitation by HPLC-UV of mangiferin and isomangiferin in coffee (*Coffea arabica*) leaves from Brazil and Costa Rica after solvent extraction and infusion. *Food Analytical Methods*, 9(9), 2649–2655.
13. Liang, N., Xue, W., Kennepohl, P., & Kitts, D. D. (2016). Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. *Food Chemistry*, 213, 251–259.
14. Yang, J., Guo, J., & Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6), 1060–1066.
15. Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40: 945-948.
16. Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. and Almeida, L. M. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino

salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 315: 161-169.

17. Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M and Ochi H. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J Agric Food Chem* 44(1):37- 41.

