

# 客家委員會獎助客家學術研究計畫 研究成果報告

客家酸柑茶之活性成分鑑定分析與年份之相關性探討

計畫主持人：張祐維 教授

執行單位：國立臺灣海洋大學食品科學系

、食品安全與風險管理研究所

本報告係接受客家委員會獎助完成

中華民國 109 年 9 月

## 摘要

茶是世界上大多數人廣泛食用的飲料。關於它的製造過程，茶分為青茶，綠茶，烏龍茶，紅茶和普洱茶。台灣知名客家酸柑茶是屬於發酵茶和老化茶的一種，在已知文獻中茶含有大量的生物活性化合物，其用作治療和治療許多疾病的治療方法。茶葉中的生物活性化合物由黃烷醇，黃酮醇糖苷，茶黃素，茶紅素，酚酸，生物鹼和氨基酸組成，各化合物皆具有不同的功能與生理活性。因此，本計畫擬應用化學分析、層析方法鑑定不同年份的酸柑茶生物活性化合物的特徵輪廓，將不同儲存年份之酸柑茶分為茶葉及果皮部分，以蒸餾水萃取形成酸柑茶水萃液，進一步分析一般成分分析、物理性質、多酚含量及抗氧化能力。隨著儲存年份增加，茶葉及果皮的多酚及類黃酮含量皆隨著貯存年份先增加後減少。隨著儲存年份增加，果皮的 GC 含量增加，茶葉的 GC 含量呈現先減少後增加的趨勢，另外著儲存年份增加，果皮、茶葉中咖啡因含量下降。

本研究發現長時間存放 (1 年、5 年) 酸柑茶會影響抗氧化能力，隨著儲存年份增加，果皮的 DPPH 自由基清除能力先下降再增加，茶葉的 DPPH 自由基清除能力下降，但仍具有很高的清除自由基能力 (71-72%)。隨著儲存年份增加，果皮、茶葉的螯合亞鐵能力先減少再增加。本計畫的主旨為探討的酸柑茶活性成分，以幫助客家酸柑茶增加品質可信度與附加價值。

**關鍵字:** 酸柑茶、活性成分、液相層析

## Abstract

Tea is a widely consumed drink by most of people in the world. Regarding its manufacturing process, tea is differentiated as white tea, green tea, oolong tea, black tea, and pu-erh tea. In Taiwan, bitter orange (*Citrus × aurantium*) tea is belonged to one of the fermented and aging tea. According to the reported literature, tea has high amount of bioactive compounds in it which are used as therapeutic treatment to cure and prevent many illness. Bioactive compounds in tea consist of flavanols, flavonol glycosides, theaflavins, thearubigins, phenolic acids, alkaloids, and amino acid. Each of them has many metabolites compounds that still need to be detected the amount level and specific chemical structures. Therefore, the objectives of the proposed project are firstly to develop chemical methods coupling with chromatography techniques to identify the bioactive and indicative compounds from Tsuan-kan tea. The different production year of Tsuan-kan tea can divide into peel and tea part, which extract with distilled water to form Tsuan-kan water extract; afterward, analysis of physical property, bioactives content and antioxidation activities. During the storage, 1) the phenol and flavoind content of the peel and tea part increase initially and decrease afterward ; 2) the gollocatechin content of peel increase, and tea part decrease initially and increase afterward ; 3) the caffeine content of the peel and tea part decrease.

It is noted that the antioxidatoin activies can change within long storage (1、5 years). During the storage, 1) the DPPH acaverage effect of peel decrease initially and increase afterward, while the tea part decrease ; 2) the ferrous ion chelating ability of peel and tea part decrease initially and increase afterward.

Hopefully the research outcome will help Tsuan-kan tea increase quality with added value.

**keywords:**Bitter orange tea, Bioactive compounds, High performance liquid chromatography

## 第一章 前言與目的

茶 (*Camellia sinensis*, Theaceae) 是世界上消費最廣泛的飲料，僅次於水 (Kuo et al., 2005)。印度和中國被認為是茶的發源地，如今有 25 個以上的國家生產不同的茶，由於民眾對茶化學及其健康效益的認知的增長，茶逐漸成為世界上使用最廣泛的飲料之一，近年來茶潛在的健康效益受到研究人員和大眾的關注，許多研究表明，茶具有生物活性成分對健康有益，例如黃酮類作為降血脂療法 (Lv et al., 2013); 茶多酚具有抗癌、抗氧化、抗心血管疾病及抗菌之活性 (Bancirova, 2010; Nibir et al., 2017)。

茶依製造過程，可分為非發酵茶 (白茶和綠茶)、半發酵茶 (烏龍茶) 和發酵茶 (紅茶和普洱茶)。緊壓茶 (compressed tea) 是為了長途運輸和長時間保存，透過模具將鬆散茶壓製而成，其中普洱茶為最著名的緊壓茶之一，普洱茶根據產品最終形狀分為鬆散茶和緊壓茶 (Fig.1)，鬆散茶經高壓滅菌和乾燥過程後，通過不同模具壓製成不同形狀的緊壓茶 (Fig. 2)，其中以蛋糕茶 (cake tea) 最為常見 (Lv et al., 2013)。

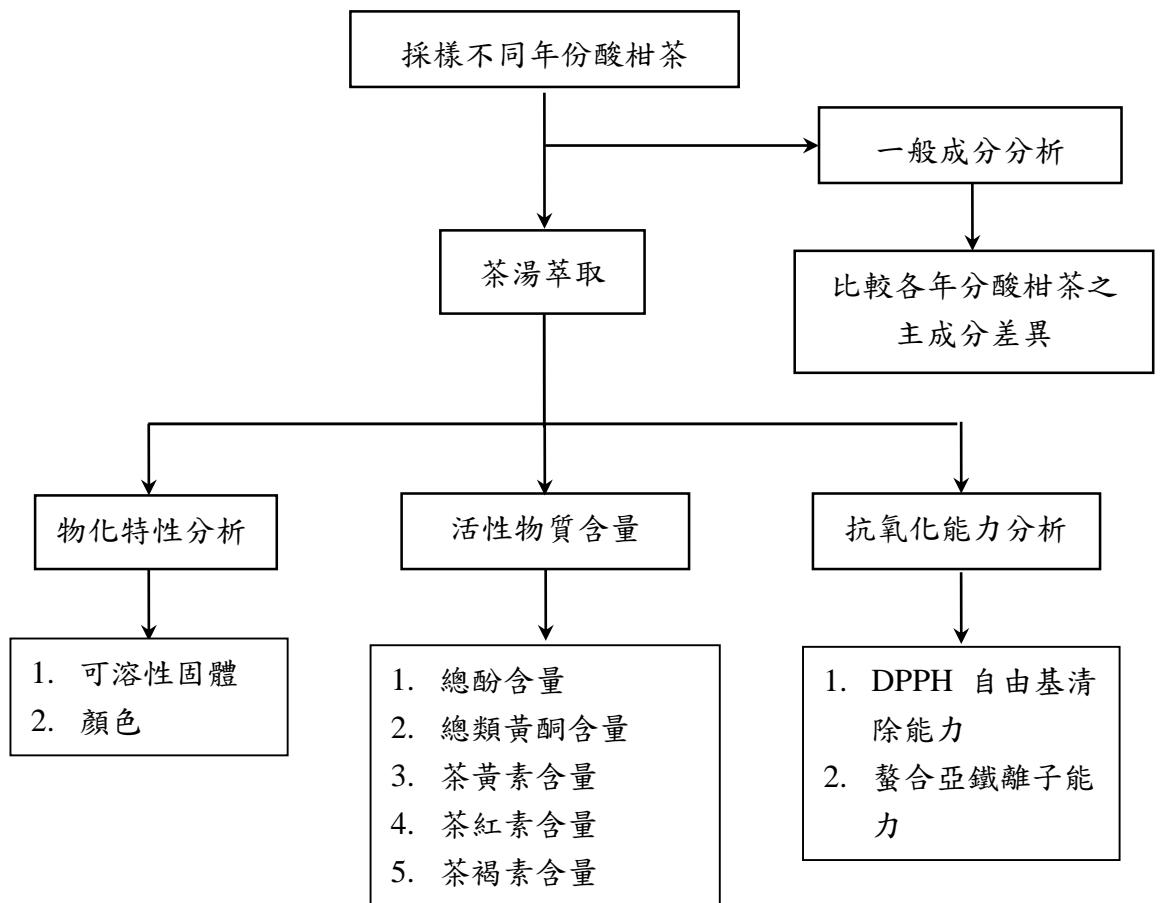
台灣酸柑茶由桃、竹、苗的客家農村所產，大致均承襲於廣東梅縣。客家酸柑茶的標準工序是九蒸九晒，蒸的功能可達到殺菌效果，加速使其再氧化發酵，晒的步驟則是以繩綁緊後，再以日晒脫水，達到乾燥殺菌的目的，經九次重複的處理後，需耗時三個月，使酸柑茶外型如普洱沱茶般緊實堅固，因此客家酸柑茶又可稱為「客式普洱茶」、台式「緊壓茶」，也是客家在勤儉惜物的理念下，以「折福」的理念出發自創品牌的產物 (廖，2012)。

先前文獻指出酸柑茶具有抗氧化、抗發炎、抗菌功效，其中抗發炎機能性及抗菌機能性優於一般茶葉 (江，2013)，然而較少研究探討酸柑茶的生物活性物質含量，此外客家酸柑茶屬於發酵茶和老化茶的一種，酸柑茶之存放時間與其生物活性物質之相關性仍是未知，綜合上述，本研究核心為實地訪查瞭解製作方法，同時採樣不同年份的酸柑茶，完成酸柑茶的一般成分分析，訂定酸柑茶湯標準萃取流程，並且開發鑑定酸柑茶的活性成分之化學分析方法，訂定酸柑茶的活性成分。

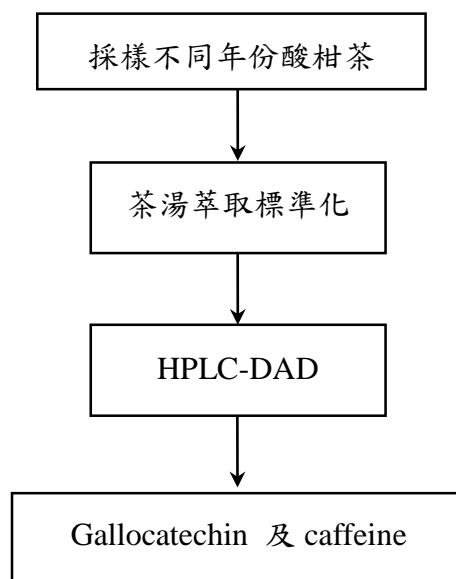
## 第二章 研究材料與方法

### 2.1 實驗架構

#### Part 1



## Part 2



## 2.2 實驗樣品

### 2.2.1 樣品來源

本實驗之主要樣品由藝欣茶坊 (六爺酸柑茶) 提供 2019 製作的酸柑茶成品、雲霧製茶廠中提供 2018 製的酸柑茶、永順農產品提供 2014 製的酸柑茶，詳細產品資訊列於表一。

## 2.3 實驗藥品與試劑

1. Gallic acid (Sigma, USA)
2. Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck, Germany)
3. Sodium carbonate anhydrous (Panreac, Spain)
4. Quercetin dihydrate 98% (Sigma, USA)
5. Potassium acetate (Yakuri Pure Chemicals, Japan)
6. Aluminium chloride hexahydrate (Riedel-de Haen, Germany)
7. L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich, USA)
8. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, USA)
9. Iron(II) chloride (ACROS Organics, Belgium)
10. FerroZine™ iron reagent (ACROS Organics, Belgium)

## 11. Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA (Scharlau, Spain)

### 2.3.1 標準品

1. Gallic acid (GC), 購自 Sigma 公司 (St. Louis, U.S.A.), 純度  $\geq 98\%$
2. Caffeine (C), 購自 Sigma 公司, Pharmaceutical Secondary Standard。

## 2.4 實驗方法

### 2.4.1 樣品處理

參考楊 (2019) 的方法加以改良, 如圖三所示將酸柑茶以鐵錘敲開酸柑茶, 將果皮 (Tsuan-kan peel) 與茶葉 (Tsuan-kan tea) 分離, 分別以粉碎機打碎, 保存於密閉容器並置於乾燥器中, 作為後續一般成分分析、萃取之樣品。

### 2.4.2 一般成分分析

酸柑茶之一般成份, 包括水分、灰分、粗脂肪、粗蛋白、粗纖維等, 均參照 AOAC (2003) 之方法進行測定。將經過前處理且不同年份的酸柑茶的果皮與茶葉進行分析。

### 2.4.3 茶湯製備

參考 Liang 等人 (2003) 之方法加以改良, 秤取 3.0 g 果皮與茶葉, 加入沸騰去離子水 150 mL, 順時針攪拌 3 分鐘後沸騰 5 分鐘, 接著以 NO. 2 過濾, 冷卻後將濾液儲存於  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 後續進行分析。

### 2.4.4 物理化學特性分析

以製備好冷卻至室溫的茶湯進行測定。

#### 2.4.4.1 可溶性固體

將三角瓶洗淨與烘乾後測定重量 ( $M_1$ ) 後, 置入茶湯 20 mL 並測定重量 ( $M_2$ ), 接著將三角錐瓶置入  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘箱烘乾, 待隔夜後測定已等卻至室溫之三角

錐瓶重量 ( $M_3$ )，直到重量穩定 (江，2013)。每個樣品測定三重複。計算公式如下：

$$\text{可溶性固體 (mg/g tea infusion)} = \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1}$$

#### 2.4.4.2 茶湯顏色之分析

參考 Guo 等人 (2016) 之方法加以改良，茶湯通過比色計得出 CIE-Lab 空間的  $L^*$ 、 $a^*$  和  $b^*$  值及 Hunter-Lab 空間的  $L$ 、 $a$  和  $b$  值，皆以蒸餾水作為空白組以確認顏色。

#### 2.4.5 總酚含量

參考 Waterhouse 方法 (2002) 加以修改，取 8.2  $\mu\text{l}$  茶湯加入 36.4  $\mu\text{l}$  10% Folin-Ciocalteu phenol 試劑反應 3 分鐘後，添加 145.4  $\mu\text{l}$  7.5 % 碳酸鈉溶液混合均勻，於室溫下反應 1 小時後以分光光譜儀 (Molecular Devices, SpectraMax<sup>®</sup> ABS Plus, USA) 於 760 nm 測定吸光值，另取不同濃度沒食子酸 (gallic acid) 建立標準曲線以計算樣品中的總酚含量，總酚類含量以 mg GAE (gallic acid equivalents)/g sample 表示。

#### 2.4.6 總類黃酮含量

參考 Chang 等人 (2002) 之方法，取 0.1 mL 茶湯，加入 0.1 mL 10% 氯化鋁六水合物 (aluminium chloride hexahydrate)、0.1 mL 1M 醋酸鉀 (potassium acetate)、4.3 mL 80% 乙醇以及 2.8 mL 二次去離子水。震盪混合均勻，於室溫下避光反應 40 分鐘，以分光光譜儀 (Molecular Devices, SpectraMax<sup>®</sup> ABS Plus, USA) 於 415 nm 下測其吸光值。並以槲皮酮 (quercetrin) 之標準曲線計算樣品總類黃酮含量，總類黃酮含量以 mg QE (quercetin equivalents)/g sample 表示。

#### 2.4.8 茶黃素 (Theaflavins, TF)、茶紅素 (Thearubigins, TR)、茶褐素 (Theabrownins, TB) 含量

參考 Jiang 等人 (2018) 的方法，將茶湯至於分液漏斗中，加入乙酸乙酯，待分層後取 2 mL 乙酸乙酯層並加入乙醇定容置至 25 mL，形成溶液 A；取水層 2 mL 加入 2 mL 飽和草酸、6 mL 蒸餾水並加入乙醇定容置至 25 mL，形成溶液 B；取 15 mL 乙酸乙酯層，加入 2.5 % 碳酸氫鈉後，取下層 4 mL 並加入乙醇定容置至 25 mL，形成溶液 C；將茶湯至於分液漏斗中，加入正丁醇，待分層後取 2 mL 水層，加入 2 mL 飽和草酸及 6 mL 蒸餾水並加入乙醇定容置至 25 mL，形成溶液 D，溶液 A、B、C、D 皆在 380 nm 下測定吸光值，分別以 EA、EB、EC、ED 表示，theaflavin, thearubigin, theabrownin 含量則依照下方程式計算。

$$\text{theaflavin}(\%) = 2.25 \times \text{EC}/(1-M)$$

$$\text{thearubigin}(\%) = 7.06 \times (2\text{EA} + 2\text{EB} - \text{EC} - 2\text{ED})/(1-M)$$

$$\text{theabrownin}(\%) = 2 \times \text{ED} \times 7.06/(1-M)$$

## 2.4.8 DPPH 自由基清除能力測定

參考 Brand-Williams 等人 (1995) 之方法，取 0.2 mL 茶湯並加入 3 mL 新鮮配製的 0.1 mM DPPH 之甲醇溶液，均勻混合後在室溫下靜置 30 分鐘，以分光光譜儀 (Molecular Devices, SpectraMax<sup>®</sup> ABS Plus, USA) 檢測於 517 nm 之吸光值。並以不同濃度的 trolox 溶液製作標準曲線，DPPH 自由基清除能力以 trolox equivalent (TE)/g DM 表示。

### 2.4.10 螯合亞鐵離子能力

參考 Decker 和 Welch (1990) 之方法，取 1 mL 茶湯，加入 0.1 mL 之 2 mM 的氯化亞鐵 (FeCl<sub>2</sub>) 溶液，混合均勻 30 秒後再加入 0.2 mL 之 5 mM ferrozine，反應 10 分鐘後，使用分光光譜儀 (Molecular Devices, SpectraMax<sup>®</sup> ABS Plus, USA) 檢測 562 nm 之吸光值。並以不同濃度的 trolox 溶液製作標準曲線，螯合亞鐵離子能力以 TE/g DM 表示。

### 2.4.11 Gallic acid 及 caffeine 含量

參考 An 等人 (2019) 的方法加以修改，秤取 0.2 g 樣品，加入 70% 5 mL 甲

醇，超音波震盪 30 分鐘，以 5000 g 離心 10 分鐘，殘基加入 70% 5 mL 甲醇，重複上述步驟，收集上清液，經 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過後，注入 HPLC 分析。HPLC 條件則參考 Liang 等人 (2003) 之方法加以改良，採用 Sykam 高壓液相層析系統 (S 1125 HPLC Pump System, S 5200 Autosampler, German) 搭配光電二極體陣列 (photodiode array, PDA) 偵測器，主要分析管柱則為 C18 column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  pore size, Thermo)，流動相為 Solvent A: 2% 乙酸；Solvent B 為乙晴，梯度設定如附表一所示；移動項流速 1.0 mL/min; 樣品注射量為 15  $\mu\text{L}$ 。

附表一 HPLC 沖提梯度

Time	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	93.5%	6.5%
25	85%	15%
27	85%	15%
30	93.5%	6.5%
40	93.5%	6.5%

## 第三章 結果與討論

### 3.1 一般成分分析

就酸柑茶部位而言，果皮的水分含量 (10.40-12.38%) 高於茶葉 (7.79-10.73%)；茶葉的粗蛋白含量 (18.20-22.73%) 遠高於果皮 (6.71-12.73%)，由於茶葉蛋白質含量約佔 20-28% (乾重) (Gu et al., 2002)；果皮及茶葉之粗脂肪含量約為 1.03-3.57%；果皮及茶葉之灰份含量約為 4.17-4.97%。

以存放年份而言，2018 年製之酸柑茶水分含量最高，而 2019 年製之水分含量最低；果皮的粗蛋白含量隨著儲存年份先下降再增加，而茶葉的粗蛋白含量隨著儲存年份先增加再下降；果皮之粗脂肪含量隨著儲存年份增加而減少，茶葉之粗脂肪含量隨著儲存年份先增加再下降；果皮的灰份含量隨著儲存年份下降，而茶葉的灰份含量隨著儲存年份先下降再增加。

### 3.2 物理化學特性分析

$L^* = 0$  表示黑色而  $L^* = 100$  表示白色； $a^*$  為負值表示綠色的程度而正值表示紅色的程度； $b^*$  為負值表示藍色的程度而正值表示黃色的程度。就酸柑茶部位而言，酸柑茶果皮部分的  $L^*$ 、 $b^*$  小於茶葉部分， $a^*$  則大於茶葉部分。就存放期間而言，果皮部分  $L^*$ 、 $b^*$  先下降後上升， $a^*$  先上升後下降；茶葉部分  $L^*$ 、 $b^*$  隨著存放時間增加而下降， $a^*$  先上升後下降。Liang 等人 (2005) 探討綠茶、紅茶及烏龍茶湯之  $\Delta L$ 、 $\Delta a$ 、 $\Delta b$  及  $\Delta E$  與感官品評之相關性，結果顯示綠茶、烏龍茶湯的  $\Delta L$  與品質呈正相關，紅茶茶湯則呈現負相關，此外茶湯的  $\Delta a$  能有效區別綠茶、紅茶，由於測量茶湯顏色方便且快速，可用於判斷茶的品質，然而茶湯的品質之系統須經由專業人士建立，目前缺乏文獻及指標判定酸柑茶之品質。

可溶性固形物是指液體或流體食品中溶解於水的化合物的總稱，包括糖、酸、維生素、礦物質等，酸柑茶部位及存放期間對可溶性固形物影響不大，其值低於台灣知綠茶 (4.90 mg/g)、包種茶 (3.62 mg/g)、烏龍茶 (3.54 mg/g) 及紅茶 (3.00 mg/g) (林聖敦 等人，2011)

### 3.3 總酚含量

酚類化合物廣泛存在於各種天然植物中，研究指出酚類化合物具有抗發炎、抗過敏、降血壓、抗菌及抗病毒之功效 (Jeszka et al., 2010 ; Oszmian ́ski & Lachowicz, 2016)。本實驗總酚測定採用 Folin-Ciocalteu 法，反應原理為 Folin-Ciocalteu reagent 作用於酚類化合物的-OH 基，加入碳酸鈉生成藍色化合物，以 735 nm 測定吸光值，吸光值越大代表總多酚含量越高。本實驗以 gallic acid 作為標準品製作標準曲線，再使用內插法方式求得相對 gallic acid 濃度求得樣品中之多酚類化合物含量。總酚含量如圖二所示，隨儲存年份增加，果皮及茶葉中的多酚含量皆隨著貯存年份先增加後減少，茶葉的總酚含量 (28.35-40.00 mg QAE/g) 高於果皮 (39.79-50.12 mg QAE/g)。Chang 等人 (2020) 探討台灣紅茶在短時間存放 (15 日) 對總酚含量之影響，文獻顯示短時間存放總酚含量無顯著差異 ( $p < 0.05$ )，然而本研究發現長時間存放 (1 年、5 年)，會影響總酚含量。

### 3.4 總類黃酮含量

類黃酮為低分子量之多酚化合物所組成，多存在於植物體中，為植物體的二次代謝物，具有舉多生理功能，如能抑制粒線體呼吸的關鍵酵素，預防冠心病、血管相關疾病，並具有抗痙攣、抗發炎、抗氧化、雌激素、抗腫瘤、抗菌活性 (Harborne & Williams, 2000)。本實驗採用光譜法，反應原理為類黃酮化合物於鹼性條件下可與三氯化鋁形成穩定的錯合物，以 510 nm 測定吸光值。本實驗以 quercetrin 作為標準品製作標準曲線，再使用內插法方式求得相對 quercetrin 濃度求得樣品中之類黃酮含量。總類黃酮含量如圖二所示，與總酚含量具有相同趨勢，隨儲存年份增加，果皮及茶葉中的總類黃酮含量皆隨著貯存年份先增加後減少，而茶葉的總類黃酮含量 (5.24-9.83 mg QAE/g) 高於果皮 (5.02-7.48 mg QAE/g)。

### 3.4 茶色素-茶黃素、茶紅素及茶褐素之含量

茶在發酵時期間，茶多酚會經酵素型氧化作用形成低聚物如茶黃素，或者形成多聚物如茶紅素，亦或者氧化、聚合形成茶褐素。

茶黃素呈亮橘紅色，佔萃取固體的 3 - 5% (wt/wt)，主要的茶黃素包括 theaflavin (TF1)、theaflavin-3-gallate (TF2a)、theaflavin-3'-gallate (TF2b) 及 theaflavin-3,3'-digallate (TF3) (附圖三)，茶黃素易被氧化，為不穩定的酚類，與茶飲之新鮮度與風味強烈有關 (Jiang et al., 2018)，好品質的紅茶之茶黃素含量需大於 1% (Harbowy et al., 1997)，酸柑茶及果皮的茶黃素含量皆低於 1% (Fig. 2)，含量低於紅茶 (1%)，可能是因為酸柑茶在儲存過程中兒茶素氧化而造成茶黃素含量減少 (Yao et al., 2006)。

茶紅素呈紅棕色或深棕色，佔萃取固體的 20% (wt/wt)，形成機制如附圖四所示，茶紅素是由 700 至 4 萬個兒茶素、多醣及蛋白質聚合體所組成之混和物，但其完整的化學結構仍是模糊的 (Izawa et al., 2010; Li et al., 2010)。好品質的紅茶之茶紅素含量需大於 10%，紅茶中富含茶紅素，總類黃酮中約有 50-60% 為茶紅素 (Stangl et al., 2006)，酸柑茶及果皮的茶紅素含量約分別為 0.52-1.90% (Fig. 2A) 及 1.45-2.44% (Fig. 2B)，含量皆低於紅茶 (10%)，另外酸柑茶及果皮之茶紅素含量皆隨著存放時延長而先增加後減少。

茶褐素呈紅棕色或棕色，藉由微生物發酵、胞外酵素 (PPO, POD, pectinase, cellulase, and laccase) 氧化、聚合形成茶棕素 (Wang, L. et al., 2014)，由酚類、生物鹼、多醣、蛋白質、胺基酸所組成，分子量為 4 kDa 至 100 kDa，甚至高於 100 kDa (Peng et al., 2013)。與茶飲的品質有關，造成紅茶深色、風味收斂的化合物 (Wang, K. et al., 2014)，酸柑茶及果皮的茶褐素含量約為 2.08-4.95% (Fig. 2A) 及 2.84-5.35% (Fig. 2B)，另外酸柑茶之茶褐素含量皆隨著存放時間延長而增加，而果皮之茶褐素含量隨著存放時延長而先增加後減少，與總酚含量、類黃酮含量具有相同趨勢，機制尚未明瞭，需進一步探究。

### 3.5 Gallic acid 及 caffeine 含量

茶葉中含量最多之多酚為兒茶素 (Catechins) (Harbowy et al., 1997)，茶中常見的兒茶素包括 (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epicatechin-3-gallate (ECG) 及 (-)-epicatechin (EC) (Cabrera et al., 2006)，在熱處理後上述兒茶素會經差向異構化 (epimerize) 形成 (-)-catechin (C)、(-)-gallocatechin (GC)、(-)-catechin gallate (CG) 及 (-)-gallocatechin gallate (GCG) (Ikeda et al., 2005)，HPLC 為最廣泛使用於分析兒茶素之技術，如在 Nishitani &

Sagesaka (2004) 文獻中定量出八種兒茶素及咖啡因，紅茶中以 (-)-EGCG 含量最高 (5.73 %, dry weight)，其次為 (-)-ECg (1.80 %, dry weight)，酸柑茶的製程為在虎頭柑中塞入茶葉，林志城 (2015) 指出酸柑茶中含有豐富 GC (1.82-53.10 mg/g)。

兒茶素在人體中具有許多生理功能，GC 濃度 20 Mm 能降低 osteoclastogenesis，進而降低骨骼流失及增加骨密度 (Ko et al., 2009)，並且 GC 具有強自由基清除能力，ORAC 清除能力為 8.56 g Trolox/g active (Colon & Nerin, 2012)，就酸柑茶部位而言，本研究發現酸柑茶果皮部分的 GC 含量 (17.58 – 222.11 mg/g) 高於茶葉部分 (24.04- 138.28 mg/g)，酸柑茶之 GC 含量高於中國市售紅茶 (5.81 – 29.96 mg/g) (Liang et al., 2003)；就存放期間而言，果皮部分的 GC 含量隨著存放時間延長而增加，茶葉部分的 GC 含量隨著存放時間呈現先減少後增加的趨勢。

研究指出適當攝取咖啡因能改善心情、提神及增強身體耐力，但可能有頭痛、疲勞、煩躁等副作用 (Colon & Nerin, 2012)，就酸柑茶部位而言，本研究發現酸柑茶茶葉部分的咖啡因含量 (144.10 – 262.41 mg/g) 高於果皮部分 (44.89- 137.52 mg/g)；就存放期間而言，果皮、茶葉部分的咖啡因含量皆隨著存放時間延長而減少。西班牙市售茶飲中綠茶及紅茶之咖啡因含量約為 0.264 – 0.844 % (w/w, dry base) 及 0.189 - 0.507 % (w/w, dry base) (Fernández et al., 2000)，與酸柑茶之咖啡因含量相似。

### 3.4 抗氧化能力分析

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 為少數穩定及商業上可購買之含氮自由基，DPPH 溶液呈紫色，在 517 nm 時有最強吸光值，當 DPPH 被還原時，顏色由紫色轉為無色，說明吸光值越低，DPPH 自由基清除能力越強。

就酸柑茶部位而言，酸柑茶茶葉與果皮部分之 DPPH 自由基清除能力相似，伊拉克產紅茶及綠茶之 DPPH 自由基清除能力為 63% 及 69% (Al-Obaidi & Sahib, 2015)，台灣紅茶約為 80% (Chang et al., 2020)，說明茶的 DPPH 自由基清除能力與區域有關；就存放期間而言，果皮的 DPPH 自由基清除能力隨著存放時間先降低再增加，茶葉的 DPPH 自由基清除能力隨著存放時間延長而下降，Chang 等人 (2020) 探討台灣紅茶在短時間存放 (15 日) 對 DPPH 自由基清除能力之影響，文獻顯示短時間存放 DPPH 自由基清除能力無顯著差異 ( $p < 0.05$ )，

然而本研究發現長時間存放 (1 年、5 年)，會影響 DPPH 自由基清除能力。

植物萃取液之抗氧化能力可取決於其螯合過渡態金屬離子 (特別是  $\text{Fe}^{2+}$  及  $\text{Cu}^{2+}$ ) 之能力 (Md Yusof et al., 2013)。Ferrozine 和  $\text{Fe}^{2+}$  會螯合成錯合物 (ferrozine- $\text{Fe}^{2+}$ )，此錯合物溶液呈紅色，在 625 nm 時有最強吸光值，當萃取液能與  $\text{Fe}^{2+}$  螯合，導致 ferrozine- $\text{Fe}^{2+}$  含量下降、吸光值變低，而吸光值越低說明亞鐵離子螯合能力越強。

就酸柑茶部位而言，酸柑茶果皮部分之螯合亞鐵能力 (8.99 – 12.52%) 高於茶葉部分 (7.97 – 11.93%)，酸柑茶之螯合亞鐵能力遠低於沙烏地阿拉伯市售綠茶 (83% -84%) (Omar et al., 2016)；就存放期間而言，果皮、茶葉部分的螯合亞鐵能皆隨著存放時間先減少再增加。

## 第四章 結論

茶是世界上大多數人廣泛食用的飲料，酸柑茶為桃竹苗地區特有的茶飲，在台灣已有多年的歷史，根據文獻茶中含有許多活性物質且具有標準化萃取流程，然而缺乏文獻探討酸柑茶之潛在活性物質，因此本計畫的主旨為探討酸柑茶之活性物質並建立標準化萃取流程，以提升酸柑茶之文化價值及增強在未來之運用性。另外，本計畫也探討酸柑茶於存放過程中物化性質、活性物質含量及抗氧化能力之變化，在未來可作為判定酸柑茶品質的參考。

由多酚及類黃酮分析結果顯示，隨著儲存年份增加，茶葉及果皮的多酚及類黃酮含量皆隨著貯存年份先增加後減少。由 HPLC 分析顯示，酸柑茶的 gallic acid (GA) 含量高於市售紅茶、綠茶，隨著儲存年份增加，果皮的 GC 含量增加；茶葉的 GC 含量呈現先減少後增加的趨勢，另外著儲存年份增加，果皮、茶葉中咖啡因含量下降。

本研究發現長時間存放 (1 年、5 年) 酸柑茶會影響抗氧化能力，隨著儲存年份增加，果皮的 DPPH 自由基清除能力先下降再增加，茶葉的 DPPH 自由基清除能力下降，但仍具有很高的清除自由基能力 (71-72%)。隨著儲存年份增加，果皮、茶葉的螯合亞鐵能力先減少再增加，但其螯合亞鐵能力低於市售綠茶及紅茶，存放過程中可能有多酚物質的合成與轉化，其機制複雜，未來可以進一步研究。

## 第五章 參考資料

- 江君理 (2013)。客家酸柑茶之保健功能研究-抗氧化，抗發炎及抗菌能力探討。國立中興大學食品暨應用生物科技學系所碩士論文，台中。
- 林志城 (2015)。客家酸柑茶田野調查與加工貯存對成份變化的影響。客家委員會獎助客家學術研究計畫研究成果報告，台灣。
- 林聖敦、張秀銀、許清安、陳怡伶、蔡秀蘭 (2011)。不同製程處理對茶葉之化學成分、品質及機能性的影響之研究。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告，台灣。
- 楊珮蓁 (2019)。不同製程所得酸柑茶之抗氧化與抗發炎活性探討。國立臺灣海洋大學食品科學所碩士論文，基隆。
- 廖純瑜 (2012)。台灣客家飲食文學的研究。中央大學客家語文研究所碩士論文，桃園。
- Al-Obaidi, R. S. S., & Sahib, D. H. (2015). Determination of antioxidants activity in tea extract. *American Journal of Biochemistry*, 5(3), 49-52.
- An, R., Sun, L., Xiang, L., Zhang, W., Li, Q., Lai, X., Wen, S., Huo, M., Li, D., & Sun, S. (2019). Effect of yellowing time on bioactive compounds in yellow tea and their antiproliferative capacity in HepG2 cells. *Food science & nutrition*, 7(5), 1838-1847.
- AOAC. (2003). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 17th edition.
- Bancirova, M. (2010). Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Research International*, 43(5), 1379-1382.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Cabrera, C., Artacho, R., & Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea—a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79-99.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Chang, M.-Y., Lin, Y.-Y., Chang, Y.-C., Huang, W.-Y., Lin, W.-S., Chen, C.-Y., Huang, S.-L., & Lin, Y.-S. (2020). Effects of infusion and storage on antioxidant activity and total phenolic content of black tea. *Applied Sciences*, 10(8), 2685.
- Colon, M., & Nerin, C. (2012). Role of catechins in the antioxidant capacity of an active film containing green tea, green coffee, and grapefruit extracts. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9842-9849.
- Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 674-677.
- Fernández, P. L., Martín, M. J., González, A. G., & Pablos, F. (2000). HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas. *Analyst*, 125(3), 421-425.
- Gu, L., Lu, J., & Ye, B. (2002). Tea chemistry. *Hefei: Chinese University of Science and Technology Publishing*.
- Guo, Y., & Lai, L. (2016). Analysis on Quality Indicators of Taste and Infusion Color and Discrimination of Famous and Superior Green Tea with Different Appearances in Fujian Province, PR China. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(5), 1084-1092.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Harbowy, M. E., Balentine, D. A., Davies, A. P., & Cai, Y. (1997). Tea chemistry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 16(5), 415-480.
- He, H.-F. (2017). Research progress on theaflavins: Efficacy, formation, and preparation. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1344521.
- Ikeda, I., Tsuda, K., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Unno, T., Tomoyori, H., Goto, H., Kawata, Y., Imaizumi, K., & Nozawa, A. (2005). Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. *The Journal of Nutrition*, 135(2), 155-159.
- Izawa, K., Amino, Y., Kohmura, M., Ueda, Y., & Kuroda, M. (2010). Human–environment interactions – taste. In H.-W. Liu & L. Mander (Eds.), *Comprehensive natural products II*, (pp. 631-671). Oxford: Elsevier.
- Jiang, Y., Hua, J., Wang, B., Yuan, H., & Ma, H. (2018). Effects of variety, season, and region on theaflavins content of fermented Chinese Congou black tea. *Journal of Food Quality*, 2018.
- Ko, C. H., Lau, K. M., Choy, W. Y., & Leung, P. C. (2009). Effects of tea catechins, epigallocatechin, galocatechin, and galocatechin gallate, on bone metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7293-7297.
- Li, Y., Shibahara, A., Matsuo, Y., Tanaka, T., & Kouno, I. (2010). Reaction of the Black Tea Pigment Theaflavin during Enzymatic Oxidation of Tea Catechins. *Journal of Natural Products*, 73(1), 33-39.
- Liang, Y., Lu, J., Zhang, L., Wu, S., & Wu, Y. (2003). Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions. *Food Chemistry*, 80(2), 283-290.
- Liang, Y., Lu, J., Zhang, L., Wu, S., & Wu, Y. (2005). Estimation of tea quality by

- infusion colour difference analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 286-292.
- Lv, H.-p., Zhang, Y.-j., Lin, Z., & Liang, Y.-r. (2013). Processing and chemical constituents of Pu-erh tea: A review. *Food Research International*, 53(2), 608-618.
- Md Yusof, N. B., Hasan, M. H., Armayni, U. A., Ahmad, M. S. B., & Wahab, I. A. (2013). The ferrous ion chelating assay of pandanus extracts. In *The Open Conference Proceedings Journal*, vol. 4 (pp. 57).
- Nibir, Y. M., Sumit, A. F., Akhand, A. A., Ahsan, N., & Hossain, M. S. (2017). Comparative assessment of total polyphenols, antioxidant and antimicrobial activity of different tea varieties of Bangladesh. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(4), 352-357.
- Nishitani, E., & Sagesaka, Y. M. (2004). Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(5), 675-685.
- Omar, U. M., Shorbaji, A. M., Arrait, E. M., Al-Agha, T. D., Al-Marzouki, H. F., Al-Doghaither, H. A., & Al-Ghafari, A. B. (2016). Comparative study of the antioxidant activity of two popular green tea beverages available in the local market of Saudi Arabia. *Natural Science*, 8(6), 227-234.
- Peng, C.-x., Liu, J., Liu, H.-r., Zhou, H.-j., & Gong, J.-s. (2013). Influence of different fermentation raw materials on pyrolyzates of Pu-erh tea theabrownin by Curie-point pyrolysis-gas chromatography–mass spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 197-203.
- Stahl, W. H. (1963). The Chemistry of tea and tea manufacturing. In C. O. Chichester, E. M. Mrak & G. F. Stewart (Eds.), *Advances in food research*, vol. 11 (pp. 201-262): Academic Press.
- Stangl, V., Lorenz, M., & Stangl, K. (2006). The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(2), 218-228.
- Troll, W., & Cannan, R. K. (1953). A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 200, 803-811.
- Wang, K., Chen, Q., Lin, Y., Li, S., Lin, H., Huang, J., & Zhonghua, L. (2014). Comparison of Phenolic Compounds and Taste of Chinese Black Tea. *Food Science and Technology Research*, 20(3), 639-646.
- Wang, L., Mei, Q., & Wan, D. (2014). Simultaneous Determination by HPLC of Quercetin and Kaempferol in Three Sedum Medicinal Plants Harvested in Different Seasons. *Journal of Chromatographic Science*, 52, 334.
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food*

*Analytical Chemistry*, 6(1), II.1.1-I1.1.8.

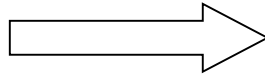
Yao, L. H., Jiang, Y. M., Caffin, N., D'Arcy, B., Datta, N., Liu, X., Singanusong, R., & Xu, Y. (2006). Phenolic compounds in tea from Australian supermarkets. *Food Chemistry*, 96(4), 614-620.

## 第六章 圖表

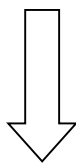


Sun-dried green tea

Autoclaved,  
compressed and dried



Pu-erh raw tea  
(Compressed tea, cake tea)

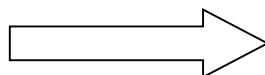


Microbial Post-  
fermentation

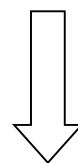


Pu-erh ripen tea  
(Loose tea)

Autoclaved,  
compressed and dried



Pu-erh ripen tea  
(Compressed tea, cake tea)



Natural aging

附圖一 普洱茶的種類及其相關加工過程

Figure 1 Different types and their processing relations of Pu-erh tea.

(Lv et al., 2003)



1 Melon tea



2 Melon tea



3 Tuoचा



4 Mushroom-shaped tea



5 Brick tea

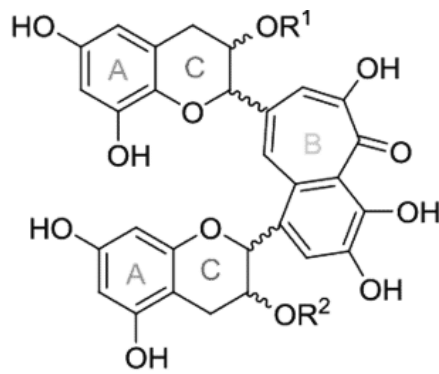
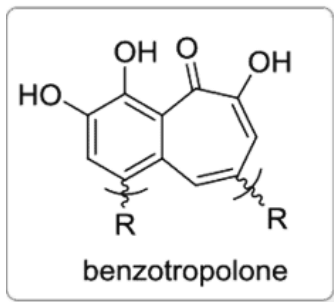


6 Column tea

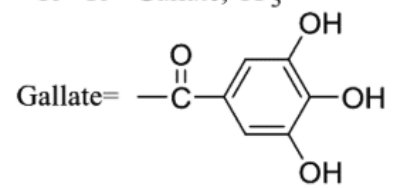
附圖二 不同形狀的普洱茶

Figure 2 Different shapes of Pu-erh tea.

(Lv et al., 2003)

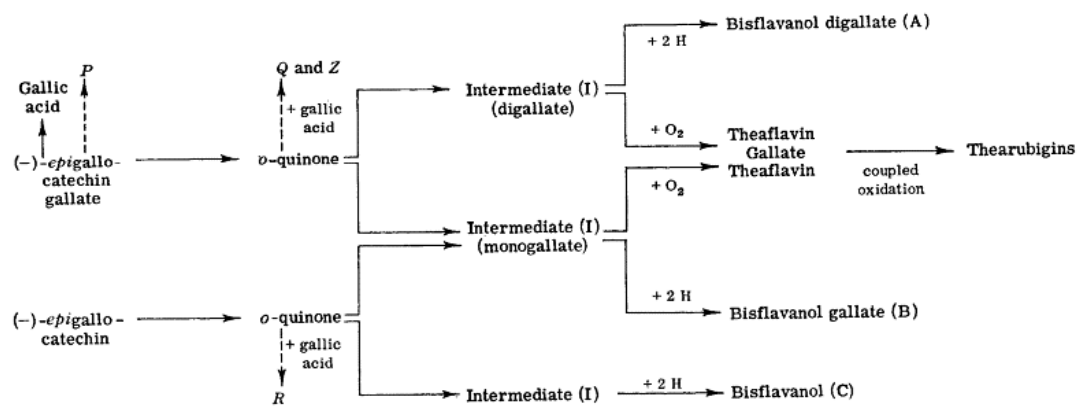


$R^1=R^2=OH$ , TF  
 $R^1=H$ ,  $R^2=Gallate$ , TF<sub>1</sub>  
 $R^1=Gallate$ ,  $R^2=H$ , TF<sub>2</sub>  
 $R^1=R^2=Gallate$ , TF<sub>3</sub>



附圖三 茶黃素之化學結構

(He, 2017)



附圖四 茶紅素生成機制

(Stahl, 1963)



Crush



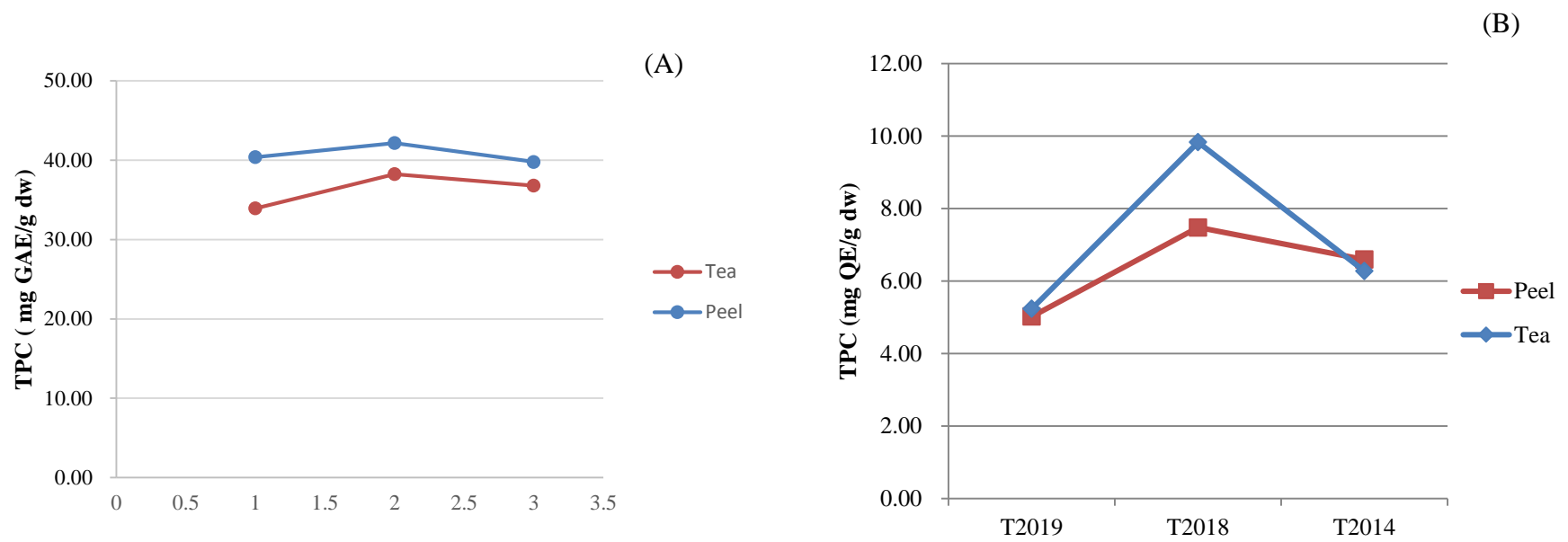
Mill



Ground powder

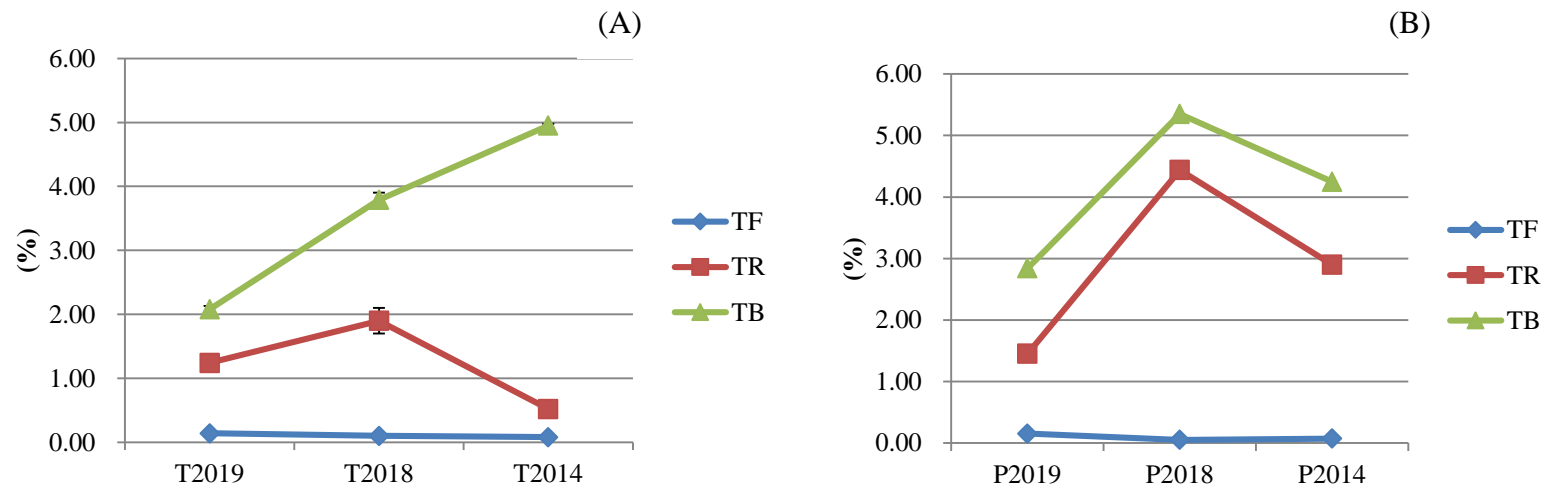
圖一 酸柑茶前處理步驟

Fig. 1 The procedure of Tsuan-kan tea treatment.



圖二 酸柑茶與茶葉的 (A) 總酚含量；(B) 總類黃酮含量

Fig. 2 The amounts of total phenolic compounds, total flavonoids in Tuan-kan peel and tea.






圖三 不同年份酸柑茶 (A) 及果皮 (B) 之茶黃素、茶紅素、茶褐素比例

Fig. 3 The contents of theaflavin (TF), thearubigin (TR) and theabrownin (TB) in Tsuan-kan tea (A) and peel (B).

表一樣品資訊、來源及代號

Table 1. Samples information, factory, source, and tag number

Sample	Factory	Source	Picture
2014 年製 酸柑茶	永順農產品	臺灣 苗栗縣	
2018 年製 酸柑茶	雲霧製茶廠	臺灣 苗栗縣	
2019 年製 酸柑茶	藝欣茶坊	臺灣 苗栗縣	

表二、不同年份酸柑茶之一般成分分析

Table 2. Proximate composition of Tsuan-kan peel and tea

Composition	P2019	T2019	P2018	T2018	P2014	T2014
Moisture (%)	10.40 ± 0.05	7.79 ± 0.13	14.42 ± 0.11	10.73 ± 0.06	12.38 ± 0.17	8.58 ± 0.23
Crude protein (%)	7.40 ± 0.06	21.54 ± 0.17	6.71 ± 0.15	22.73 ± 0.10	12.73 ± 0.70	18.20 ± 0.00
Crude fat (%)	3.29 ± 0.59	2.71 ± 0.26	2.29 ± 0.94	3.57 ± 0.32	1.04 ± 0.09	3.33 ± 0.09
Ash (%)	6.68 ± 0.20	4.76 ± 0.06	4.97 ± 0.09	4.35 ± 0.06	4.17 ± 1.27	4.80 ± 0.05
Carbohydrate (%)	72.23 ± 0.50	63.20 ± 0.56	71.61 ± 0.90	58.62 ± 0.50	69.68 ± 1.00	65.09 ± 0.35

Data are expressed as mean ± SD (n=3).

TK2019, Tsuan-kan made in 2019; TK2018, Tsuan-kan made in 2018; TK2014, Tsuan-kan made in 2014.

表三、不同年份酸柑茶之物理化學特性分析

Tables 3 Physicochemical properties of Tsuan-kan peel and tea.

	L*	a*	b*	Total soluble solid conten (mg/g)
P2019	44.94 ± 0.01	15.58 ± 0.07	48.57 ± 0.11	1.00 ± 0.01
P2018	35.53 ± 0.21	25.62 ± 0.12	36.93 ± 0.09	1.00 ± 0.00
P2014	42.79 ± 0.04	20.35 ± 0.03	40.49 ± 0.08	1.00 ± 0.00
T2019	49.66 ± 0.02	15.34 ± 0.05	50.03 ± 0.07	1.00 ± 0.00
T2018	45.84 ± 0.07	17.50 ± 0.07	45.30 ± 0.09	1.00 ± 0.00
T014	45.29 ± 0.08	10.26 ± 0.06	38.95 ± 0.11	1.00 ± 0.00

Data are expressed as mean ± SD (n=3).

表四、不同年份酸柑茶之 gallic catechin 及 caffeine 含量

Table 4 The gallic catechin and caffeine contents of Tsuan-kan peel and tea

	gallic catechin (mg/g)	caffeine (mg/g)
P2019	17.58 ± 0.56	137.52 ± 0.55
P2018	146.36 ± 0.87	113.97 ± 0.89
P2014	722.11 ± 2.55	44.89 ± 0.12
T2019	43.41 ± 0.49	255.67 ± 0.94
T2018	24.04 ± 0.20	262.41 ± 1.05
T014	138.28 ± 0.93	144.10 ± 1.22

Data are expressed as mean ± SD (n=3).

表五、不同年份酸柑茶之抗氧化能力

Table 5 Antioxidant capacities of Tsuan-kan peel and tea

Treatment	DPPH	FIC
P2019	80.47 ± 1.03	1252 ± 0.35
P2018	59.62 ± 0.89	8.99 ± 0.05
P2014	72.00 ± 1.25	10.48 ± 0.12
T2019	82.11 ± 0.83	11.93 ± 0.23
T2018	73.03 ± 0.56	7.97 ± 0.03
T014	71.03 ± 0.55	8.03 ± .0.09

FIC: ferrous ion chelating ability

Data are expressed as mean ± SD (n=3)

