

第一章、前言

油脂氧化酸敗 (rancidity) 是造成含油食品喪失營養及商品價值的主要原因，若人體不慎食入亦可能造成健康上的危害 (五十嵐，1985)。油脂氧化的發生除了需要氧氣外，亦需要促氧化因子如自由基 (free radical)、金屬離子、光、熱及輻射等的存在或能量的提供。因此杜絕氧氣和促氧化因子對食品的影響或添加抗氧化劑以消除油脂氧化反應產生的自由基等方法，便得以有效延緩油脂食品的氧化酸敗 (Fennema, 1985)。近年來研究亦指出，自由基與活性氧物質對細胞損傷與基因突變有關，進而造成許多疾病如動脈粥狀硬化 (atherosclerosis)、癌症及老化等，因此減少體內自由基生成或增強抗氧化能力，便成為預防疾病的重要課題 (Bergendi *et al*, 1999)。

然而就食品而言，主要以添加抗氧化劑來抑制油脂食品的氧化酸敗，其中 butylated hydroxyanisole (BHA)、butylated hydroxytoluene (BHT) 等人工合成抗氧化劑效果雖好，卻因使實驗動物之肝、腎損傷，甚至引發腫瘤 (顏，1993；Branen, 1975)，以致於歐美有些國家已禁用或限制使用範圍。目前較常見的天然抗氧化劑 α -生育醇 (α -tocopherol, vitamin E) 也因製造價格稍嫌昂貴，且溶解性及抗氧化性皆不如人工合成之抗氧化劑，添加過量反而具有促氧化 (prooxidation) 等因素，使 α -生育醇在使用上受限，因此尋找具強抗氧化性且安全性高的天然抗氧化劑實為重要；就生物體而言，體外抗氧化成分的補充可減少氧化傷害的發生 (Cutler, 1991)，因此可藉由膳食來補充抗氧化物質，以調節生理機能來達到增進健康的目的。

本研究室對於多種天然中藥、香辛料及農產廢棄物等之抗氧化成分研究至今多年，證實數種農產廢棄物如山竹、百香果等之果殼具有優於 α -生育醇之抗氧化成分 (樊，1995；張，1997)。故本研究選取咖啡之加工廢棄物—咖啡果肉進行抗氧化成分之分離、純化及結構鑑定。

第二章、咖啡果肉抗氧化成分之研究

第一節、文獻整理

一、咖啡之簡介

咖啡屬於茜草科 (*Rubiaceae*) 咖啡屬 (*Coffea*) 的常綠喬木。以熱帶地方為中心，約有五百屬、六千種的茜草科植物分布，一直以來便被認為具有藥效，如健胃、醒腦、止血、散熱、強身等。(田口，2004)。

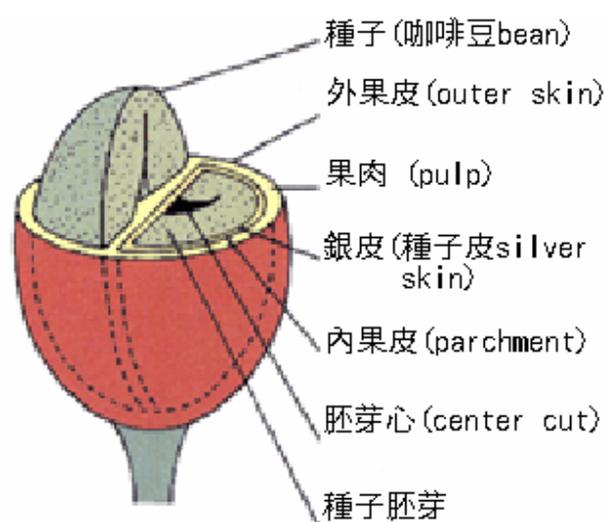
咖啡屬的植物約有四十種，但較具有商品價值的咖啡種僅有三種：1.阿拉比卡種 (*Coffea arabica*)、2.羅布斯塔種 (*Coffea robusta*)、3.賴比瑞亞種 (*Coffea liberica*)。阿拉比卡種為目前最大宗的主要咖啡豆品種，產量約佔70%，其香味、品質均較為優秀。而羅布斯塔種因品質較差，所以多用來製成即溶咖啡。賴比瑞亞種則因為品質較差，產量少，因此很少被提及。

咖啡果 (coffee fruit) 是由外皮、果肉、內果皮、銀皮和種子 (咖啡豆) 所構成 (圖一)，種子位於果實中心部分，種子以外的部分幾乎沒有利用價值。此外，為了使咖啡豆得以長期保存，必須將成熟的咖啡果實加工精製，目前咖啡果的加工流程大致可分為乾式加工 (dry process) 與濕式加工 (wet process) 兩種 (圖二)，乾式加工 (又稱自然乾燥法) 是利用露天日曬或機器乾燥，使外皮與果肉變硬而容易取下，但此法受制於天候且耗日費時，精製後容易混雜過多瑕疵豆與雜質，故現今大多以水洗式精製法替代；水洗式 (即濕式) 加工則是先利用機器去除果肉，接著用發酵槽去除殘留在內果皮上的黏膜，而後清洗、乾燥，因水洗式加工能透過每一步驟去除雜質與瑕疵豆，因此生豆 (未烘焙之咖啡豆) 的品質較高。

咖啡果肉 (coffee pulp) (圖三) 是屬於咖啡工業的副產品 (by-product) 之一，大約佔整顆咖啡果的41%濕重 (Montero, 1992)。早年因咖啡廢棄物大量囤積造成環境污染 (Bayne *et al*, 1976)，而

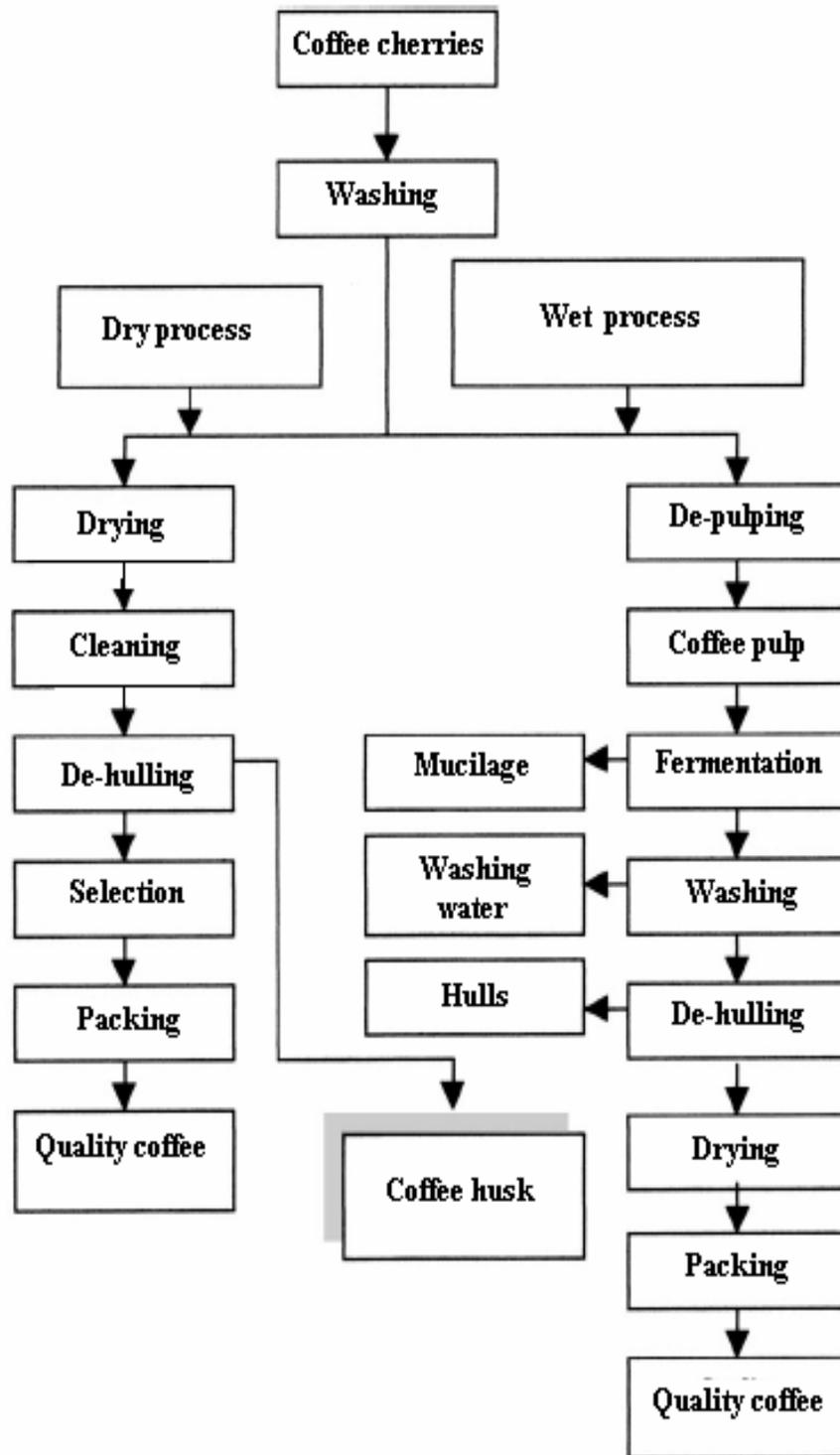
後研究指出，咖啡果肉中的化學成分組成(表一)大部分與玉米相似，因此可應用於反芻動物的飼料添加物以及堆肥等(Rolz *et al*, 1980)；Calzada等人(1986)也利用麥稈和咖啡果肉混合物作為基質用以篩選真菌菌株。近年來，隨著咖啡飲品需求量增加，咖啡廢棄物的產量也隨之提升，其中咖啡果肉在食品方面的應用，包括釀酒、釀醋、提煉果膠及製造糖蜜等，大大提高了廢棄物的價值。

目前咖啡豆已被研究出的功效成分包括 caffeine、tannin、kahweol、cafestol 等，其中存在於咖啡油的 kahweol 與 cafestol 兩種成分雖被研究出可能會增加血液中膽固醇(cholesterol)和三酸甘油酯(triglyceride)的含量(Heckers *et al*, 1994)，但亦有研究指出，此兩種成分具有抑制致癌蛋白(CYP2C11、CYP3A2)cytochromes P450的表現或活性、誘導抗氧化酵素 Glutathion S-transferase 的結合，並且清除自由基(Huber *et al*, 2002；Cavin *et al*, 2002)。咖啡果肉的功效成分目前被研究不多，已發現的主要為咖啡酸(caffeic acid)、漂木酸(chlorogenic acid)等酚類化合物，此類型化合物亦被證實具有抗氧化的功效(Asther *et al*, 2005)。



圖一、咖啡果的構造(田口, 2004)

Fig 1. Structure of coffee fruit.



圖二、咖啡果之工業化加工流程

Fig 2. Industrial processing of coffee cherries.

(Pandey *et al* , 2000)



圖三、咖啡果肉

Fig 3. *Coffea arabica* pulps.

表一、咖啡果肉與果皮之成分（%，乾重）

Table 1. Composition of coffee pulp and husk (% dry weight basis)

Components	Coffee pulp ¹	Coffee pulp ²	Coffee husk ³
Carbohydrates	50	44	57.8
Proteins	10	12	9.2
Fibres	18	21	—
Fat	2.5	—	2
Caffeine	1.3	1.25	1.3
Tannins	1.8-8.56	—	4.5
Polyphenols	—	1	—
Pectins	—	—	12.4

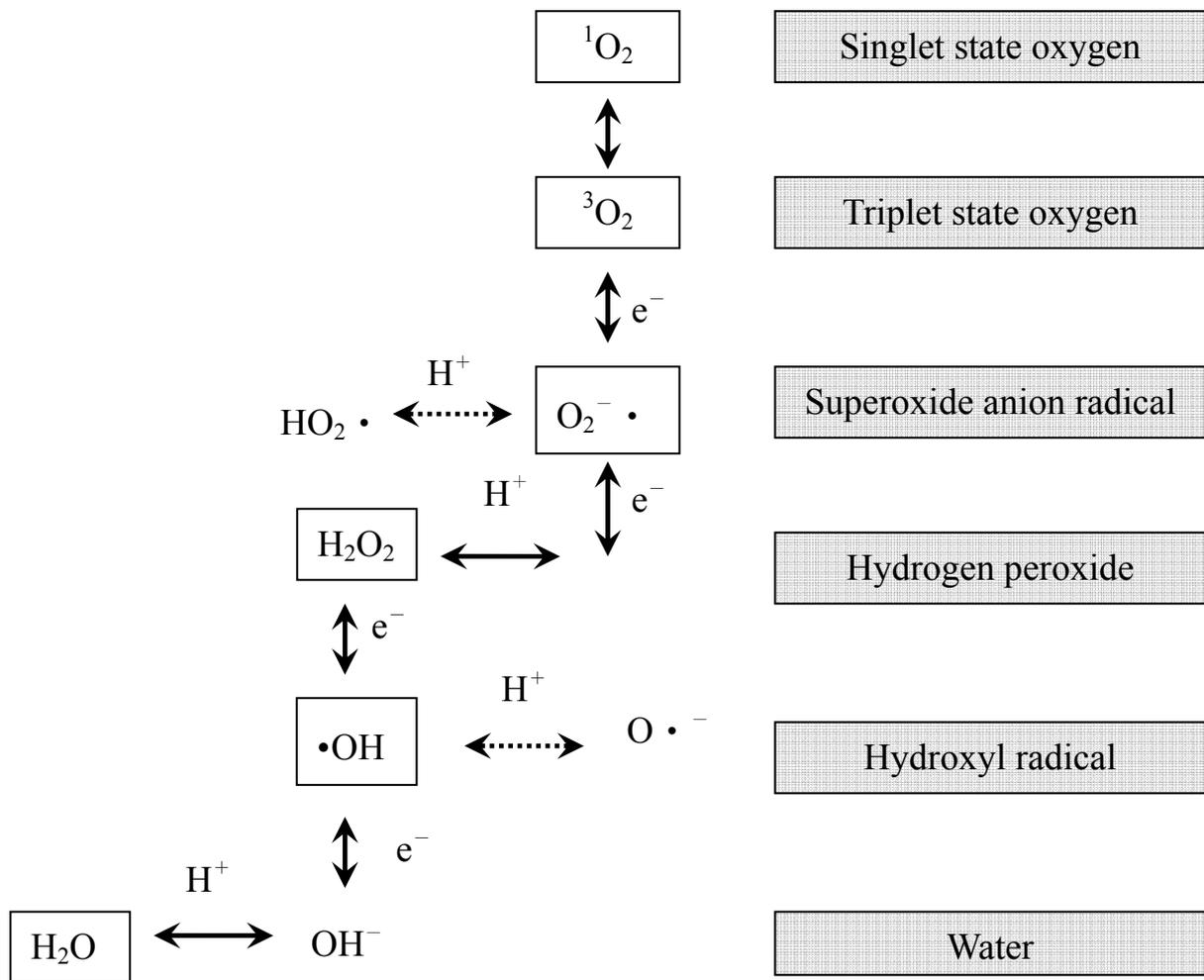
¹ Elias *et al* (1979), ² Porres *et al* (1993), ³ Pandey (1998)

二、自由基與活性氧

(一) 自由基與活性氧的種類

自由基 (free radicals) 是指含有一個或多個不成對電子而獨立存在之原子或分子 (Halliwell, 1994)，可依其未成對電子所在位置而區分成以碳、氧、氮或硫為中心之自由基 (Simic, 1988)。它具有高能量，極易與附近的分子發生反應，抓取其電子，自身成為穩定的配對狀態並釋放出能量，使該分子產生新的不穩定自由基，引起連鎖反應。

活性氧分子 (reactive oxygen species; ROS) 是指反應性較三旋態氧分子 ($^3\text{O}_2$) 強的含氧分子。狹義的活性氧是指需氧生物體，在生物體內代謝過程中產生的超氧自由基 (superoxyl radical; $\text{O}_2^- \cdot$)、過氧化氫 (hydroperoxide; H_2O_2)、氫氧自由基 (hydroxyl radical; $\text{HO} \cdot$) 及由光或激發態光增感劑如葉綠素作用產生之單旋態氧分子 (singlet oxygen; $^1\text{O}_2$)。如圖四所示，正常的代謝過程，兩個氧原子共可接收四個電子，並和氫離子結合形成兩分子的水。若一個氧分子僅接收一個電子，則形成超氧陰離子；接收兩個電子和氫離子，則形成過氧化氫；接收三個電子則形成羥自由基 (遠藤和淺田, 1992)。廣義的活性氧則泛指含氧的高反應分子 (Niki, 1992)，許多活性氧亦屬於自由基如表二。



圖四、氧分子之氧化還原及激發狀態（遠藤和淺田，1992）

Fig 4. Oxygen and reactive oxygen species

表二、活性氧族群

Table 2. Reactive oxygen species

Radicals		nonradicals	
Hydroxyl	$\bullet\text{OH}$	Peroxynitrite	ONOO^-
Alkoxy	$\text{L(R)O}\bullet$	Hypochlorite	^-OCl
Hydroperoxyl	$\text{HOO}\bullet$	Hydroperoxide	L(R)OOH
Peroxy	$\text{L(R)OO}\bullet$	Singlet oxygen	$^1\Delta\text{O}_2$
Nitric oxide	$\bullet\text{NO}$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Superoxide	$\text{O}_2^-\bullet$		

(Abuja and Albertini, 2001)

(二) 自由基與活性氧的來源

生物體內自由基與活性氧的來源，一般可分為外在及內在兩方面。外在來源包括環境污染物、香菸、離子輻射及化學藥劑如農藥等所誘發體內產生的自由基。細胞進行氧化作用所產生的自由基為主要內在來源，一般生物體進行的呼吸作用；一些藥物在體內的代謝過程皆會產生自由基，如表三。

人體內的自由基大約可分成四類，第一類為生物合成 (biosynthesis)，此類自由基在人體內會因需要而由胺基酸合成，為人體所不可或缺，例如一氧化氮自由基 ($\cdot\text{NO}$)，乃由 L-Arginine 在一氧化氮合成酶 (NO synthase) 的作用下所產生，其不但是人類神經系統傳遞訊息的分子，更對人體免疫系統有所貢獻。第二類為新陳代謝 (Metabolism)，這些自由基產量的多寡會因人而異，通常是依賴酵素的催化才能在代謝的機轉中形成，其中最主要的為氧自由基 (包括超氧自由基， $\text{O}_2^- \cdot$ 與氫氧自由基， $\text{HO} \cdot$) (Machlin and Bendich, 1987; Halliwell and Gutteridge, 1994)。第三類為外來物質所引起，包括空氣或水質污染，某些藥物、農藥或防腐劑等，或食入燒焦肉類中的多環碳化物 (如 benzo[α] pyrene 或 benzanthracene)，進而對人體產生危害。第四類為生活習慣引起，包括情緒緊張或抽煙使身體暴露於外生性和內生性自由基環境所造成的傷害 (Maxwell, 1992)。

(三) 自由基與活性氧對生物體的影響

近年來有研究指出自由基會使得 DNA 損傷、蛋白質傷害及和脂質反應產生之代謝物，造成細胞老化、突變甚至死亡 (Shigenaga, 1989; Rikans and Hornbrook, 1997; Moskovitz *et al*, 2002)。

當體內自由基或活性氧增加或抗氧化防禦能力降低時，易使細胞組織甚至於器官造成傷害，包括紅血球、腎臟、肺臟、皮膚病及心血管疾病等，並可能進一步引發癌症及體內其他系統疾病等 (表四) (Gutteridge, 1993; McCord, 2000; Moskovitz *et al*, 2002)。

表三、自由基與活性氧之主要來源

Table 3. The major sources of free radicals and reactive oxygens

Intrinsic Source	Extrinsic Source
Electron transport chain of mitochondria	Re-dox substrate
Electron transport chain of microsomal Oxidase	paraquat
Xanthine oxidase	Medication oxidation
Indoleamine dioxygenase	Smoking
Tryptophane dioxygenase	Ion irradiation
Galactose oxidase	Sun light
Lipoxygenase	Food processing
Monoamine oxidase	
Phagoytic cells	
Neutrophils	
Monocytes	
Eosinophiles	
Endothelial cell	
Auto oxidation-reduction	
Fe^{2+}	

(Morrissey and O'Brien, 1998)

表四、自由基與其參與的各種疾病

Table 4. The sources of free radicals and involved disease of free radicals

Human disease	Source
阿茲海默症、關節炎、氣喘等	活化吞噬細胞引發過量氧自由基、過氧化氫
帕金森氏症、酒精中毒等	藥物或病毒引發過量氧自由基
鐵中毒、大腸癌等	過渡金屬(銅、鐵)電子轉移產生氧自由基
呼吸窘迫症、休克、凍傷等	正常氧化作用或氧氣濃度變化而產生氧自由基
唐氏症器官移植、高血壓、動脈粥狀硬化、紅斑性狼瘡等	免疫系統失調產生過多或過少氧自由基與一氧化氮自由基
肌萎縮性脊髓側索硬化症、肌肉萎縮症等	細胞結構變化產生多種自由基
腎炎、膀胱炎、白內障、皮膚癌等	輻射照射引發自由基
免疫系統失調、鎌形血球貧血等	基因缺陷帶來過多或過少自由基

(Gutteridge, 1993; McCord, 2000)

三、脂質氧化作用

近年來脂質的氧化作用已被廣泛地研究於食品、化學、生物及醫藥上。例如油脂及含油脂食品的氧化酸敗 (rancidity) 所產生的低分子揮發性物質，使食品產生不悅的油耗味、黏度增加及色澤加深等現象，並伴隨著油脂酸敗所裂解物質的產生，對生物體也有不良的影響 (Kubow, 1990; Niki *et al*, 1991)。此外，脂質過氧化的過程與生物膜的結構和功能損傷亦有關聯，顯示出對於生物體可能造成各種生理失調與疾病的產生 (如動脈硬化) (Glass and Witztum, 2001)，表五表示脂質氧化對食品及生物體之危害 (Ferrari and Torres, 2003)。

(一) 脂質自氧化作用

就食品而言，脂質的自氧化作用 (autoxidation) 是最常見且最主要的脂質酸敗。脂質自氧化作用是由於油脂所含戊二烯雙鍵中間之甲烯基 (α -methylene, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) 上因外在因素失去一個質子而形成活性極高的自由基，進一步進行過氧化連鎖反應所引起的。油脂所含雙鍵數愈多，形成自由基的機率也愈高，且更易加速油脂氧化作用的進行。此自由基會與氧分子作用形成過氧化自由基 (peroxy radical)，再經連鎖反應而形成不安定的一級氧化產物，脂質氫過氧化物 (lipid hydroperoxide)。整個油脂自氧化作用是不飽和脂肪酸或含不飽和脂肪酸的油脂因輻射、助氧化劑或酵素的存在，促使其與氧分子結合，產生氫過氧化物，再分解成醛、酮及低級脂肪酸或形成聚合物的過程。油脂自氧化作用可分為三個步驟 (圖五)：

1.起始反應期(initiation of autoxidation)

藉由單旋態氧(singlet oxygen, $^1\text{O}_2$)、過渡金屬、光、熱或脂質氧化過程中所產生的脂質自由基($\text{R}\cdot$)與脂質自氧化自由基($\text{ROO}\cdot$)等高能量物質引發起始反應，此自由基會攻擊尚未氧化的多元不飽和脂肪酸(RH)，使多元不飽和脂肪酸的戊二烯雙鍵中間之甲烯基(α -methylene)脫落一個質子，形成活性極高的脂質自由基。此階段反應較慢，卻是脂質自氧化速率的決定步驟。圖六為不飽和脂質自氧化反應在各階段的變化。

2.連鎖反應期(propagation of autoxidation)

此時期的主要反應為正常油脂因受到自由基的攻擊，而產生更多的自由基。脂質自由基在連鎖反應的過程中與氧反應形成過氧化自由基($\text{ROO}\cdot$)，過氧化自由基再去攻擊其他不飽和脂肪酸，奪取其質子以產生新的脂質自由基與脂質氫過氧化物(lipid hydroperoxides)，此步驟不斷進行直到系統內所有不飽和脂肪酸全部變成自由基為止。圖七表示脂質自由基的形成，且與環境中之氧反應形成的脂質過氧化物(Gorkum and Bouwman, 2005)。氧化反應初期會先經過氧化誘導期(induction period)，先形成氫過氧化物，並在氫過氧化物形成量達最高點後開始分解。

3.終止反應期(termination of autoxidation)

此時期主要反應為自由基之間相互結合，形成相對穩定的產物。氫過氧化脂質非常不安定，在此時期會形成醛、酮、醇、酸及短鏈的碳氫化合物等低分子揮發性物質或聚合成非揮發性的雙聚物(dimer)、三聚物(trimer)或多聚物(polymer)等高分子物質。圖八表示氫過氧化物進一步氧化，產生斷裂或重組生成非揮發性聚合物(Gorkum and Bouwman, 2005)。

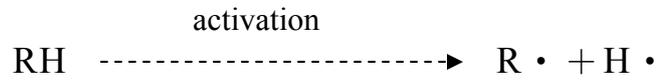
表五、食品 and 生物系統中之脂質氧化與疾病之關聯

Table 5. Disorders associated with lipid oxidation (LO) in food and biological system

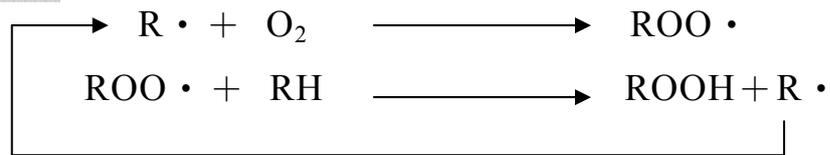
Disease or disorder	Oxidative mechanisms
Atherosclerosis	Induced by intracytoplasmic macrophage accumulation of cholesterol oxides from oxidized foods and biological sources
Cataract	Diet rich in fat and deficient in antioxidants (tocopherol and ascorbic acid)
Diabetes	Oxidation of carbohydrates and lipids from a diet rich of these nutrients
Diarrhea and respiratory inflammations	Peroxides irritate gastrointestinal mucosae. There is occupational risk of lung disease in food services
Aging	Ingestion of a diet rich in fat and deficient in antioxidants , since childhood, can increase cellular aging
Hemolysis and anemia	Diet rich in PUFAs predisposes erythrocytes to cell membrane disruption, resulting in hemolysis and, as a consequence, in anemia
Partial losses of essential vitamins and nutrients	ROS and products of LO induce loss of liposoluble vitamins (A, carotenoids and E) , of vitamin C and of essential fatty acids. Peroxides and LO end products block intestinal absorption of many nutrients (tiamin, pantotenate, riboflavin, ascorbate, vitamin B ₁₂ , vitamin A, tocopherols lysine and sulfured peptides)
Necrosis and/or apoptosis	Cell death is provoked by peroxides, malonaldehyde and 4-hydroxynonenal
Mutagenicity, genetic damage and cancer	Peroxides, malonaldehyde and 4-hydroxynonenal and other aldehydes are clastogenic agents that damage genetic material, increasing cancer risk

(Ferrari and Torres , 2003)

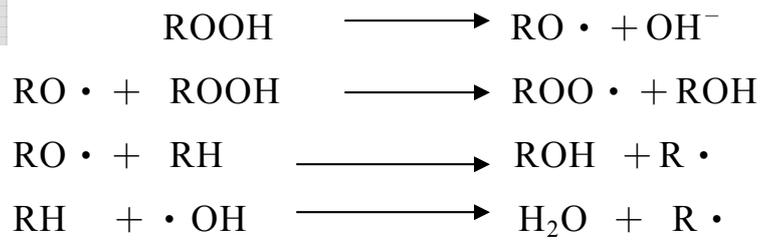
Initiation



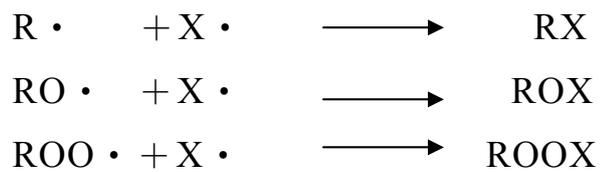
Propagation



Chain branching reaction



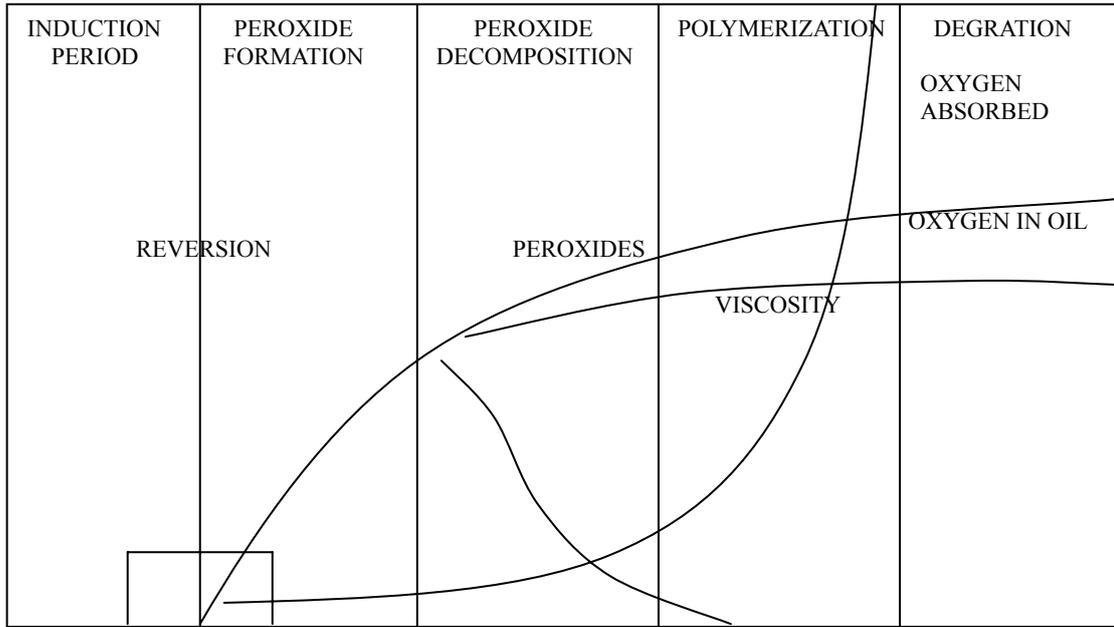
Termination



RH : unsaturated fatty acid , ROOX : lipid peroxide

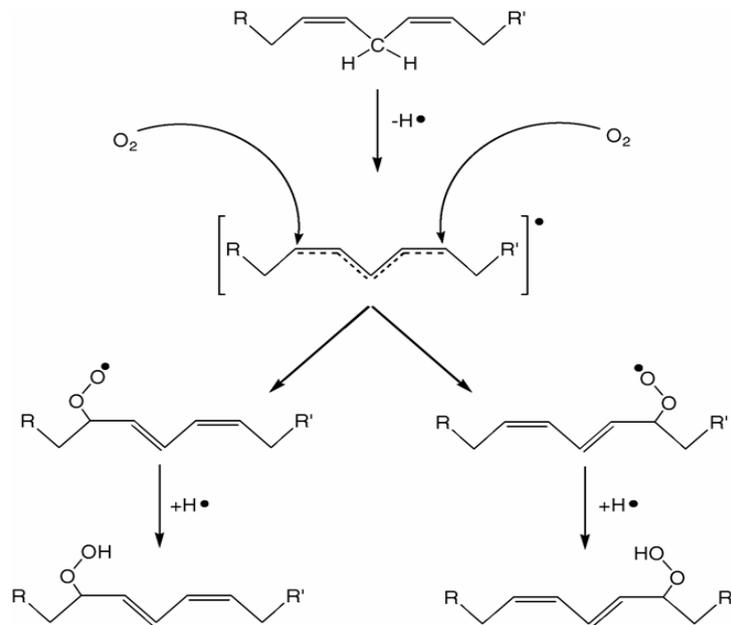
圖五、脂質自氧化連鎖反應 (Nawar, 1985)

Fig 5. Autoxidation chain reaction of lipid.



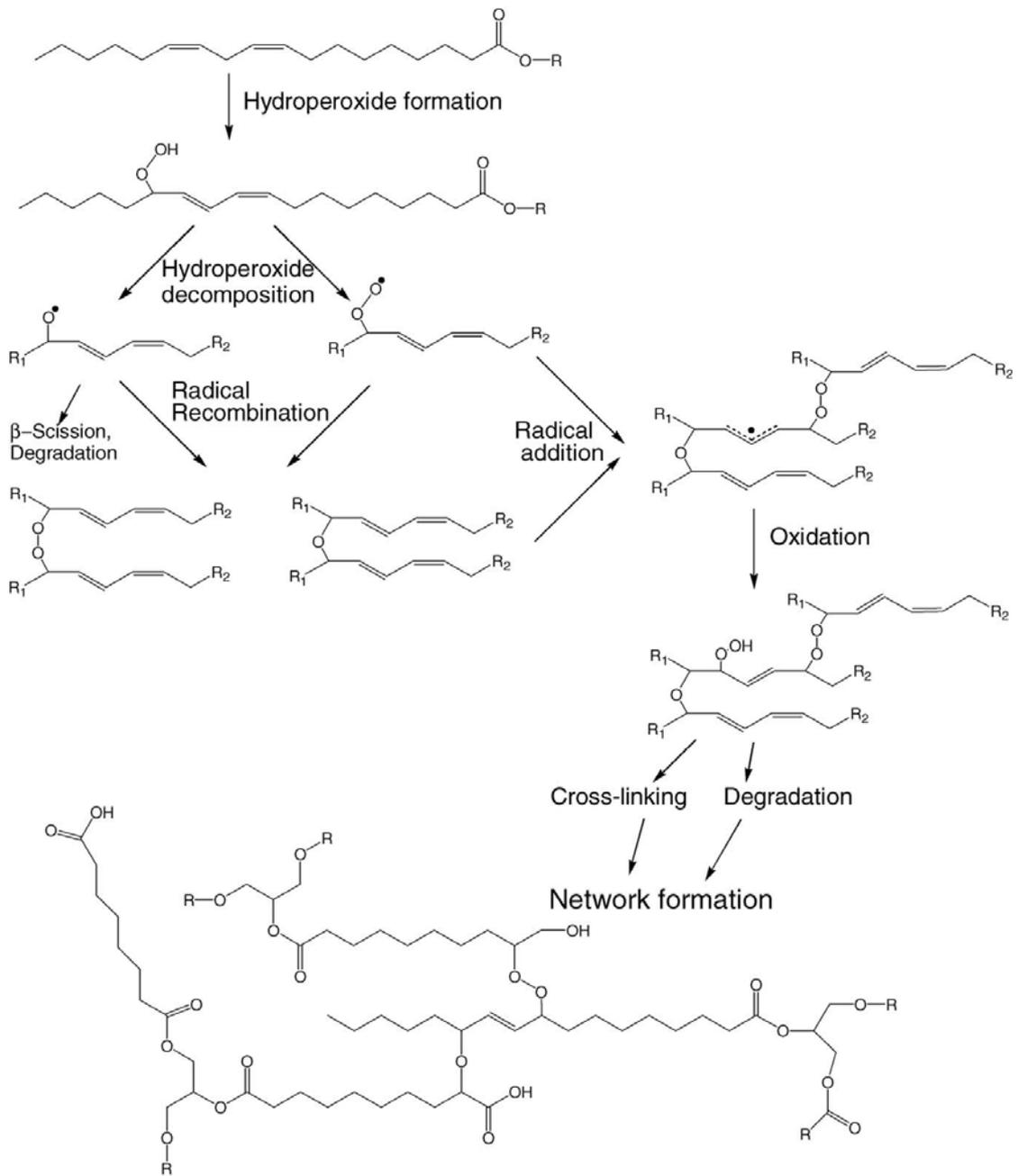
圖六、油脂自氧化的反應階段

Fig 6. The stages of lipid autoxidation. (Perkins , 1967)



圖七、脂質自氧化反應中氫過氧化物的形成

Fig 7. Initial hydroperoxide formation in the autoxidation of the fatty acid chain. (Gorkum and Bouwman , 2005)



圖八、脂質氧化之最終產物

Fig 8. Terminal products by lipid oxidation.

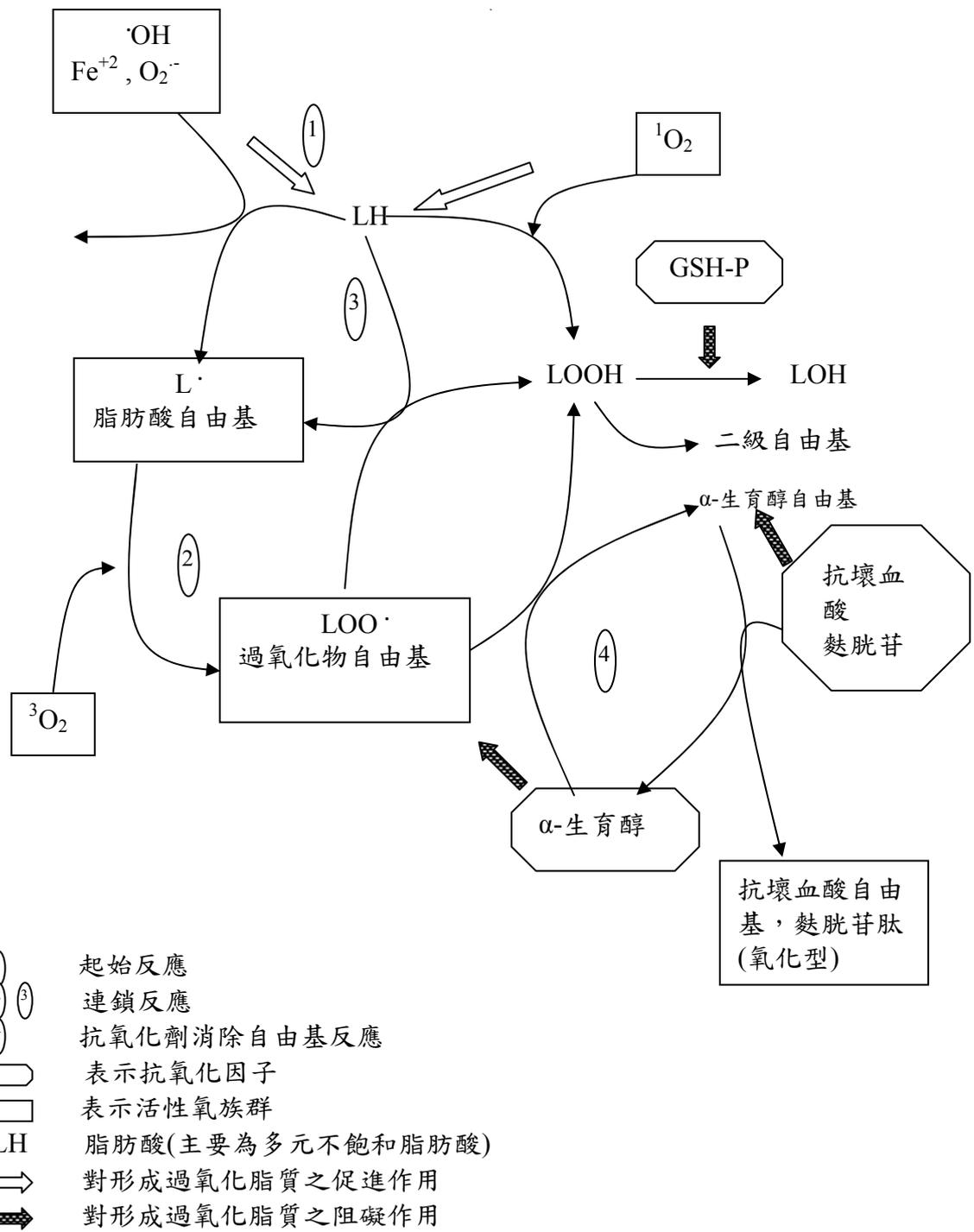
(Gorkum and Bouwman , 2005)

(二) 脂質氧化與疾病

脂質自氧化過程中所產生之自由基、氫過氧化物或醛、酮、醇和酸等物質會破壞食品中維生素與蛋白質變性等；脂質自氧化過程最後階段生成之雙聚物或多聚物會造成食品顏色加深、黏度及比重變大的情形，不僅會降低食品營養及商品價值，對生物體亦會造成老化、肝病及癌症等疾病。研究報告指出，飲食中若含有高量過氧化脂質易造成膽固醇氧化，間接引發動脈硬化等疾病 (Yagi, 1987)。

在生物體中，多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 主要存在於粒腺體小胞體膜、紅血球膜、細胞膜等生物膜的磷脂質 (phospholipids) 中，若 PUFA 上的質子被拔除而形成自由基，會誘發連鎖反應產生氫過氧化脂質。當體內囤積過量氫過氧化脂質時，會使生物體膜上選擇性通透性及被動運輸等機能受到損傷，直接或間接造成血栓、動脈硬化、肝臟病變及白內障等病變。此外，亦可能導致前列腺素 (prostaglandins) 代謝、轉換異常及加速老化和致癌等 (八木和五島, 1981; 內山等, 1985; Niki *et al*, 1991; Blair, 2001)。

即使如此，生物體內的自然防禦機制可協助抑制自由基及脂質過氧化所帶來的危害，例如細胞內的超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、麩胱苷肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 等酵素均具有消除自由基活性的功能；細胞外的防禦機制主要來自於一些具有抗氧化的物質，例如維生素 E、維生素 C、類胡蘿蔔素等，皆能中止脂質過氧化的連鎖反應 (圖九) (五十嵐等, 1986)。



圖九、生物體中過氧化脂質之形成及抗氧化機制 (五十嵐等, 1986)。

Fig 9. Formation of lipid peroxides and mechanisms of antioxidation *in vivo*.

四、抗氧化機制與抗氧化物質

抗氧化劑在食品工業上佔有頗重要的角色，它能延緩或阻止食品氧化變質，以延長儲存期限並穩定食品的品质。然而在生物體內，自由基亦會攻擊 DNA、蛋白質、脂質及許多小分子等，造成一連串有害的連鎖反應，對組織造成各種傷害。因此對抗氧化劑有一個較廣泛的定義為—對於低濃度下具有抑制或延緩基質氧化（oxidizable substrate）的物質即稱之為抗氧化劑（Aruoma，1999）。此處所指的氧化基質包括食品中或生物體內的分子，如脂質、蛋白質、醣類及 DNA 等。

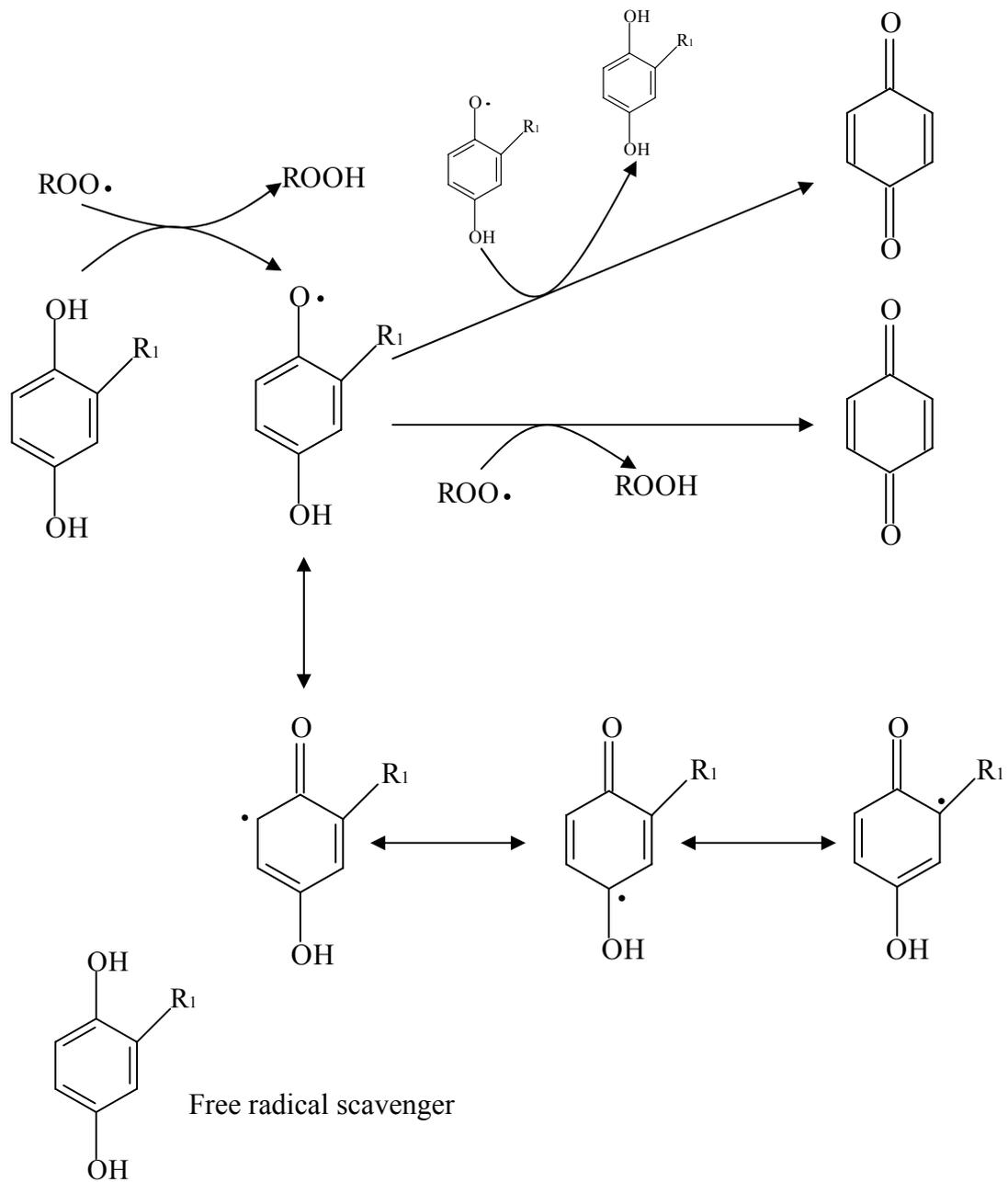
（一）抗氧化劑的作用機制

不同抗氧化劑展現的抗氧化特性皆有不同，大致可分為下列四種：

1. 自由基清除劑（free radical scavenger）

此類抗氧化劑大多為酚類化合物，因酚類化合物易釋出氫氧基上的氫原子，提供一個電子或直接提供一個質子和自由基作用，而自身的苯環結構上的不成對電子會轉移而形成穩定的共振結構（resonating structure）。圖十表示酚型化合物清除脂質自由基之作用機制。

食品中的自由基清除劑以維生素 E 及人工合成抗氧化劑如 butylated hydroxyanisole（BHA）、butylated hydroxytoluene（BHT）為最常見，但人工合成之抗氧化劑有安全性上的顧慮（Branen，1975），因此從天然物中尋求天然抗氧化劑是目前所重視的。



圖十、自由基清除劑之作用機制。

Fig 10. Mechanism of antioxidation for free radical scavenger.

(Sherwin, 1978)

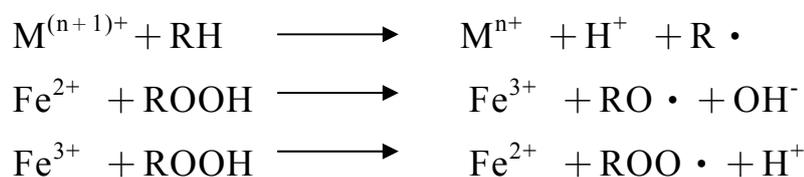
2. 單旋態氧之消光劑 (singlet oxygen quencher)

空氣中的氧主要以較安定的基態三旋態氧 (triplet oxygen, $^3\text{O}_2$) 狀態存在。由於在食品中常含有一些光增感劑 (photosensitizer) 如葉綠素、血紫質及核黃素等, 這些物質會吸收光能, 從基態 (ground state) 提升至激發態 (excited state), 當激發態返回基態時, 所釋放的過多能量便被三旋態氧吸收而提升至單旋態氧 ($^1\text{O}_2$), 此單旋態氧就容易和食品中的不飽和脂肪酸上的雙鍵反應產生氫過氧化物。

此類抗氧化劑包括一些類胡蘿蔔素如 β -胡蘿蔔素 (β -carotene) 等, 可吸收光增感劑所釋放的過多能量使單旋態氧恢復成穩定的三旋態氧型態, 藉此降低與不飽和脂肪酸反應的可能性 (Kellogg and Fridovich, 1975; Bando *et al*, 2004)。

3. 金屬螯合劑 (metal chelator)

過渡金屬離子具有促進脂質氧化的能力：



金屬螯合劑本身不具抗氧化性, 但能與促氧化之金屬離子如銅及鐵離子結合, 進而抑制脂質氧化反應。例如檸檬酸 (citric acid)、EDTA 及聚磷酸鹽 (polyphosphate) 等。

4. 相乘劑 (synergist)

相乘劑本身並不與促氧化因子作用, 而是可還原已失去氫原子之酚型自由基, 進而達到增強酚型抗氧化劑的抗氧化能力。在食品系統中的相乘劑以抗壞血酸 (ascorbic acid) 為代表, 例如抗壞血酸可還原失去一個質子的 α -生育醇, 以提供 α -生育醇的抗氧化能力。

許多天然物質的抗氧化效果是由於同時具有數種抗氧化機制，例如一些類黃酮（flavonoids）具有清除過氧化自由基的能力外，亦有螯合金屬離子及還原劑等抗氧化功能（Bors，1999）。此外，β-胡蘿蔔素除了做為單旋態氧及三旋態光增感物質的消除劑外，在亞麻油酸氧化反應系統中亦可防止氫过氧化物的形成（Burton，1989）。

（二）體內抗氧化酵素系統

自由基與活性氧會對細胞造成氧化傷害，但生物體中自有一套抗氧化防禦系統可供保護，其中抗氧化酵素是體內的第一道防線，包括 superoxide dismutase（SOD）、glutathione peroxidase、glutathione reductase、catalase、glutathione S-transferase 等酵素，圖十一即表示細胞內清除超氧自由基之酵素系統。以下就生物體中較重要的抗氧化劑做介紹：

1. 超氧歧化酶（superoxide dismutase, SOD）

Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) 將超氧陰離子轉變為過氧化氫 (H₂O₂) 及氧分子，以減輕超氧陰離子對細胞所造成的傷害（Beyer，1994），其反應式如下：

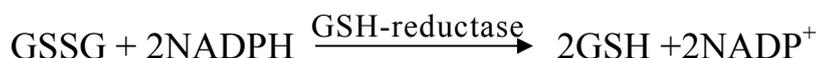


SOD 可分成三類：(1) Cu-Zn SOD，(2) Mn SOD，(3) Fe SOD。Cu-Zn SOD 主要存在於真核生物之細胞質、溶酶體、細胞核及粒線體的內外膜間（Fridovich，1995）；Mn SOD 一般則存在於真核生物之粒腺體內；Fe SOD 則主要存在於原核生物和植物葉綠體中。

2. 麩胱苷肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)

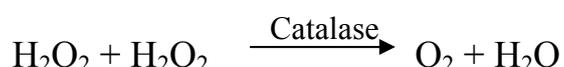
Glutathione peroxidase 一般多存在於血液、肝臟、粒腺體及細胞質中，需要硒（selenium）作為 cofactor（Jacob，1994）。其作用機制是將還原態的 glutathione (GSH) 氧化為氧化態的

glutathione(GSSG)來清除過氧化氫。另有 glutathione reductase以 NADPH為還原力來源，催化GSSG再生成GSH，其反應式如下：



3.觸酶(catalase)

Catalase屬於 Fe^{3+} —heme proteins，大多存在於peroxisomes內，能將過氧化氫(H_2O_2)催化為水分子(H_2O)與氧分子(O_2)，然而在許多細胞內如內皮細胞、神經細胞等，其catalase含量不足以清除體內所產生的過氧化氫，因此必須依賴GSH-Px來清除過氧化氫，以保護細胞防止氧化傷害的產生(Meyer and Isaksen, 1995)。其反應式如下：

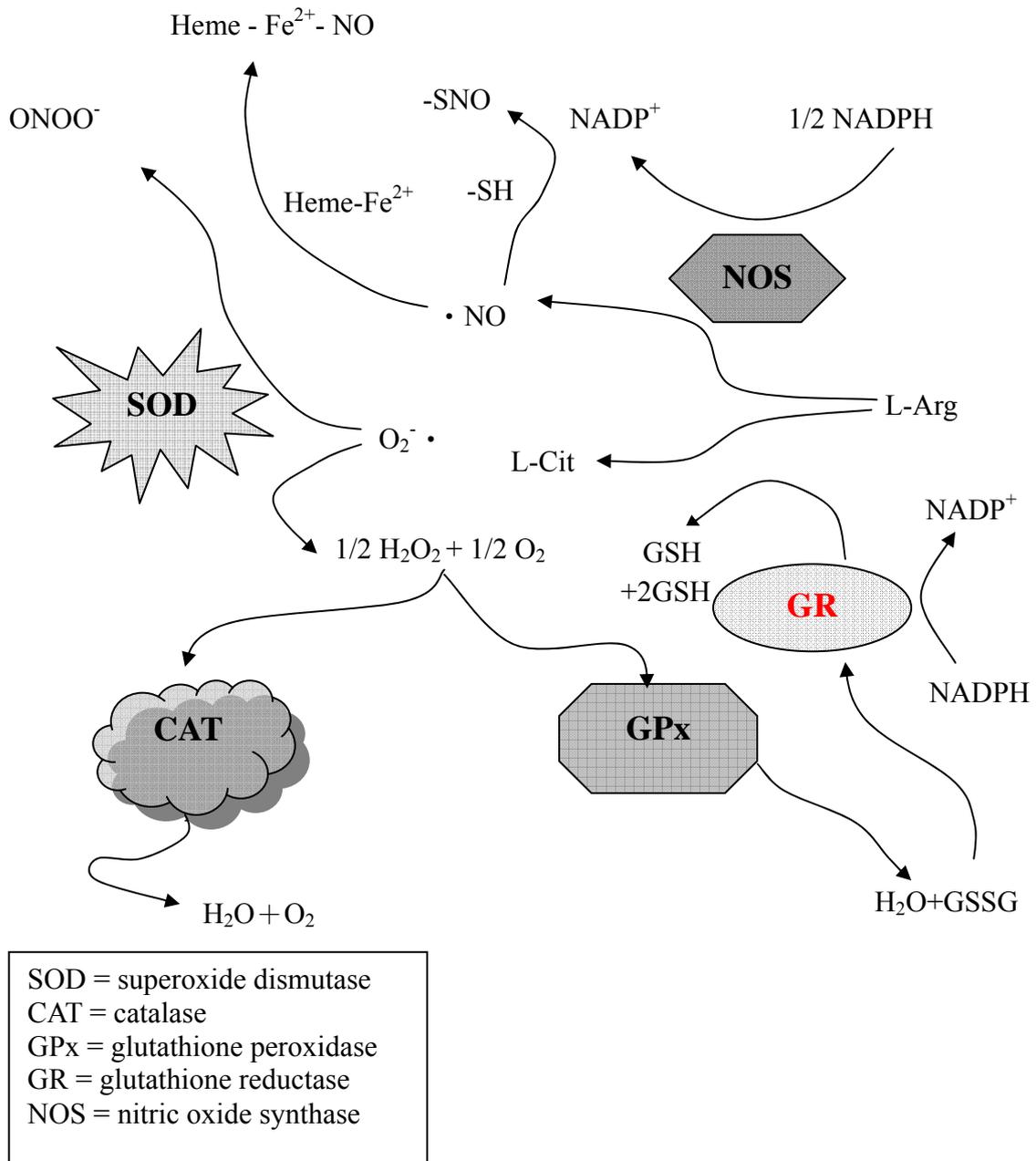


4.Ubiquinol (coenzyme Q)

Ubiquinol為粒腺體酵素所進行氧化磷酸化反應之輔酵素，在電子傳遞鏈中負責電子的傳送與接收，將碳水化合物與脂肪酸之能量轉換為ATP，以維持細胞正常運作與生合成之進行(Crane, 2001)。其可提供質子以清除細胞膜上自由基的攻擊，以終止脂質過氧化反應的發生，其反應式如下：



氧化態之 CoQH^{\cdot} 可於粒腺體電子傳遞鏈中再被還原成 CoQH_2 的型態。另一方面ubiquinol可在粒腺體內膜上幫助氧化態生育醇的還原，互為彼此之還原劑(Murray, 1996)。



圖十一、細胞內抗氧化酵素之防禦系統

Fig 11. Cellular antioxidative enzymatic defense system.

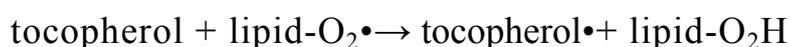
(Mruka *et al* , 2002)

(三) 天然抗氧化物質

近年來許多研究證實在天然植物中含有多種不同型式的抗氧化物質如表六，包括穀類、豆類、蔬果類、香辛料、植物根部、葉子、及中草藥都含有抗氧化的成分。一般提供抗氧化能力的化合物可分為下列數種：生育醇 (tocopherols)、抗壞血酸 (L-ascorbic acid)、類黃酮 (flavonoids)、葉綠素衍生物 (chlorophyll derivatives)、類胡蘿蔔素 (carotenoids) 及酚類化合物 (phenolic compounds) 等 (Larson, 1988; Papas, 1999)。

1. 維生素 E (生育醇, tocopherol)

生育醇為一脂溶性維生素，是目前使用最廣泛的抗氧化劑。tocopherol 可分為四型 (α 、 β 、 γ 、 δ)，其中以 α 型在自然界中分佈最多 (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996)。當生育醇遭受到脂質自由基攻擊時，會將酚基上的質子轉移給脂質過氧化的 peroxy and alkoxy radicals，本身形成共振結構而呈穩定的狀態，進而阻斷自由基連鎖反應及生物體膜上脂質的過氧化反應 (Burton, 1994; Fang *et al.*, 2002)。抗氧化機制如下：



因此，生育醇可抑制活性氧分子誘導產生脂質過氧化自由基的生成，並且避免生物膜上不飽和脂肪酸的過氧化、血漿中極低密度脂蛋白的氧化及對細胞中 DNA 和蛋白質的傷害 (Topinka *et al.*, 1989)。

表六、天然抗氧化劑的來源

Table 6. Natural source of antioxidants

Antioxidants	Some food source and activity
Carotenoids	Parsley, carrots, winter squash, sweet potatoes, yams, cantaloupe, apricots, spinach, kale, turnip greens, citrus fruit. Antioxidants and cell differentiation agents (cancer cell non-differentiated)
Catechins	Green tea, berries. Antioxidants, linked to lower rates of gastro-intestinal cancer; mechanism not understood.
Flavonoids	Most fruits and vegetables, including parsley, carrots, citrus fruits, broccoli, cabbage, cucumbers, squash, yams, tomatoes, eggplant, peppers, soy products, berries. Block receptor sites for certain hormones that promote cancers. Phenolic compounds possessing antioxidant actions.
Lycopene	Tomatoes. Red grapefruit.
Monoterpenes	Parsley, carrots, broccoli, cabbage, cucumbers, squash, yams, tomatoes, eggplant, peppers, mint, basil, citrus fruit. Some antioxidant properties; inhibit cholesterol production in tumors; aid protective enzyme activity.
Phenolic acids	Parsley, carrots, broccoli, cabbage, tomatoes, eggplant, peppers, citrus fruits, whole grains, berries. Some antioxidant properties; inhibit formation of nitrosamine, a carcinogen, and affect enzyme activity.
Spice and plant extracts	Antioxidant activities have been demonstrated in extracts from rosemary, oregano, clove, pepper, ginger, olive, birch bark, nutmeg, red onions, garlic, oats, Chia seeds, etc.
Various tropical fruits	Papaya, mango, passion fruit and equisi seeds may contain antioxidant nutrients and are therefore recommended.
Vitamin C	Fruits and vegetables.
Vitamin E	Sunflower, seed oils, almonds, hazelnuts, eggs, margarine, cheese, butter, dairy products, wholegrain breakfast cereal, wholemeal bread, dark green vegetables.

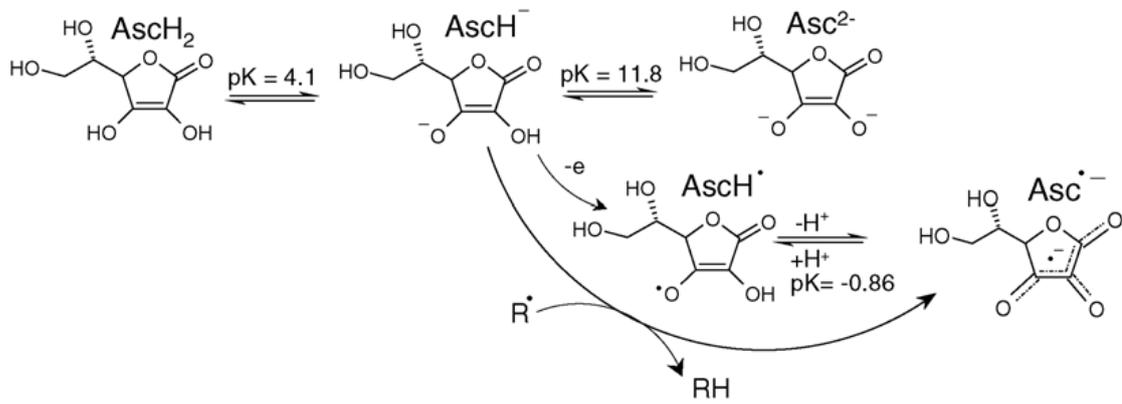
(Aruoma, 1994)

2. 維生素 C (抗壞血酸, ascorbic acid)

抗壞血酸為一水溶性物質，存在於體內水溶性部分如血漿與細胞間質內。其抗氧化機制在於其 C-2 和 C-3 上有兩個羥基 (hydroxyl group)，可提供氫離子來穩定自由基，本身轉變為半脫氫抗壞血酸 (semidehydroascorbic acid) (Beyer, 1994)。圖十二表示不同型態的抗壞血酸與自由基的反應。若在細胞內，可再經由麩胱甘肽或 NADPH 還原再生成具抗氧化活性的還原態 (Jacob and Burri, 1996)。此外，抗壞血酸可還原生育醇回復至抗氧化狀態 (圖十三)，因此在細胞內可以此種相乘性的抗氧化作用預防膜和脂蛋白受到氧化性的傷害 (Aruoma, 1994, Beyer, 1994)。但若抗壞血酸在體內血漿中的濃度過高，或組織受傷後環境中有較高濃度金屬離子，抗壞血酸反而產生促氧化作用，進而導致活性氧分子如氫氧自由基的生成 (Halliwell *et al*, 1995)。

3. 類胡蘿蔔素(carotenoids)

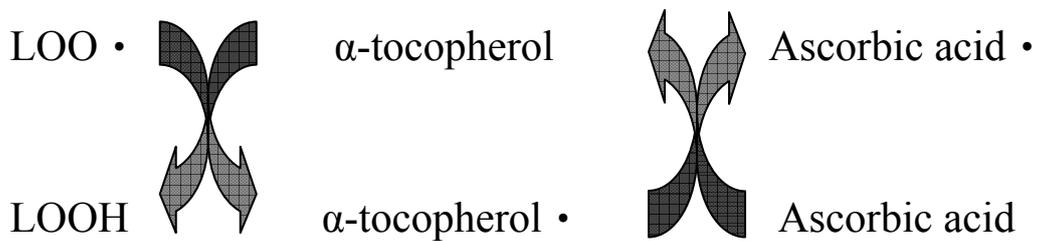
Carotenoids 具有多重共軛雙鍵之長鏈多烯結構 (圖十四)，可抑制單旋態氧及捕捉過氧化自由基，以終止自由基連鎖反應。例如 β -胡蘿蔔素 (β -carotene) 因具有共軛雙烯 (conjugated dienes) 結構，可與過氧化自由基作用形成穩定的共振結構，來抑制脂質過氧化反應的發生 (Aruoma, 1998)。Carotenoids 的自由基清除能力視其結構而定，如結構上共軛雙鍵長度及 β -ionone 環上銜接之官能基種類，當共軛雙鍵數較多，則自由基清除能力便較強 (Anguelova and Warthsen, 2000)，例如茄紅素 (lycopene) 含有 11 個共軛雙鍵，其中又以順式結構者具有較強的清除自由基及終止單旋態氧活性的能力。



圖十二、不同型式抗壞血酸與自由基之反應

Fig 12. Various forms of ascorbic acid and its reaction with radicals (R^\bullet)

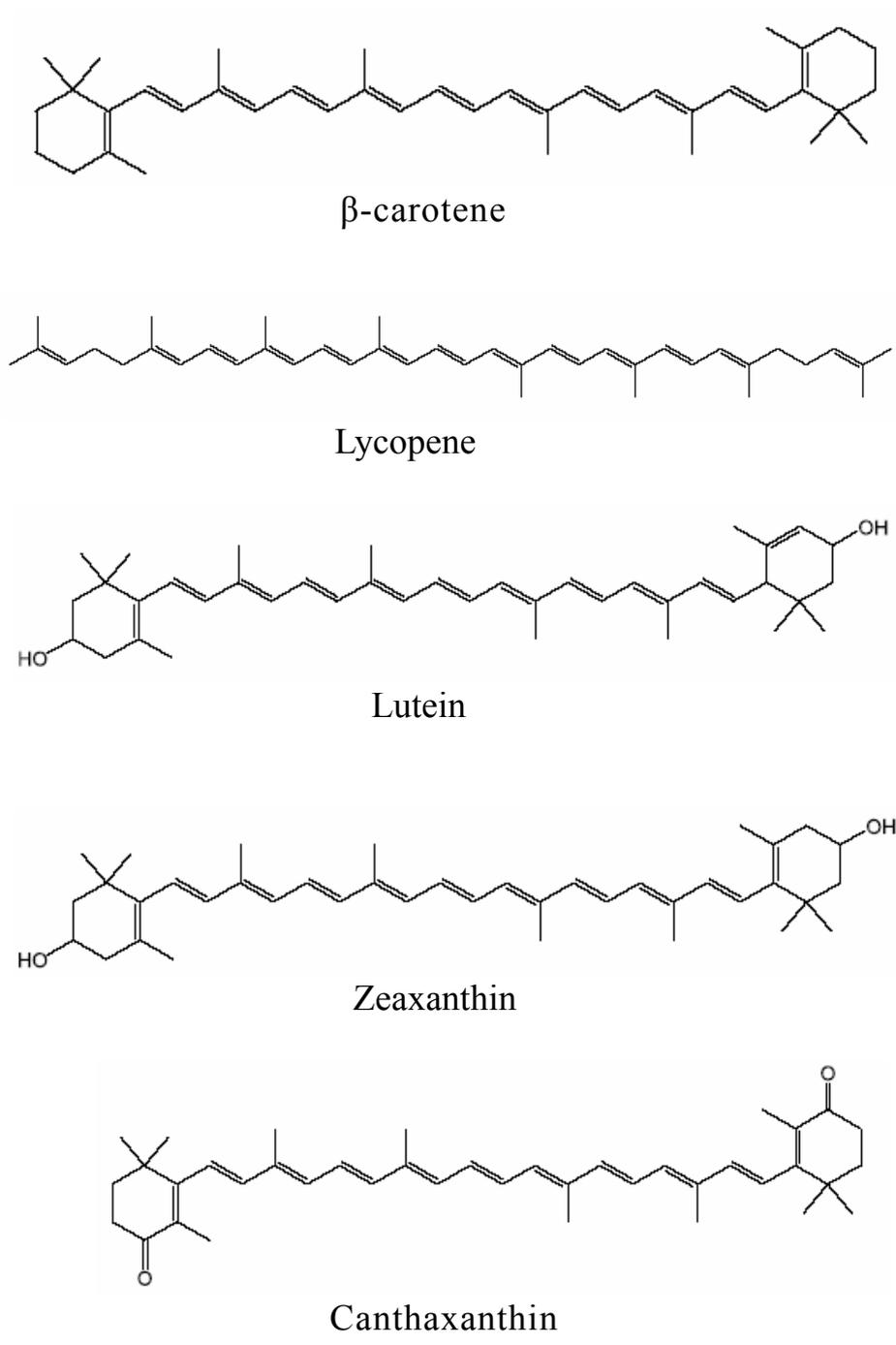
(Valko *et al*, 2006)



圖十三、還原劑之作用機制

Fig 13. Mechanism of antioxidation for reducing agent.

(Hudson, 1990)



圖十四、常見類胡蘿蔔素之結構圖

Fig 14. Structures of some of the dietary carotenoids.

(Cantrell *et al* , 2003)

4. 麩胱甘肽 (glutathione, GSH)

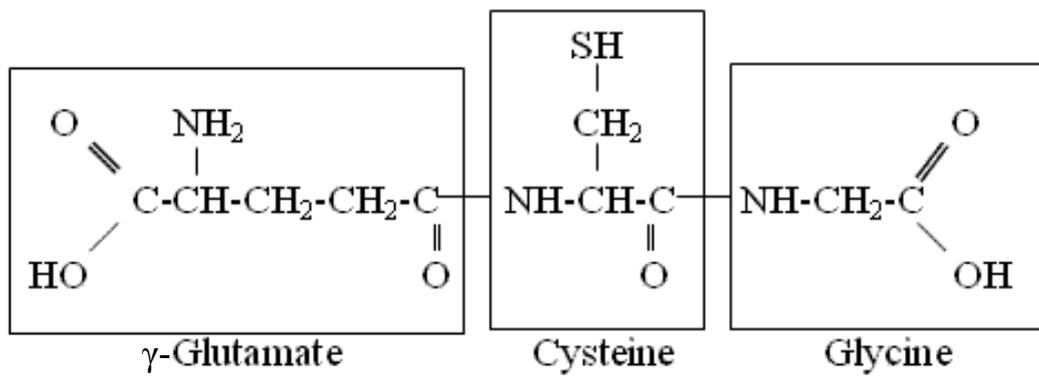
GSH 是由麩胺酸 (glutamic acid)、半胱胺酸 (cysteine) 與甘胺酸 (glycine) 等三種胺基酸所組成，結構如圖十五所示，其廣泛存在於動植物與微生物細胞中，是細胞內含量最豐之小分子硫化物，在細胞抗氧化系統中為一個重要之成分 (Sen, 1997; Wu et al, 2003; Barry and John, 1999)。其抗氧化機制是將 GSH 的 cysteine 具有高度親核性 (nucleophilic) 的側鏈硫氫基 (sulfhydryl group)，提供電子給活性氧分子將其還原，氧化後形成之 GS• 可與 GS• 形成 GSSG，進一步再藉由 NADPH-dependent glutathione reductase 還原為 GSH，以終止自由基連鎖反應，並降低活性氧對細胞的傷害 (Maarten, 1999)。

5. 多酚類 (polyphenols)

polyphenols 為植物中廣泛存在的成分，種類超過 8000 種，其酚型構造上帶有數個羥基，此羥基與體內的抗氧化有關，主要包括酚酸 (phenolic acids)、類黃酮 (flavonoids) 及鞣質 (tannins) 等，以下就幾種主要酚類化合物做介紹：

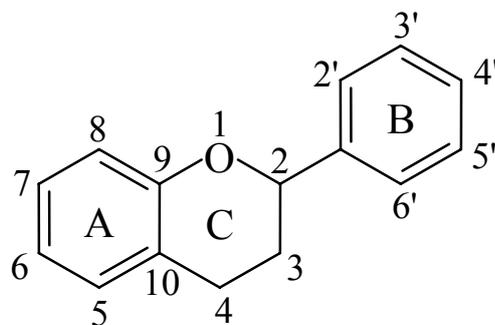
5-1. 類黃酮 (flavonoids)

類黃酮是由三個環狀結構的 diphenyl propane ($C_6-C_3-C_6$) 型式所構成 (圖十六)，屬於多酚類化合物 (polyphenolic compounds) 的一種，廣泛存在於植物組織中，尤其是葉、花、果實、種子等。依其結構差異性可分為黃酮 (flavones)、黃酮醇 (flavonols)、黃烷酮 (flavanones)、黃烷醇 (flavanols)、異黃酮 (isoflavones)、黃烷酮醇 (flavanonols)、花青素配質 (anthocyanidins) 及查酮 (chalcones) 等八大類 (表七)。



圖十五、麩胱甘肽之結構圖

Fig 15. Structure of Glutathione (Maarten *et al* , 1999)

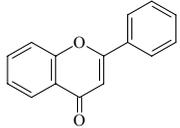
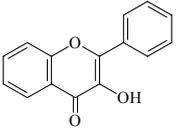
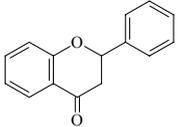
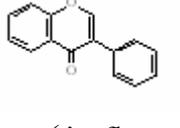
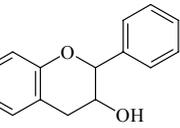
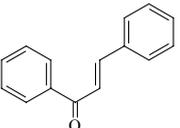
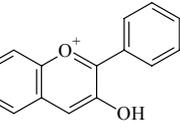
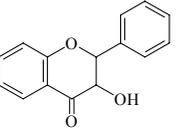


圖十六、類黃酮之基本結構圖。

Fig 16. Structures of flavonoid. (Cook and Samman , 1996)

表七、類黃酮之抗氧化性

Table 7. The antioxidative activities of flavonoid

類黃酮類別	抗氧化性特徵
 黃酮 (flavones)	* 此結構為在 C 有 2,3 double bond, 4-oxofu, 但沒有 3-OH。 * B 環上-OH 越多, A 環在 C5 及 C7 上有-OH, 抗氧化性越強。 * 抗氧化性: lutein > apigenin > chrysin
 黃酮醇 (flavonols)	* 此結構為在 C 有 2,3 double bond, 4-oxofu 且有 3-OH。 * B 環上-OH 越多, A 環在 C5 及 C7 上有-OH, 抗氧化性越強。 * 抗氧化性: quercetin > myricetin > morin > kaempferol
 黃烷酮 (flavanones)	* 抗氧化性: taxifolin > naringenin > hesperitin > hesperidin > naringin 和 OH 的數目及取代位置有關。 * 其抗氧化性小於 flavonols 及 flavanones。
 異黃酮 (isoflavones)	* genistin, daidzein 屬之。 * 抗氧化性差, 在天然產物中此類結構較少。 * orthodihydroxyl 的結構。
 黃烷醇 (flavanols)	* 此類結構由於 C 環為飽和的 heterocyclic 環, 在 AB 環間無法電子非定域化, 抗氧化性較具相同-OH 的 flavones 及 flavonols 較差。 * 抗氧化性: catechin-gallate > catechin
 查酮 (chalcones)	* butein, phloretin, phloridzin 屬之。 * 從甘草的成分可分離出具有抗氧化性的物質 lichalcone A。 * 具有潛在抗氧化性, dihydrochalcone > chalcone
 花青素配質 (anthocyanidins)	* Antioxidant: cyanidin > cyanidine-3-β-D-glucoside * Cyanidin 以 flavylium cation 的形式存在時抗氧化性較佳 (pH2 > pH4 > pH7), B 環結構影響抗氧化性。 * Cyanidin = dephindin > malvidin > pelargonidin
 黃烷酮醇 (flavanonols)	* 抗氧化性類似 flavanones, 和 OH 的數目及取代位置有關。 * taxifolin, fustin 屬之。

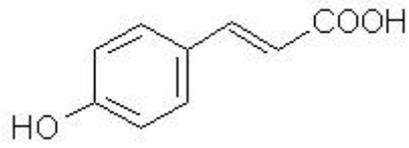
(Cook and Samman, 1996)

大多數類黃酮會與醣類形成配醣體以醣苷 (glycosides) 的形式存在，經過酸、鹼及熱水解後可產生配醣質 (aglycones) 和醣基，而 flavonoid glycosides 的抗氧化性比 flavonoid aglycone 來得弱，顯示醣化作用會影響類黃酮的化學、物理與生物特性 (Rice-Evans *et al*, 1996; Scalbert and Williamson, 2000)。

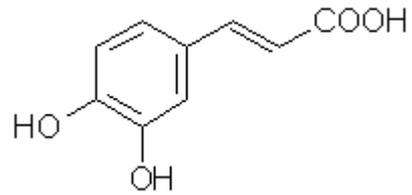
類黃酮的抗氧化性與其結構有很大的關係：(1) 若在 A 環上 5、7 位置有羥基，則能延長此類結構的共軛系統。(2) 若在 B 環上 3、4 位置有鄰位雙羥基 (ortho-dihydroxy)，則對過渡金屬離子 (Cu^{2+} 、 Fe^{2+}) 有螯合作用，間接抑制脂質過氧化反應的發生。(3) 若在 C 環上的 2、3 位置有雙鍵與 4 位置上有酮基，則會與 B 環形成共軛結構。(4) 若在 A、C 環上 2、5 位置有羥基與 C 環上 4 位置有酮基，則會形成分子內氫鍵，具有清除自由基與螯合金屬離子的能力。

5-2. 酚酸 (phenolic acids)

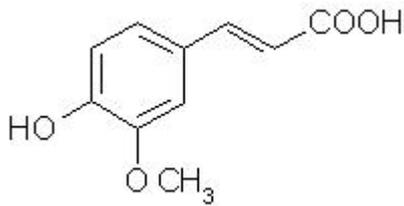
酚酸依其結構大致可分為苯甲酸 (benzoic acid) 與肉桂酸 (cinnamic acid) 兩大類，兩者之羥基衍生物廣泛存在於植物中 (圖十七)，且雙羥基衍生物之抗氧化性優於單羥基衍生物，如 3,4-二羥基肉桂酸 (caffeic acid) 在多種抗氧化系統中皆顯示出強抗氧化力 (Milic *et al*, 1998)，若第二個羥基位於苯環的鄰位或對位上，其抗氧化性會增加。此外，研究顯示許多酚酸如 ferulic acid、caffeic acid 等皆具有抑制低密度脂蛋白 (LDL) 氧化的能力 (Bors *et al*, 1990)。



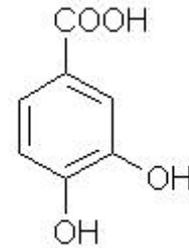
p-coumaric acid



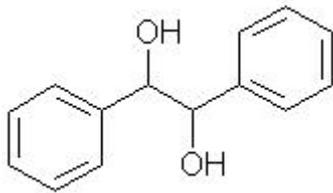
caffeic acid



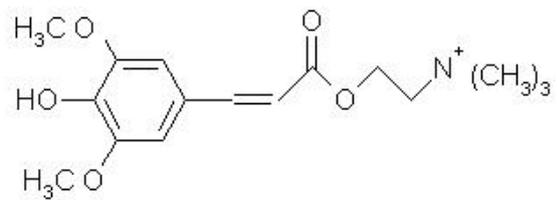
ferulic acid



protocatechuic acid



hydrobenzoin



sinapine

圖十七、苯甲酸與肉桂酸之衍生物結構圖

Fig 17. The structures of the derivatives of benzoic acid and cinnamic acid.

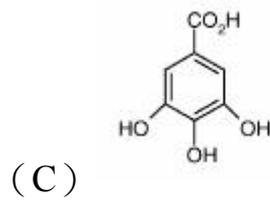
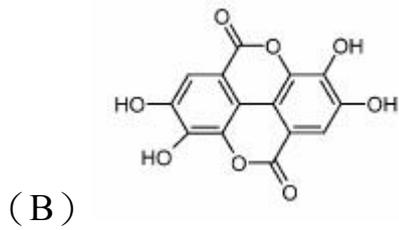
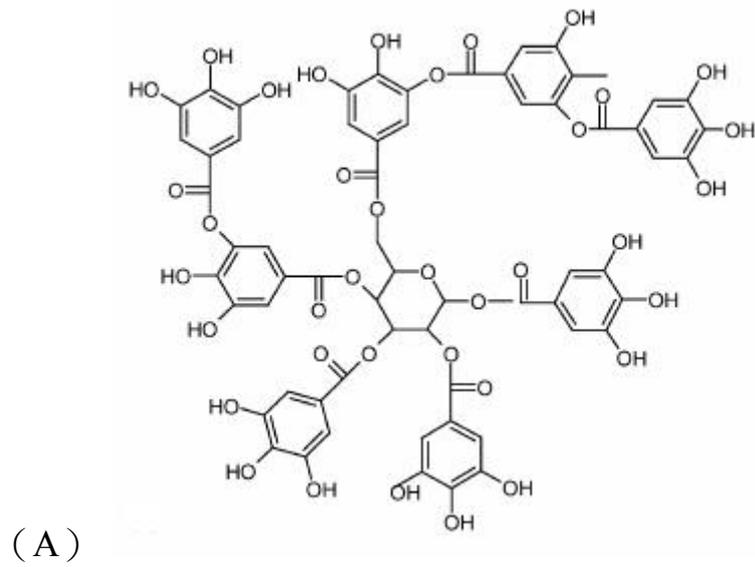
(Pokorny, 1987)

5-3.鞣質（單寧，tannins）

Tannin廣泛存在於多種植物性食品及動物飼料中，一般可分為hydrolyzable 及condensed tannins（proanthocyanidins，原花青素）。植物中的tannin 屬於hydrolyzable tannins，其分子量約500-3000 dalton，分子量低於500 dalton或高於3000 dalton是不具功能的tannin（Bate and Swain，1962）。其抗氧化性在於苯環上之hydroxyl group，可清除自由基防止脂質過氧化（Yokozawa *et al*，2000），且容易與過渡金屬離子 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 螯合，所形成的 Fe^{2+} -Tannin複合物可防止氫氧自由基的氧化傷害（George *et al*，1999；Lodovici *et al.*，2001）。其反應式如下：



此外，研究顯示tannins與其水解物如鞣酸（tannic acid）、沒食子酸（gallic acid）及鞣花酸（ellagic acid）等（圖十八）被證實具有抗致突變的活性（Huang *et al*，1985；Horn and Vargas，2003）。



圖十八、單寧之化學結構圖 (A) 鞣酸，(B) 鞣花酸，(C) 沒食子酸
Fig 18. Chemical structures of tannins: (A) tannic acid, (B) ellagic acid,
(C) gallic acid.

(Fedeli, 2004)

第二節、研究目的與實驗架構

一、研究目的

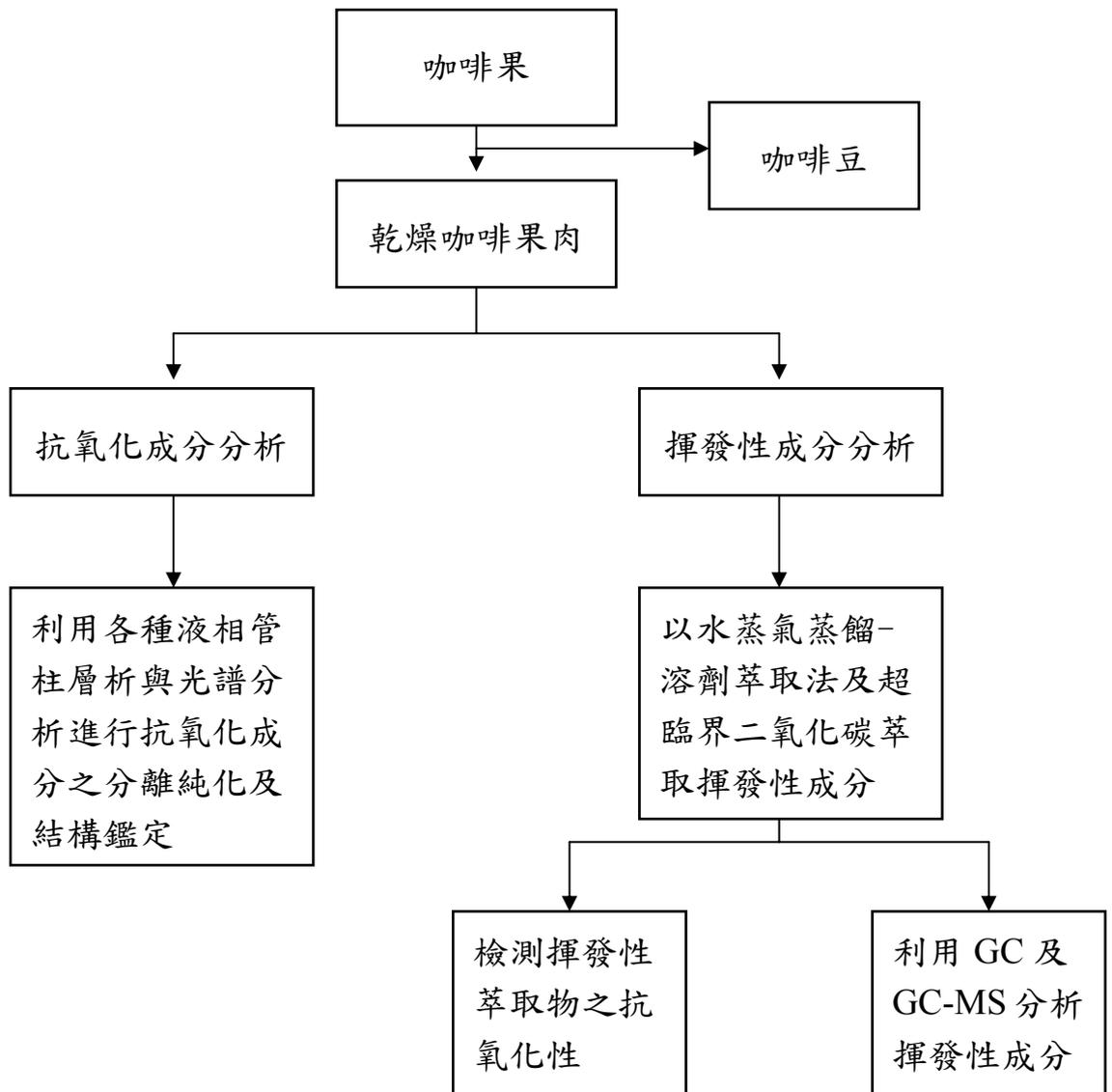
脂質的氧化是人體從脂肪獲得能量的正常生理代謝之一，但近年來許多研究指出脂質過氧化所產生的自由基和氫過氧化物對人體易產生種種不良的影響，包括老化、心血管疾病及癌症等（Kubow，1990；Glass and Witztum，2001）；此外，含油脂食品的氧化酸敗亦是造成食品品質劣變與營養流失的因素之一，故避免脂質過氧化實為重要的課題。

在食品上，防止油脂氧化最普遍且有效的方法是直接添加抗氧化劑（Fennema，1985）。但由於人工合成抗氧化劑如 BHA 與 BHT 可能造成動物肝、腎傷害及致癌性（IARC，1986a；IARC，1986b；Schildermann *et al*，1995），及天然抗氧化劑— α -生育醇因價格稍嫌昂貴且溶解性及抗氧化性不如 BHA 與 BHT 等因素，在自然界中尋找更安全有效的新天然抗氧化劑亦成為學者們研究的重點之一。

咖啡豆目前已被研究出具有抗氧化性的化學成分包括咖啡酸（caffeic acid）、漂木酸（chlorogenic acid）等酚類化合物（Daglia *et al*，2000；Richelle *et al*，2001）。此外，咖啡豆具有獨特的香氣，尤其將生豆經焙炒（roasting）使內部成分產生梅納反應與醣類、胺基酸及脂質降解等化學反應，使咖啡豆形成更具特色且成分複雜的香氣（黃，2003）。

本研究目的主要以農產廢棄物—咖啡果肉之抗氧化性及揮發性成分為研究重點，以分離、純化及結構鑑定等步驟，尋找出具有強抗氧化性之物質；亦分析不同萃取法所萃取之揮發性成分並檢測其抗氧化性。此外，在取得咖啡豆之過程中會產生大量廢棄物，希望藉此增加副產品的附加價值及再利用性。

二、實驗架構



第三節、材料與方法

一、實驗材料

本實驗之樣品為咖啡 (*Coffea arabica*) 之乾燥果肉，2005 年 3 月產於雲林縣古坑鄉劍湖山，由愛之味股份有限公司生技研究所提供。樣品以磨粉機 (台中榮聰鐵工廠製) 磨碎至可通過 20 mesh 篩網孔之粗粉。

二、化學試藥

1. 以下購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)，試藥級

α -Tocopherol：純度 95%

Butyl hydroxyl anisole (BHA)：純度 90%

Peroxidase from horseradish：113 units/mg solid

2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)：

純度 98%

2. 以下購自林純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)，試藥級

Iron(II) chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)：純度 95%

Potassium phosphate, monobasic (KH_2PO_4)：純度 99%

3. 以下購自 CIL 公司 (Andover, MA, USA)

Methanol- D_4 (CD_3OD)：純度 99.8%

Chloroform- d (CDCl_3)：純度 99.8%

4. 以下購自 Riedel-de Haën 公司 (Seelze, Germany)

Dimethyl sulfoxide (DMSO)：純度 99.5%

Hydrogen peroxide (H_2O_2)：純度 30%

5. 以下購自 Tedia 公司 (Ohio, USA)

Ethyl acetate (EtOAc)：HPLC 級，純度 99.9%

n-Hexane：HPLC 級，純度 95%

6.其他

Linoleic acid：購自 Wako 公司（Osaka, Japan）。使用前經充氮減壓蒸餾，再分裝於 2 mL 指形瓶中貯存於-20°C 冷凍庫備用，每隔兩個月重新蒸餾再製。

Ammonium thiocyanate (NH₄SCN)：試藥級，純度 99%，購自關東化學株式會社（Tokyo, Japan）

Sodium hydroxide (NaOH)：試藥級，純度 95%，購自聯工化學公司（HsinChu, Taiwan）

6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2,2-carboxylic acid (Trolox)：試藥級，純度 97%，購自 Aldrich 化學公司（Milwaukee, WI, USA）

Methanol (MeOH)：HPLC 級，純度 99.9%，購自 Baker 公司（New Jersey, USA）

Acetic acid：純度 99%，購自聯工化學公司（HsinChu, Taiwan）

三、填充樹脂

1.Silica gel 60 樹脂(70-230 mesh，德國 Merck 公司)

2.ODS 樹脂：Cosmosil₁₄₀C₁₈-OPN(日本 Nacal Tesque 公司)

四、TLC 板：Silica gel 60F-254（德國 Merck 公司）

五、儀器設備

1.旋轉式減壓濃縮機

使用日本 Tokyo Rikakikai 公司的 EYELA N-1 機型。

2.凍結乾燥機

使用日本 Tokyo Rikkakikai 公司的 EYELA FD-5N 機型。

3. 紫外—可見光吸光光譜儀

使用日本 Hitachi 公司的 U-2001 Spectrophotometer。

4. 光二極矩高效能液相層析儀

使用日本 Hitachi 公司 L-7100 型的液相層析儀、L-7450A 型的光二極體陣列層析器及 D-7000 型層析控制與資料處理器。

5. 液相層析—質譜儀

使用日本 Hitachi 公司的 M-8000 型 LC/3DQMS 質譜儀。

6. 核磁共振光譜儀

使用 VXR-300/51 型核磁共振光譜儀($^1\text{H-NMR}$ 以 300MHz、 $^{13}\text{C-NMR}$ 以 75MHz) 檢測。

六、實驗方法

1. 抗氧化性檢測

(1) 脂質氫過氧化物之測定 (Ferric thiocyanate method)

本實驗參考 滿田 (1967) 及 蘇 (1991) 等之方法 (圖十九)。將欲檢測物質、 α -生育醇(α -Tocopherol) 及 丁基羥基甲氧苯 (Butyl hydroxyl anisole, BHA) 分別配製成濃度為 1mg/mL 之甲醇溶液，各取 0.2mL 加入具有磨砂瓶蓋之 50mL 三角錐形瓶中，對照組則僅加入等量甲醇 (0.2mL) 於三角錐形瓶中，再分別加入 0.13% 之亞麻油酸 (Linoleic acid) 甲醇溶液 10mL 及 1/30M pH 7.0 之磷酸緩衝溶液 10mL，最後以去離子水定量至 25mL。將三角錐形瓶密封，置入 40°C 循環式恆溫烘箱內，每隔 24 小時定時取出進行顯色反應及比色分析。

顯色反應：取上述反應基質 0.2mL 至含有 9.4mL 75% 甲醇水溶液之試管中，再依次加入氯化亞鐵鹽酸溶液 (2.45×10^{-2} g FeCl_2 / 10 mL

3.5% HCl) 0.2mL，硫氰酸鉞溶液(3g NH₄SCN / 7mL dist. H₂O) 0.2mL。震盪使之混合均勻，反應 3 分鐘後，再檢測波長 500 nm 下之吸光值。

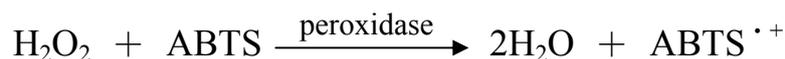
當油脂的氧化程度愈高，氫過氧化物生成便愈多，顏色也就愈深，因此由吸光值的大小可推得氧化程度，並可獲知氧化性強弱。其反應式如下：



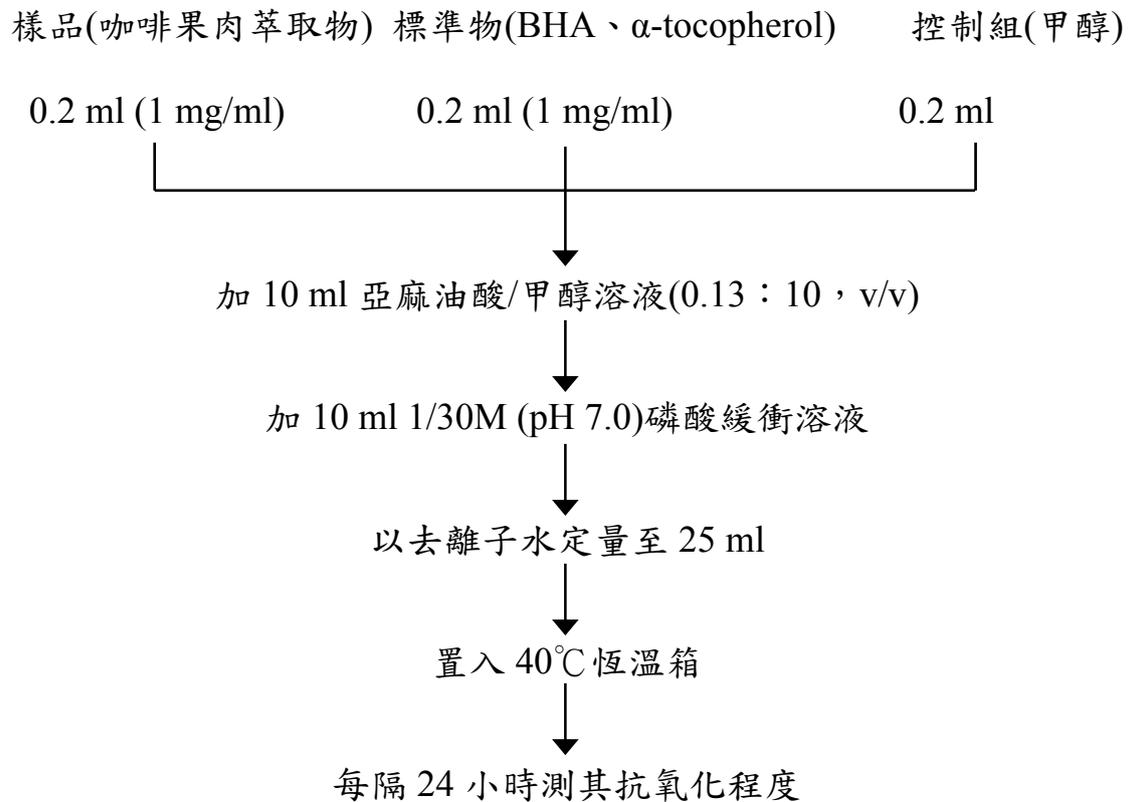
$\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$: red pigment complex at λ_{max} 500 nm

(2)總抗氧化能力 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

本實驗參考 Miller (1993)及 Arnao (1996)等之方法。將 peroxidase、2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 與 H₂O₂ 混合均勻，使最終系統濃度分別為 peroxidase (4.4 unit/mL)、ABTS (100 μ M)及 H₂O₂ (50 μ M)，於 30°C 下避光反應 1 小時，使其成為藍綠色穩定的 ABTS^{•+} 自由基反應試劑。其反應式如下：



加入 0.25mL 不同濃度樣品，反應 10 分鐘後測 734 nm 之吸光值，並觀察其脫色程度。測得後再由不同濃度 Trolox 清除 ABTS^{•+} 自由基所作之檢量線，換算樣品與 Trolox 之相對濃度 (μ M)。



取上述溶液 0.2 ml
 加入 75% 甲醇 9.4 ml
 加入硫氰酸銨溶液 0.2 ml
 加入含氯化亞鐵之鹽酸溶液 0.2 ml
 反應三分鐘，測其 500 nm 之吸光值

圖十九、硫氰酸鐵法之測定流程圖。

Fig 19. Analytic procedure for the ferric thiocyanate method.

2.咖啡果肉抗氧化成分之萃取、分離及純化

咖啡果肉抗氧化成分之分離流程如圖二十。

(1)溶劑萃取與粗分離

將磨碎之咖啡果肉粉末(共計 2 公斤)先以 10 公升之甲醇重複萃取三次，經過濾收集其濾液，再依序用 5 公升之正己烷及乙酸乙酯以分液漏斗重複萃取三次，收集萃取物並以旋轉式減壓濃縮機在低於 40°C 下濃縮，而後利用硫氰酸鐵法檢測三種萃取物之抗氧化性。

(2)矽膠液相管柱層析

首先以 Silica gel 60 (70-230 mesh，德國 Merck 公司)充填於玻璃管柱中(5.0× 70 cm)，再將咖啡果肉乙酸乙酯萃取物充填至管柱最頂層，依次利用正己烷：乙酸乙酯(v/v)= 100：0、80：20、60：40、50：50、40：60、20：80、0：100 及乙酸乙酯：甲醇(v/v)=50：50、0：100 之混合溶劑作為充提溶劑，每 300 mL 收集一瓶，並以紫外線—可見光吸光光譜儀檢測其在 270 nm 之吸光值，並對收集瓶作圖進行區分。而後利用硫氰酸鐵法檢測各區分之抗氧化性。

(3)乙酸乙酯萃取物沖提區分 I、II、VI及VII之薄層層析

咖啡果肉乙酸乙酯萃取物具抗氧化性之區分 I、II、VI及VII經薄層層析(Thin layer chromatogram, TLC)比對後，因區分 I、II及區分 VI、VII成分相似，故分別合併後以 HPLC 分析。

(4)乙酸乙酯萃取物沖提區分 I + II之矽膠液相管柱層析

將咖啡果肉乙酸乙酯萃取物具抗氧化性之區分 I + II經減壓濃縮後，置入充填矽膠之管柱(2.0× 45cm)進行液相管柱層析，其沖提劑條件依序是正己烷：乙酸乙酯 (v/v)=100：0、95：5、90：10 之溶劑，沖提液以每 10 mL 為收集單位，並以紫外線—可見光吸光光譜儀

檢測其在 270 nm 之吸光值，並對收集瓶作圖進行區分。而後利用硫氰酸鐵法檢測各區分之抗氧化性。

(5) 乙酸乙酯萃取物沖提區分 VI + VII 之 ODS 液相管柱層析

將咖啡果肉乙酸乙酯萃取物具抗氧化性之區分 VI + VII 經減壓濃縮後，置入充填 Cosmosil140C18-OPN(日本 Nacalai Tesque 公司) ODS 樹脂之玻璃管柱(2.0×40cm)進行液相管柱層析，其沖提液條件依序是甲醇：去離子水(v/v)=0：100、10：90、20：80、30：70 之溶劑，沖提液以每 10 mL 為收集單位，並以紫外線—可見光吸光光譜儀檢測其在 270 nm 之吸光值，並對收集瓶作圖進行區分。而後利用硫氰酸鐵法檢測各區分之抗氧化性。

(6) 高效液相層析

將上述具抗氧化性之區分(I + II)-2、區分(I + II)-3、區分(VI + VII)-2 及區分(VI + VII)-3 利用高效液相層析進行分析，先以分析型高效液相層析找尋分離條件，再依其沖提條件套用於製備型高效液相層析，重複分離抗氧化成分。將經高效液相層析分離之各區分濃縮後，進行結構鑑定。高效液相層析條件敘述如下：

a. 區分(I + II)-2、區分(I + II)-3

(a) 分析型高效液相層析

管 柱：Develosil Silica 60-5

(4.6×250 mm，日本 Nomura 公司)

沖提液：*n*-Hexane：EtOAc (v/v) = 90：10

流 速：1.0 mL/min

偵測器：280 nm

(b) 製備型高效液相層析

管 柱：Develosil Silica 60-5
(20× 250 mm，日本 Nomura 公司)
沖提液：*n*-Hexane：EtOAc (v/v)=90：10
流 速：5.0 mL/min
偵測器：280 nm

b. 區分(VI+VII)-2、區分(VI+VII)-3

(a) 分析型高效液相層析

管 柱：Develosil ODS-HG-5
(4.6× 250 mm，日本 Nomura 公司)
沖提液：MeOH：H₂O (v/v)=25：75
流 速：0.8 mL/min
偵測器：270 nm

(b) 製備型高效液相層析

管 柱：Develosil ODS-HG-5
(20× 250 mm，日本 Nomura 公司)
沖提液：MeOH：H₂O (v/v)=25：75
流 速：5.0 mL/min
偵測器：270 nm

3. 咖啡果肉抗氧化成分之構造鑑定

(1) ¹H-及 ¹³C-核磁共振 (¹H-及 ¹³C-NMR) 光譜測定

將純化之樣品分別溶於 CDCl₃ 或 CD₃OD 中，以 VXR-300/51 型核磁共振光譜儀 (¹H-NMR 以 300MHz，¹³C-NMR 以 75MHz) 測定，獲得其 ¹H-及 ¹³C-NMR 光譜。光譜解析以 δ 表示化學位移

(chemical shift)，並以 TMS(tetramethylsilane)充當比較基準點，s 表示單線峰(singlet)，d 表示雙線峰(doublet)，t 表示三線峰(triplet)，q 表示四線峰(quartet)，b 表示寬線峰(broad)，m 表示多重線峰(multiplet)。

(2)液相層析－質譜檢測

分子量之測定是使用音速氣化噴霧游離法質譜(Sonic Spray Ionization Mass Spectrometer，SSI-MS)。使用的質譜儀為日本 Hitachi 公司的 M-8000 型 LC/3DQMS 質譜儀。

層析條件：

(a) 分析型高效液相層析 [區分(I + II)-2、區分(I + II)-3]

管 柱：Develosil Silica 60-5

(4.6×250 mm，日本 Nomura 公司)

沖提液：*n*-Hexane：EtOAc (v/v) = 90：10

流 速：1.0 mL/min

偵測器：280 nm

(b) 半分析型高效液相層析 [區分(VI + VII)-2、區分(VI + VII)-3]

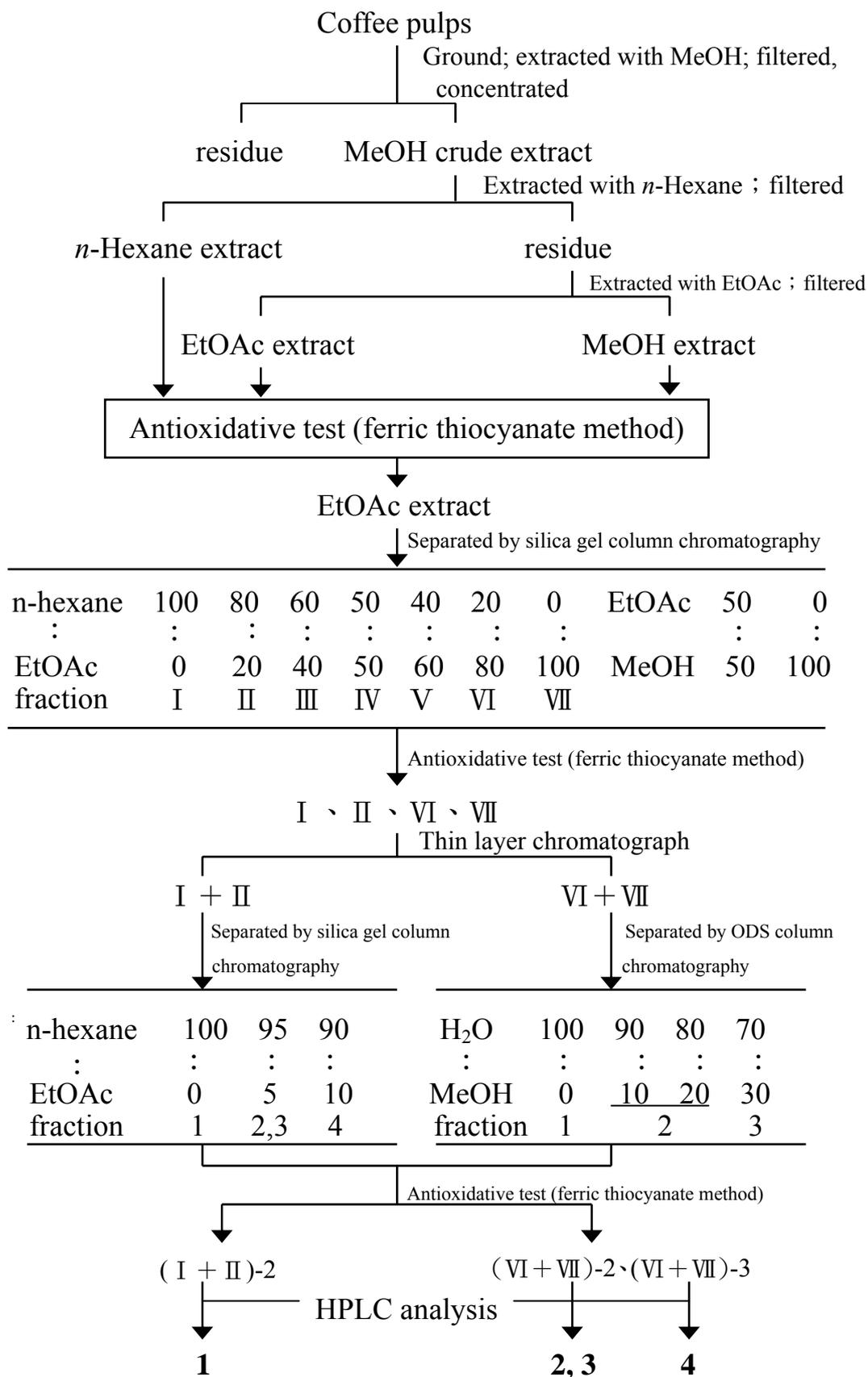
管 柱：Develosil ODS-UG-5

(2.0×250 mm，日本 Nomura 化學公司)

沖提液：MeOH：H₂O (v/v) = 25：75

流 速：0.2 mL/min

偵測器：270 nm



圖二十、咖啡果肉抗氧化成分研究之流程圖。

Figure 20. Scheme on separation and isolation of antioxidative components from coffee pulps.

第四節、結果與討論

一、咖啡果肉抗氧化成分之萃取、分離及純化

1. 抗氧化成分之萃取

將 2 公斤乾燥咖啡果肉經磨碎後，所得的粗粉先經過 10 L 甲醇重複萃取三次，過濾後收集其濾液，經減壓濃縮機濃縮後，所得的甲醇萃取液依序以 5 L 正己烷及乙酸乙酯分層萃取，各溶劑萃取物產率見表八，總產率約為 28.8%。三種不同溶劑萃取物經過濾後，所得濾液以減壓濃縮濃縮，再分別利用硫氰酸鐵法檢測其抗氧化性（圖二十一），抗氧化檢測結果以乙酸乙酯萃取物之抗氧化性最佳，逼近 BHA 之抗氧化性，因此選取乙酸乙酯萃取物進行液相管柱層析分離。

2. 矽膠液相管柱層析

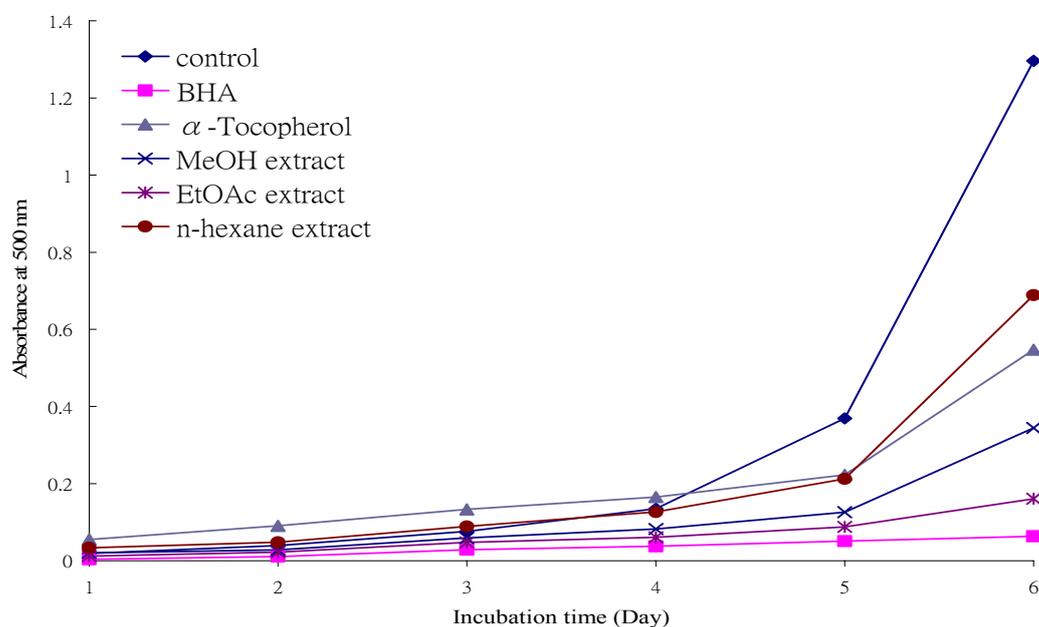
咖啡果肉乙酸乙酯萃取物首先以 Silica gel 60 填充於玻璃管柱進行第一次矽膠管柱層析，其沖提條件依序為正己烷：乙酸乙酯(v/v) = 100：0、80：20、60：40、50：50、40：60、20：80、0：100 及乙酸乙酯：甲醇(v/v) = 50：50、0：100 之混合溶液，沖提液以每瓶 300 mL 為收集單位，並以紫外線—可見光吸光光譜儀掃描，在波長 270 nm 具強吸收，故選取 270 nm 之吸光值對收集瓶作圖，共取 7 個區分（圖二十二）。各區分經濃縮後秤重，並計算其產率（表九），總產率約為 28.8%，而後各區分以硫氰酸鐵法檢測其抗氧化性（圖二十三）。結果顯示區分 I、II、VI 及 VII 的抗氧化性皆強於 α -Tocopherol，其中以區分 VII 之抗氧化性最強，因此選取區分 I、II、VI 及 VII 進行進一步抗氧化成分之分離。

表八、咖啡果肉各種溶劑萃取物之產率

Table 8. Yields of the solvent extracts of coffee pulps

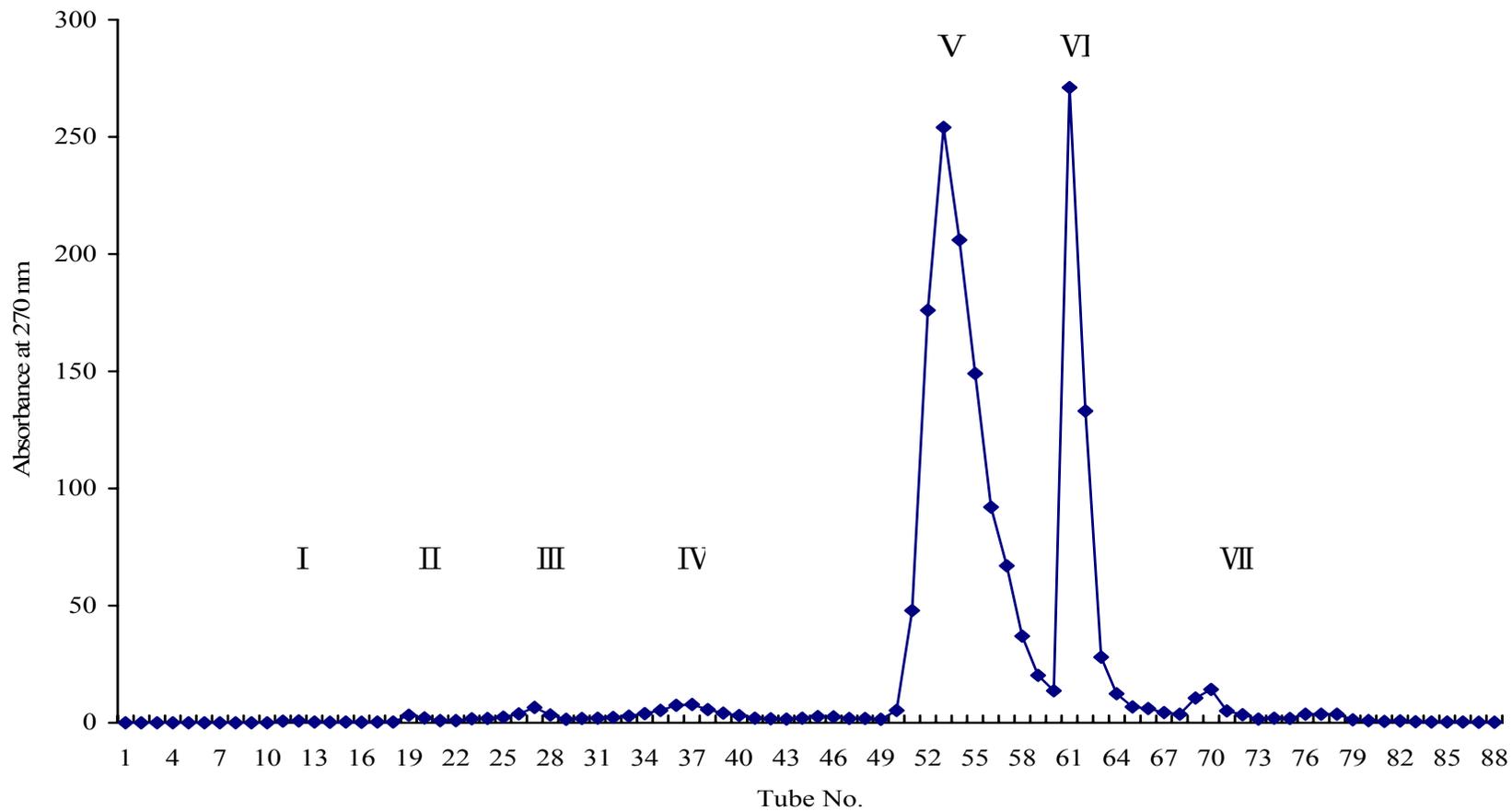
Extract	Weight(g) ^a	Yield(%)
n-Hexane extract	47.6	2.38
EtOAc extract	225.2	11.26
MeOH extract	303.4	15.16
Total	576.2	28.80

^a sample weight : 2.0kg



圖二十一、咖啡果肉各種溶劑萃取物之抗氧化性

Fig 21. Antioxidative activity of the solvent extracts from flowers of coffee pulps.



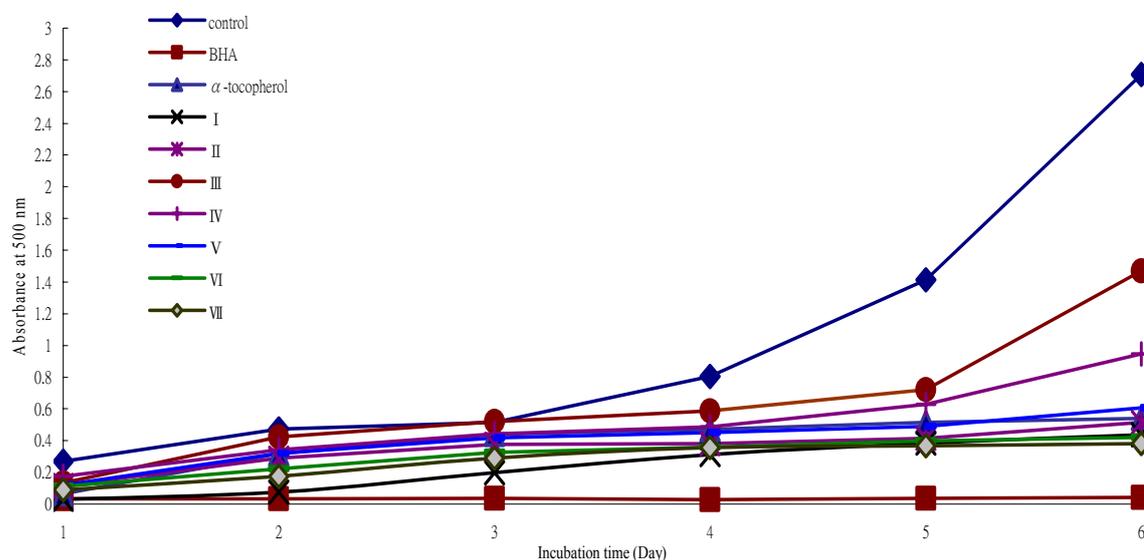
圖二十二、咖啡果肉乙酸乙酯萃取物之矽膠液相管柱層析圖

Fig 22. Silica gel liquid column chromatogram of elution fractions from ethyl acetate extract of coffee pulps.

表九、咖啡乙酸乙酯萃取物經矽膠液相管柱層析後各沖提區分之產率
 Table 9. Yields of elution fractions separated from ethyl acetate extract of coffee pulps by silica gel liquid column chromatography

Fraction	Weight(g) ^a	Yield(%)
I	0.2	0.35
II	0.3	0.52
III	3.6	6.26
IV	4.3	7.48
V	7.7	13.39
VI	26.4	45.91
VII	2.8	4.87
Total	45.3	78.78

^a weight of ethyl acetate extract : 57.5 g



圖二十三、咖啡果肉乙酸乙酯萃取物經矽膠液相管柱層析後各沖提區分之抗氧化性

Fig 23. Antioxidative activity of elution fractions from ethyl acetate extract of coffee pulps by silica gel liquid column chromatography

3.. 乙酸乙酯萃取物沖提區分 I、II、VI及VII之薄層層析

將具有抗氧化性之區分 I、II、VI及VII分別以 TLC 板展開分離後可分別得到 3、3、3 及 2 個 R_f 值的區分 (圖二十四)，比對其 R_f 值後發現區分 I 及區分 II 有高度重複性，且區分 I 和 II 產率很低，故將兩區分合併以增加往後鑑定分析所需的量；比對區分 VI 及 VII 後發現兩者有部份重複性，因此亦將兩區分合併。將區分 I + II 及 VI + VII 經高效液相層析分離後發現無顯著波峰，故繼續進行第二次液相管柱層析。

4. 乙酸乙酯萃取物沖提區分 I + II 之矽膠液相管柱層析

將區分 I + II 置入充填著矽膠 (silica-60) 之液相管柱進行層析，其沖提條件依序是正己烷：乙酸乙酯 (v/v)=100：0、95：5、90：10，沖提瓶以每瓶 10 mL 為單位收集，每瓶收集液經由紫外線-可見光吸光光譜儀掃描波長 270 nm 之吸光值對收集瓶作圖，共可細分成四個區分 (圖二十五)，分別濃縮後秤重，並測其產率 (表十)，總產率約為 38.0%。再以硫氰酸鐵法檢測其抗氧化性 (圖二十六)，其中以區分(I + II)-2 及區分(I + II)-3 顯示出強於 α -生育醇的抗氧化性，故選取此兩區分繼續進行抗氧化成分之分離。

Plate : Silica gel 60 F-254
Developing solvents : EtOAc : *n*-Hexane=20 : 80
Detector : UV 254 nm

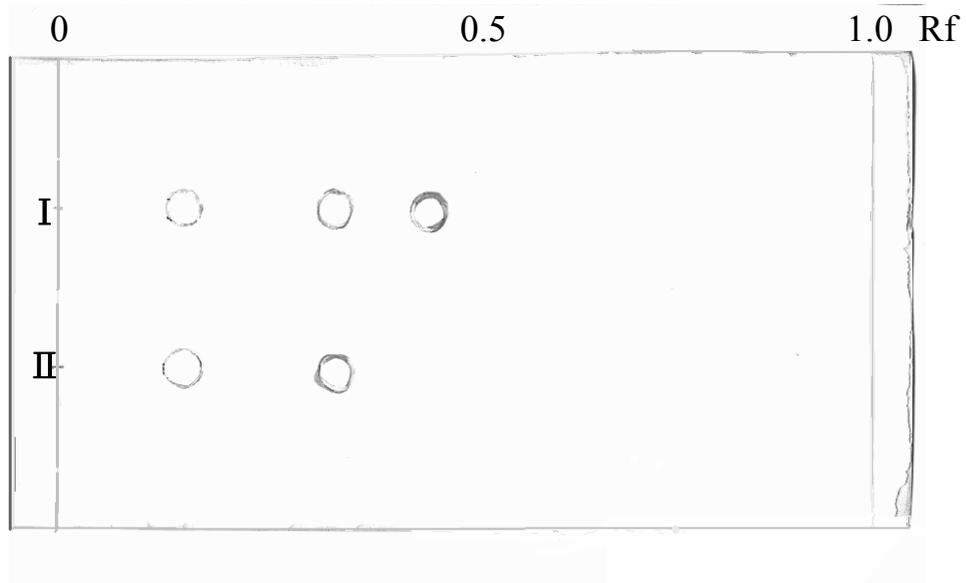
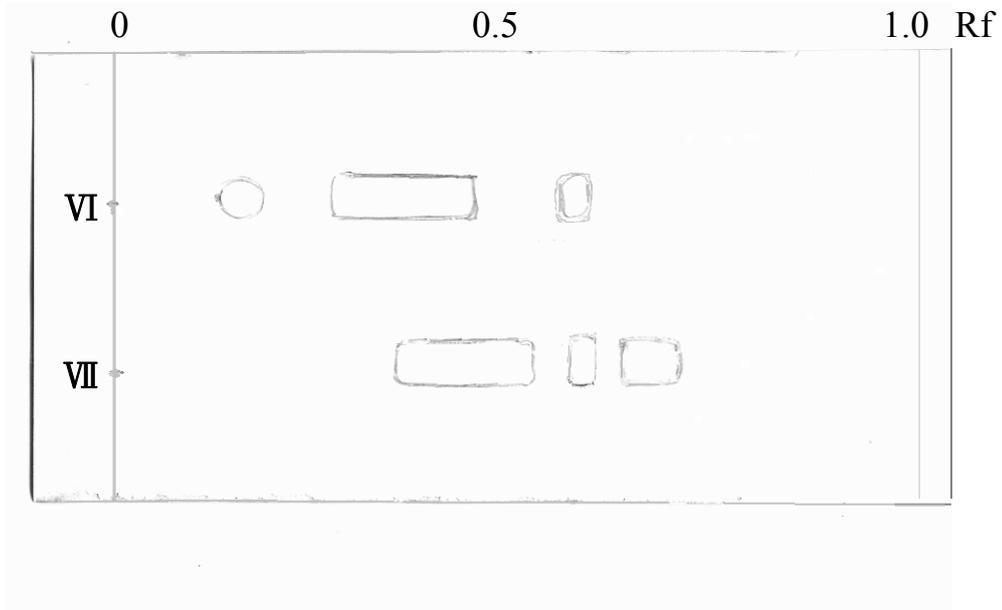
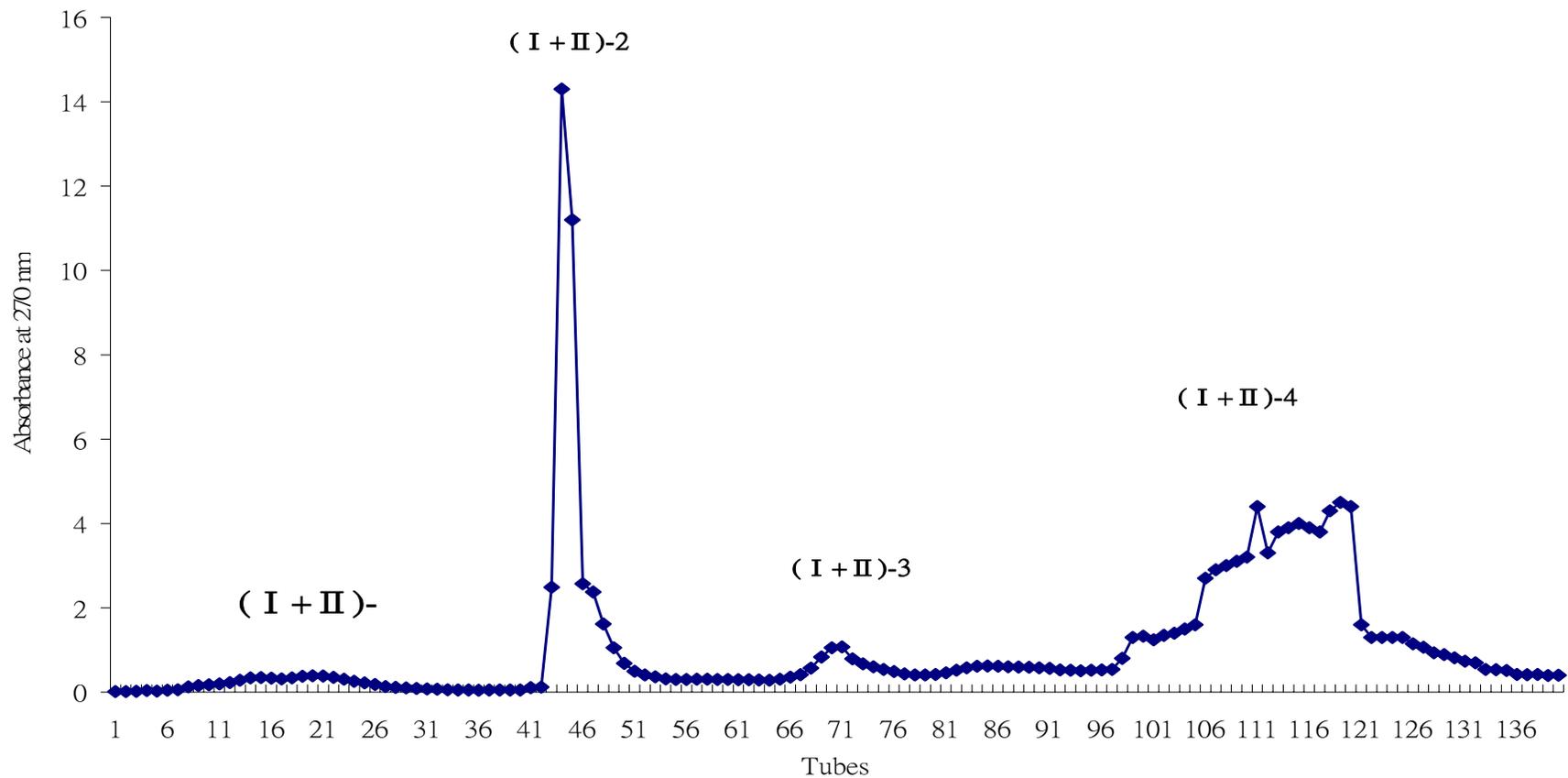


Plate : Silica gel 60 F-254
Developing solvents : EtOAc : *n*-Hexane=80 : 20
Detector : UV 254 nm



圖二十四、咖啡果肉乙酸乙酯萃取物沖提區分 I、II、VI及VII之薄層層析圖

Fig 24. Thin layer chromatogram for elution fraction I、II、VI and VII from ethyl acetate extract of coffee pulps.



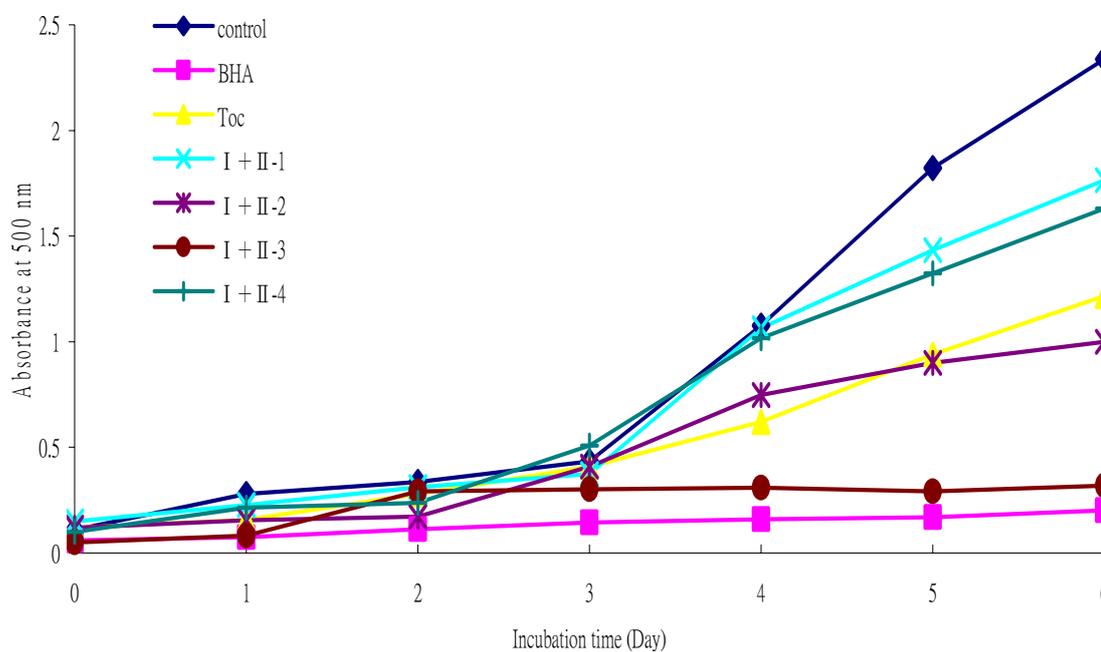
圖二十五、咖啡果肉乙酸乙酯萃取物沖提區分 I + II 之矽膠液相管柱層析圖

Fig 25. Silica gel liquid column chromatogram for fraction I + II from ethyl acetate extract of coffee pulps.

表十、咖啡果肉沖提區分 I + II 經矽膠液相管柱層析區分後之產率
 Table 10. Yields of elution fractions separated for the fraction I + II
 from coffee pulps by silica gel liquid column chromatography

Fraction	Weight(g) ^a	Yield(%)
(I + II)-1	0.05	10.0
(I + II)-2	0.07	14.0
(I + II)-3	0.02	4.0
(I + II)-4	0.05	10.0
Total	0.19	38.0

^a weight of the fraction I + II : 0.5 g

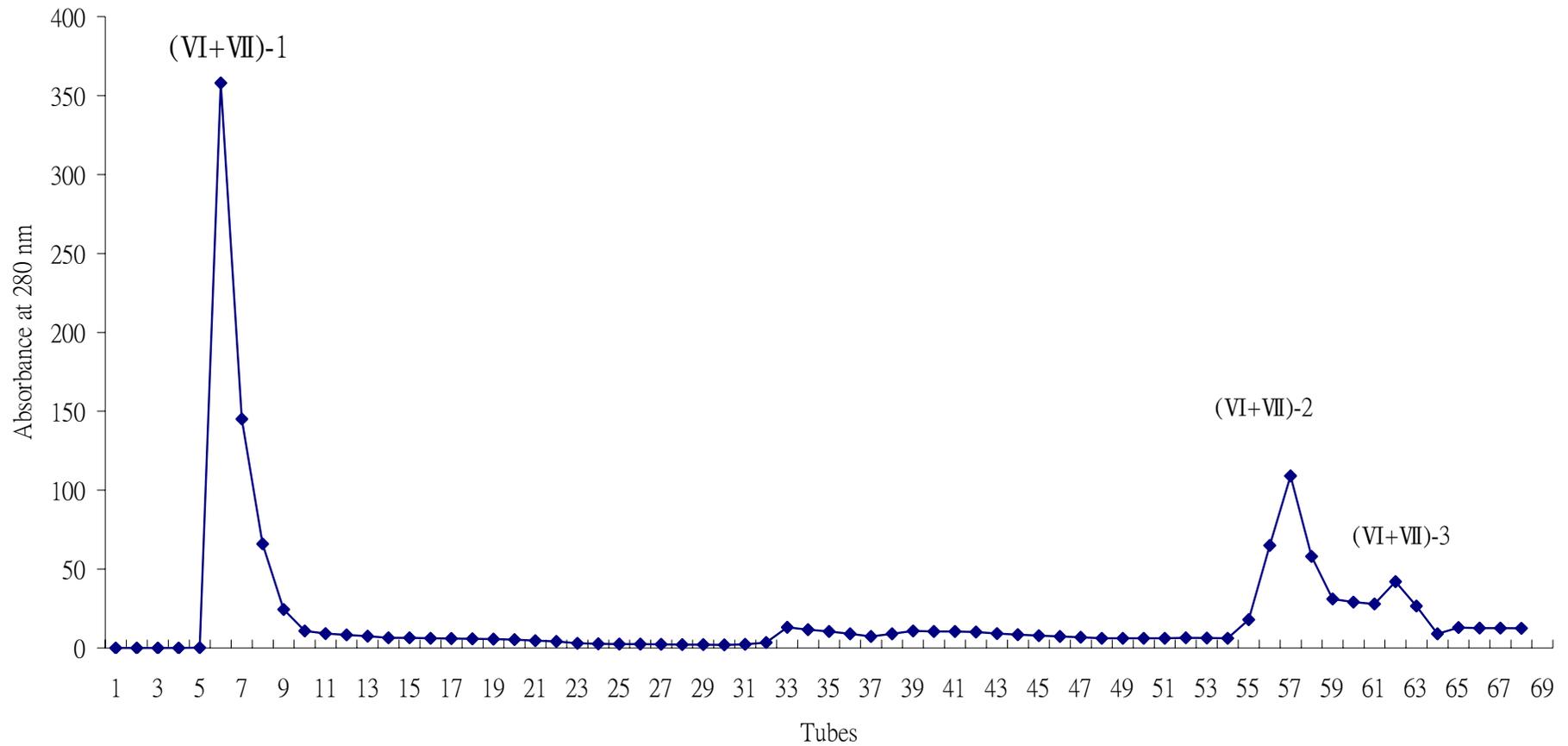


圖二十六、咖啡果肉沖提區分 I + II 經矽膠液相管柱層析後各沖提區
 間之抗氧化性

Fig 26. Antioxidative activity of elution fractions I + II from acetate
 extract of coffee pulps by silica gel liquid column chromatography.

5. 乙酸乙酯萃取物沖提區分VI+VII之 ODS 液相管柱層析

將區分VI+VII置入充填著 Cosmosil140C18-OPN ODS 樹脂之管柱進行液相管柱層析，其沖提液條件依序是甲醇：去離子水(v/v)=0：100、10：90、20：80、30：70 之溶劑，沖提液以每 10 mL 為收集單位，並以紫外線—可見光吸光光譜儀檢測其在 270 nm 之吸光值，並對收集瓶作圖，共可分成三個區分（圖二十七），各區分經濃縮後秤重，並測其產率（表十一），總產率約為 28.36%。之後以硫氰酸鐵法檢測其抗氧化性（圖二十八），其中以區分(VI+VII)-2 及區分(VI+VII)-3 顯示出強於 α -生育醇的抗氧化性，故選取此兩區分繼續進行抗氧化成分之分離。



圖二十七、咖啡果肉乙酸乙酯萃取物沖提區分VI+VII之 ODS 液相管柱層析圖

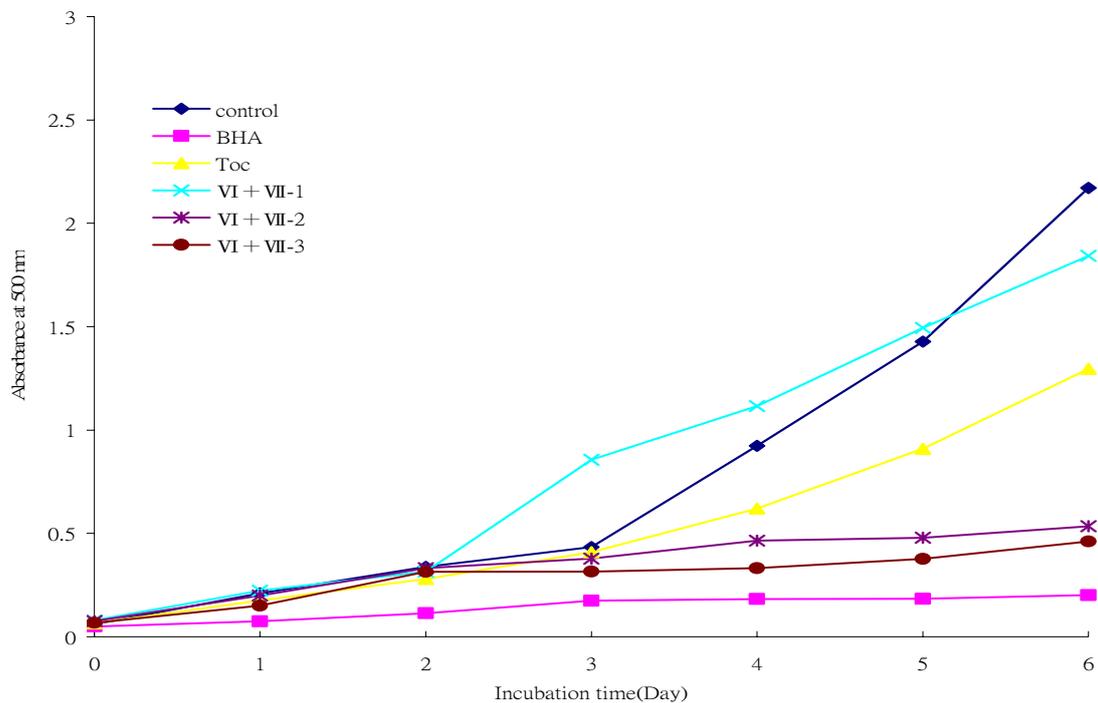
Fig 27. ODS liquid column chromatogram for fraction VI + VII from ethyl acetate extract of coffee pulps.

表十一、咖啡果肉乙酸乙酯萃取物沖提區分VI+VII經 ODS 液相管柱層析各沖提區間之產率

Table 11. Yields of elution fractions VI+VII separated from ethyl acetate extracts of coffee pulps by ODS liquid column chromatography

Extract	Weight(g) ^a	Yield(%)
(VI+VII)-1	6.3	21.58
(VI+VII)-2	1.3	4.45
(VI+VII)-3	0.68	2.33
Total	8.28	28.36

^a weight of the fraction VI+VII : 29.2 g



圖二十八、咖啡果肉沖提區分VI+VII經 ODS 液相管柱層析後各沖提區間之抗氧化性

Fig 28. Antioxidative activity of elution fractions VI+VII from acetate extract of coffee pulps by ODS liquid column chromatography.

6. 高效液相層析

(1) 區分(I + II)-2 和(I + II)-3 之高效液相層析

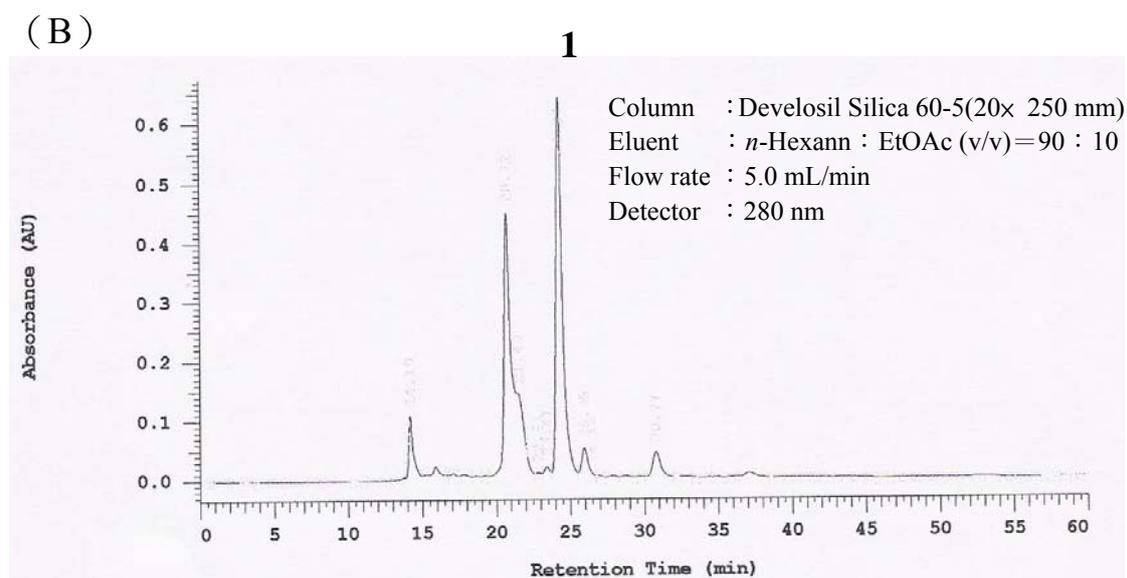
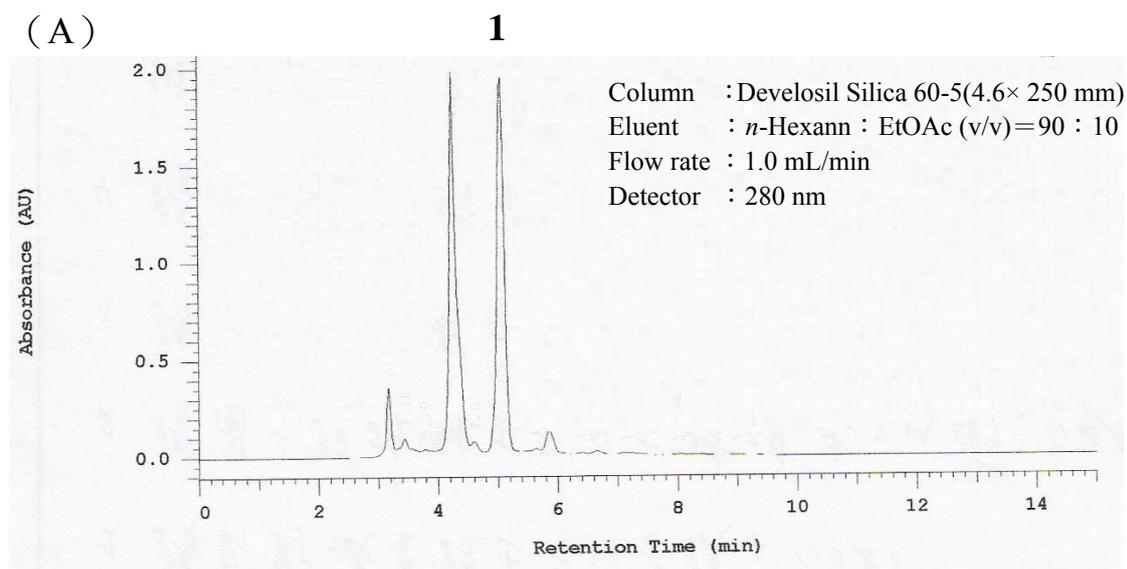
首先以紫外線吸收光譜儀掃描區分(I + II)-2 及區分(I + II)-3，獲得相同最大吸收波長為 280 nm，因此選取波長 280 nm 作為區分(I + II)-2 及區分(I + II)-3 之檢測波長。再將區分(I + II)-2 及區分(I + II)-3 分別濃縮乾後，以適量乙酸乙酯溶解，並經 0.45 μ m 之過濾膜過濾。

區分(I + II)-2 及區分(I + II)-3 分別以分析型高效液相層析儀找尋良好的分離條件皆為正己烷：乙酸乙酯=90：10 (v/v)，分別再以相同條件之製備型高效液相層析儀進行分離，並重複收集層析圖上滯留時間相同之沖提部分，濃縮後分別得到三個純化物質(圖二十九)，其中二個因量太少無法進行結構鑑定分析，所以僅鑑定純化物質 **1** 之結構。

(2) 區分(VI + VII)-2 和區分(VI + VII)-3 之高效液相層析

首先同樣以紫外線吸收光譜儀掃描區分(VI + VII)-2 及區分(VI + VII)-3，獲得相同最大吸收波長為 270 nm，因此選取波長 270 nm 作為區分(VI + VII)-2 及區分(VI + VII)-3 之檢測波長。再將區分(VI + VII)-2 及區分(VI + VII)-3 分別濃縮乾後，以適量甲醇溶解，並經 0.45 μ m 之過濾膜過濾。

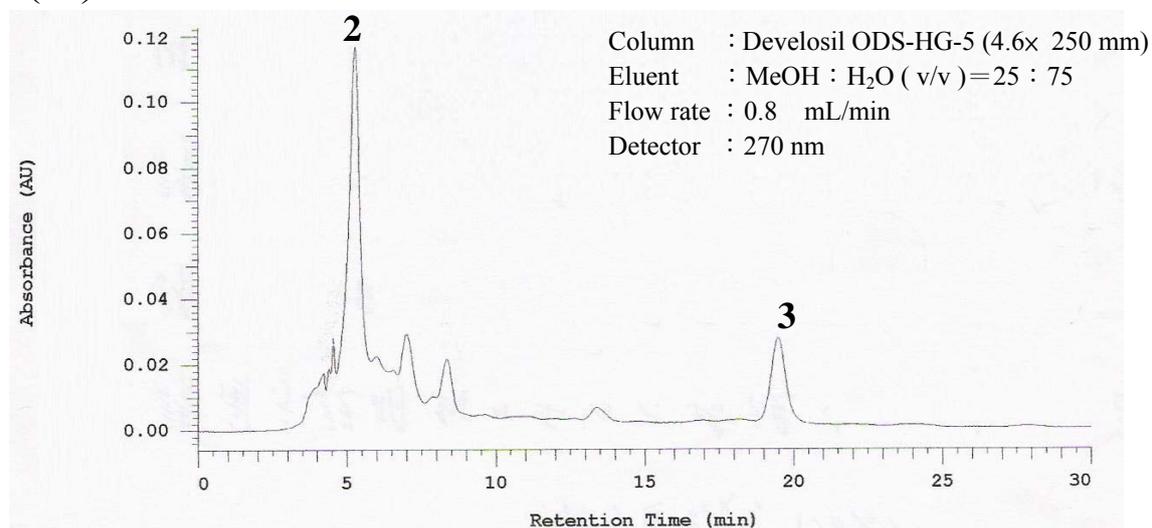
區分(VI + VII)-2 及區分(VI + VII)-3 分別以分析型高效液相層析儀找尋良好的分離條件皆為甲醇：去離子水=25：75 (v/v)，分別再以相同條件之製備型高效液相層析儀進行分離，並重複收集層析圖上滯留時間相同之沖提部分，濃縮後分別得到六個純化物質(圖三十、三十一)，其中三個皆因量太少，亦無法進行結構鑑定分析，因此僅鑑定純化物質 **2**、**3** 及 **4** 之結構。



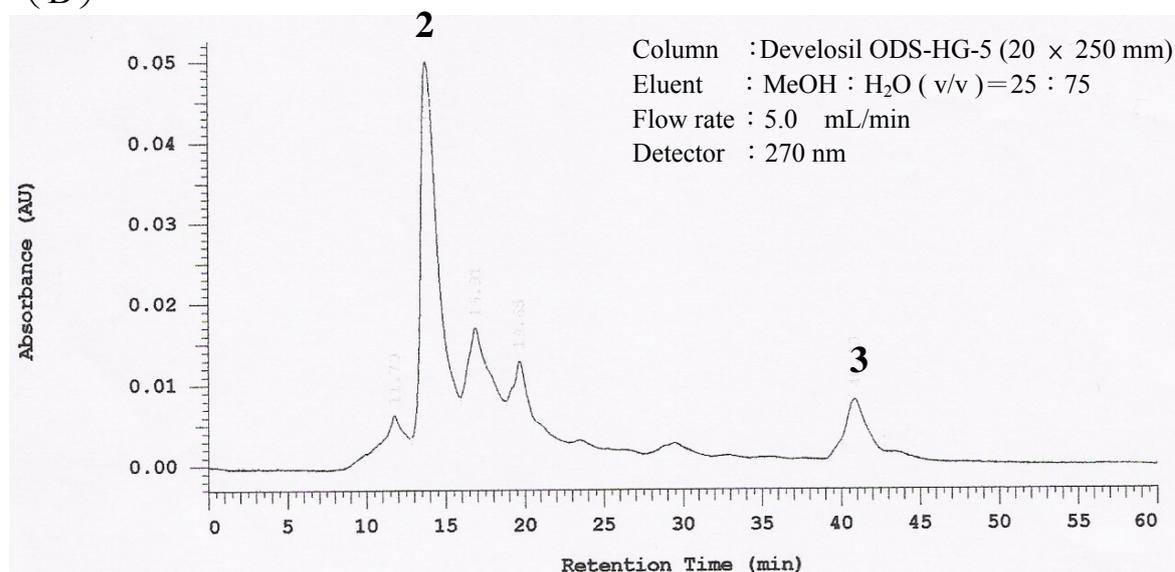
圖二十九、咖啡果肉乙酸乙酯萃取物沖提區分(I + II)-2 之高效液相層析圖 (A)分析型 (B)製備型

Fig 29. HPLC chromatograms of fraction (I + II)-2 separated from ethyl acetate extract of coffee pulps. (A) analytical HPLC chromatogram (B) preparative HPLC chromatogram.

(A)



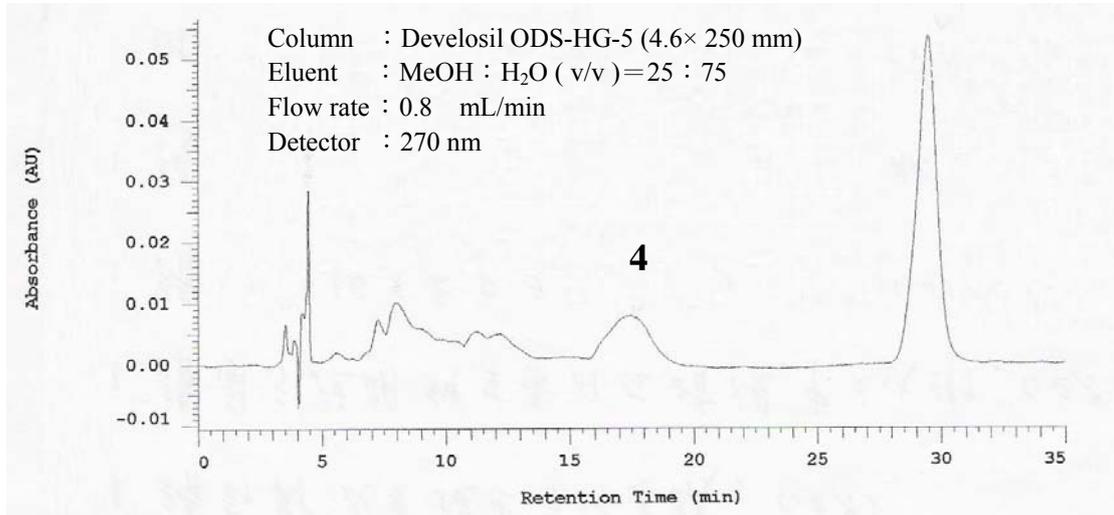
(B)



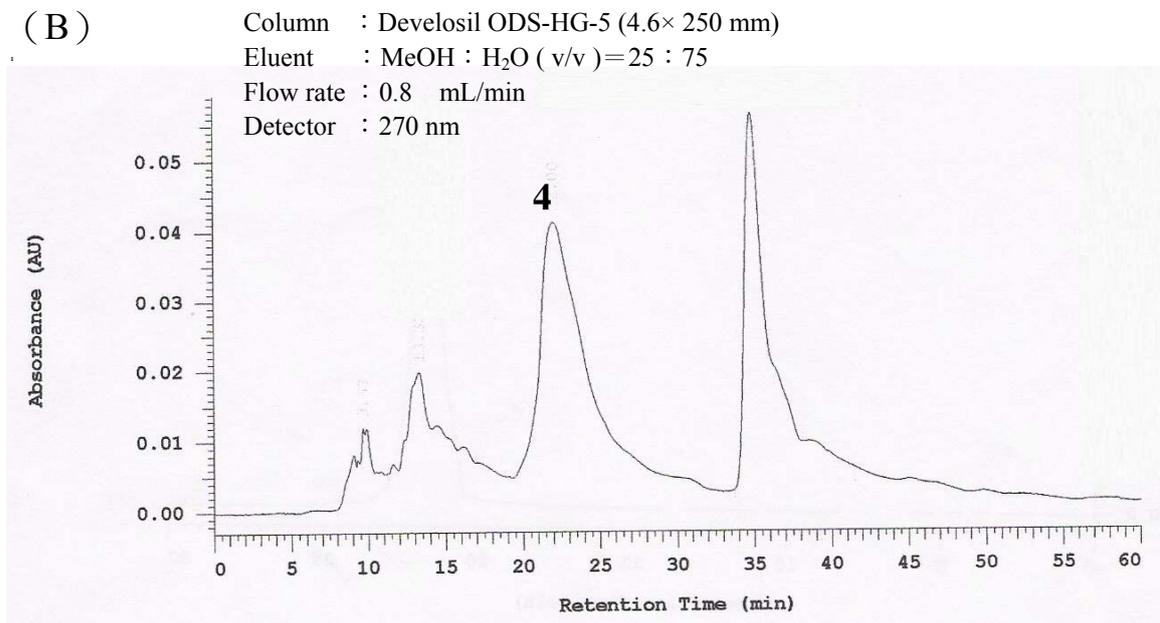
圖三十、咖啡果肉乙酸乙酯萃取物沖提區分(VI+VII)-2 之高效液相層析圖 (A)分析型 (B)製備型

Fig 30. HPLC chromatograms of fraction (VI + VII)-2 separated from ethyl acetate extract of coffee pulps. (A) analytical HPLC chromatogram (B) preparative HPLC chromatogram.

(A)



(B)



圖三十一、咖啡果肉乙酸乙酯萃取物沖提區分(VI + VII)-3 之高效液相層析圖 (A)分析型 (B)製備型

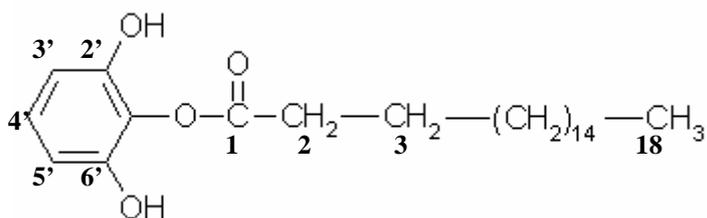
Fig 31. HPLC chromatograms of fraction (VI + VII)-3 separated from ethyl acetate extract of coffee pulps. (A) analytical HPLC chromatogram (B) preparative HPLC chromatogram.

二、咖啡果肉純化物質之結構鑑定

1. 純化物質 **1** 之結構鑑定

純化物質 **1** 為無色油狀物，UV 吸收光譜（圖三十二）顯示 λ_{\max} (CHCl_3) 274.0 nm 為芳香族之 phenyl group B band 吸收帶。 $^1\text{H-NMR}$ 光譜（圖三十三）之 δ 6.99 (3H, m) 為苯環 H-3'、H-4' 及 H-5' 之質子波訊； δ 4.14 (d, $J=6.9\text{ Hz}$)、2.58 (d, $J=6.9\text{ Hz}$) 分別為 H-3、H-2 互為耦合的質子波訊；另外 δ 1.22~1.43 有 28 個質子波訊，推測鍵結一個硬脂酸殘基。再由 EI-MS 質譜圖（圖三十四）顯示分子離子波訊 393 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ，推測純化物質 **1** 為 Galloyl stearate。

Component 1 : Galloyl stearate



UV-Visible λ max nm (MeOH) : 274.0

Formula : C₂₄H₄₀O₄

LC-MS : 393 [M+H]⁺

¹H-NMR (CDCl₃, 300MHz) : δ

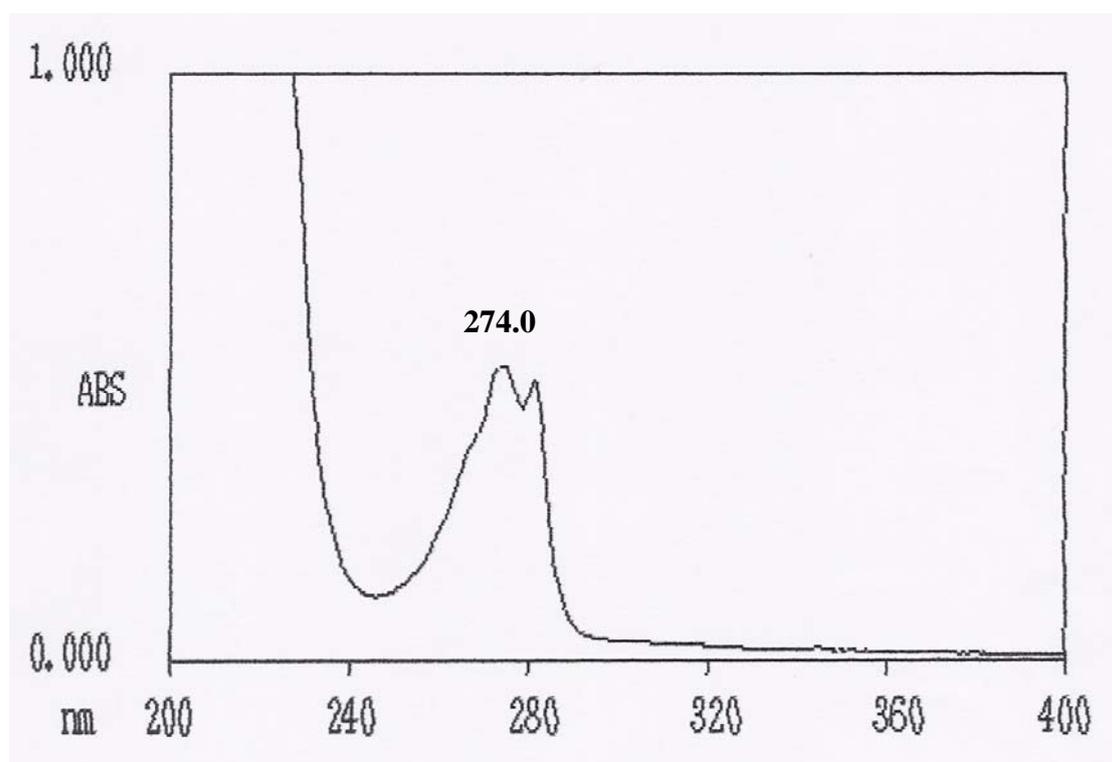
6.99 (3H, m, H-3', H-4', H-5')

4.14 (2H, t, $J = 6.9\text{Hz}$, H-3)

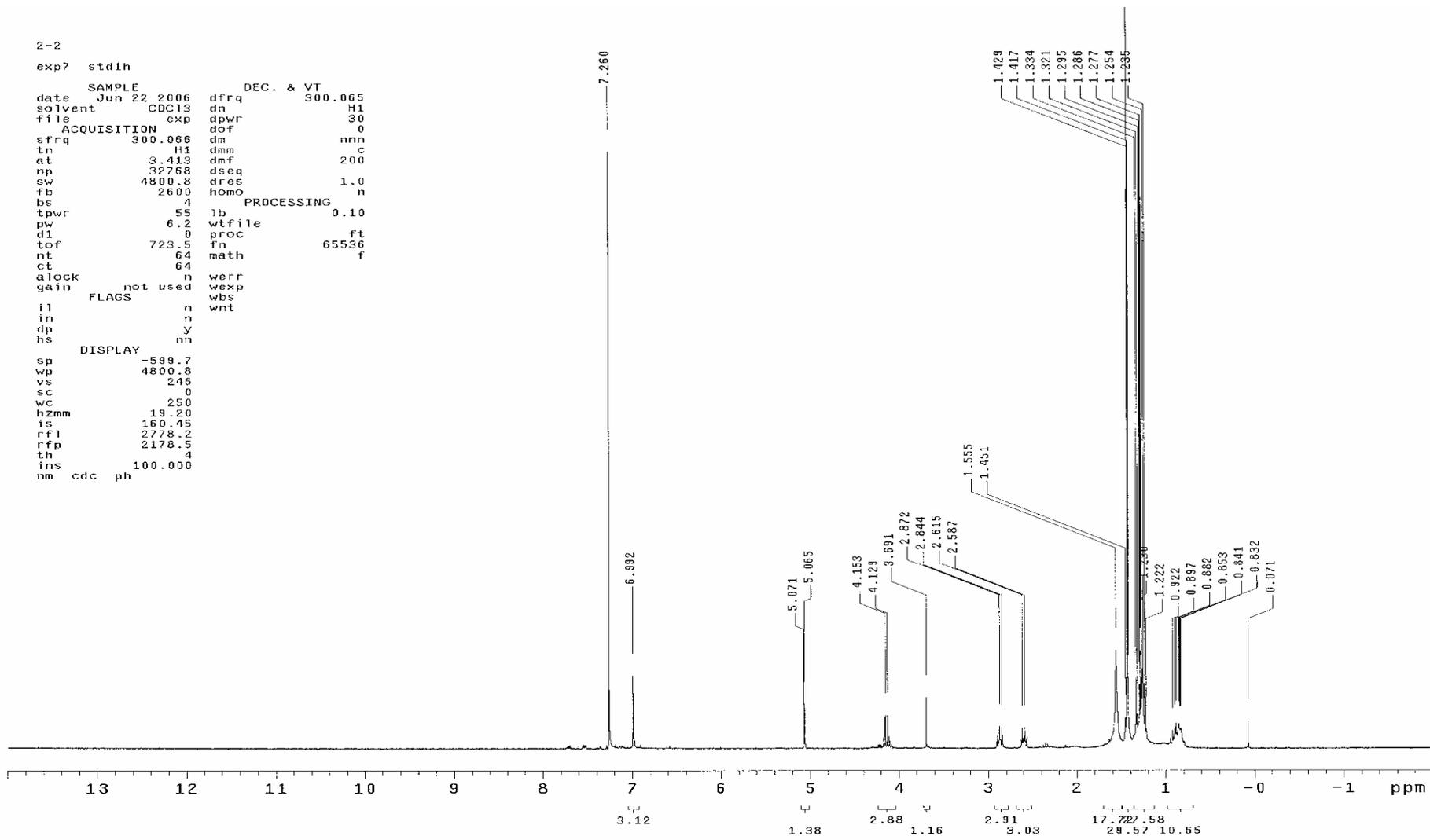
2.28 (2H, t, $J = 6.9\text{Hz}$, H-2)

1.22~1.43 (28H, m, $J = \text{H-4~17}$)

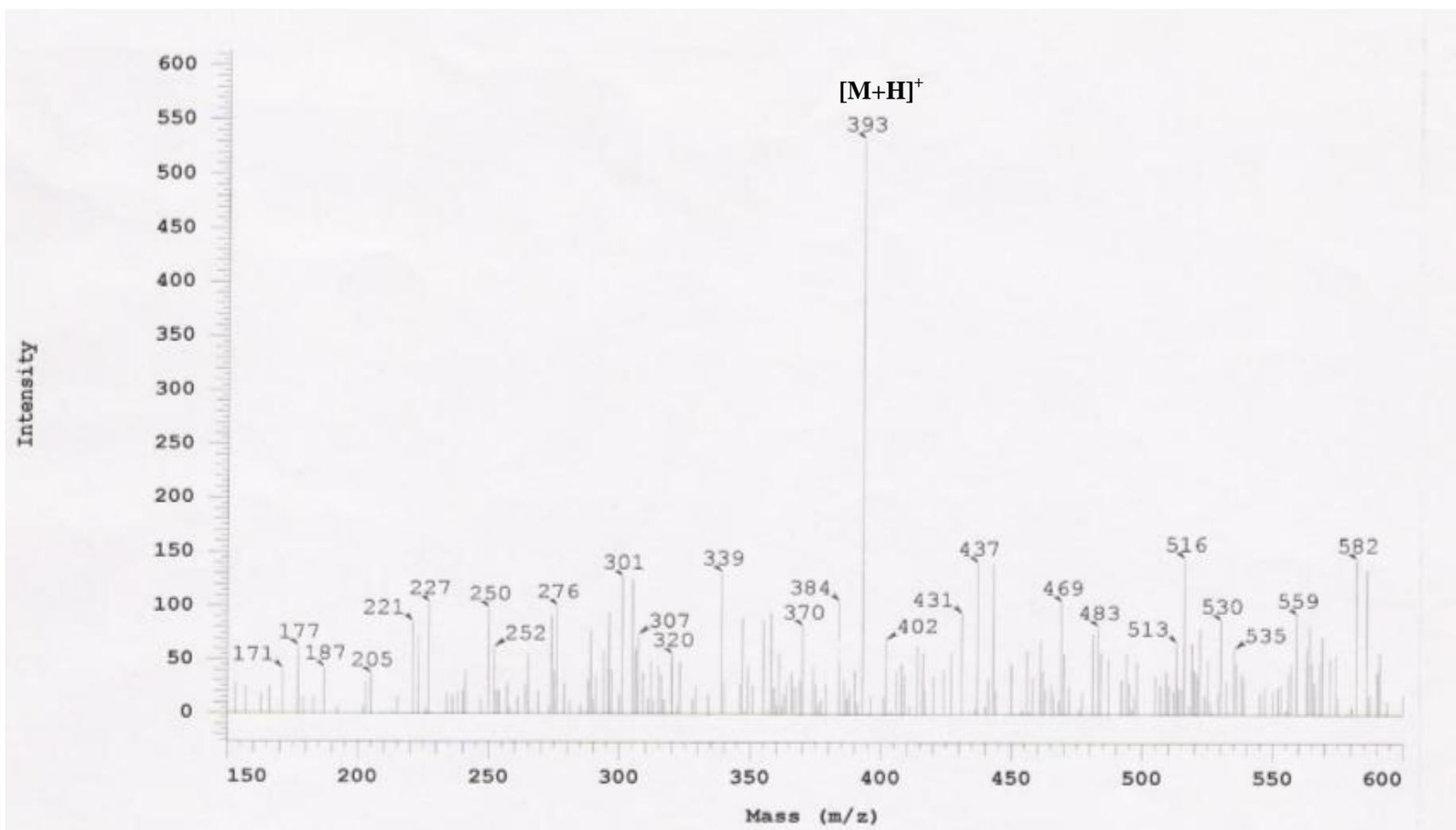
0.88 (3H, t, $J = 6.9\text{Hz}$, H-18)



圖三十二、咖啡果肉純化物質 **1** 之紫外光-可見光光譜圖。
Fig 32. UV-visible spectrum for the isolated component **1** from coffee pulps.



圖三十三、咖啡果肉純化物質 **1** 之 ^1H -核磁共振光譜圖
 Fig 33. ^1H -NMR spectrum for the isolated component **1** from coffee pulps.



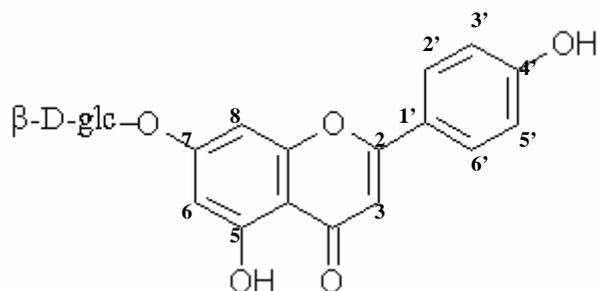
圖三十四、咖啡果肉純化物質 **1** 之質譜圖。

Fig 34. MS spectrum for the isolated component **1** from coffee pulps.

2. 純化物質 2 之結構鑑定

純化物質 2 為黃色粉狀物，UV 光譜 λ_{\max} (MeOH) (圖三十五) 顯示的 flavonyl 結構 266.5 nm 為 A 環吸收帶，323.5, 344.5 (sh) 為 B 環吸收帶，參考已知文獻得知與 apigenin 非常接近 (Harborne *et al*, 1975)。EI-MS 質譜圖 (m/z) (圖三十六) 顯示分子離子波訊 433 $[M+H]^+$ ，推測分子式為 $C_{21}H_{20}O_{10}$ ，亦即配質 (aglycone) apigenin 加上一個六碳糖。 1H -NMR 光譜 (圖三十七) δ 6.92 (2H, d, $J=8.7$ Hz), δ 7.58 (2H, d, $J=8.7$ Hz) 分別為 1,4 二取代 B 環上 phenyl H-3', H-5' 與 phenyl H-2', H-6' 二組對稱的質子波訊， δ 6.25 (1H, d, $J=2.1$ Hz), δ 6.78 (1H, d, $J=2.1$ Hz) 分別為 A 環上 1, 2, 3, 5 四取代的 phenyl H-6, H-8 處於 meta 位置的質子波訊，比對文獻 (Harborne, 1993; Harborne and Mabry, 1982) 鑑定純化物質 2 為 apigetrin (apigenin-7-O- β -D-glucoside)。

Component 2 : Apigenin (Apigenin-7-O- β -D-glucoside)



UV λ_{\max} (MeOH) nm : 266.5, 323.5, 344.5 (sh)

Formula : $C_{21}H_{20}O_{10}$

LC-MS : 433 [M+H]⁺

¹H-NMR (CD₃OD , 300MHz) : δ

7.58 (2H, d, $J = 8.7\text{Hz}$, H-2' , H-6')

6.92 (2H, d, $J = 8.7\text{Hz}$, H-3' , H-5')

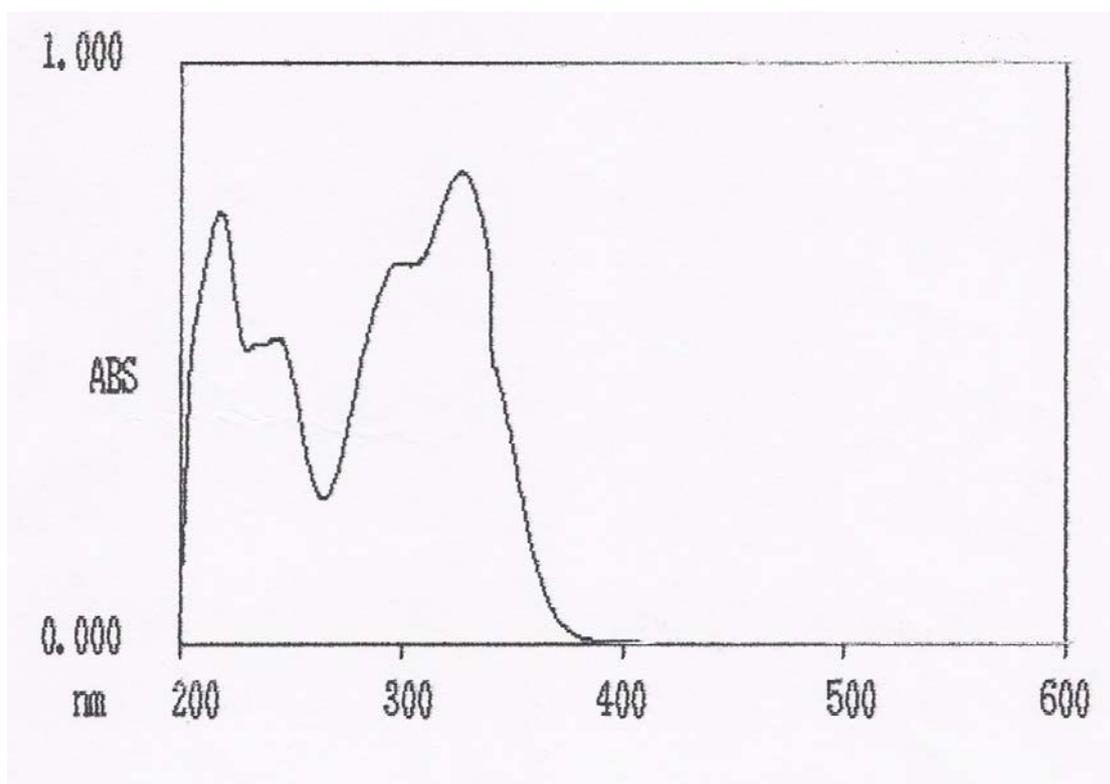
6.87 (1H, d, $J = 2.1\text{Hz}$, H-8)

6.30 (1H, s, $J = \text{H-3}$)

6.25 (1H, d, $J = 2.1\text{Hz}$, H-6)

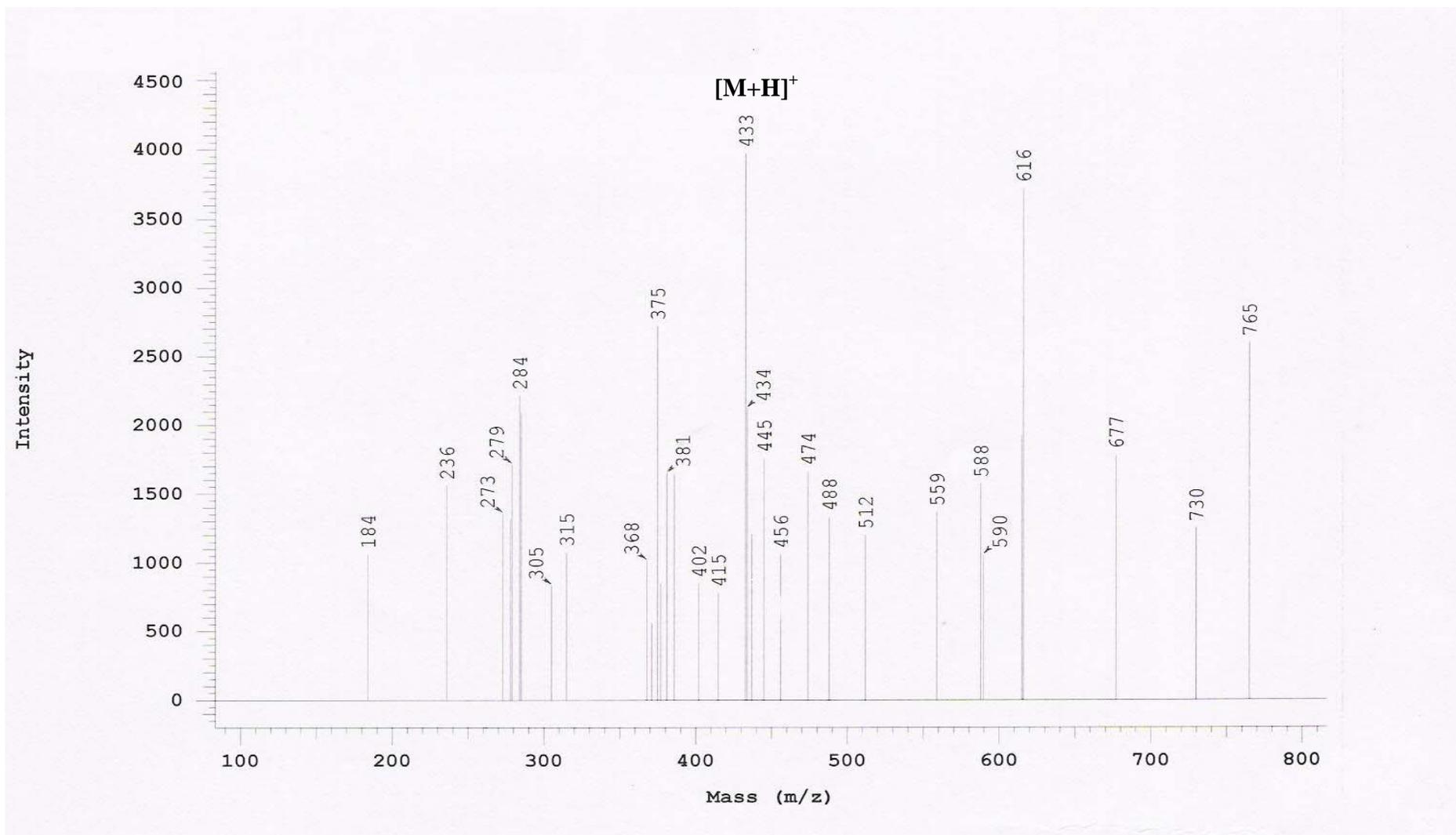
5.15(1H, d, $J=7.2\text{Hz}$, β -form glucosyl H-1'')

3.40~3.69 (5H, m, glucosyl 5 protons)



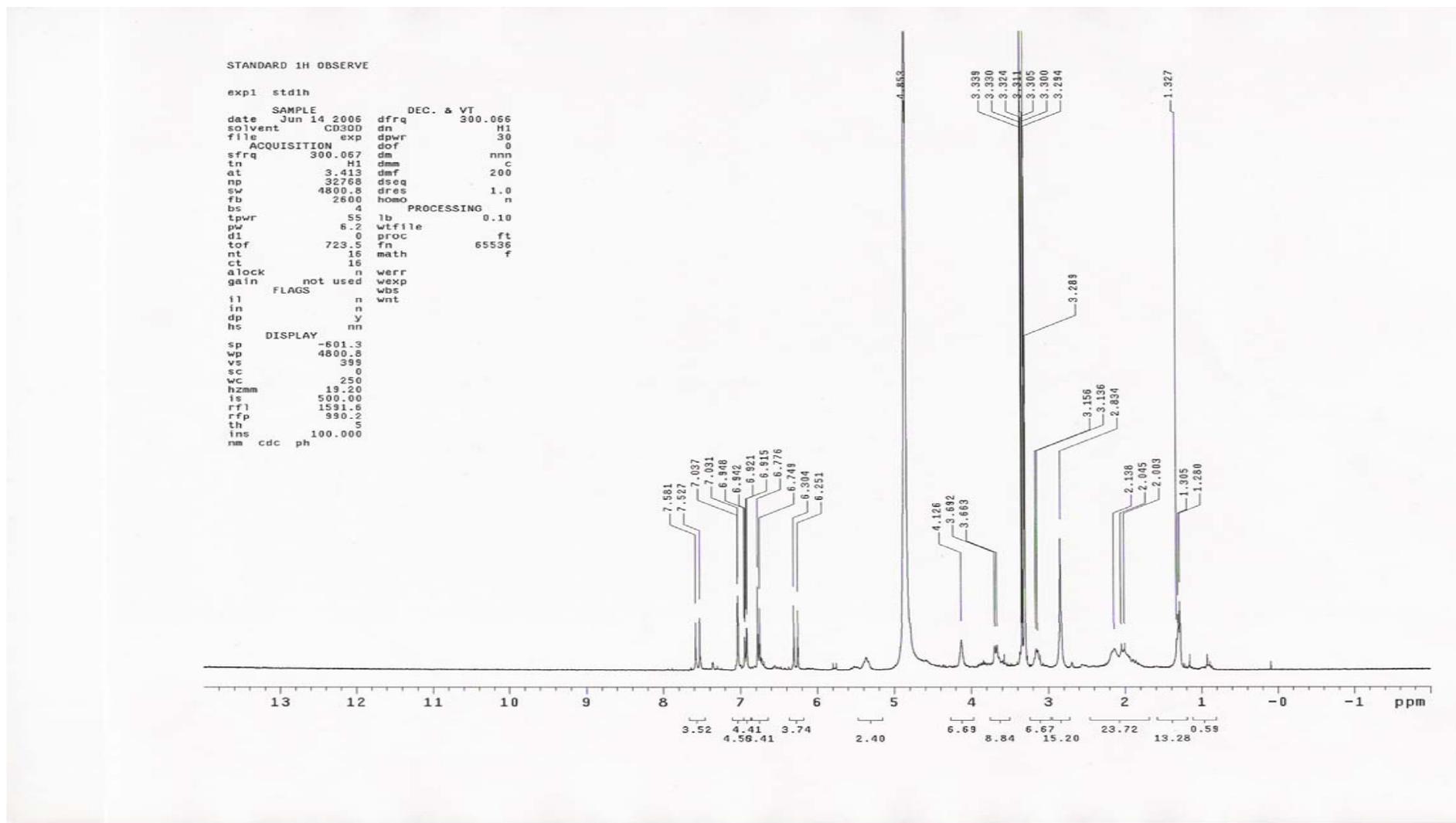
圖三十五、咖啡果肉純化物質 2 之紫外光-可見光光譜圖。

Fig 35. UV-visible spectrum for the isolated component 2 from coffee pulps.



圖三十六、咖啡果肉純化物質 2 之質譜圖。

Fig 36. MS spectrum for the isolated component 2 from coffee pulps.

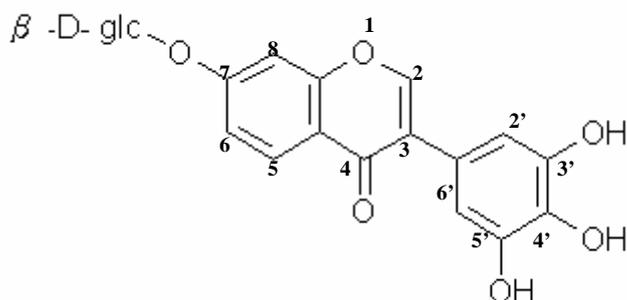


圖三十七、咖啡果肉純化物質 2 之 ^1H -核磁共振光譜圖
 Fig 37. ^1H -NMR spectrum for the isolated component 2 from coffee pulps.

3. 純化物質 **3** 之結構鑑定

純化物質 **3** 為黃褐色結晶狀物，UV 吸光光譜（圖三十八）顯示 λ_{\max} (MeOH) 270.0、322.5 nm 為類黃酮 A 環與 B 環的吸收。EI-MS 質譜圖（圖三十九）顯示分子離子波訊為 448 $[M]^+$ ，推測類黃酮環接上一個單糖。再由 $^1\text{H-NMR}$ 光譜（圖四十）低磁場 δ 7.85 (1H, s) 為典型 isoflavone H-2 的質子波訊， δ 7.27、7.37 及 7.43 為苯環 1, 2, 4 三取代的 ABX 互為偶合的 H-5、H-6 及 H-8 的質子波訊；另外 δ 7.40 為另一苯環上 H-2'、H-6' 的質子波訊； δ 5.04 為 glucosyl 接在類黃酮 7-O-上 H''-1 的質子波訊。綜上所述及與已知文獻比對（Harborne, 1993；Harborne and Mabry, 1982），推測純化物質 **3** 的結構為 Baptigenin-7-O- β -D-glucoside。

Component 3 : Baptignin-7-O- β -D- glucoside



UV λ_{\max} (MeOH) nm : 270.0、322.5 (sh)

Formula : $C_{21}H_{20}O_{11}$

LC-MS : 448 $[M]^+$

1H -NMR (CD₃OD, 300MHz) : δ

7.85 (1H, s, H-2)

7.43 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8)

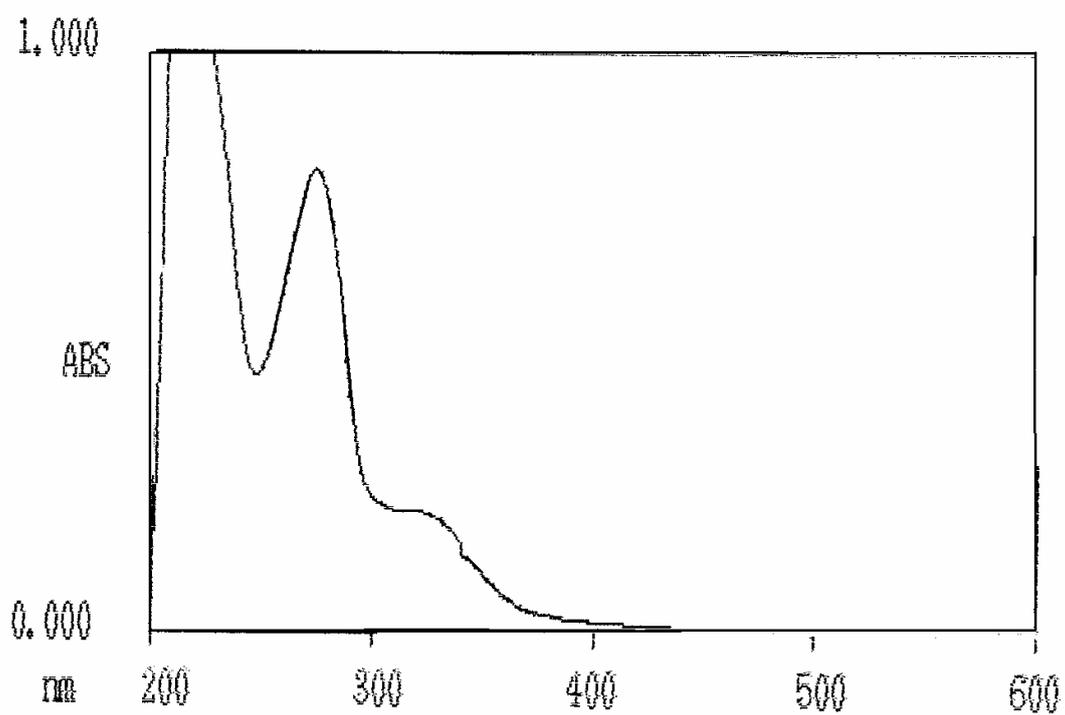
7.40 (2H, s, H-2', H-6')

7.37 (1H, d, d, $J = 1.8, 8.4$ Hz, H-3)

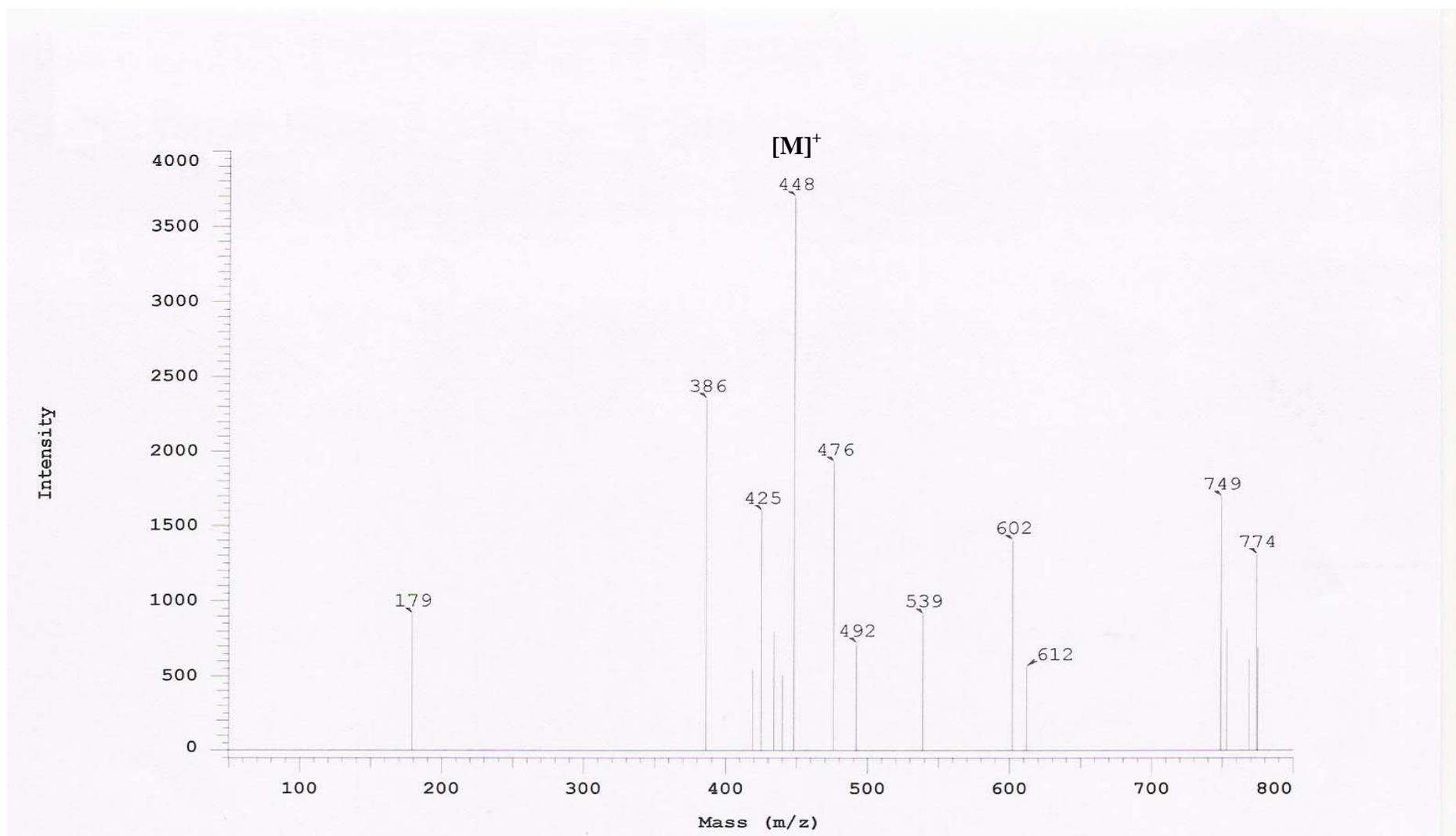
7.27 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5)

5.04 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, glucosyl H-1)

3.30~3.96 (5H, m, glucosyl 5 protons)

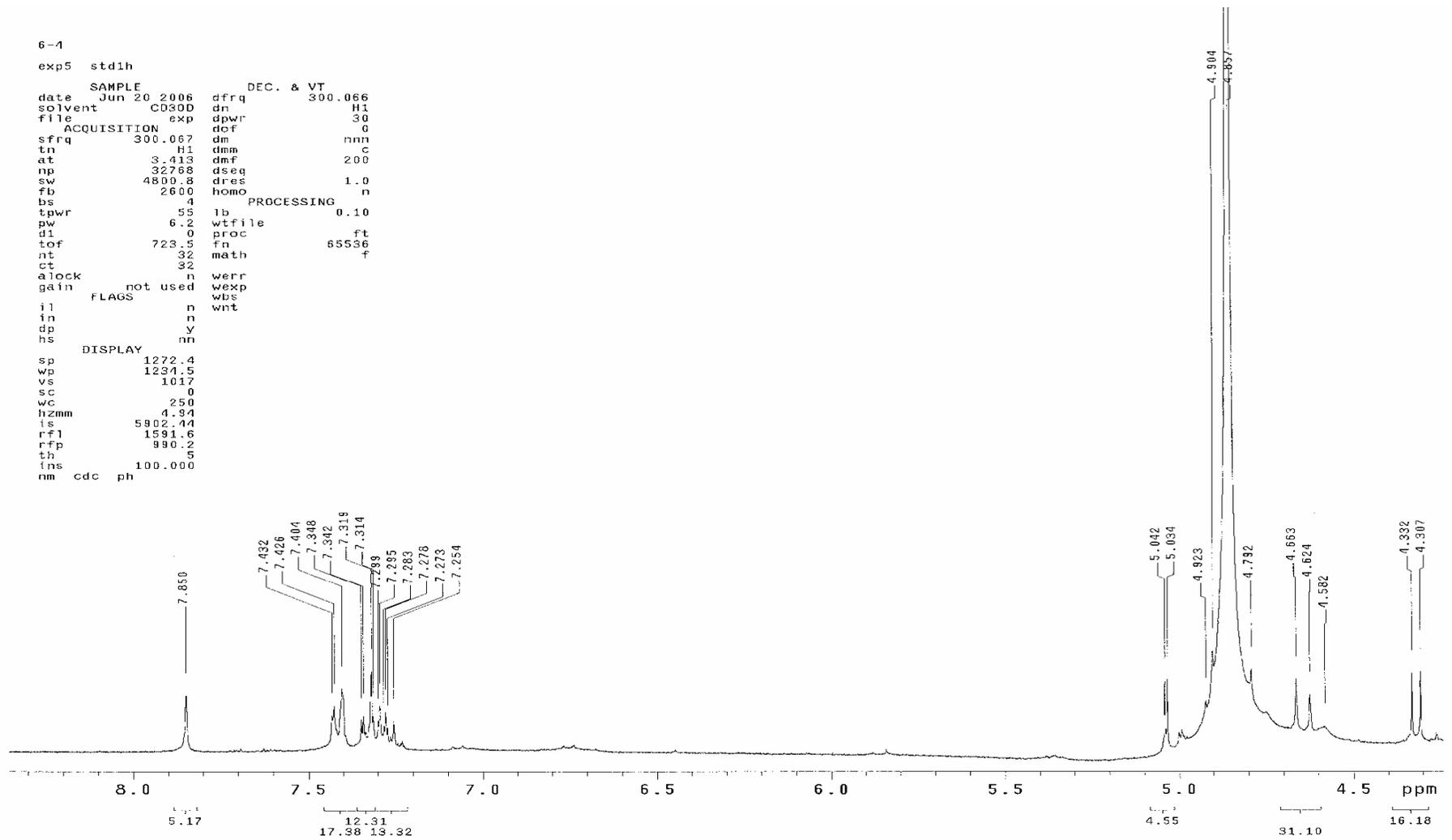


圖三十八、咖啡果肉純化物質 **3** 之紫外光-可見光光譜圖。
Fig 38. UV-visible spectrum for the isolated component **3** from coffee pulps.



圖三十九、咖啡果肉純化物質 **3** 之質譜圖。

Fig 39. MS spectrum for the isolated component **3** from coffee pulps.

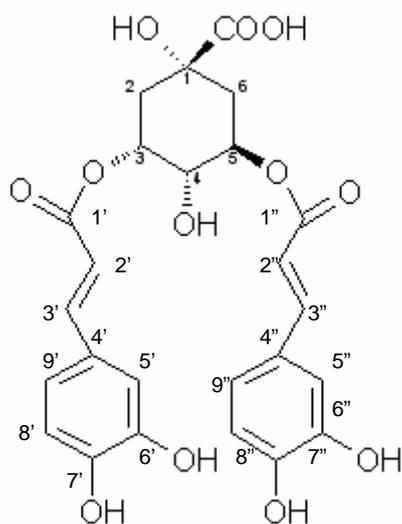


圖四十、咖啡果肉純化物質 **3** 之 ^1H -核磁共振光譜圖
 Fig 40. ^1H -NMR spectrum for the isolated component **3** from coffee pulps.

4. 純化物質 4 之結構鑑定

純化物質 4 為黃色粉狀物，EI-MS 光譜（圖四十一）顯示分子離子波訊 515 $[M-H]^+$ 。UV 吸光光譜（圖四十二） λ_{\max} (MeOH) 為 240.0, 293.0 nm 顯示 caffeic acid 特徵吸收帶。再由 $^1\text{H-NMR}$ 光譜（圖四十三），低磁場處顯現二組 caffeoyl 質子波訊， δ 7.61 (1H, d, $J=15.9$ Hz) 與 δ 6.40 (1H, d, $J=15.9$ Hz) 及 δ 7.59 (1H, d, $J=15.9$ Hz) 與 δ 6.30 (1H, d, $J=15.9$ Hz) 分別為 H-2' 與 H-3' 及 H-2'' 與 H-3'' 互為偶合，且屬 cis 鍵結的質子波訊； δ 7.06、6.96 及 6.78 為二組苯環 1,2,4 取代典型 ABX 質子波訊，分別為 caffeoyl 環上 H-5' (H-5'')、H-9' (H-9'') 及 H-8' (H-8'') 的質子波訊； δ 5.52、5.41 分別為接上 quinoyl 環上 H-5 及 H-3 的質子波訊；另外在較高磁場處 δ 3.91 (1H, dd, $J=9.8, 3.4$ Hz)， δ 2.28 (1H, dd, $J=13.8, 3.0$ Hz) 及 δ 2.12 (3H, m) 則分別為 H-4、H-6_{ax} 及 H-2、H-6_{eq} 之 5 個質子波訊。綜上所述及比對相關文獻，純化物質 4 的結構鑑定為 3,5-Dicaffeoyl quinic acid。

Component 4 : 3,5-Dicaffeoyl quinic acid



UV λ_{\max} (MeOH) nm : 240.0, 293.0, 323.0

Formula : $C_{25}H_{24}O_{12}$

LC-MS : 515 $[M-H]^+$

1H -NMR (CD₃OD, 300MHz) : δ

7.61 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-3')

7.59 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-3'')

7.06 (2H, m, H-5', H-5'')

6.96 (2H, m, H-9', H-9'')

6.78 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-8', H-8'')

6.40 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2')

6.31 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2'')

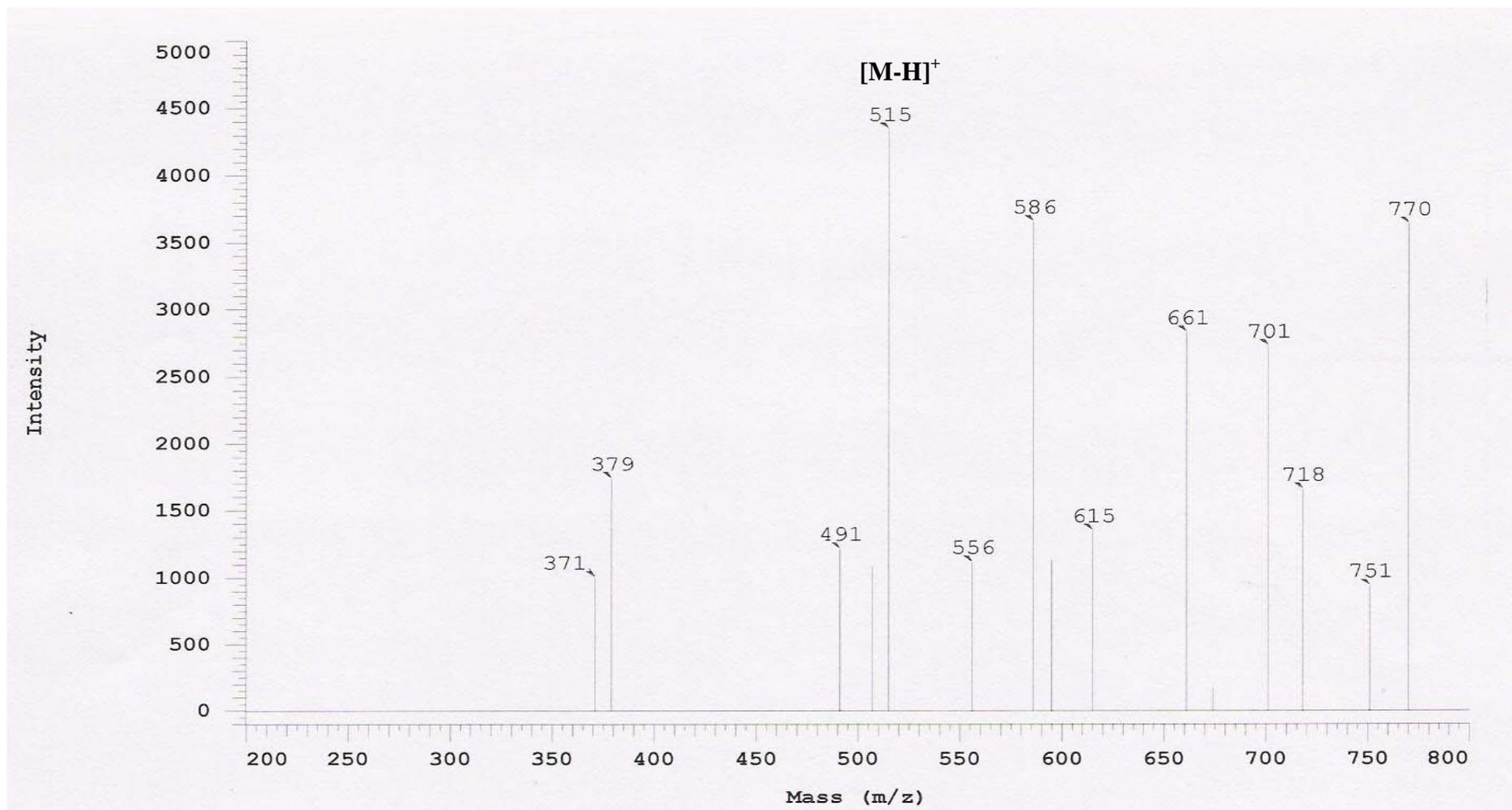
5.52 (1H, m, H-5)

5.41 (1H, brd, $J = 3.0$ Hz, H-3)

3.91 (1H, dd, $J = 9.8, 3.4$ Hz, H-4)

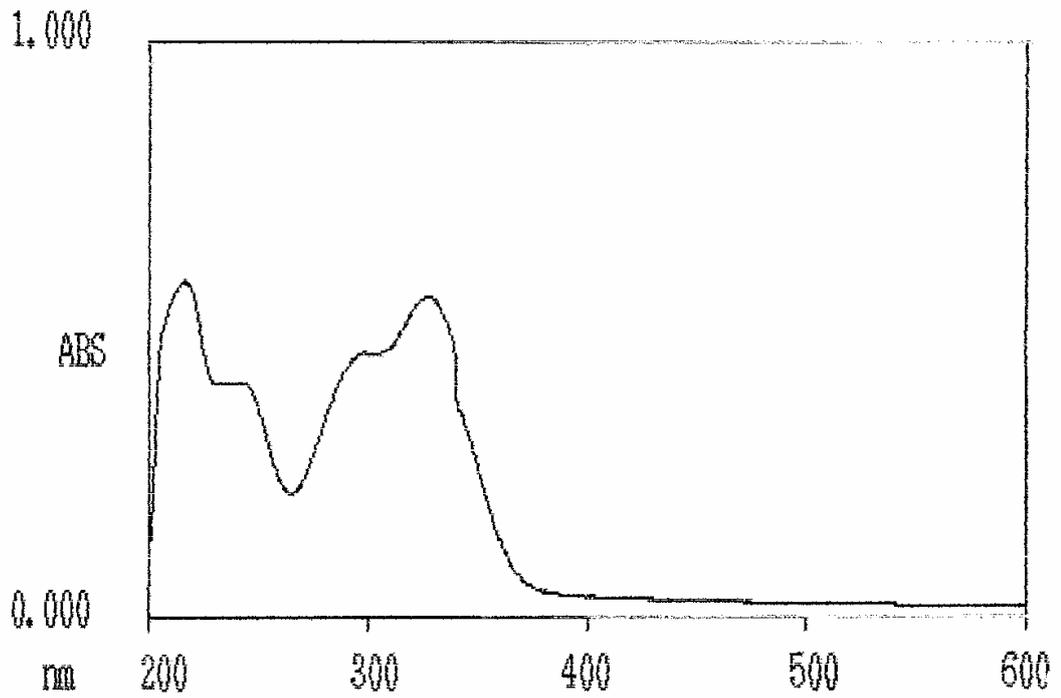
2.28 (1H, dd, $J = 13.8, 3.0$ Hz, H-6_{ax})

2.12 (3H, m, H-2, H-6_{eq})



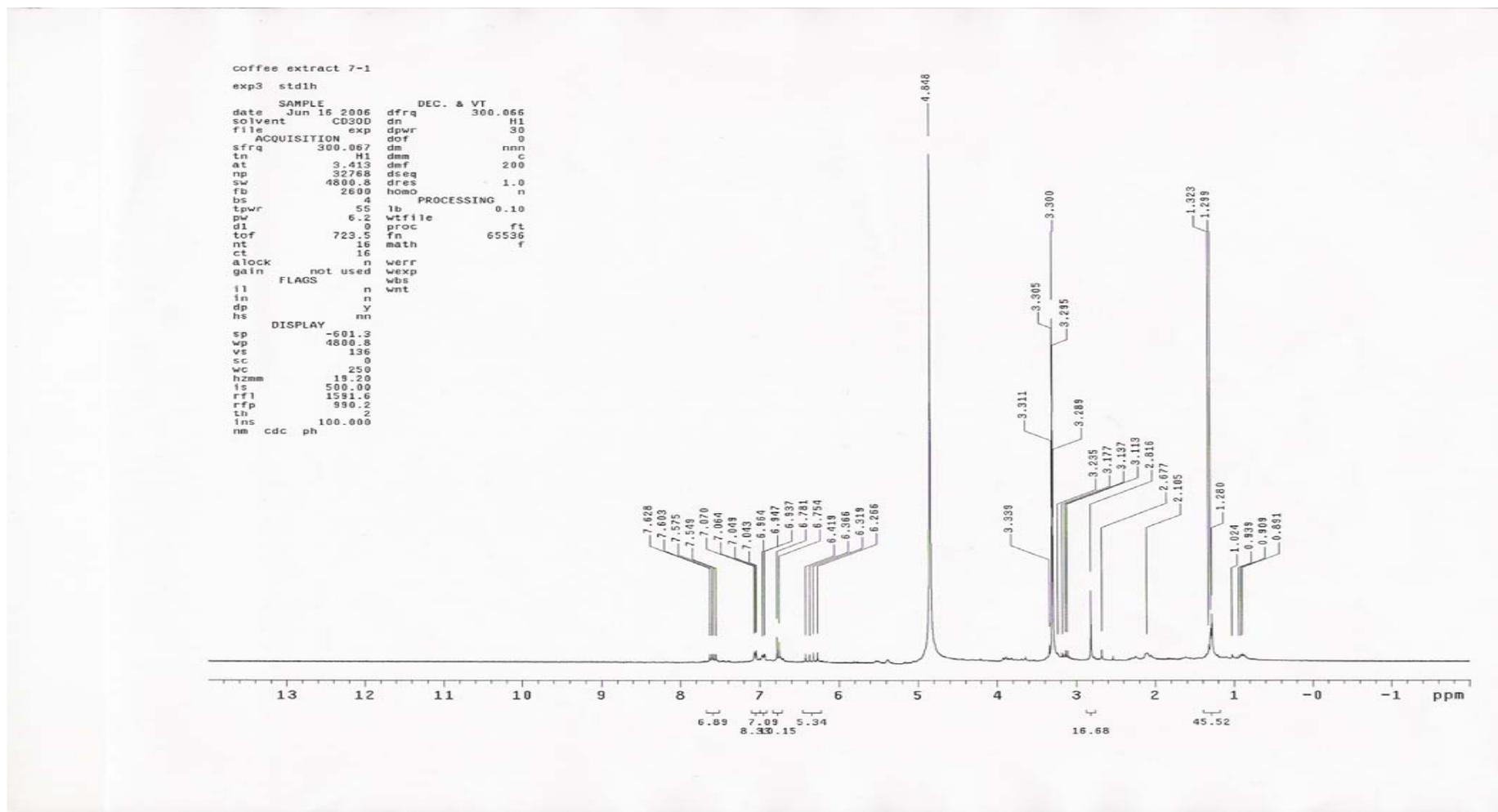
圖四十一、咖啡果肉純化物質 4 之質譜圖。

Fig 41. MS spectrum for the isolated component 4 from coffee pulps.



圖四十二、咖啡果肉純化物質 4 之紫外光-可見光光譜圖。

Fig 42. UV-visible spectrum for the isolated component 4 from coffee pulps.



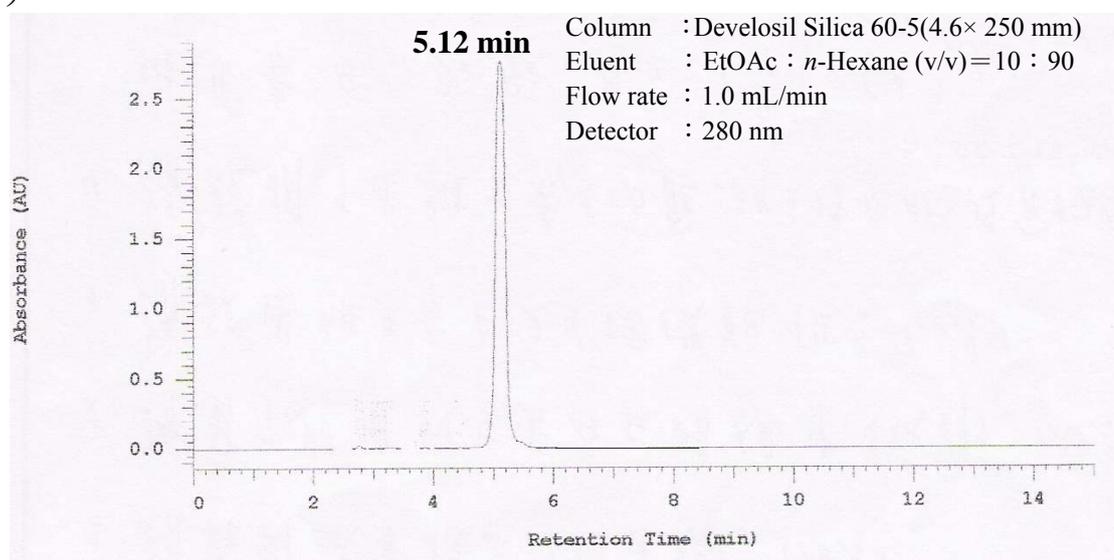
圖四十三、咖啡果肉純化物質 4 之 ^1H -核磁共振光譜圖

Fig 43. ^1H -NMR spectrum for the isolated component 4 from coffee pulps.

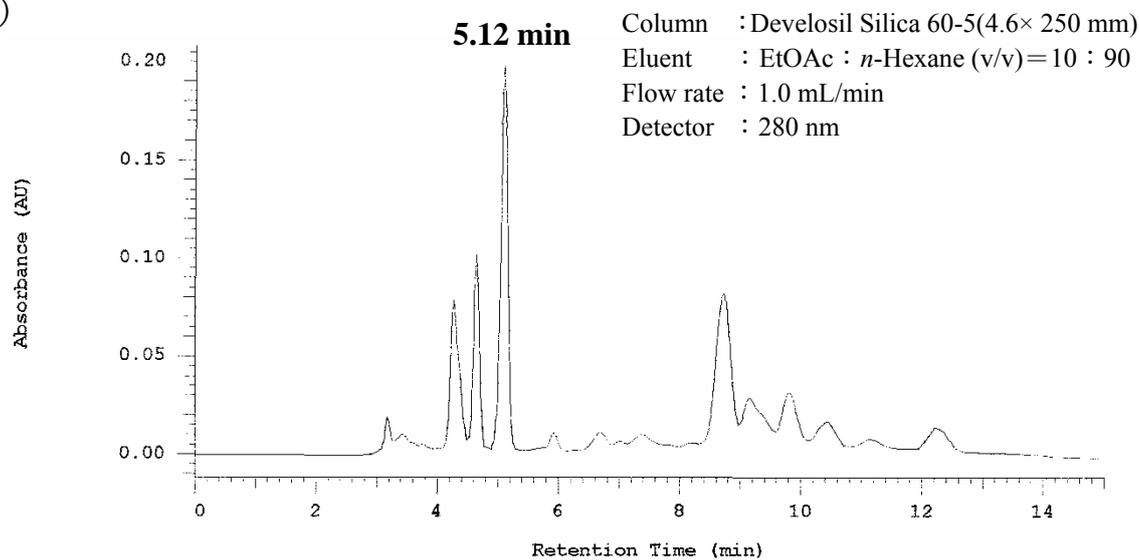
5. α -生育醇之比對分析

一般植物種子中或多或少會含有具保護作用的生育醇 (Su, 1992), 因此本實驗亦進行 α -生育醇的比對分析。在矽膠液相管柱層析區分過程中, 低極性子區分(I + II)-3 曾利用 HPLC 進行分析, 並與標準品 α -生育醇比對結果發現子區分(I + II)-3 可能含有 α -生育醇 (圖四十四) (滯留時間 5.12 min), 同時再利用 LC-MS (圖四十五) 確認子區分(I + II)-3 的確含 α -生育醇。因此推斷 α -生育醇亦為咖啡果中重要的抗氧化成分之一。

(A)

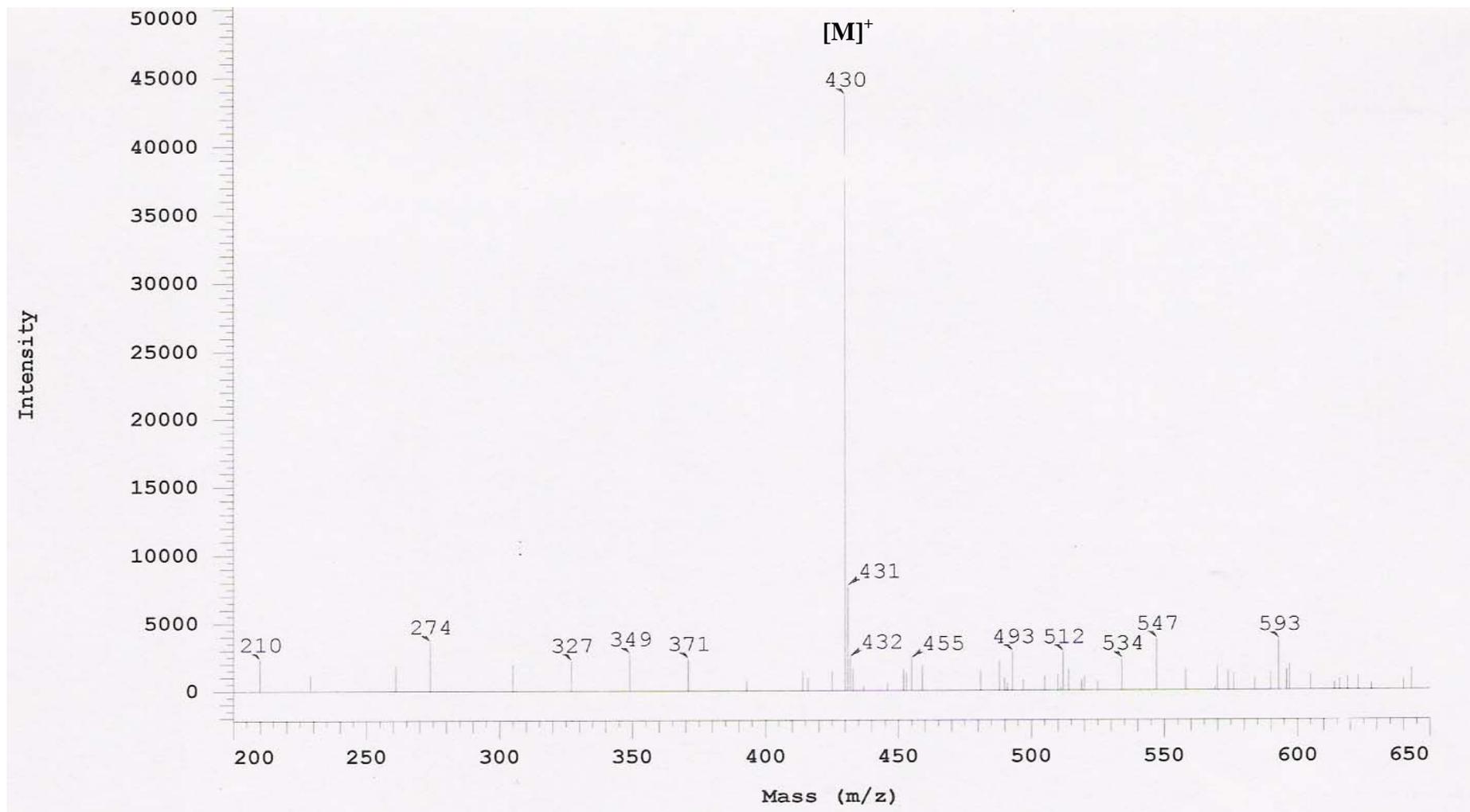


(B)



圖四十四、(A)標準品 (α -生育醇) 與(B)咖啡果肉乙酸乙酯萃取物沖提子區分(I + II)-3 之高效液相層析圖

Fig 44. HPLC chromatograms of (A) standard (α -tocopherol) and (B) the sub-fraction (I + II)-3 separated from ethyl acetate extract of coffee pulps.



圖四十五、咖啡果肉乙酸乙酯萃取物沖提子區分(I + II)-3-1 之質譜圖。

Fig 45. MS spectrum of the sub-fraction (I + II)-3-1 separated from ethyl acetate extract of coffee pulps.

三、純化物質之總抗氧化力測定

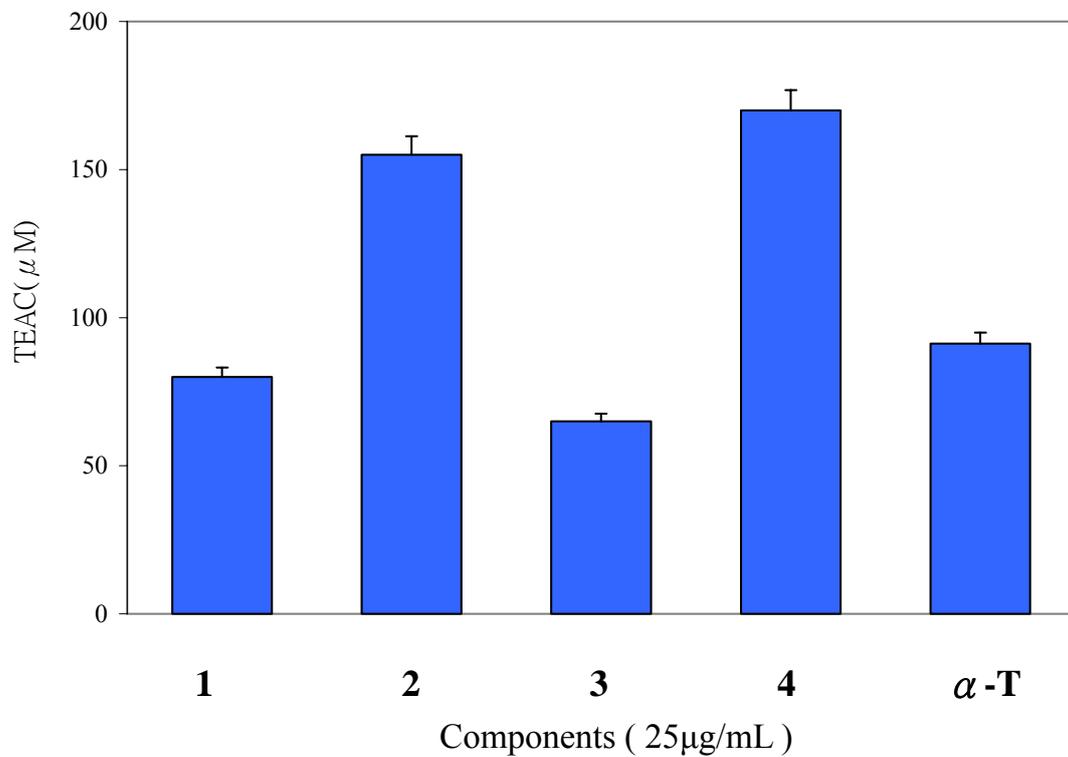
經由 HPLC 分離、純化後，再藉由各種光譜分析法鑑定出 4 種純化物質分別為 galloyl sterate (1)、Apigetrin (Apigenin-7-O- β -D-glucopyranoside) (2)、Baptignin-7-O-glucoside (3)、Ferulic acid 與 Caffeic acid 混合物 (4)，再以 TEAC 法比較其抗氧化能力。TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) 總抗氧化力之測定方法是以 peroxidase/ ABTS/ H₂O₂ 系統誘導 ABTS 產生 ABTS^{•+} 自由基，此為一非常穩定之藍綠色物質，於 734 nm 下有吸收波峰，加入樣品後，若藍綠色脫色程度愈明顯，表示總抗氧化力越好 (Re *et al*, 1999)，並以 Trolox 做標準曲線，計算樣品清除 ABTS^{•+} 自由基的能力相當於多少 μ M 的 Trolox 清除 ABTS^{•+} 自由基之能力，即為樣品的 TEAC 值。

圖四十六為各純化物質總抗氧化力之表現，並以 α -生育醇作為正對照組。TEAC 值愈高表示抗氧化能力愈強，當樣品濃度 25 μ g/mL 時，純化物質 2、4 的抗氧化能力皆優於 α -生育醇 (91.3 μ M)，其中純化物質 4 之抗氧化能力為 170.0 μ M 最佳，其次是純化物質 2 為 155.0 μ M。

由此結果發現，極性較高的化合物在此實驗系統具有較佳的抗氧化能力，因為 ABTS 為水溶性自由基，相較於純化物質 1，純化物質 2 與 4 於此系統對 ABTS 自由基具有較佳的供氫能力。純化物質 4 為 3,5-Dicaffeoyl quinic acid，根據研究指出，咖啡豆中亦含有大量 Caffeoyl quinic acids 且顯示出優於 α -生育醇的自由基清除能力及抑制 LDL 氧化的能力 (Clifford, 1985; Azuma *et al*, 1999; Hung *et al*, 2006)。因此可證明純化物質 4 具有強抗氧化能力。此外，純化物質 2 與 3 分別為含一糖基之黃酮與異黃酮，亦有研究指出，黃酮之抗氧化性優於異黃酮 (Cook and Samman, 1996)，由此可知，純化物質 2 抗氧化能力強於純化物質 3。

就本研究而言，自咖啡果肉乙酸乙酯萃取物中分離純化出之酚類化合物，由文獻報告已知具有強弱不等的抗氧化能力，咖啡果肉乙

酸乙酯萃取物強抗氧化性之展現，可推測為這些酚型化合物發揮綜合性或相乘性（synergism）抗氧化作用所致。



圖四十六、利用 TEAC 法檢測咖啡果肉分離出的純化物質之總抗氧化力

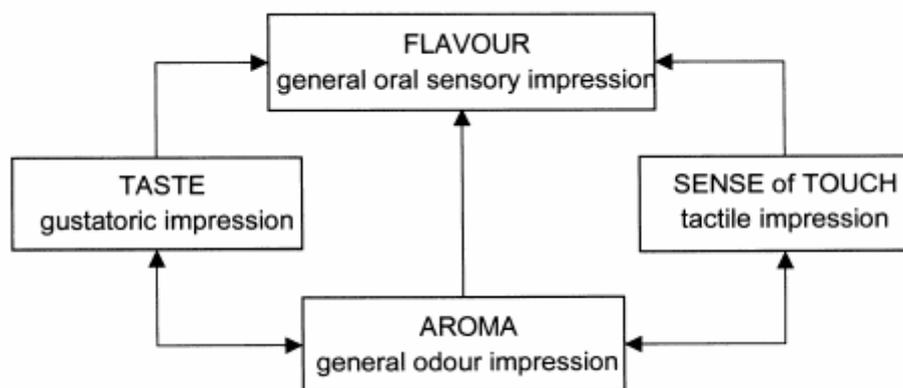
Fig 46. The antioxidative activity of the pure components isolated from coffee pulps by Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) method.

第三章、咖啡果肉揮發性成分之研究

第一節、文獻整理

一、揮發性成分

食品風味(flavor)一般指的是食品在咀嚼時，口腔內所感覺出的味道和氣味；味覺(taste)為由非揮發性物質刺激味蕾所產生的感覺；香氣(aroma)為由揮發性物質刺激嗅覺神經所產生的感覺；觸覺(sense of touch)則為咀嚼時口腔對食品的直接刺激的感覺(圖四十七)。這些感覺受冷、熱、痛及觸覺等其他感覺所影響，所以食品風味是綜合且複雜的感覺(Thomson, 1986)。風味成分(flavor component)是指提供物質香味的複雜化合物，例如植物體的主要香氣成分-有機酸類、醛類、酮類、醇類、酯類等。動物類的香氣成分，獸肉為脂肪酸類，魚肉為胺類等。此類化合物的化學官能基及構造式差異皆很大，沸點的範圍也都很廣 (Schreier *et al*, 1985)。



圖四十七、風味、香氣、味覺及觸覺之定義與相互關係。

Fig 47. Definitions and interactions between flavour, aroma, taste and sense of touch. (Stephan *et al*, 2000)

影響揮發性成分萃取的因子，簡述如下：

1. 樣品前處理的方式

磨碎、乾燥及儲藏的過程中均會對揮發性成分造成破壞或喪失等影響。有研究報告指出在低溫下磨碎樣品，其低分子量、高揮發性成分會較室溫下磨碎所造成喪失的情形少(Pesek, 1985)。Pruthi (1990)亦指出低溫下具有樣品易粉碎、氧化情形減少、揮發性成分損失減少、磨碎速率增加、微生物含量降低、因產率提高而降低成本等優點。

2. 溶劑的選擇

不同溶劑所萃取的揮發性成分不儘相同 (Cu, 1989)。

3. 萃取方法

1992 年 Reverchon 等提出以水蒸氣蒸餾及超臨界萃取兩種方法萃取迷迭香揮發性成分時，萜烯類化合物以水蒸氣蒸餾萃取量較多，而芳香族 (aromatic) 化合物則反之。Eiserle 等 (1972) 則指出以溶劑直接萃取時，除揮發性成分，亦會萃取出一些非揮發性物質。

風味物質 (flavor substance) 可分成三類：

- (1) 天然香味物質 (nature flavoring substance)，可直接以物理方法從天然原料分離出來，可分為植物性和動物性香料。植物性香料為由植物的果實、種子、根、莖、葉及花等原料萃取出之精油及香氣成分；動物性香料為自動物材料得到之香料，例如麝香、龍涎香等。
- (2) 天然鑑定出風味物質 (natural-identical flavoring substance)，為利用化學方法從天然芳香物質分離純化出，或以有機化學合成法製成的香味物質，此物質與天然成分之化學結構相同，且具有安全性，例如香草精 (vanillin)。
- (3) 人造香味物質 (artificial flavoring substance) 由有機化學合成之香味物質，不存在於天然中，但具有高安全性，例如乙基香草精 (ethyl-vanillin) (IOFI, 1976)。

食品中香氣的特性，歸納如下（喬，1986）：

- (1) 成分複雜。以咖啡為例，目前已知的香氣成分已超過 700 種。
- (2) 香氣成分濃度偏低，大部分含量在數 ppm 至 100 ppm 之間，亦有低於 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ ppb 者。
- (3) 各成分之間的濃度含量差異頗大。
- (4) 極性分佈及沸點範圍相當廣。
- (5) 不同成分間氣味潛能 (odor potencies) 具有差異性。
- (6) 各香氣成分的化學性質互不相同，且不穩定，易受光線、溫度、pH、酵素等影響而改變。
- (7) 食品中含大量揮發性成分者，亦有如水般無香性特徵者。
- (8) 含量之分佈與官能基具有相關性。

二、揮發性成分的種類及其感官特性

物質具有香氣之條件有二：首先其必須為揮發性。其次，香氣物質的分子中必須含有特定的原子團 (atomic group)，稱之為發香團 (osmophore group) 如表十二所示，與食品氣味形成有關之化合物簡述如下：

1. 脂肪酸化合物 (aliphatic acids)

低分子量之脂肪，如蟻酸 (formic acid)、醋酸 (acetic acid)、丙酸 (propionic acid) 等，多具有刺鼻之酸味或不愉快的耗味 (rancidy odor) 然而此等低分子量的脂肪酸之酯類化合物卻呈現水果般的香氣，例如正丁酸的乙酯衍生物具有似鳳梨的獨特香味；乙酸衍生物則具有蘋果般的香味。

2. 醇類 (alcohols)

低分子量的醇類具有輕爽 (spirit-like) 之香氣，而隨著分子量的增加氣味漸減至無氣味。庚醇 (hepty alcohol) 有葡萄香氣、辛醇 (octyl alcohol) 及壬醇 (nonyl alcohol) 有薔薇花香氣。另外具有雙鍵的醇類，其氣味與上述醇類不同，如 β -己烯醇 (β -hexenol) 有強烈青草臭。另外植物精油中的香氣成分亦具有雙鍵之醇類，如沉香醇 (linalool)。而多

元醇一般無氣味。

3. 酮類(ketones)

一般而言，酮類有良好的氣味，如丙酮、丁酮、二丙酮等都有讓人愉快的香氣。芳香族酮類的氣味很香，如苯乙酮(benzophenone)為乳酪之重要香氣成分，雙酮類(diketones)也有良好的氣味，如雙乙醯(diacetyl)具有新鮮奶油中甜的香氣，另外 α ， β -紫蘿蘭酮(α ， β -ionone)是很多水果及食品的香氣成分。

4. 酯類(esters)

酯類由醇類與酸類結合，通常具有水果般的芳香，一般而言醇基部分的分子量增加，會降低其香氣。乙酸異戊酯(isoamyl acetate)、乙酸酯(amy acetate)及丁酸戊酯(amy butyrate)具有類似香蕉氣味。另外由有機酸形成酯類，氣味較不同，如柳酸甲酯(methyl salicylate)為冬青樹油的主要香氣成分，鄰胺苯甲酸甲酯(methyl anthranilate)存在於葡萄、柑桔精油中，具葡萄香氣，苯甲酸甲酯(methyl benzoate)則具有薄荷香氣。

5. 醛類(aldehydes)

一般有機物中以醛類之沸點最低，對於氣味貢獻極重要。飽和碳鏈醛(fatty aldehyde)中，碳數小者香氣較辛辣刺鼻不被接受，但當碳數增加至 C_{10} 、 C_{12} 、 C_{14} 時，則變成令人愉悅的花香。不飽和醛類(unsaturated aldehyde)在植物精油的香氣化合物中很重要，如檸檬醛(citral)、香茅醛(citronellal)有似檸檬的香氣。

6. 香族化合物(aromatic compounds)

苯環上具有醛基或醇基取代的環狀化合物在食品香料中扮演極重要的角色。如苯甲醛(benzaldehyde)、甲基苯甲醛(methyl benzaldehyde)都有杏仁的香氣。桂皮醛(cinnamic aldehyde)為肉桂皮精油中主要香氣化合物。

7. 萜烯類(terpenes)

一些單不飽和烯化合物如(citronellol)及雙不飽和萜烯化合物(如順式的 nerol，反式 geraniol)為重要香氣化合物，常存在於一些檸檬、

柑桔類水果精油中。

8.含硫化合物(sulfur compounds)

含硫化合物通常為香料的重要香氣化合物，例如韭菜、洋蔥、蒜的香辛氣味成分主要為硫化丙烯化合物(allyl sulfide)，芥子油類(allyl mustard oil)的主要香辛氣味成分為硫氰酸烯丙酯(allyl isothiocyanate)。

9.含氮化合物(nitrogen compounds)

此類化合物中與食品有關者主要為胺類(amines)，如甲胺(methyl amines)、二甲胺(dimethyl amines)等，均係蛋白質腐敗後之臭味，甚至有毒。而在發酵食品中如醬油、醃菜、臭豆腐中須有微量胺類存存，才可構成特殊風味。

10.內酯(lactones)

一般內酯有所謂的 α 、 β 、 γ 、 δ 四種，主要是依據形成內酯中碳數不同而劃分。例如中 γ -lactones 是由 γ -hydroxy 經硫酸作用脫水時產生的五環內酯，但在鹼性條件下此環不安定會被分解。另 γ -lactones 為乳酪、奶油及牛乳製品的重要香氣化合物。

表十二、主要的發香基團

Table 12. The major osmophoric groups

發香物質	發香基團
羥基(hydroxyl group)	-OH
醛基(aldehyde group)	-CHO
羰基(carbonyl group)	-CO
醚基(ether group)	-ROR'
酯基(ester group)	-COOR
羧基(carboxyl group)	-COOH
內酯(lactone)	-RCOO └──┘
苯基(phenyl group)	-C ₆ H ₅
硝基(nitro group)	-NO ₂
亞硝酸基(nitrite group)	-ONO-
醯胺基(amide group)	-CONH ₂
異硫氰基(isothiocyanate group)	-NCS

三、揮發性成分之萃取、分離及鑑定

揮發性成分之萃取方法的選擇是依香氣物質的特性而定，以下為目前較常使用的幾種方法(喬，1986；孔，1991；林，1997)：

1.直接萃取法(direct extraction)

(1)液/液萃取 (liquid-liquid extraction)

傳統是以分液漏斗萃取，在萃取時須充分振動混合溶劑，相當耗費人力；另有一法是利用不同溶劑間之溶解性及分配性不同，將香氣分離出來。其將溶劑放置圓底燒瓶中加熱蒸發，再經冷凝管冷卻，並滴回萃取瓶，溶劑滴入萃取瓶中的樣品後，將樣品中揮發性成分溶至溶劑中，溶劑再經由迴流管迴流至圓底燒瓶內，經由不斷的循環迴流，揮發性成分會逐漸萃取至溶劑內，達到完全的萃取效果(圖四十八)。此種方法的優點為在低溫下以少量溶劑萃取即可達到良好的萃取率，適合對熱敏感的香味成分，且節省人力。缺點為在同時萃取出親脂性物質時，例如油脂、臘質及色素等，需再一次將這些物質分離。

(2)固/液萃取法—索式萃取法 (solid-liquid, Soxhlet extraction)

將固態樣品放入圓筒濾紙內，藉蒸發上來之溶劑經冷卻後，滴到圓筒濾紙內萃取樣品中之香味物質，溶劑最後會迴流至溶劑瓶中，經過不斷重覆，以一定量溶劑即能進行完全萃取，裝置圖示如圖四十九。優點為節省人力，缺點為溶劑使用量稍大。

2.水蒸氣蒸餾法 (steam distillation)

將熱空氣通入樣品內，使易揮發的物質氣化，再經冷凝加以收集。由於蒸餾液中含有溶劑、精油及水等，故會有明顯分層，去水層收集精油部分即可，裝置如圖五十所示。此法的優點是可從揮發性物質(如臘質)中分離香氣物質，並且有不錯的產率，缺點是會破壞對熱敏感的香味物質，產生非原有的香味成分。

3.水蒸氣-蒸餾溶劑萃取法 (simultaneous steam distillation solvent extraction , Likens-Nickerson extraction)

此法於 1964 年由 Likens 及 Nickerson 二人開發。後來有許多改良的方法(Marrse and Belz, 1981)，其法為使用低沸點的溶劑，例如正戊烷、二氯甲烷、乙醚等進行萃取。優點為同時進行蒸餾及溶劑萃取之工作，以少量溶劑連續進行交換萃取，達到以最少的溶劑做最有效的萃取，且萃取效率高。但使用對於熱敏感的香味物質時易產生人為的香味成分。裝置如圖五十一。

4.上部空隙吹除捕捉法 (head-space adsorption)

傳統的方法是將樣品放入密閉容器中加溫，再以注射筒吸取上部氣體，直接注入氣相層析儀中，但因樣品量太少，無法檢測出微量成分，且食品的組成成分會影響香氣成分之蒸氣壓而影響分析結果。1978~1980 年間有新的方法產生(Charalambous, 1987)裝置如圖五十二，利用惰性氣體吹入樣品中，例如氮氣或氦氣，將揮發性成分趕入裝有吸附劑的吸管中，再以溶劑或加熱將揮發性成分分離出來。常用的吸附劑有 Parapah Q (ethylvinylbenzene-divinylbenzen copolymer)及 Tenax GC (2,6-diphenyl-*p*-phenylene oxide)。此種方法的優點為可分離出與樣品揮發性成分極為接近的物質，且所需的樣品少，可輕易進行，缺點為吸附劑的容量低，且吸附量有限(Heath, 1981)。

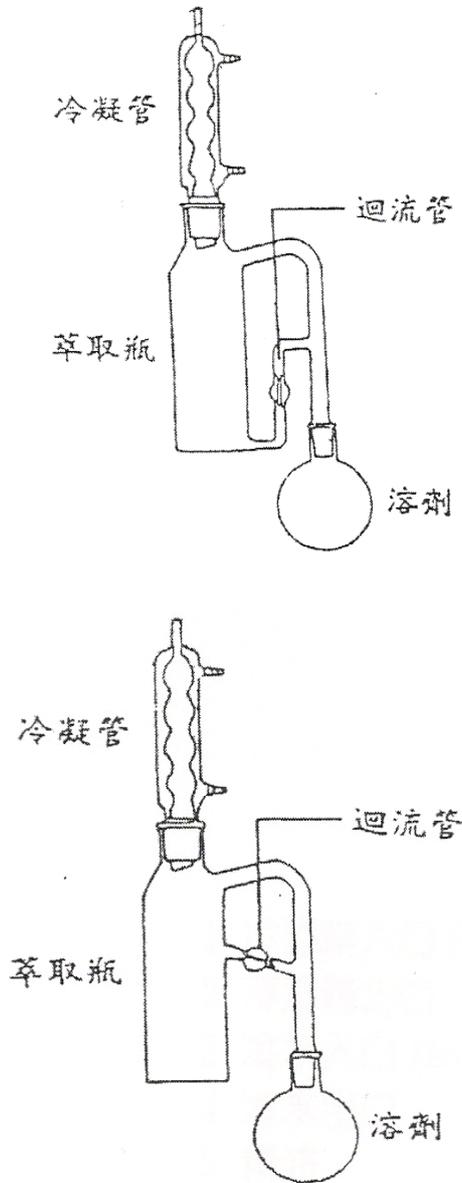
5.超臨界流體萃取法 (supercritical fluid extraction , SFE)

其原理是利用物質在臨界點(critical point)之後，氣體不因壓力增加而液化，液體不因溫度升高而氣化，液相及氣相平衡成一相，即為超臨界狀態(supercritical fluid region)(圖五十三) (陳，1992)。超臨界流體同時兼具有氣體與液體的性質，它的低黏度與高擴散能力近似於氣體，並有如液體般的溶解能力，其優點如下 (Lang and Wai, 2001)：

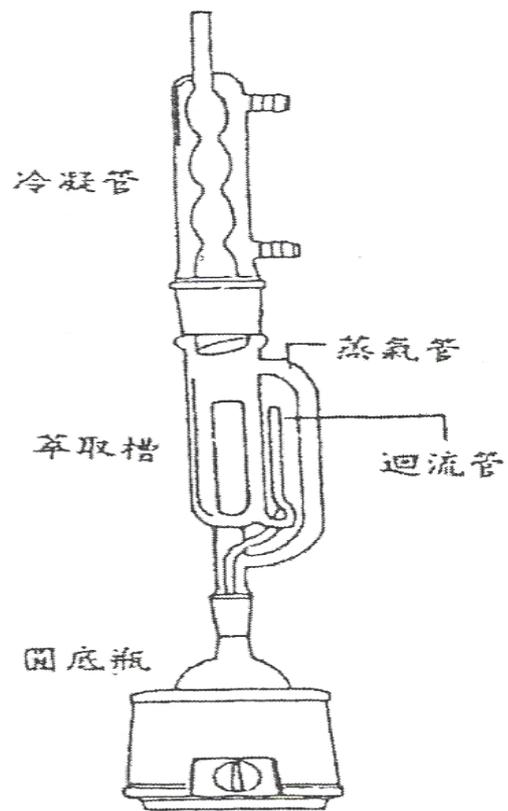
- 1.有較低的黏度及較高的擴散性，萃取效率高。

2. 溶劑可對樣品進行連續性地動態萃取，以提供完整地萃取。
3. 可同時控制壓力及溫度，有高度的選擇性。
4. 可利用調整壓力來分離溶於流體中之溶質。
5. 可於低溫下進行萃取，適用於對熱不穩定之化合物。
6. 樣品使用量少即可萃取、鑑定並定量出揮發性化合物。
7. 不需大量使用有機溶劑，對環境及人體較無害。
8. 可結合層析方法並直接定量高度揮發性化合物。
9. 大量萃取時，二氧化碳可再循環利用使廢棄物的產生最小化。
10. 可應用於分析或大量製備，進而應用至工業。

在多種起臨界流體中，二氧化碳為最常被使用，對食品而言，在 0~100°C 間之操作溫度較適宜，適中的臨界壓力使操作成本較低 (Coenen and Kriegel, 1984)，加上食用安全上的考量，二氧化碳為最適合之萃取溶劑。其臨界溫度為 31.3°C，臨界壓力為 72.9bar，萃取裝置如圖五十四所示。經由萃取濃縮後所得到含揮發性成分之萃取液，為提高相對濃度，因此需將溶劑除去。濃縮後的萃取物常以氣相層析儀 (gas chromatography, GC) 及氣相層析-質譜儀 (gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS) 分離鑑定揮發性成分，配合紅外線吸光 (infrared absorption, IR)、紫外線吸光 (ultraviolet absorption, UV) 及核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 等光譜分析法加以鑑定。

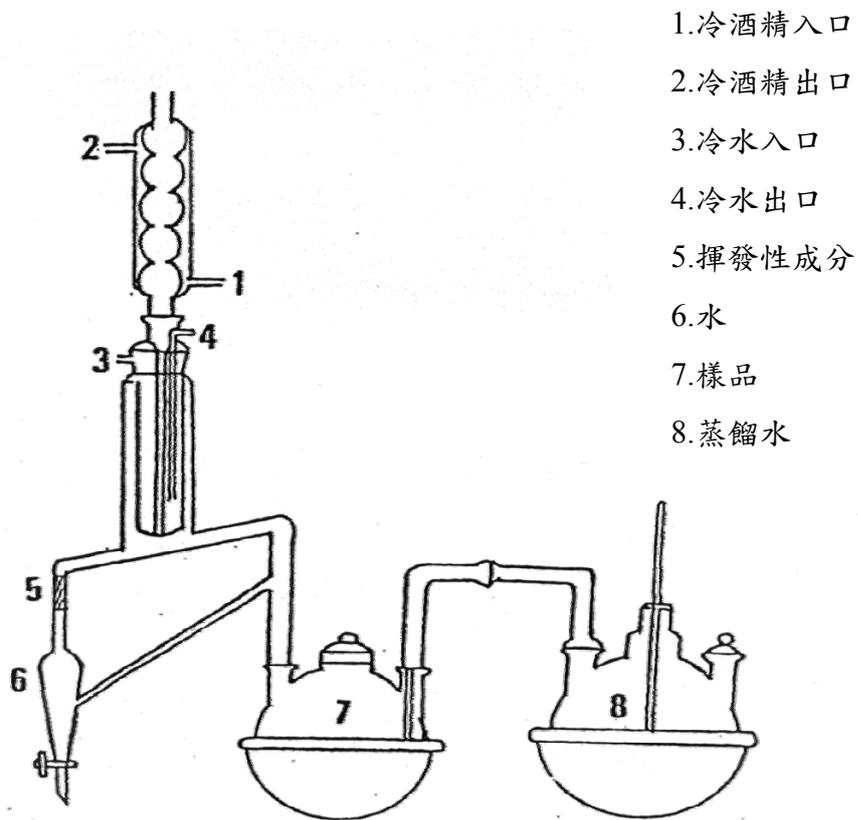


圖四十八、液體-液體萃取法裝置圖。
Fig 48. Diagram of liquid-liquid extraction equipment.



圖四十九、索氏萃取裝置圖。

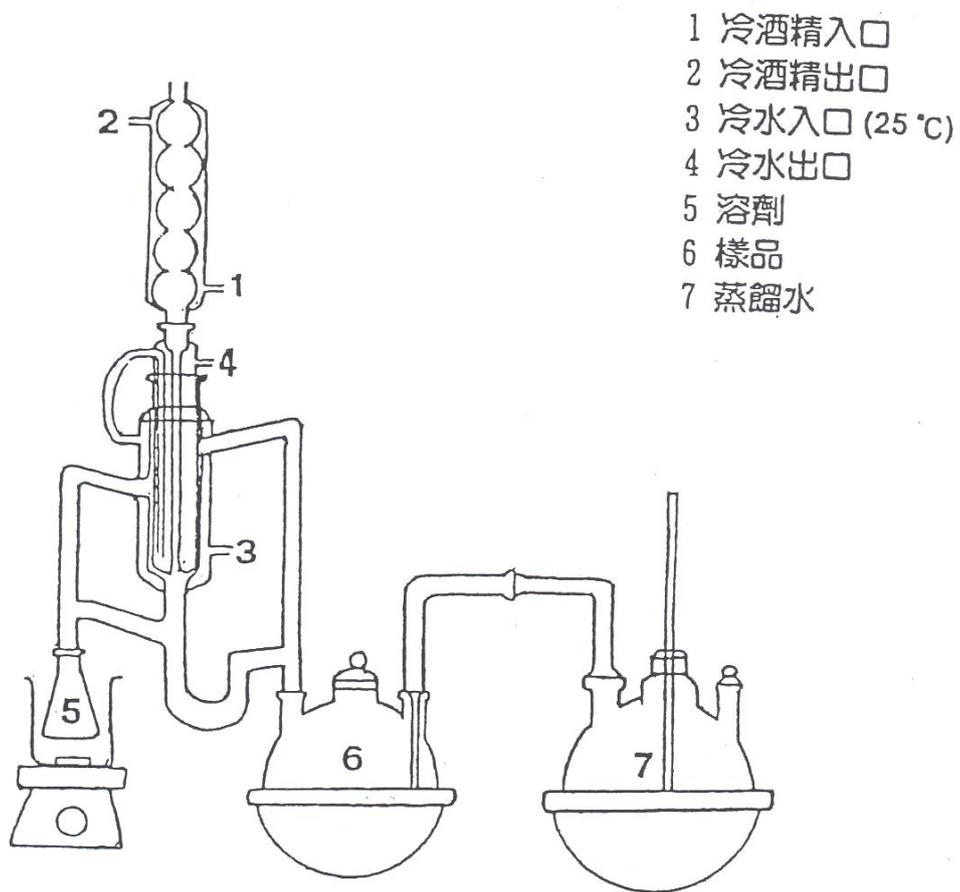
Fig 49. Diagram of Soxhlet extraction equipment.



- 1.冷酒精入口
- 2.冷酒精出口
- 3.冷水入口
- 4.冷水出口
- 5.揮發性成分
- 6.水
- 7.樣品
- 8.蒸餾水

圖五十、水蒸氣蒸餾法裝置圖。

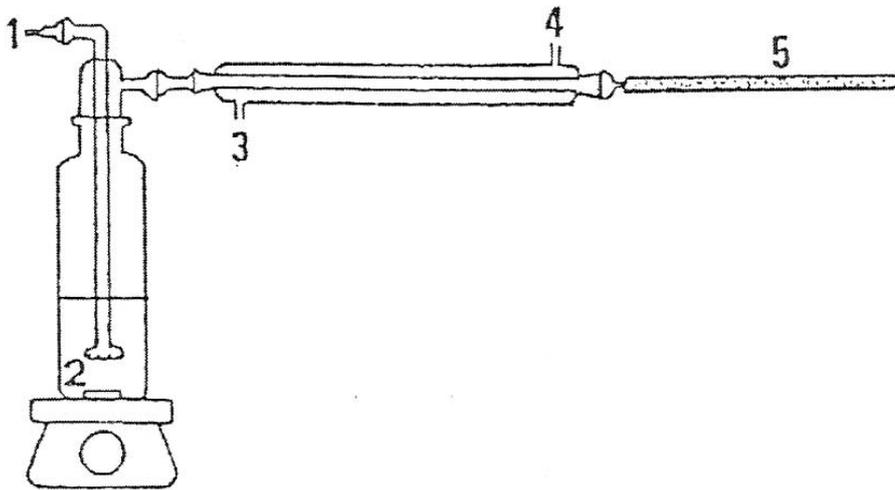
Fig 50. Diagram of steam distillation equipment.



圖五十一、水蒸氣蒸餾-溶劑萃取裝置圖。

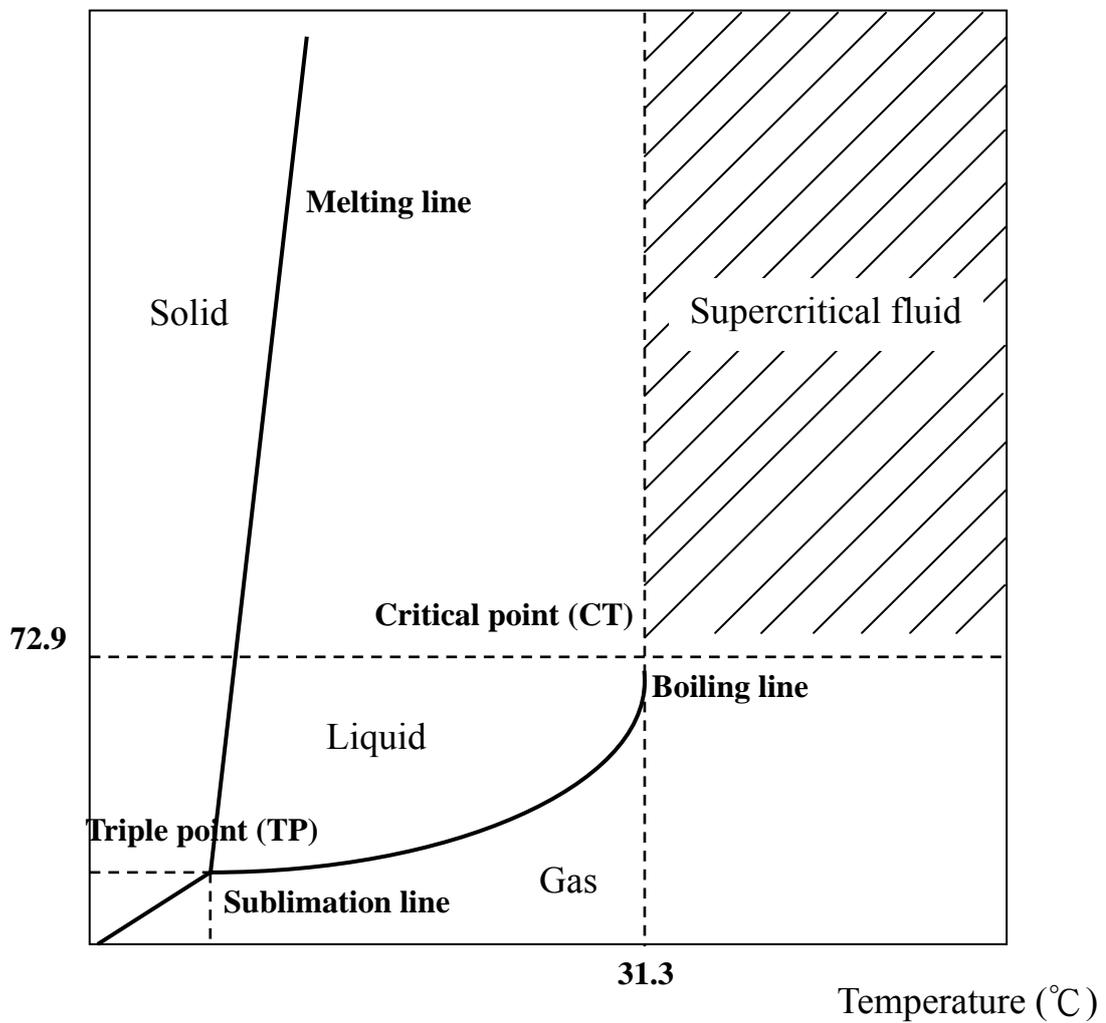
Fig 51. Diagram of Likens-Nickerson extraction equipment.

- 1 氮氣入口
- 2 樣品
- 3 冷水入口 (25°C)
- 4 冷水出口
- 5 吸附劑



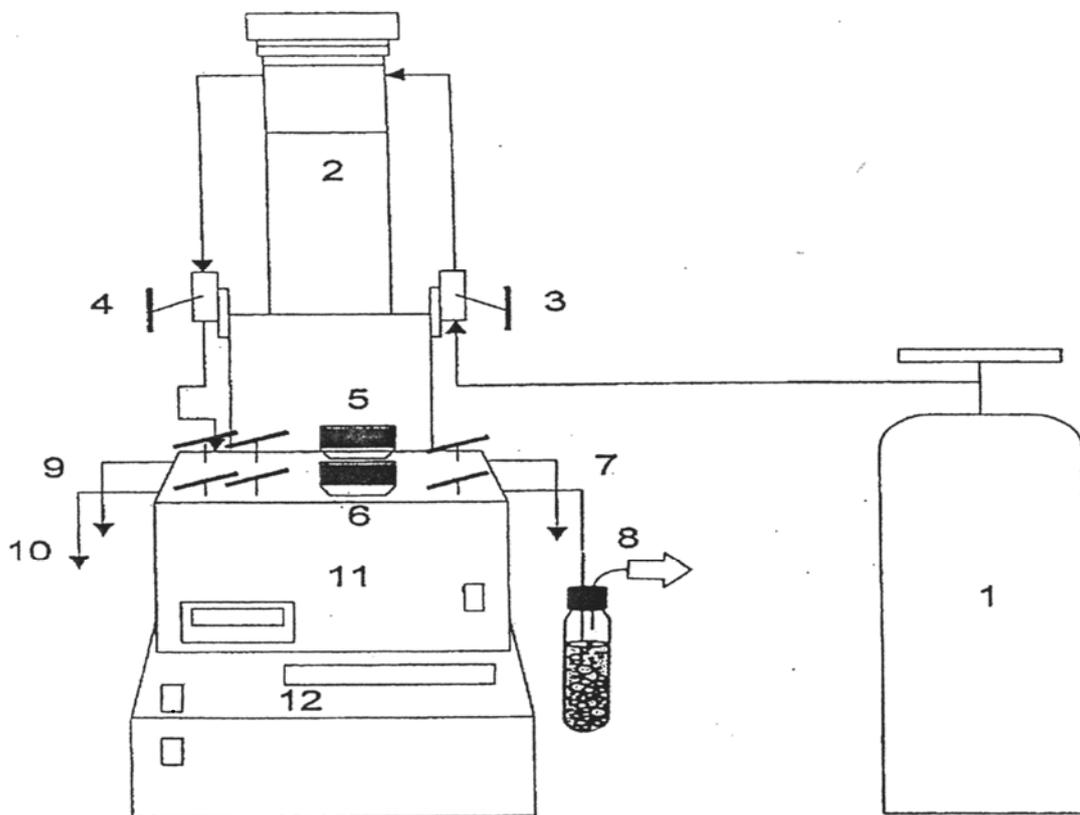
圖五十二、上部空隙吹除捕捉法裝置圖。
Fig 52. Diagram of headspace adsorption equipment.

Pressure (bar)



圖五十三、超臨界二氧化碳之三相圖。

Fig 53. Various phases diagram of supercritical carbon dioxide.



1 : carbon dioxide supply tank , 2 : syringe pump , 3 : check valve , 4 : check valve for controlling compressed carbon dioxide , 5 & 6 : extraction vessel , 7 & 8 : restrictor , 9 & 10 : vent , 11 : jacket of extraction vessel , 12 : controller of extraction apparatus

圖五十四、超臨界流體萃取裝置。

Fig 54. Diagram of supercritical fluid extraction equipment.

第二節、材料與方法

一、實驗材料及分析儀器

1. 實驗材料

本實驗之樣品為咖啡 (*Coffea arabica*) 之乾燥果肉，2005 年 3 月產於雲林縣古坑鄉劍湖山，由愛之味股份有限公司生技研究所提供。樣品以磨粉機 (台中榮聰鐵工廠製) 磨碎至可通過 20 mesh 篩網孔之粗粉。

2. 化學試劑

2-1 萃取咖啡果肉揮發性萃取物使用之溶劑

以下皆為 GR 級，購自德國 E. Merck 公司 (Darmstadt)，使用前皆先經蒸餾純化。

Diethyl ether, *n*-pentane, dichloromethane

2-2 抗氧化性檢測所使用之試劑

Linoleic acid：購自 Wako 公司 (Osaka, Japan)。使用前經充氮減壓蒸餾，再分裝於 2 mL 指形瓶中貯存於 -20°C 冷凍庫備用，每隔兩個月重新蒸餾再製。

Ammonium thiocyanate (NH₄SCN)：試藥級，純度 99%，購自關東化學株式會社 (Tokyo, Japan)

Sodium hydroxide (NaOH)：試藥級，純度 95%，購自聯工化學公司 (HsinChu, Taiwan)

Acetic acid：純度 99%，購自聯工化學公司 (HsinChu, Taiwan)

Iron(II) chloride tetrahydrate (FeCl₂ · 4H₂O)：試藥級，純度 95%，購自林純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)

Potassium phosphate, monobasic (KH₂PO₄)：試藥級，純度 99%，購自林純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)

α-Tocopherol：純度 95%，試藥級，購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)

Butyl hydroxyl anisole (BHA)：純度 90%，試藥級，購自 Sigma

公司 (St. Louis, MO, USA)

3. 使用儀器

3-1 氣相層析儀 (Gas chromatograph , GC)

使用美國 Hewlett-Packard 公司製造之 HP-5890A Series II 機型。

3-2 氣相層析質譜儀 (Gas chromatograph-mass spectrometer , GC-MS)

使用美國 Hewlett-Packard 公司製造之 HP-5972A MSD 及 5890A Series II 機型 GC。

二、實驗方法

1. 揮發性萃取物分析流程

咖啡果肉之分析流程如圖五十五

2. 揮發性萃取物

(1) 水蒸氣蒸餾-溶劑萃取法 (Likens-Nickerson extraction)

秤取咖啡果肉粉末 100 g、水 1000 ml 及內標液 100 μ l (cyclohexyl acetate) 放入 Likens-Nickerson 裝置之圓底燒瓶中，以水蒸氣當熱源，同時以 50 ml 溶劑 (正戊烷：乙醚 = 1：1，v/v) 蒸餾萃取 2 小時，連續萃取三次。

(2) 超臨界二氧化碳萃取法 (Supercritical carbon dioxide extraction)

秤取咖啡果肉粉末 4 g，放入超臨界二氧化碳萃取槽 (ISCO Model SFX 2-10)，以液態二氧化碳 (20mL，0.3mL/min) 為流體，萃取溫度為 60°C，萃取壓力為 5000 psi，萃取物的收集採用液體捕捉法 (solvent trap)，使用溶劑為 90mL 之正戊烷/二氯甲烷 = 2：1，進行批式靜態及連續式動態收集各一小時。

3. 揮發性萃取液之濃縮

將上述含有咖啡果肉揮發性成分之萃取物，先分別利用充填玻璃

珠之蒸餾管柱，於 40°C 下濃縮至體積大約僅剩 1mL，繼續以氮氣吹乾至 0.3 ml 之揮發性萃取物。

4.揮發性萃取物之分析及鑑定

將上述水蒸氣蒸餾溶劑萃取所收集得之咖啡果肉揮發性萃取物，分別以氣相層析儀 (GC) 及氣相層析-質譜儀 (GC-MS) 進行分析鑑定。

4-1.氣相層析

氣相層析儀之分析條件：

Column : CP-Wax 52CB (60 m × 0.25 mm i.d. , 0.25 μm film thickness
WCOT, 荷蘭 Chrompack 公司)

Carrier gas flow : H₂ (1.2 mL/min)

Detector : flame ionization detector , FID

Injector temp : 250°C

Detector temp : 250°C

Temp. program : 40°C , 5°C/min , 220°C (60min)

氣相層析-質譜儀之分析條件：

Column : CP-Wax 52CB (60 m × 0.25 mm i.d. , 0.25 μm film thickness
WCOT, 荷蘭 Chrompack 公司)

Carrier gas flow : He (1.0 mL/min)

Injector temp : 250°C

Initail temp : 250°C

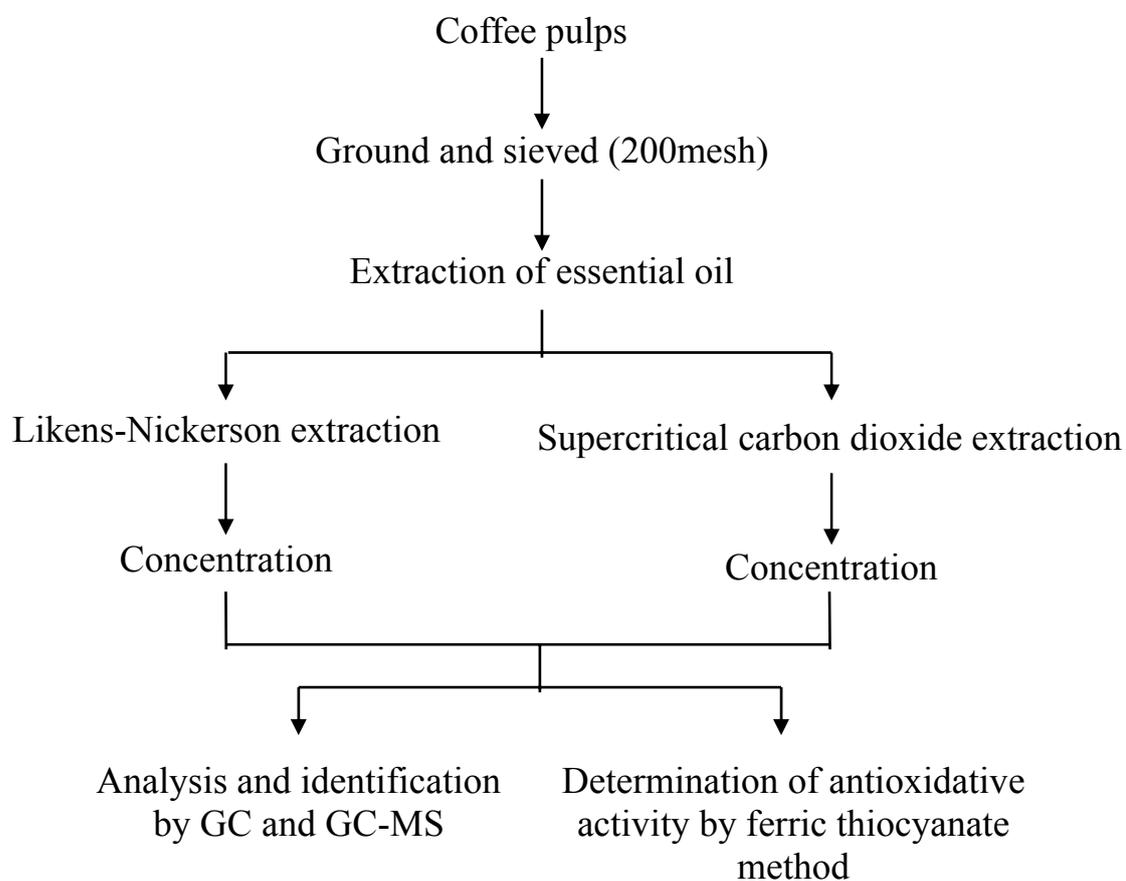
Temp. program : 40°C , 5°C/min , 220°C (60min)

Electron energy : 70 eV

Electron impact voltage : 1353 V

GC-MS interface : 260°C

MS Library : Wiley and NIST/NBS Spectrum Library



圖五十五、咖啡果肉以水蒸氣蒸餾-溶劑萃取法及超臨界二氧化碳萃取法所得揮發性萃取物之化學組成及抗氧化性之分析流程圖。

Fig 55. Flow sheet of experimental for the study on chemical compositions antioxidative activities for volatile extracts from coffee pulps by Likens-Nickerson extraction and supercritical carbon dioxide extraction.

5. 揮發性萃取物及溶劑萃取物之抗氧化活性檢測

本實驗採用對脂質氫過氧化物反應極為靈敏之硫氰酸鐵法(滿田等, 1967; 蘇等, 1991)做為抗氧化性的檢測。其檢測原理為利用各種樣品添加於含反應基質之亞麻油酸中經過一段時間放置後, 依亞麻油酸因自氧化所產生的氫过氧化物的相對含量, 描繪各樣品之油脂氧化曲線, 並加以比較得知各樣品間之抗氧化性之強弱, 揮發性萃取物、溶劑萃取物、BHA 及 α -生育醇之添加量皆為 0.2 mg。其詳細流程請參閱第三章之實驗方法。

第三節、結果與討論

一、咖啡果肉揮發性成分之探討

咖啡果肉粉末經水蒸氣蒸餾-溶劑萃取法及超臨界二氧化碳萃取法萃取後，先分別利用填充玻璃珠之蒸餾管柱，於 40°C 下濃縮至體積約剩 1mL；而後繼續以氮氣吹乾濃縮至 0.3mL，再經由氣相層析及氣相層析質譜檢測，經參考 Wiley Spectrum Library 之圖譜，鑑定出主要的 48 種化合物，其中酯類 19 種，醇類 12 種，pyrazines 類 5 種，醛類 4 種，酮類 4 種，酸類 2 種及呋喃類 (furans) 2 種 (表十三、十四)。

Flament (1989) 指出焙炒咖啡之香氣化合物包括醇類、醛酮類、酸類、酯類、呋喃類、吡咯類 (pyrroles)、pyrazines 類及吡啶類 (pyridines) 等大量的異環化合物。從本實驗結果得知，咖啡果肉經水蒸氣蒸餾-溶劑萃取法以 100°C 萃取之 48 種化合物中，除 pyrroles 及 pyridines 未檢測出，其餘皆符合構成焙炒咖啡豆之香氣成分，推測可能因咖啡果肉中含氮化合物及脂質含量較少且相較於一般咖啡豆焙炒溫度 (210~230°C)，萃取溫度較低，導致香氣成分無法完全產生。

二、水蒸氣蒸餾-溶劑萃取與超臨界二氧化碳萃取之比較

以水蒸氣蒸餾-溶劑萃取法所得之精油經 GC 及 GC-MS 分析，共鑑定出 48 種化合物 (圖五十六)，組成包括酯類 19 種，醇類 12 種，pyrazines 類 5 種，醛類 4 種，酮類 4 種，酸類 2 種及呋喃類 2 種；其中以波峰 41 (ethyl hexadecanoate) 約佔 2.29% 為最高，其次分別為波峰 46 (ethyl linoleate) 約佔 1.03%、波峰 40 (methyl hexadecanoate) 約佔 0.98%、波峰 48 (ethyl linolenate) 約佔 0.93% 及波峰 30 (furfural) 約佔 0.92%。以超臨界二氧化碳萃取法所得之精油經過 GC 及 GC-MS 分析後，共鑑定出 14 種化合物 (圖五十七)，其組成包括酯類 11 種、

醇類 1 種、醛類 1 種及酮類 1 種；其中以波峰 30 (frufural) 約佔 3.63 % 為最高，其次分別為波峰 42 (ethyl-9-hexadecenoate) 約佔 2.90%、波峰 41 (ethyl hexadecanoate) 約佔 1.98%、波峰 48 (ethyl linolenate) 約佔 1.94% 及波峰 45 (methyl linoleate) 約佔 1.48%。

在揮發性成分粗萃取率方面，本實驗結果顯示，以水蒸氣蒸餾-溶劑萃取法萃取咖啡果肉所得揮發性成分之粗萃取率為 $0.02 \pm 0.00\%$ ，而以超臨界二氧化碳萃取法所得揮發性成分之粗萃取率為 $0.33 \pm 0.02\%$ ，表示超臨界二氧化碳萃取法較水蒸氣蒸餾-溶劑萃取法有較高的粗萃取率。根據潘 (1994) 等研究指出，超臨界二氧化碳萃取法因臨界溫度只有 31.3°C ，因此可萃取出熱穩定性差及易揮發之成分，相較於水蒸氣蒸餾-溶劑萃取法，因高溫蒸餾萃取易使部分低分子揮發性化合物揮發而流失；此外，當超臨界二氧化碳萃取時，部分臘質、色素及油脂亦可能同時被萃取出來，故超臨界二氧化碳萃取法之粗萃取率較高。

三、咖啡果肉揮發性成分抗氧化性之探討

在咖啡果肉揮發性成分抗氧化性方面，除了以水蒸氣蒸餾-溶劑萃取法及超臨界二氧化碳萃取法所萃得之揮發性成分外，另外再以咖啡果肉之各層萃取物比較其抗氧化性，所得到的抗氧化性強弱依序為 $\text{BHA} > \text{乙酸乙酯萃取物} > \text{甲醇萃取物} > \alpha\text{-生育醇} > \text{正己烷萃取物} > \text{水蒸氣蒸餾-溶劑萃取物} > \text{超臨界二氧化碳萃取物} > \text{對照組}$ (圖五十八)。

由於揮發性萃取物主要為低分子量之揮發性成分，相較於以溶劑直接萃取之萃取物易得到較穩定且具抗氧化性之酚型化合物；另外，揮發性成分易受環境溫度影響而流失，因此可知揮發性萃取物之抗氧化性不如以溶劑直接萃取之萃取物。

表十三、以水蒸氣蒸餾-溶劑萃取法所得揮發性萃取物之主要揮發性成分

Table 13. The chemical composition of volatile extracts from pulps of coffee pulps by Likens-Nickerson extraction

Peak No.	Compound	Retention time	Peak area (%)
1	Ethanol	6.62	0.08
2	Ethyl propionate	7.07	0.05
3	Ethyl isobutyrate	7.19	0.05
4	Propyl acetate	7.32	0.03
5	Diacetyl	7.42	0.15
6	Isobutyl acetate	8.09	0.05
7	2-Methyl-3-buten-2-ol	8.63	0.09
8	Isobutyl alcohol	9.87	0.17
9	Isoamyl acetate	10.73	0.16
10	Butanol	11.38	0.09
11	1-Penten-3-ol	11.70	0.07
12	2-Heptanone	12.34	0.08
13	Isoamyl alcohol	12.85	0.21
14	E-2-Hexenal	13.57	0.06
15	2-Pentyl furan	13.78	0.06
16	Hexyl acetate	14.76	0.07
17	Acetoin	15.48	0.10
18	2-Methyl-2-buten-1-ol	16.09	0.09
19	Ethyl lactate	16.78	0.12
20	Hexanol	16.95	0.06
21	2,3-Dimethyl pyrazine	17.08	0.06
22	2-Nonanone	18.02	0.04
23	Z-2-Hexen-1-ol	18.45	0.04
24	Trimethyl pyrazine	18.71	0.06
25	Ethyl octanoate	19.11	0.08
26	E-2-Octenal	19.27	0.04
27	Linalool oxide	19.45	0.11
28	Acetic acid	19.77	0.06
29	3-Ethyl-2,5-dimethyl pyrazine	20.14	0.09
30	Furfural	20.20	0.92
31	Tetramethyl pyrazine	20.42	0.12
32	2,4-Heptadienal	21.10	0.11
33	2-Acetyl furan	21.33	0.03

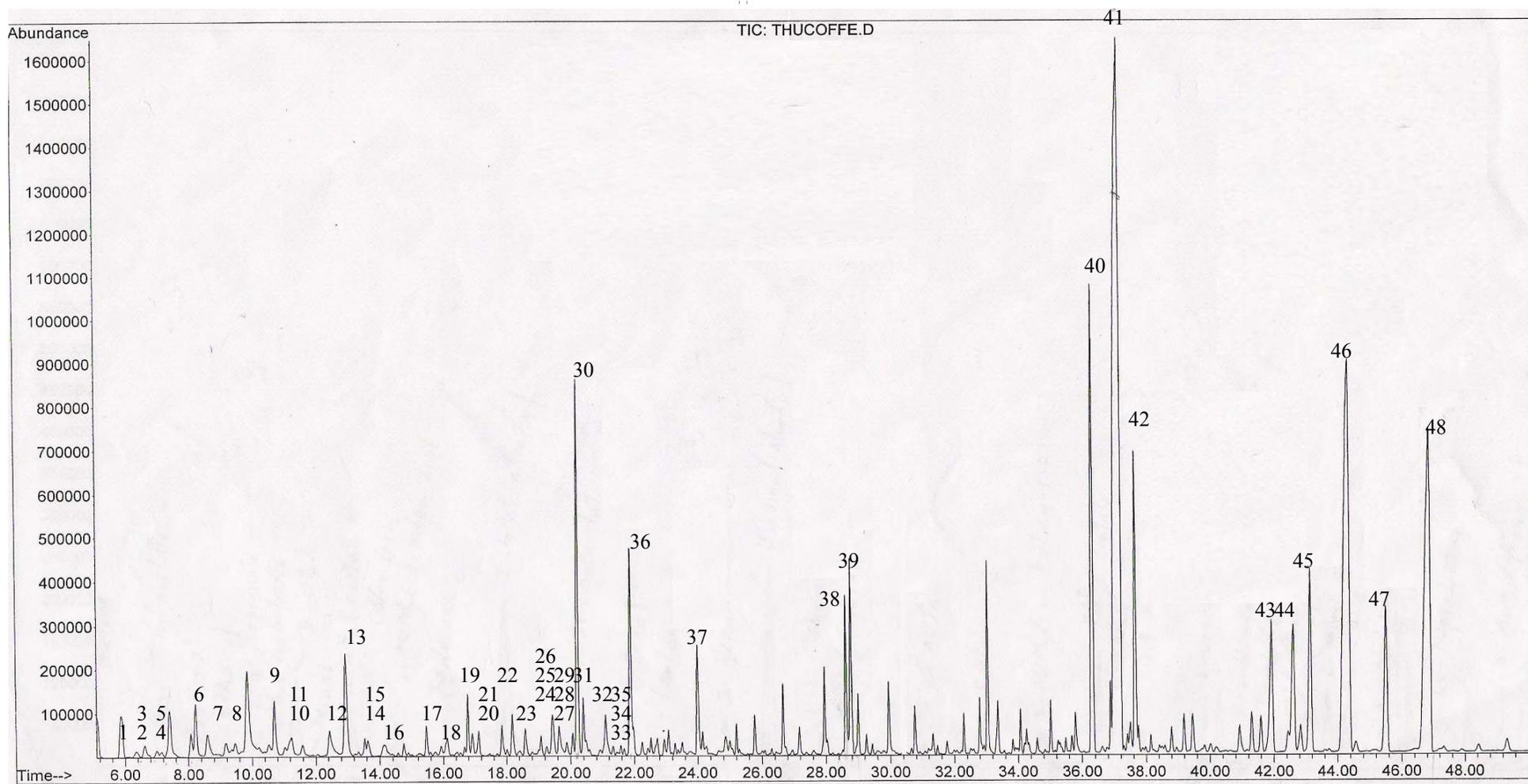
接上頁

34	2-Isobutyl-3-methoxy pyrazine	21.57	0.03
36	Linalool	21.90	0.42
37	Burytic acid	24.00	0.26
38	Phenethyl acetate	28.73	0.32
39	Damascenone	28.84	0.40
40	Methyl hexadecanoate	36.35	0.98
41	Ethyl hexadecanoate	37.12	2.29
42	Ethyl-9-hexadecenoate	37.72	0.72
43	Ethyl stearate	41.98	0.31
44	Ethyl oleate	42.54	0.30
45	Methyl linoleate	43.76	0.42
46	Ethyl linoleate	44.22	1.03
47	Methyl linolenate	45.32	0.37
48	Ethyl linolenate	46.78	0.93

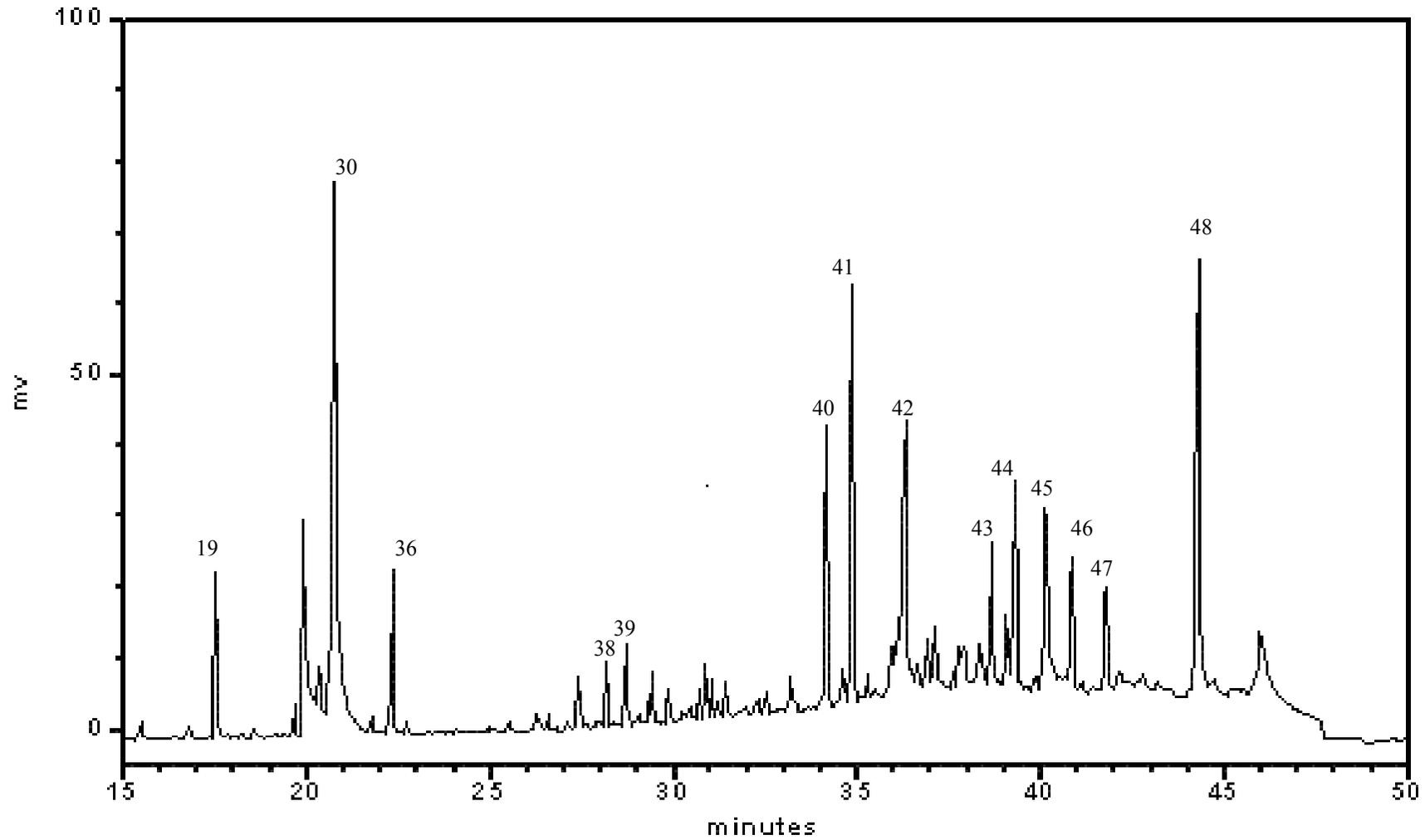
表十四、以超臨界二氧化碳萃取法所得揮發性萃取物之主要揮發性成分

Table 14. The chemical composition of volatile extracts from pulps of coffee pulps by supercritical carbon dioxide extraction

Peak No.	Compound	Retention time	Peak area (%)
19	Ethyl lactate	17.48	0.80
30	Furfural	20.76	3.63
36	Linalool	22.32	0.50
38	Phenethyl acetate	28.17	0.23
39	Damascenone	28.69	0.35
40	Methyl hexadecanoate	34.16	1.34
41	Ethyl hexadecanoate	34.87	1.98
42	Ethyl-9-hexadecenoate	36.34	2.90
43	Ethyl stearate	38.68	0.84
44	Ethyl oleate	39.33	1.17
45	Methyl linoleate	40.13	1.48
46	Ethyl linoleate	40.87	0.75
47	Methyl linolenate	41.76	0.69
48	Ethyl linolenate	44.42	1.94

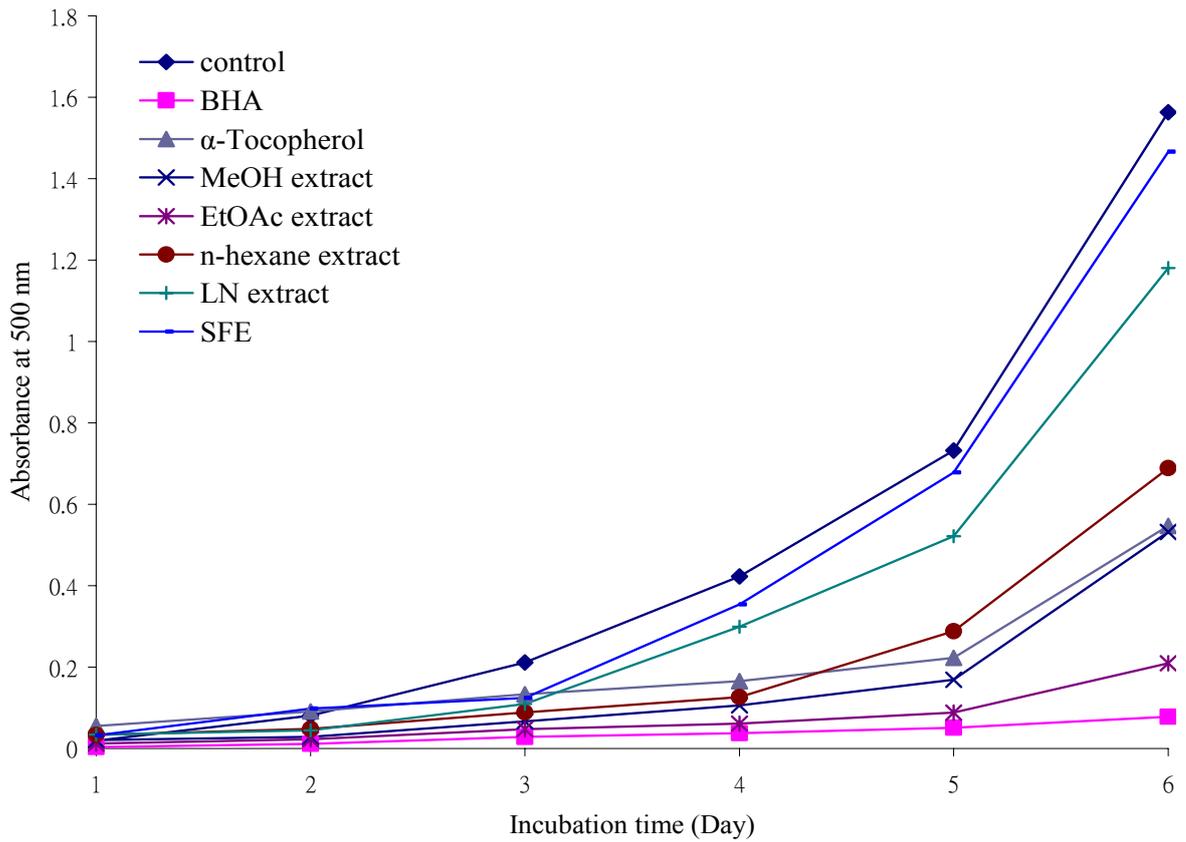


圖五十六、咖啡果肉以水蒸氣蒸餾-溶劑萃取法所得揮發性萃取物之氣相層析-質譜圖
 Fig 56. GC-MS spectrum of volatile extracts from Coffee pulps by Likens-Nickerson extraction.



圖五十七、咖啡果肉以超臨界二氧化碳萃取法所得揮發性萃取物之氣相層析圖

Fig 57. Capillary gas chromatogram of volatile extracts from Coffee pulps by supercritical carbon dioxide extraction.



圖五十八、咖啡果肉以不同方法所得揮發性萃取物及溶劑萃取物之抗氧化性

Fig 58. Antioxidative activity of the extracts from coffee pulps by various extractions.

結 論

本研究以農產廢棄物-咖啡果肉 (Pulps of *Coffea arabica*) 為材料，進行抗氧化成分及揮發性成分之分離、純化及結構鑑定，獲得初步結果如下：

1. 咖啡果肉之乙酸乙酯萃取物經分離純化鑑定後，獲得四個酚類純化物質，分別為 Galloyl stearate (1)、Apigetrin (Apigenin-7-O- β -D-glucoside) (2)、Baptignin-7-O- β -D-glucoside(3)及 3,5-Dicaffeoyl quinic acid(4)，另外低極性沖提子區分亦利用 HPLC 及 LC-MS 鑑定出含 α -tocopherol。因此推測咖啡果肉乙酸乙酯萃取物強抗氧化性的顯現，是由於這些酚類化合物利用諸如綜合性或相乘性作用所產生。

2. 咖啡果肉揮發性萃取物鑑定出主要的 48 種化合物，其中包括酯類 19 種、醇類 12 種、pyrazines 類 5 種、酮類 4 種、呋喃類 4 種、醛類 2 種及酸類 2 種。各種萃取物抗氧化性利用硫氰酸鐵法檢測，其強弱依序為 BHA > 乙酸乙酯萃取物 > 甲醇萃取物 > α -生育醇 > 正己烷萃取物 > 水蒸氣蒸餾-溶劑萃取物 > 超臨界二氧化碳萃取物 > 對照組。



參考文獻

- 八木國夫和五島雄一郎。1981。過氧化脂質與疾病。醫學書院，東京。
- 內山充，松尾光芳，嵯峨井勝。1985。過氧化脂質與生物體。學會出版中心，東京。
- 五十嵐脩，金田尚志，福場博保，美濃真。1986。過氧化脂質與營養。光生館。東京。
- 孔祥琳。1991。羌活揮發性、藥理活性及抗氧化性成分之研究。靜宜大學食品營養研究所碩士論文。
- 田口 護。2004。咖啡大全。積木文化。
- 朱慶國。1981。臺灣的咖啡。豐年 3(15)。
- 林書玉。1997。紅豆蔻揮發性及抗氧化成分之研究。東海大學食品科學研究所碩士論文。
- 張毅偉，喬長誠，蘇正德。1997。益智仁主要揮發性成分及其抗氧化性之研究。東海學報。38：93-105。
- 陳振坤。1992。二氧化碳萃取精油之十年歷程。香料資訊 4：21-33。
- 陳惠英和顏國欽。1998。自由基、抗氧化防禦與人體健康。J. Nutr. Sci. 23：105-121。
- 陳銘學。2004。篇蓄抗氧化及揮發性成分之研究。東海大學食品科學研究所碩士論文。
- 陳怡穎。2003。台灣土肉桂葉精油之組成與抗氧化性。台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- 喬長誠。1986。香味研究方法之簡介。食品工業 18：22-27。
- 葉佳聖，蘇正德。1993。補骨脂抗氧化成分之研究。食品科學 20：574-585。
- 游銅錫。1998。食品香料的穩定性。香協會訊。5：5-12。

- 黃國棟。2003。焙炒條件對咖啡豆香氣形成影響之研究。國立屏東科技大學食品科學研究所碩士論文。
- 滿田久輝、安本教傳、岩見公和。1967。抗氧化成分對亞麻油酸之自動氧化的影響。營養與糧食 19：210-214。
- 遠藤 剛、淺田浩二。1992。活性酸素在生物中之生存、消去、作用。食品工業5月30日：20-25。
- 潘懷宗，劉晉魁，周良穎，謝秉甫，李沐勳。1994。利用超臨界二氧化碳萃取肉桂中之精油成分：並與水蒸氣蒸餾法進行比較。中華醫學雜誌。5：199-207。
- 樊謙騰。1996。鳳凰花及山竹果殼抗氧化成分與花青素之研究。東海大學食品科學研究所碩士論文。
- 賴滋漢，賴業超。1994。食品科技辭典。富林出版社。
- 簡永亮。2002。沙苑子、馬櫻丹花抗氧化成分及沙苑子揮發性成分之研究。東海大學食品科學研究所碩士論文。
- 顏國欽。1993。食品安全學。藝軒出版社。
- 蘇正德和陳雅瑛。1991。省產稻米外殼抗氧化性之研究調查。東海學報 32：719-730。
- 蘇正德、蔡文騰、張基煌、蘇女淳。1991。茶湯與茶渣兒茶酚含量及抗氧化性之調查研究。食品科學 18：234-248。
- Abuja, P. M. and Albertini, R. 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clin. Chim. Acta. 306:1-17.
- Anguelova, T. and Warthsen, J. 2000. Degradation of lycopene, α -carotene, and β -carotene during lipid peroxidation. J. Food Sci. 65:71-75.
- Arnao, M. B., Cano. A., Hernadez-Ruiz, J., Carcia-Canovas, F. and

- Acosta, M. 1996. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of 2,2'-azino-bis (3-ethylbiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase : a new approach for determining total antioxidant status of food. *Analy. Biochem.* 236:255-261.
- Aruoma, O. I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem.* 72:145-171.
- Aruoma, O. I. 1999. Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radic. Res.* 30:419-427.
- Asther, M., Estrada Alvarado, M.I., Haon, M., Navarro, D., Asther, M., Lesage-Meessen, L. and Record, E. 2005. Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid. *J. Biotechnol.* 115:47-56.
- Azuma, K., Nakayama, M., Koshioka, M., Ippoushi, K., Yamaguchi, Y., Kohata, K., Yamauchi, Y., Ito, H. and Higashio, H. 1999. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3963–3966.
- Bando, N., Hayashi, H., Wakamatsu, S., Inakuma, T., Miyoshi, M., Nagao, A., Yamauchi, R. and Terao, J. 2004. Participation of singlet oxygen in ultraviolet-a-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary β -carotene: an ex vivo study. *Free Radic Biol Med.* 37:1854-1863.
- Barry, H. and John, M. C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine.* OXFORD SCIENC.
- Bate, S. and Swain, E. C. 1962. *Comparative Biochemistry, Vol. 3,*

- Mason, H. S. and Florkin, M., Eds., Academic Press, New York.
764.
- Bayne, D. R., Dunseth, D. and Ramirios, C. G. 1976. Supplemental feeds containing coffee pulp for rearing tilapia in central America. *Aquaculture*. 7133-146.
- Bergendi, G., Beneš, L., Ďuračková, F. and Ferencik, M. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*. 65:1865-1874.
- Blair, I. A. 2001. Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Exp. Gero*. 36:1473-1481.
- Bors, W. and Michel, C. 1999. Antioxidant capacity of flavonols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radic. Biol. Med*. 27:1413–1426.
- Branen, A. C. 1975. Toxicologes and biochemistry of butylated hydroxyanisole. and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 52:59-63.
- Bros, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. 1990. Flavonoids as antioxidants : Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*. 186:343-355.
- Burton, G. W. 1989. Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr*. 199:109.
- Burton, G. W. 1994. Vitamin E: molecular and biological function. *Pro. Nutr. Soc*. 53:251-262.
- Calzada, J. F., de Leon, R., de Arriola, M. C. and Rolz, C. 1987. Growth of mushrooms on wheat straw and coffee pulp : strain selection. *Biol. waste*. 20:217-226.
- Cantrell, A., McGarvey, D. J., Truscott, T. G., Rancan, F. and Böhm, F.

2003. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Arch. Biochem. Biophys.* 412:47-54.
- Cavin, C., Holzhaeuser, D., Scharf, G., Constable, A., Huber, W. W. and Schilter, B. 2002. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem. Toxicol.* 40:1155-1163.
- Charalambous, G. 1987. *Analysis of Foods and Beverages*. Academic Press Inc. New York.
- Clifford, M. N. 1985. Chlorogenic Acids, in *Coffee*, Vol.1. Chemistry. Clarke, R. J., Macrae, R., Eds. Elsevier: New York. p 153.
- Coenen, H. and Kriegel, E. 1984. Applications of supercritical gas extraction processes in the food industry. *Ger. Chem. Eng.* 7:335.
- Cook, N. C. and Samman, S. 1996. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7:66-76.
- Crane, F. L. 2001. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* 20:591-598.
- Culter, R. G. 1991. Antioxidants and aging. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:373s-379s.
- Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Berte, F., and Gazzani, G. 2000. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food. Chem.* 48:1449-1454.
- Elias, L. G. 1979. in: Braham, J. E. and Bressani, R. (Eds.). *Coffee Pulp: Composition, Technology and Utilization*, Publication 108e, International Development Research Centre, Ottawa, Ont. pp. 17-24.

- Fang, Y. Z. 2002. Free radicals and nutrition. In: Fang, Y. Z., Zheng, R. L.,(Ed.). Theory and application of free radical biology. Beijing: Scientific Press,647.
- Fedeli, D., Berrettini, M., Gabryelak, T. and Falcioni, G. 2004. The effect of some tannins on trout erythrocytes exposed to oxidative stress. *Mutat. Res.* 563:89-96.
- Fennema, O. R. 1985. Food Chemistry, edition 2, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Ferrari, C. K. and Torres, E.A. 2003. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed. Pharmacother.* 57:251-260.
- Flament, I. 1989. Coffee, Cocoa, and tea. *Food Reviews international.* 5:317-414.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97-112.
- George, K. B., Lopes, Herbert, M., Scschulman, and Marcelo, H. L. 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1472:142-152.
- Glass, C. K. and Witztum, J. L. 2001. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell.* 104:503-516.
- Gorkum, R. V. and Bouwman, E. 2005. The oxidative drying of alkyd paint catalysed by metal complexes. *Coord. Chem. Rev.* 249:1709-1728.
- Gutteridge, J. M. 1993. Anthracycline toxicity, iron and oxygen radicals, and chelation therapy. *J. Lab. Clin. Med.* 122:228-229.

- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet* 344:721-723.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M.C. 1994. In "Antioxidants in nutrition, health and disease." p90-110.
- Harborne, J. B. and Mabry, T. J. 1982. *The Flavonoids: Advances in Research.* p.135-188. Chapman and Hall, New York.
- Harborne, J. B. 1994. *The Flavonoids: Advances in Research since 1986.* Chapman and Hall, New York.
- Heath, H. B. 1981. *Source Book of Flavors.* AVI Publishing Co., Inc., Westport, CT.
- Heckers, H., Gobel, U. and Kleppel, U. 1994. End of the coffee mystery: diterpene alcohols raise serum low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride levels. *J. Intern. Med.* 235:192–193.
- Horn, R. C. and Vargas, V. M. 2003. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis.* 18:113-118.
- Huang, M. T., Chang, R. L., Wood, A. W., Newmark, H. L., Sayer, J. M., Yagi, H., Jerina, D. M. and Conney, A. H. 1985. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives. *Carcinogenesis.* 6:237-242.
- Hudson, B. J. F. 1990. *Food antioxidants,* Elsevier science publishing Co. New York.
- Huber, W.W., Scharf, G., Rossmann, W., Prustomersky, S., Grasl-Kraupp, B., Peter, B., Turesky, R.J. and Schulte-Hermann, R. 2002. The coffee components kahweol and cafestol induce

gamma-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of chemoprotective glutathione synthesis, in several organs of the rat. Arch. Toxicol. 75:685-94.

Hung, T. M., Na, M., Thuong, P. T., Su, N. D., Sok, D., Song, K. S., Seong, Y. H. and Bae, K. 2006. Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. J. Ethnopharmacol. In Press.

IARC. 1986a. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Vol. 40, Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. Butylated hydroxyanisole (BHA), pp. 123-159. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

IARC. 1986b. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 40, Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. Butylated hydroxytoluene (BHT), pp. 161-206. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Idstein, H., Bauer, C. and Schreier, P. 1985. Volatile acids in tropical fruits: cherimoya (*Annona cherimolia*, Mill.), guava (*psidium guajava*, L.), mango (*Mangifera indica*, L., var. Alphonso), papaya (*Carica papaya*, L.) Z Lebensm Unters Forsch. 180:394-397.

Jacob, R. A. 1994. Nutrition, health and antioxidants. INFORM. 11:1271-1275.

Kamal-Eldin, A. and Appelqvist, L. A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids 31:671-701.

- Kellogg, E. W. III and Fridovich, I. 1975. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 250:8812-8815.
- Kubow, S. 1990. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends in Food Sci. & Tech.* 1:67-70.
- Lang, Q. and Wai, C. M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta.* 53:771-782.
- Larson, R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* 27:969-978.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheynier, V. and Dolara. 2001. Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine. *Eur. J. Nutr.* 40:74-77.
- Maarten, F. C.M., Petra, L. M. Wilbert, H. M. and Eric, A. P. 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction a review. *European Journal of Obs. Gynecol. Reprod. Biol.* 82:171-184.
- Machlin, L. J. and Bendich, A. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1:441-445.
- Marrse, H., Belz, R. 1981. Isolation, separation and identification of volatile compound in aroma. p.21, Kluwer Boston Inc. Hingham, H. A. USA.
- Maxwell, L. and Gavin, J. 1992. Anti-oxidant therapy improves microvascular ultrastructure and perfusion in postischemic myocardium. *Microvasc. Res.* 43:255-266.
- McCord, J. M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108(8):652-659.

- Meyer, A. S. and Isaksen, A. 1995. Application of enzymes as food antioxidants. *Trends in Food Sci. and Tech.* 6:300-304.
- Milic, B. L., Djilas, S. M. and Canadanovic-Brunet, J. M. 1998. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chem.* 61:443-447.
- Miller, L. N., Rice-Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84:407-412.
- Miller, L. N., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M. and Rice-Evans, C. A. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* 384:240-242.
- Montero, M. 1992. Producción de abono orgánico de pulpa de café. CICAFFE Centro de Investigaciones del Café, ICAFFE (Instituto del Café de Costa Rica). San José, Costa Rica. p. 15.
- Morrissey, P. A. and O'Brien, N.M. 1998. Dietary antioxidants in health and disease. *Int. Dairy J.* 8:463-472.
- Moskovitz, J., Yim, M. B. and Chock, P. B. 2002. Free radicals and disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 397(2):354-359.
- Mruka, D. D., Silvestrinib, B., Moa, M. Y. and Chenga, C. Y. 2002. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 67:305-311.
- Murray, M. 1996. *Encyclopedia of Nutritional Supplements.* Rocklin, CA. 296-308.
- Nawar, W. W. 1985. Lipid in "Food Chemistry", p. 139-244. Fennema, O. R. Ed., Marcel Dekker, INC., New York.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E. and Sato, K. 1991. Membrane

- damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:201-205.
- Niki, E. 1992. Active oxygens and free radicals in biology. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 41:768-773.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E. and Sato, K. 1991. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:201-205.
- Pandey, A. and Soccol, C. R. 1998. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 41:379-390.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R. and Roussos, S. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochem. Eng. J.* 6:153-162.
- Papas, A. M. 1999. Diet and antioxidant status. *Food Chem. Toxic.* 37:999-1007.
- Perkins, E. G. 1967. Formation of nonvolatile decomposition products in heated fats and oils. *Food Technol.* 21:125-134.
- Pokorny, J. 1987. In "Autoxidation of unsaturated lipids." Edited by Chan, H. Academic Press, London. 141-206.
- Porres, C., Alvarez, D. and Calzada, J. 1993. Caffeine reduction in coffee pulp through silage. *Biotechnol. Adv.* 11:519-523.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 9-10:1231-1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20:933-956.
- Richelle, M., Tavazzi, I., and Offord, E. 2001. Comparison of the

- antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa and tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food. Chem.* 49:3438–3442.
- Rikans, L. E. and Hornbrook, K. R. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1362:116-127.
- Rolz, C., Menchfi, J. F., Arriola, M. C. and Micheo, F. 1980. Pressing of coffee pulp. *Agric. Wastes.* 2:207-214.
- Scalbert, A. and Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130:2073-2085.
- Schildermann, P. A. E. L., Ten Hoor, F. and Kleinjas, J. C. S. 1995. Induction of oxidative DNA damage and early lesions in rat gastro-intestinal epithelium in relation to prostaglandin H synthase-mediated metabolism of butylated hydroxyanisole. *Food Chem. Toxic.* 33:99-109.
- Schreier, P., Lehr, M., Heidlas, J. and Idstein, H. 1985. Aroma of the papaya fruit (*Carica papaya*, L.): indication of volatile precursors of terpene compounds. *Z Lebensm Unters Forsch.* 180:297-302.
- Sen, C. K. 1997. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutrl. Biochem.* 8:660-672.
- Sherwin, E. R. 1978. Oxidation and antioxidants in fat and oil peocessing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55:809-814.
- Shigenaga, M. K., Gimeno, C. J. and Ames, B. N. 1989. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86:9697-9701.
- Simic, M. G. 1988. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.*

202:377-386.

- Stephan, A., Bücking, M. and Steinhart, H. 2000. Novel analytical tools for food flavours. *Food Res. Int.* 33:199-209.
- Su, J. D. 1992. Investigation of antioxidative activity and tocopherol contents on Chinese crude drugs of fruits or seeds. *Food sci.* 19:12.
- Thomson, D. M. 1986. *The meaning of flavour.* Academic Press, Inc., New York.
- Topinka, J., Bincova, B., Sram, R. J. and Erin, A. N. 1989. The influence of α -tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutat Res.* 255:131.
- Tsai, C. H., Miller, A., Spalding, M. and Rodermel, S. 1997. Source strength regulates an early phase transition of tobacco shoot morphogenesis. *Plant. Physiol.* 115(3):907-914.
- Turesky, R. J., Stadler, R. H., and Leong-Moergenthaler, P. M. 1993. The pro- and antioxidative effects of coffee and its impact on health. *Proceedings of the 15th Colloquium ASIC, Montpellier.* pp. 426–431.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160:1-40.
- Williams, G. M., Iatropoulos, M. J. and Whysner, J. 1999. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food Chem. Toxicol.* 37:1027-1038.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R. and Turner, N. D. 2003. Glutathione metabolism and its implications for health. *Nutr. Sci.*

18 :489-492.

Yagi, K. 1987. Lipid peroxides and human disease. *Chem. Phys. Lipids.* 45:337-341.

Yen, G. C., Duh, P. D. and Su, H. J. 2005. Antioxidant properties of lotus seed and its effect on DNA damage in human lymphocytes. *Food Chem.* 89:379-385.

Yokozawa, T., Cho, E. J., Hara, Y. and Kitaani, K. 2000. Antioxidative activity of green tea treeayed with radical initiator 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.* 48:5068-5073.