

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
Tunghai University

食品科技組
Food Technology Section

碩士論文
Master Thesis

指導教授：江文德 博士
黃進發 博士
Advisor : Wen-Dee Chiang, Ph.D.
Chin-Fa Hwang, Ph.D.

亞麻籽中酚類化合物之萃取、轉換及其抗氧化活性之評估

Extraction and Conversion of Phenolic Compounds from
Flaxseed and Assessment of Their Antioxidative Activities

研究生：陳雅紋 撰
Graduate Student : Ya-Wun Chen

中華民國九十七年一月
January, 2008

碩士論文指導教授推薦書

食品科學研究所科技組 陳雅紋 君所提之論文

亞麻籽中酚類化合物之萃取、轉換及其 抗氧化活性之評估

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學研究所所長 翁心浩

指導教授：翁心浩
黃進學

中華民國九十七年一月五日

碩士論文考試委員審定書

食品科學碩士班食品科技組 陳雅紋 君所提之論文

亞麻籽中酚類化合物之萃取、轉換及其抗氧化活性之評估

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

蔡正宗

東海大學食品科學系教授

傅昌光

食品工業發展研究所檢驗技術研發及服務中心副主任

高慶君

銘傳大學餐旅管理學系助理教授

指導教授：

陳雅紋

黃進學

中華民國九十七年一月五日

謝誌

感謝恩師 江文德博士和 黃進發博士兩年多來的悉心指導、砥礪與肯定，尤其在實驗遇到瓶頸時所給予的支持與啟發，及提供完善的研究設備和充分的資源，且也讓學生學習到不同領域的知識及待人處世，並於論文撰稿期間細心的校閱斧正，使論文得以順利完成，師恩浩瀚，衷心感謝，謹於卷首致最深謝意。

文稿初成，承蒙食品工業發展研究所檢驗技術研發及服務中心副主任 傅偉光博士、銘傳大學餐旅管理學系助理教授 高馥君博士和本系所教授 蔡正宗博士撥冗詳加審閱及斧正，並於口試期間給予學生精闢的指導與寶貴意見，使論文更臻周嚴，特此致上由衷謝意。

研究期間，感謝系上所有的老師和系辦王琴助理、怡君助教和淑瑜助教的關懷與協助；還有學長姐鈞弼、詠菱、偉龍等的勉勵與指點；以及同學育玫、于珊、文彥等的互相鼓勵與幫忙；學弟妹書涵、群凱、美燕、志剛、佳宏、敬哲等的陪伴與協助，讓我兩年多來過著多采多姿的日子，感謝大家。

最後，感謝我最親愛的家人，尤其是多年辛苦培育我的父母親，由於您們無限的關懷與無悔的付出，才能讓我順利完成學業。將此論文獻給你們，願與你們一同分享這份喜悅。

陳雅紋 謹誌於

東海大學食品科學研究所

中華民國九十七年一月

摘要

本研究分別以水萃取、乙醇萃取、鹼處理、熱處理和酵素水解等方法從脫脂亞麻籽粉末中萃製酚類化合物，所得萃取物分別為 pd 1、pd 2、pd 3、pd 4 和 pd 5。依據 HPLC 分析結果顯示，pd 1 及 pd 2 不含游離態的酚類化合物，pd 3 及 pd 4 以配醣體的酚類化合物 coumaric acid glucoside (CAG)、ferulic acid glucoside (FAG)和 secoisolariciresinol diglycoside (SDG)為主，以 pd 3 總含量較高，pd 5 以去醣基的酚類化合物 coumaric acid (CA)、ferulic acid (FA)和 secoisolariciresinol (SECO)為主。其次，依據比色分析總酚類化合物的結果顯示，pd 2 的總酚含量最高，以木酚素及酚類化合物之複合物形式存在，約 31.70 mg gallic acid equivalent/g dry matter，其他依次為 pd 3、pd 1、pd 5 和 pd 4。本研究利用 Trolox 當量的抗氧化能力(TEAC)、螯合亞鐵離子能力、還原力、清除氫氧自由基、清除超氧陰離子能力及抑制脂質氫過氧化物生成能力等比較此 5 種萃取物的抗氧化活性；TEAC 測定的結果顯示，此 5 種萃取物皆具有清除 $ABTS^{\cdot+}$ 陽離子自由基能力，樣品溶液在 200 $\mu\text{g/mL}$ 濃度下其 TEAC 介於 30.52–140.84 μM ，以 pd 2 為最高，而 pd 4 為最低，此結果與總酚類化合物含量成正相關，且 pd 2 在 200 $\mu\text{g/mL}$ 濃度下，其抗氧化能力相當於 25.98 $\mu\text{g/mL}$ 之 BHT 及 30.89 $\mu\text{g/mL}$ 之 Vit. C；螯合亞鐵離子能力的結果顯示，所有萃取物皆具有螯合能力，樣品溶液在 250 $\mu\text{g/mL}$ 濃度下其螯合力介於 8.73–84.60%，以 pd 4 為最高，而 pd 2 為最低，且 pd 4 在 200 $\mu\text{g/mL}$ 濃度時已維持穩定，其螯合能力可達 85.14%，相當於 109.30 $\mu\text{g/mL}$ 之 EDTA 的螯

合能力。但就還原力、清除氫氧自由基及超氧陰離子能力而言，所有萃取物之效果均不明顯。此外，在亞麻油酸乳化液系統中，所有萃取物添加濃度為 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，於 48 小時測定其脂質氧化的抑制率仍然都維持 90% 以上，其中 pd 3 與同濃度下 BHT 之抑制率相近；當添加濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，其抑制率由大至小依序為 BHT > pd 2 > pd 1 > pd 4 = pd 3 = pd 5，前四者於 48 小時的抑制率分別為 97.82%、82.91%、45.81% 及 3.20%。

Abstract

In this study, several methods have been applied to prepare extracts from defatted flaxseed flour (DFF). The extracts obtained from water extraction, ethanol extraction, alkali treatment, heat treatment and enzyme hydrolysis of DFF were denoted as pd 1, pd 2, pd 3, pd 4 and pd 5, respectively. Based on HPLC analysis, the results indicated that both pd 1 and pd 2 had no free form phenolic compounds, both pd 3 and pd 4 contained mainly coumaric acid glucoside (CAG), ferulic acid glucoside (FAG) and secoisolariciresinol diglycoside (SDG), pd 5 contained mainly coumaric acid (CA), ferulic acid (FA) and secoisolariciresinol (SECO). Furthermore, based on colorimetric analysis of total phenolic compounds (TPC), pd 2 had the highest TPC than others, followed by pd 3, pd 1, pd 5 and finally pd 4. The pd 2 contained 31.70 mg gallic acid equivalent/g dry matter. The phenolic compounds of pd 2 existed in a complex form containing lignan, phenolic and aliphatic compounds. Each extract was also evaluated its antioxidant activities including trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay, ferrous ion chelating, reducing activity, hydroxyl radical scavenging, superoxide anion radical scavenging and lipid peroxidation inhibition. The TEAC results showed that all extracts exhibited ABTS radical scavenging effect. The TEAC values ranged from 30.52 to 140.84 μM trolox equivalent at a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The highest was pd 2, whereas the lowest was pd 4. There was a positive linear relationship between antioxidant activity and total phenolic compounds. The result indicated that phenolic compounds were the dominant antioxidant components in the extracts. Again, the antioxidant capacity of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pd 2 was equal to 25.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BHT and 30.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vitamin C, respectively. In addition, all five extracts were shown to exhibit ferrous ion chelating capacities. The

chelating capacities ranged from 8.73 to 84.69% at a concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$. The highest was pd 4, whereas the lowest was pd 2. Also, the chelating capacity of 200 $\mu\text{g/mL}$ pd 4 was 85.14% and equal to 109.30 $\mu\text{g/mL}$ EDTA. However, all extracts were far less active in reducing activity, hydroxyl radical scavenging and superoxide anion radical scavenging assays. Moreover, inhibiting lipid peroxidation reactions of linoleic acid emulsion were measured according to ferric thiocyanate method. All extracts showed to be greater than 90% inhibition of lipid peroxidation at a concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$ after 48h of incubation. Also, the effect of pd 3 was equivalent to BHT at the same concentration. On the other hand, at the relatively low concentration (i.e. 50 $\mu\text{g/mL}$), the antioxidant activities of five extracts and BHT followed the order: BHT > pd 2 > pd 1 > pd 4 = pd 3 = pd 5. Percentage of inhibition of the top four was 97.82, 82.91, 45.81 and 3.20%, respectively.

目錄

	頁碼
中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
目錄.....	V
表次.....	IX
圖次.....	X
附錄.....	XII
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	3
一、亞麻籽簡介.....	3
(一) 形態、品種及分布.....	3
(二) 組成分及功能.....	4
(三) 應用.....	6
二、亞麻籽中的木酚素及酚類化合物.....	6
(一) 木酚素之來源及結構.....	6
(二) 亞麻籽中的其他酚類化合物.....	12
(三) 木酚素的吸收及代謝.....	14
(四) 木酚素促進健康的可能機制.....	16
三、脫脂亞麻籽萃取物之製備.....	19
四、木酚素及其他酚酸之分析方法.....	20
五、抗氧化之評估.....	21
(一) 自由基、活性氧及活性氮對生物體之影響.....	21
(二) 抗氧化劑之作用機制.....	22
1. 自由基抑制劑 (free radical inhibitor).....	23
2. 還原劑或氧清除劑 (oxygens scavenger).....	23
3. 金屬螯合劑 (metal chelator).....	23
4. 單重態氧抑制劑 (singlet oxygen inhibitor).....	24

5. 過氧化分解劑 (peroxide decomposer).....	24
(三) 抗氧化活性之測定	24
1. Trolox 當量抗氧化能力(TEAC)之測定	24
2. 螯合亞鐵離子能力之測定	25
3. 還原力之測定	25
4. 氫氧自由基清除能力之測定	26
5. 超氧陰離子(SOD-like)清除能力之測定	26
6. 抑制脂質氫過氧化物生成之測定	27
(四) 天然抗氧化劑 (natural antioxidants)	27
參、材料與方法	28
一、實驗材料與藥品	28
二、儀器設備	30
(一) 脫脂所需之儀器設備	30
(二) 萃取及水解脫脂亞麻籽粉末所需之儀器設備	30
(三) 高效能液相層析儀 (HPLC)	30
(四) 總酚類化合物含量及抗氧化性測定所需之儀器設備	31
三、實驗方法	31
(一) 脫脂亞麻籽粉末的製備	31
(二) DFF 萃取物的製備	32
1. 水溶性萃取物 (pd 1)	32
2. 乙醇萃取物 (pd 2)	32
3. 鹼甲醇萃取物 (pd 3)	32
4. 熱處理甲醇萃取物 (pd 4)	34
(1) 熱處理條件之探討	34
(2) 熱處理甲醇萃取物的製備	34
5. pd 2 之酵素水解產物	34
6. 鹼甲醇萃取物之酵素水解產物 (pd 5)	36
(1) 配醣體去除醣基之酵素篩選	36
(2) 以 β -glucuronidase from <i>Helix pomatia</i> (HP-2) 進行	

酵素水解.....	36
(3) 所篩選到的酵素與 HP-2 作比較.....	37
(4) 以不同的 En 4 酵素濃度進行酵素水解.....	37
(5) 鹼甲醇萃取物之酵素水解產物的製備.....	37
(三) DFF 萃取物中木酚素及其他酚類化合物含量之測定.....	38
(四) DFF 萃取物中總酚類化合物含量之測定.....	39
(五) DFF 萃取物中抗氧化活性之測定.....	39
1. Trolox 當量抗氧化能力(TEAC)之測定.....	39
2. 螯合亞鐵離子能力之測定.....	40
3. 還原力之測定.....	40
4. 氫氧自由基清除能力之測定.....	40
5. 超氧陰離子(SOD-like)清除能力之測定.....	41
6. 抑制脂質氫過氧化物生成之測定.....	41
四、統計分析.....	42
肆、結果與討論.....	43
一、脫脂亞麻籽粉末(DFF)的製備.....	43
二、DFF 萃取物的製備條件探討.....	43
(一) pd 4 製備條件探討.....	43
1. 熱處理條件之探討.....	45
2. 酵素處理條件之探討.....	48
(二) pd 5 製備條件探討.....	50
1. 配醣體去除醣基之酵素篩選.....	51
2. HP-2 去醣基的效率.....	55
3. 比較所篩選到的酵素 En 4 與 HP-2 之去醣基效率.....	60
4. 不同的 En 4 酵素濃度對 DFF 及 pd 3 之影響.....	62
三、五種 DFF 萃取物中酚類化合物及總酚類化合物之含量.....	64
四、五種 DFF 萃取物之抗氧化活性.....	67
(一) Trolox 當量的抗氧化能力(Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC).....	67

(二) 螯合亞鐵離子之能力	69
(三) 還原力	74
(四) 清除氫氧自由基及超氧陰離子自由基之能力	77
(五) 抑制脂質氫過氧化物生成之能力	79
伍、結論.....	84
陸、參考文獻.....	86
柒、附錄.....	100

表次

	頁碼
表一、酵素之特性	35
表二、脫脂亞麻籽粉末之製備	44
表三、利用不同酵素水解脫脂亞麻籽鹼萃物對其酚類化合物濃度之影響	52
表四、利用不同濃度的 En 4 及 En 8 水解脫脂亞麻籽粉末或脫脂亞麻籽鹼甲醇萃物對其酚類化合物濃度之影響	54
表五、利用 β -glucuronidase 水解脫脂亞麻籽粉末或脫脂亞麻籽鹼甲醇萃物對其酚類化合物濃度之影響	57
表六、利用不同濃度的 En 1 及 HP-2 水解脫脂亞麻籽粉末或脫脂亞麻籽鹼甲醇萃物對其酚類化合物濃度之影響	59
表七、利用不同濃度的 En 4 及 HP-2 水解脫脂亞麻籽鹼甲醇萃物對其酚類化合物濃度之影響	61
表八、利用不同濃度的 En 4 水解脫脂亞麻籽粉末或脫脂亞麻籽鹼甲醇萃物對其酚類化合物濃度之影響	63
表九、DFF 萃物中酚類化合物及總酚類化合物之含量	66
表十、DFF 萃物在 200 μ g/mL 濃度下之 BHT 及 Vit. C 當量的抗氧化能力	72
表十一、不同濃度 DFF 萃物、BHT 及 Vit. C 之清除氫氧自由基與超氧陰離子自由基能力	78

圖次

	頁碼
圖一、木酚素的基本架構	7
圖二、亞麻籽中之植物木酚素	8
圖三、亞麻籽木酚素寡聚合物的結構	10
圖四、哺乳類木酚素前驅物 SDG 及 matairesinol 經由腸道微生物菌群 轉換成 enterodiol 及 enterolactone.....	11
圖五、Coumaric acid glucoside、ferulic acid glucoside 及 caffeic acid glucoside 之結構式	13
圖六、植物木酚素在人類體內的腸肝循環	15
圖七、脫脂亞麻籽粉末萃取物的製備及抗氧化活性測定之流程圖 ..	33
圖八、不同溫度及 pH 值對脫脂亞麻籽粉末中 SDG 釋放率之影響..	46
圖九、在 pH 9、80°C 下加熱時間對脫脂亞麻籽粉末中 SDG 釋放率之 影響.....	47
圖十、不同酵素處理對脫脂亞麻乙醇萃取物中 SDG 釋放率之影響..	49
圖十一、脫脂亞麻籽萃取物溶液之高效能液相層析圖	65
圖十二、不同濃度 DFF 萃取物其 Trolox 當量的抗氧化能力	68
圖十三、不同濃度 pd 1、pd 2、pd 3 及 pd 5 其 Trolox 當量的抗氧化 能力.....	70
圖十四、不同濃度 BHT 及 Vit. C 其 Trolox 當量的抗氧化能力	71
圖十五、不同濃度 DFF 萃取物、EDTA、BHT 及 Vit. C 的螯合鐵離子 之能力	73
圖十六、不同濃度 EDTA 的螯合亞鐵離子之能力	75
圖十七、不同濃度 DFF 萃取物、BHT 及 Vit. C 的還原能力	76
圖十八、在亞麻油酸乳化液系統中不同濃度 DFF 萃取物、Trolox、 BHT 及 Vit. C 之抗氧化能力.....	80

圖十九、在亞麻油酸乳化液系統中不同濃度 DFF 萃取物、Trolox、
BHT 及 Vit. C 之抗氧化能力82

附錄

	頁碼
附錄一、縮寫列表	100
附錄二、標準品溶液之高效能液相層析圖	101
附錄三、SDG、CA、FA 之標準品檢量線.....	102
附錄四、在 25-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 範圍內酚類化合物之標準品檢量線.....	103
附錄五、脫脂亞麻籽粉末萃取物之製備	104

壹、前言

近年來由於醫藥科技的發達、公共衛生的改善與進步，許多傳染性疾病逐漸減少，但一些慢性疾病，如心血管疾病、糖尿病、高血壓與惡性腫瘤等，其罹患率與死亡率皆有增加的趨勢。因此使得保健食品之研究與製造蓬勃發展，其中以亞麻籽之生理功效頗值得注意。亞麻籽除含大量之 ω -3 脂肪酸外，亦含有高量的植物木酚素(lignan)如 secoisolariciresinol diglycoside (SDG)，屬植物雌激素(phytoestrogen)，具有弱雌激素及抗雌激素之活性(Haggans *et al.*, 1999; Phipps *et al.*, 1993)，亦具有抗氧化(Kitts *et al.*, 1999)、抗癌(Jenab & Thompson, 1996; Li *et al.*, 1999)、預防動脈粥狀硬化(Prasad, 1997a)及延遲第二型糖尿病的發病(Prasad, 2001)等機能，其作用機制主要與 SDG 本身，及其在腸道中經微生物代謝後之產物，即 secoisolariciresinol (SECO)、enterodiol (END)及 enterolactone (ENL)等之作用有關。此外，亞麻籽中的酚類化合物也包含酚酸如 coumaric acid (CA)和 ferulic acid (FA)等，常與葡萄糖苷形成配醣體如 coumaric acid glucoside (CAG)和 ferulic acid glucoside (FAG)且以酯鏈的形式存在(Westcott & Muir, 1996)，具有抗氧化及抗癌等功能。

亞麻籽中的酚類化合物如 SDG、CAG 及 FAG 等，常以酯鏈的形式連結在一起而形成聚合物(Bakke & Klosterman, 1956; Klosterman & Smith, 1954; Klosterman *et al.*, 1955; Westcott & Muir, 1996; Kamal-Eldin *et al.*, 2001; Johnsson *et al.*, 2002)，因此若要將 SDG、CAG 及 FAG 等單體釋放出來，通常需經由鹼處理破壞之間的酯鏈(Eliasson

et al., 2003), 但鹼處理亦可能發生胺基酸消旋及產生 lysinoalanine 等毒素(Schwass & Finnley, 1984), 因此本研究期望能以溫和的處理方法如熱處理或酵素處理來取代鹼處理以釋出配醣體木酚素如 SDG 及酚類化合物等單體。

文獻報導指出去醣基木酚素 SECO 的抗氧化效力較 SDG 高(Prasad, 2000b), 而 SDG 為雙配醣體形式, 若要將 SECO 釋放出來需牽涉到醣苷鍵的水解, 通常是以 β -glucuronidase from *Helix pomatia* (type HP-2)來進行酵素的水解反應(Obermeyer *et al.*, 1995), 以去除其碳水化合物的部份, 然而此酵素價格昂貴, 因此本研究亦期望能篩選出適當的酵素來取代 HP-2, 將 SDG 去醣基轉換成 SECO, 以降低生產成本。

酚類化合物具有良好的抗氧化(Osawa, 1999)、抗突變(de Mejía *et al.*, 1999)及抗腫瘤(Soleas *et al.*, 2002)等特性, 其中以具有苯環及雙鍵結構的多酚類抗氧化活性最強, 當植物的多酚類含量越高, 清除自由基的能力就越強(Robak & Grygelewski, 1988)。木酚素SDG及SECO已被證實具有自由基清除能力及抑制脂質過氧化能力(Prasad, 1997b; Kitts *et al.*, 1999; Prasad, 2000b), 且酚酸CA及FA亦具有清除自由基之能力(Kanski *et al.*, 2002), 但是鮮有針對脫脂亞麻籽萃取物之抗氧化能力為主之研究, 因此本研究目的為利用不同的處理方法將脫脂亞麻籽粉末中的酚類化合物萃製出來, 並進一步比較其抗氧化能力, 期望藉由各項抗氧化力的測定推測其抗氧化作用機制。

貳、文獻回顧

一、亞麻籽簡介

(一) 形態、品種及分布

亞麻(flax)為一年生草本植物，高約40-70公分，其莖皮纖維長而韌，是很好的紡織原料，春、夏季開藍紫色或白色花，原產於歐洲、亞洲地區，目前世界上除炎熱赤道和極寒地帶外，廣大溫熱帶地區均可栽培。

亞麻籽(flaxseed)為亞麻科植物亞麻(*Linum usitatissimum* L.)的乾燥成熟種子，是加拿大及大陸西北地區特有之經濟作物，主要產區包括加拿大Saskatchewan與Manitoba兩個省，以及大陸甘肅、寧夏、青海、河北、山西、內蒙古、黑龍江和東北等地區。亞麻籽有兩種品種，分別為褐色亞麻籽及黃色亞麻籽。褐色亞麻籽富含 α -linolenic acid (ALA)；黃色亞麻籽又分成兩種，一種命名為Omega，其ALA含量與褐色亞麻籽類似，而另一種命名為Solin，其ALA含量較低。ALA屬於 ω -3系列的必需脂肪酸，具有抗發炎、抗血栓及抗心律不整等功效 (Simopoulos, 1999)。

本實驗以褐色亞麻籽為試驗材料，呈扁平卵圓形，長3.0–6.4mm，寬1.8–3.4 mm，厚0.5–1.6 mm (Freeman, 1995)，表面紅棕色或灰褐色，平滑有光澤，一端鈍圓，另端尖而略偏斜，種臍位於尖端凹陷處，種脊位於一側的邊緣，種皮薄，子葉黃白色，富油性，嚼之有豆腥味。中藥大典描述亞麻籽，性平味甘，主治潤燥、祛風，用於腸燥便秘、皮膚乾燥搔癢、毛髮枯萎脫落、癩瘋、暈眩等。

(二) 組成分及功能

亞麻籽富含油脂、蛋白質及膳食纖維。其化學成分分析中，油脂佔30–40%，蛋白質佔20–25%，膳食纖維佔20–28%，水分佔4–8%，而灰分佔3–4% (Bhatty, 1997; Coskuner & Karababa, 2007)。油脂中含大量的多元不飽和脂肪酸，特別是 α -次亞麻油酸及亞麻油酸，分別為 ω -3及 ω -6的必需脂肪酸，其含量分別佔總油脂的57%及16% (Daun & DeClercq, 1994)。蛋白質的胺基酸組成類似大豆蛋白(Friedman *et al.*, 1991; Oomah & Mazza, 1993)，有高含量的 arginine、glutamate/glutamine、aspartate/asparagines (Chung, 2005)，而富含 arginine 的食物具有預防心臟病等功效(Pszczola, 2000; Sugano & Beynen, 1990)。此外，NorMan品種的亞麻籽蛋白質，其lysine : arginine (L/A)比為0.33 (Chung, 2005)，而大豆蛋白及油菜籽蛋白其L/A比約為0.88 (Oomah & Mazza, 2000)。低L/A比的蛋白質與高L/A比的蛋白質比較，攝取前者具有較低的血脂及血管硬化風險(Czarnecki & Kritchevsky, 1992; Park & Liepa, 1982)。

亞麻籽殼中含2–7%黏液狀的可溶性纖維，具有降低高血糖及高膽固醇等功效(Rickard & Thompson, 1997)；且亞麻籽的多醣也具有營養價值，可以減少生活型態疾病之風險如糖尿病、心血管疾病、過胖等，亦可預防大腸及直腸癌(Kritchevsky, 1995; Mazza & Oomah, 1995)。此外，亦含有5–8%的亞麻籽膠，廣泛應用於食品及化工製藥業，因為它具有高保水性及高乳化性，較Tween 80、阿拉伯膠佳(BeMiller, 1973; Mazza & Biliaderis, 1989; Fedeniuk & Biliaderis, 1994; Cui *et al.*, 1996; Rebole *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006)。

亞麻籽中的植物化學物質主要包含游離態的酚酸、糖苷鍵的酚酸、類黃酮及木酚素等，所含的總酚酸含量約佔 0.8–1% (Oomah *et al.*, 1995)，其酚酸主要以酯鏈及糖苷鍵形式存在於聚合物中，研究報導指出這些聚合物經轉換釋放出的游離態酚酸，具有抗癌、抗微生物及抗氧化等功效。亞麻籽中總類黃酮約佔 0.049–0.087% (Oomah *et al.*, 1996)，然而最近的研究主要著重於它的木酚素，它屬於植物雌激素，同時具有弱雌激素活性和抗雌激素活性；木酚素的弱雌激素活性，約相當於 1/100 至 1/1000 的雌二醇活性。因為結構類似內源性雌激素 17 β -雌二醇，可藉由和雌激素受器的結合，而產生弱雌激素效應，內源性雌激素的分泌隨著年齡的增長會不斷減少，當體內缺乏雌激素時，木酚素能模擬雌激素的生理生化作用，與雌激素受器結合達到補充雌激素之目的(Haggans *et al.*, 1999; Phipps *et al.*, 1993)。另一方面，當體內雌激素失調含量過高時，木酚素對雌激素具有拮抗作用，與 17 β -雌二醇競爭結合至雌激素受器，若雌激素受器位置被較弱的植物雌激素佔據，那麼內源性雌激素就不能再被結合，使得 17 β -雌二醇不能產生激素效應，進而避免因雌激素對靶細胞的過度刺激而誘發癌細胞的發生，有助於體內的雌激素保持一個平衡的濃度(Orcheson *et al.*, 1998)，且木酚素亦具有預防心血管疾病及抗氧化能力等功效。在亞麻籽中主要的木酚素為 secoisolariciresinol diglycoside (SDG) (Bakke & Klosterman, 1956; Bambagiotti-Alberti *et al.*, 1994)，其含量是其他植物來源的數十至數百倍，脫脂亞麻籽粉末約含有 1–3% SDG (Johnsson *et al.*, 1991)。

(三) 應用

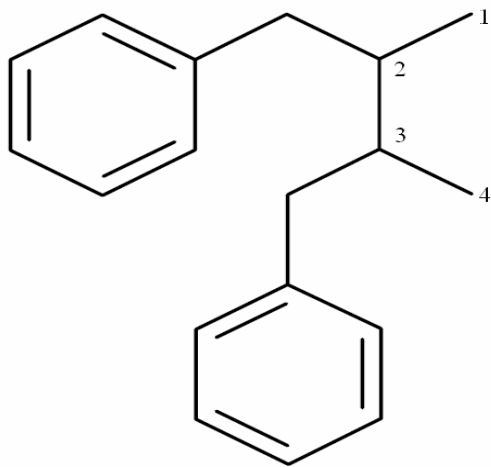
亞麻籽除含大量的 ω -3 必需脂肪酸外，且富含膳食纖維，亦含有多種機能性成分，如木酚素、酚酸等，因此亞麻籽廣範應用在烘培業、家畜飼料及寵物食品中，直接將亞麻籽添加到食品，或者添加到飼料或寵物食品中，從而提高動物產品的食用價值、維持動物健康及預防疾病等。美國食品及藥品管理局(FDA)已經表明不反對亞麻籽在食品裡的用量達 12% (Long, 1997)。目前已有亞麻籽木酚素萃取物的保健產品在販售，所標榜的木酚素濃度高達 20%。

二、亞麻籽中的木酚素及酚類化合物

(一) 木酚素之來源及結構

木酚素屬於雙酚類化合物(diphenolic compounds)，其結構是由二個肉桂酸殘基(cinnamic acid residues)結合形成的，基本的架構為 2,3-dibenzylbutane 如圖一。木酚素分為兩類，分別為植物木酚素(plant lignans)及哺乳類木酚素(mammalian lignans)。木酚素普遍存在於植物的根、莖、葉、種子及果實，在植物之主要作用為預防疾病與昆蟲害 (Ayres & Loike, 1990)，並與植物之生長調節有關，且他們擁有多種生物活性例如抗腫瘤、抗有絲分裂、抑制DNA及RNA的合成、抗病毒、抑制酵素活性、抗昆蟲、抗菌和防止黴菌生長等 (MacRae & Towers, 1984)。

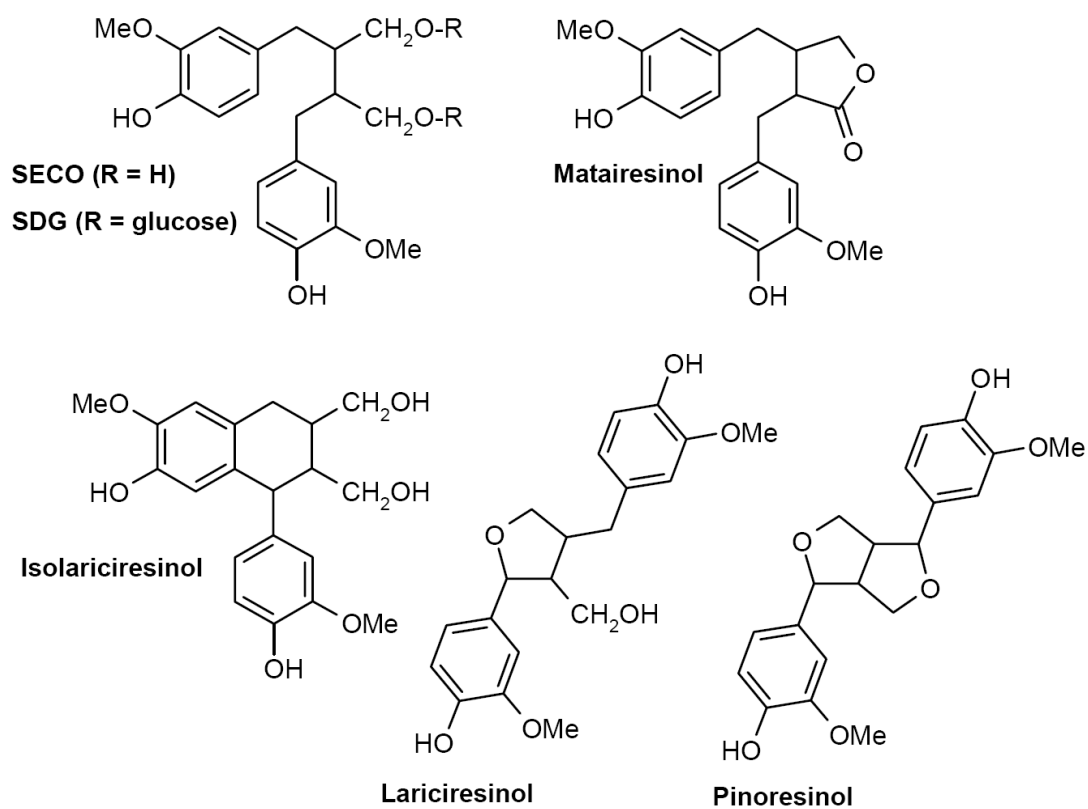
植物木酚素含量有很大的變異，主要受到品種、生長地區和栽種年份之影響，自然界中發現以亞麻籽含量最豐富，其主要的植物木酚素為SDG如圖二，含量為其他食品的數十至數百倍。在1956年，Bakke和Klosterman 從脫脂亞麻籽粕中分離出SDG約有3%的產量。相同的



2,3-dibenzylbutane

圖一、木酚素的基本架構。

Figure 1. The basic structure of lignans — 2,3-dibenzylbutane.



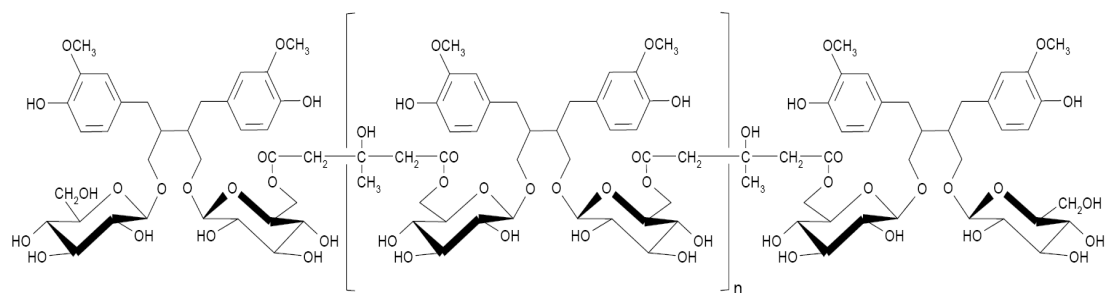
(adapted from Johnsson, 2004)

圖二、亞麻籽中之植物木酚素。

Figure 2. Plant lignans identified in flaxseed (demethoxy-SECO is missing one of the methyl groups).

團隊再透過酸水解將SDG轉換成secoisolariciresinol (SECO)，SECO是SDG的非醣基部分。SDG和SECO皆在280 nm有最大的紫外線吸光值，這是木酚素的特性之一。亞麻籽也含其他少量的木酚素如matairesinol (11 µg/g of full fat flaxseed)、isolariciresinol、lariciresinol和pinoresinol如圖二(Meagher *et al.*, 1999; Sicilia *et al.*, 2003)。文獻研究證實SDG大多以寡聚合物型態存在，SDG之間分別與3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMGA)形成酯鍵而連結在一起，一條直鏈寡聚合物的結構通常是由5個SDG及4個HMGA殘基相互連接組成的，其分子量約4000 Da 如圖三(Kamal-Eldin *et al.*, 2001)。

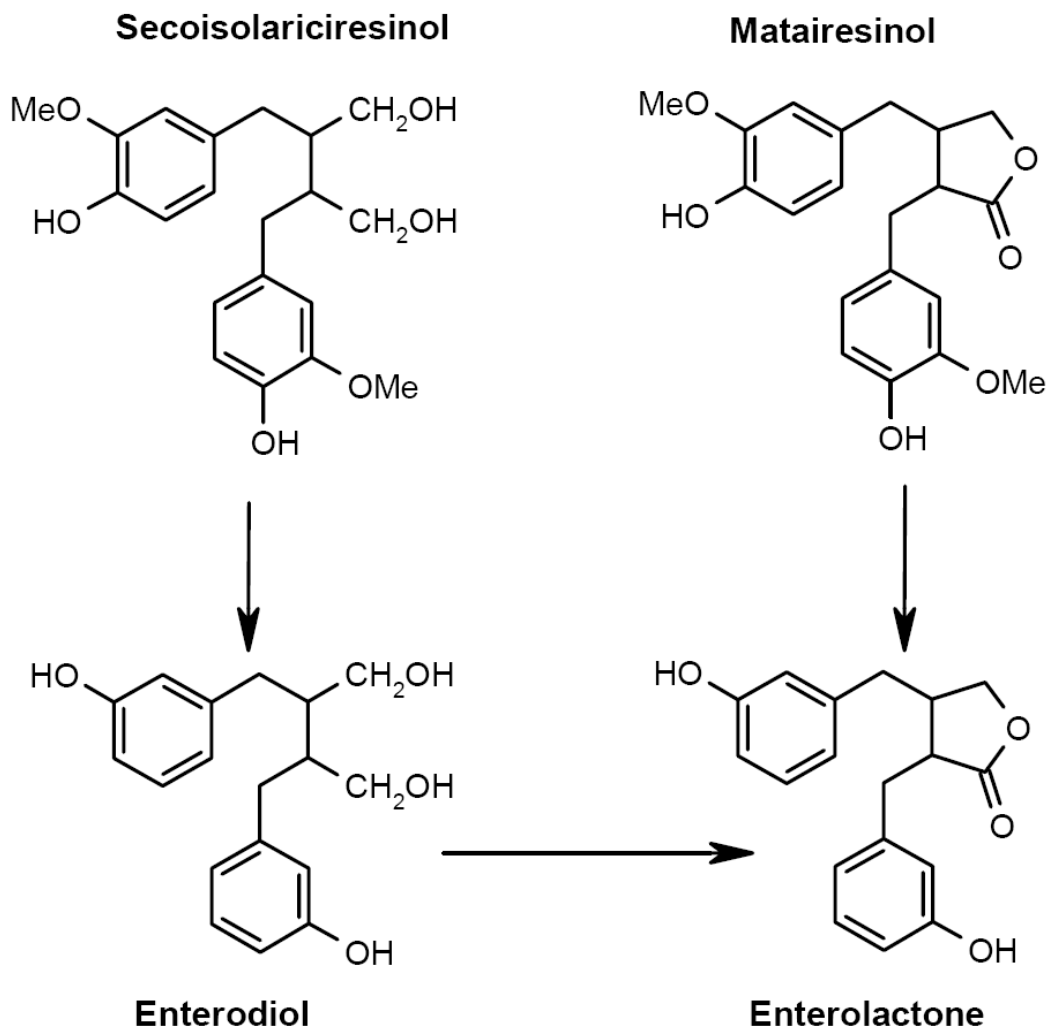
另一種為哺乳類木酚素，它們是在哺乳類動物的腸道裡形成的，未發現於天然植物中。在1980年代初期，enterodiol (END)和enterolactone (ENL)這兩種具有雌激素活性的哺乳類木酚素已經在人類和動物的尿液中被發現(Setchell *et al.*, 1979; Stitch *et al.*, 1980)。SDG、matairesinol (Axelson *et al.*, 1982a)、lariciresinol、pinoresinol (Heinonen *et al.*, 2001)及植物細胞壁裡的木質素(lignin) (Begum *et al.*, 2003)已被鑑定為哺乳類木酚素的前趨物。當植物木酚素SDG及matairesinol glycoside被人類攝取後，在胃腸道內會被微生物菌群代謝去除醣基而形成SECO及matairesinol，隨後再藉由微生物菌群所產生的酵素進行去氫氧基作用(dehydroxylation)和去甲基作用(demethylation)分別形成END及ENL，且END也可能直接進行不可逆的氧化作用形成ENL如圖四(Axelson & Setchell, 1981; Setchell *et al.*, 1981; Borriello *et al.*, 1985)。哺乳類木酚素不同於植物木酚素，在於其兩個芳香環的間位上以氫氧基取代植物木酚素的甲氧基，且對位不具



(adapted from Kamal-Eldin *et al.*, 2001)

圖三、亞麻籽木酚素寡聚合物的結構。

Figure 3. The structure of the flaxseed oligomer containing secoisolariciresinol diglycoside (SDG) and 3-hydroxy-3-methyl-glutaric acid units (HMGA) (average size, $n = 3$).



(adapted from Johnsson, 2004)

圖四、哺乳類木酚素前驅物 SDG 及 matairesinol 經由腸道微生物菌群轉換成 enterodiol 及 enterolactone。

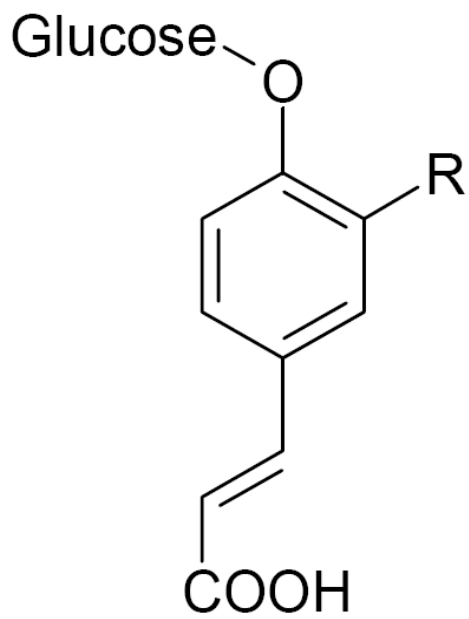
Figure 4. Conversion of mammalian lignan precursors SDG and matairesinol to enterodiol and enterolactone by the gut microflora.

有氫氧基。哺乳類木酚素之結構類似內源性雌激素17 β -雌二醇，可藉由和雌激素受器的結合，而產生弱雌激素活性和抗雌激素活性，因此可藉以調節細胞之生長或預防與雌激素有關之疾病。

(二) 亞麻籽中的其他酚類化合物

除木酚素外，亞麻籽亦含有游離態的酚酸、醣苷化的酚酸和類黃酮。Kozłowska *et al.* (1983)表示在亞麻籽中高比例的酚酸是以酯鏈鍵結的形式存在，因此使用 80% 甲醇萃取亞麻籽，所得的酯鏈鍵結之酚酸含量每公斤脫脂亞麻籽粉末(DFF)約含 320 mg，主要成分為 hydroxybenzoic acid、*trans*-ferulic acid 和 *trans*-*p*-coumaric acid；而游離態的酚酸約為 200–280 mg/kg DFF，主要是由 *trans*-sinapic acid、*cis*-sinapic acid、*o*-coumaric acid、*trans*-*p*-hydroxybenzoic acid、*trans*-*p*-coumaric acid 及 vanillic acid 組成，然而用此方法無法萃取出酚酸含量約為 70 mg/kg DFF。Dabrowski 和 Sosulski (1984)利用 tetrahydrofuran 來萃取脫脂亞麻籽時，無法萃取出游離態的酚酸。Harris 和 Haggerty (1993)指出在整個亞麻籽裡僅含 11 mg ferulic acid/kg DFF，這是因為他們沒使用鹼處理，所以無法偵測到含酯鏈鍵結的酚酸。文獻指出鹼處理可以切斷酯鏈釋放出大部分的酚酸，約 730 mg phenolic acids/kg DFF (89%的總酚酸)，主要為 *trans*-ferulic acid 和 *trans*-sinapic acid。Oomah *et al.* (1995)指出亞麻籽約含有 8000–10000 mg phenolic acids/kg DFF，其中的 48–66%為酯鏈鍵結的酚酸。

在亞麻籽裡的酚酸含量變異很大，主要是歸因於季節性的效應 (Oomah *et al.*, 1995)。*p*-coumaric acid、ferulic acid 及 caffeic acid 的配醣體如圖五已經在亞麻籽裡被發現 (Westcott & Muir, 1996; Eliasson *et*



(adapted from Johnsson, 2004)

圖五、Coumaric acid glucoside、ferulic acid glucoside 及 caffeic acid glucoside 之結構式。

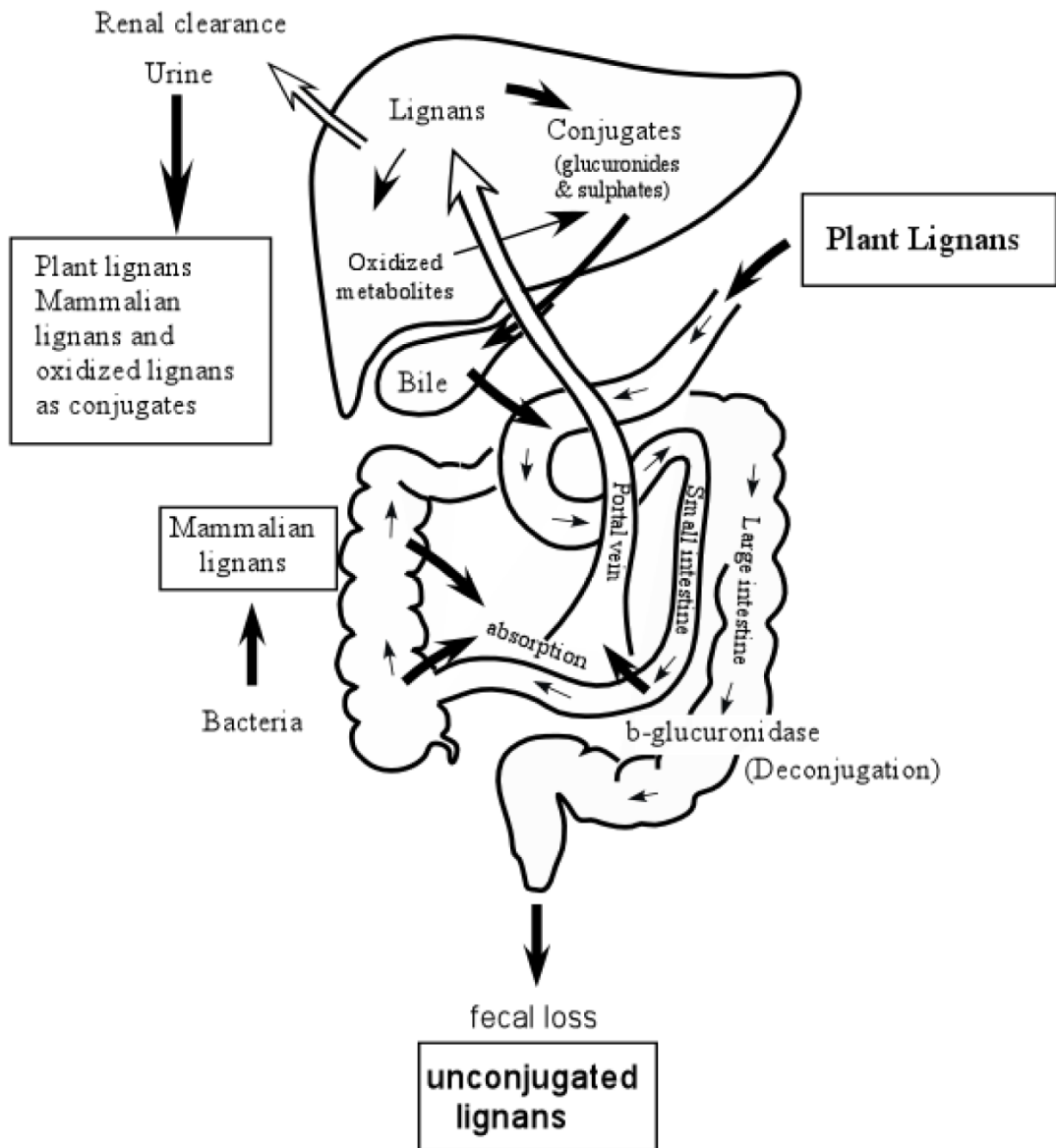
Figure 5. Structures of coumaric acid glucoside (R = H), ferulic acid glucoside (R = OMe), and caffeic acid glucoside (R = OH).

al., 2003)。上述的植物酚其功能可作為芳香族致癌物誘發的癌症阻斷劑或捕捉劑，且亦具有抗氧化能力。

(三) 木酚素的吸收及代謝

植物木酚素經人攝取後，木酚素的配醣體可透過胃酸來水解(Xu *et al.*, 1995)，或是透過小腸末端及大腸前端黏膜上的微生物菌群之醣苷酶(glycosidases)去除碳水化合物的部份，釋放出具生物活性的去醣基(aglycones)形式，然後再經由腸道的微生物菌群轉換成哺乳類木酚素END及ENL。一但在腸道裡產生END及ENL會迅速被吸收，運送至肝臟，並透過肝的第II階段酵素UDP-glucuronosyltransferases和sulfotransferases將END和ENL分別接合葡萄糖醛酸或硫酸(Axelsson & Setchell, 1980; Morton *et al.*, 1994; Adlercreutz *et al.*, 1993a)，有一部分會到達腎臟並且最終以接合(conjugated)的形式在尿液裡排泄出來，而其餘接合的木酚素會經歷腸肝循環(enterohepatic circulation)，由膽汁排泄回消化道，在小腸被重新吸收，然而未吸收的部分則會透過腸內菌之 β -glucuronidase作用轉變為去接合(deconjugated)的形式，然後在糞便裡被排遺出來(Axelsson & Setchell, 1980)。圖六為植物木酚素的腸肝循環路徑之示意圖。因此，在尿液裡萃取出木酚素主要是與葡萄糖醛酸苷(glucuronides)接合，大部分為單葡萄糖醛酸苷(monoglucuronides)形式，及少量雙葡萄糖醛酸苷(diglucuronides)和硫酸鹽形式(Axelsson *et al.*, 1982b; Bannwart *et al.*, 1984; Axelsson *et al.*, 1984; Axelsson & Setchell, 1980; Axelsson & Setchell, 1981)，而糞便裡90%以上為去接合形式的木酚素(Adlercreutz *et al.*, 1995)。

隨著亞麻籽攝取量的增加，哺乳類木酚素在尿和血液中的濃度顯



(adapted from Setchell *et al.*, 1982)

圖六、植物木酚素在人類體內的腸肝循環。

Figure 6. The enterohepatic circulation of plant lignans, their colonic and liver metabolites in humans.

著地增加(Lampe *et al.*, 1994; Nesbitt *et al.*, 1999)。更年期婦女每天攝取5 g或10 g亞麻籽，結果顯示尿液中的END排泄量分別為1.01和2.87 $\mu\text{mol}/\text{day}$ ，而尿液中的ENL排泄量為21.24和52.83 $\mu\text{mol}/\text{day}$ (Hutchins *et al.*, 2000)。每天餵食老鼠1.5 mg的SDG，其血液中的END及ENL濃度約為1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (Orcheson *et al.*, 1998)。而人每日每公斤體重攝取1.5 μmol SDG，其血液中的END及ENL濃度亦約為1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (Kuijsten *et al.*, 2005)。

(四) 木酚素促進健康的可能機制

木酚素之健康益處，包括癌症化學預防(Jenab & Thompson, 1996; Li *et al.*, 1999)、抗氧化(Kitts *et al.*, 1999)、改善高膽固醇症(Jenkins *et al.*, 1999)、延遲第二型糖尿病的發病(Prasad, 2001)、抗血栓(Sano *et al.*, 2003)和抗血管粥狀化的效果(Prasad, 1997a)等。

在降低慢性疾病的危險中，特別是荷爾蒙有關的癌症，例如乳癌和前列腺癌，木酚素扮演著重要的角色。在動物研究中，食用亞麻籽的老鼠其乳癌細胞生長減慢，且擴散亦明顯下降(Dabrosan *et al.*, 2002)。在臨床實驗中，證實患有乳癌的女病患，每日食用含25 g亞麻籽的鬆餅，持續5週半，其乳癌細胞擴散及生長皆明顯的降低(Chen *et al.*, 2004)。前列腺癌與乳癌一樣，亦是由體內荷爾蒙刺激而誘發，前列腺腫瘤是受男性荷爾蒙睪丸激素及它的代謝物二氫睪丸酮影響而產生(Denis *et al.*, 1999)。在動物研究中，發現亞麻籽能阻礙前列腺癌細胞的生長；餵食亞麻籽的老鼠，其前列腺癌細胞死亡率增加，且癌細胞的擴散也減少(Lin *et al.*, 2002)，另一項體外測試亦證明亞麻籽中木酚素SDG能抑制前列腺癌細胞的生長(Lin *et al.*, 2001)。此外，在結

腸癌的流行病學研究裡，證實血液中高濃度的木酚素代謝物與結腸癌的危險大幅降低有關(Kuijsten *et al.*, 2006)。將老鼠注射致癌藥物，然後餵食亞麻籽4週，發現體內的異常腺窩(Aberrant Crypts)較未食用亞麻籽組明顯地降低，而癌細胞的擴散亦有減少，異常腺窩在體內的含量，被認為是結腸癌的前期指標(Thompson, 1998; Jenab & Thompson, 1996)。在體外測試中，亦證實哺乳類木酚素能抑制人體的結腸癌症細胞的生長，且ENL的效果比END高出兩倍(Sung *et al.*, 1998)。

亞麻籽木酚素亦具有降低高膽固醇動脈粥狀硬化、預防心血管疾病及延遲糖尿病發病等益處。每日餵食紐西蘭公兔含SDG (15 mg/kg body weight)的食物持續8週，可降低其高膽固醇動脈粥狀硬化的發展，減少35% LDL膽固醇及64% LDL/HDL之比值(Prasad, 1999)。也有文獻指出含2–3% α -次亞麻油酸的亞麻籽(7.5 g/kg daily)可以使兔子降低46%動脈粥狀硬化的發生(Prasad *et al.*, 1996)。於飲水中添加SDG (22 mg/kg body weight)的老鼠餵食實驗，其結果顯示在易發糖尿病的老鼠裡可以降低71%第一型糖尿病的形成(Prasad, 2000a)；同樣地讓Zucker糖尿病肥胖母鼠每日攝食SDG (40 mg/kg body weight)，亦可以降低75%第二型糖尿病的形成(Prasad, 2001)。

亞麻籽木酚素的健康益處可能歸因於其類雌激素和抗氧化活性。在癌症化學預防上，主要是來自於END及ENL這兩種哺乳類木酚素，其化學結構與雌二醇類似，因此均具有弱雌激素活性及抗雌激素活性，能增加性荷爾蒙結合球蛋白(SHBG)的量，使SHBG能鍵結較大量之內源性游離雌激素，而降低誘導細胞癌化所需雌激素量，因此可抑制癌細胞之生成(Adlercreutz *et al.*, 1992; Wang, 2002)，END和ENL

亦具有抑制人類雌激素合成酵素(aromatase)活性之潛力(Adlercreutz *et al.*, 1993b; Wang *et al.*, 1994)，除此之外，SDG會降低血漿中第一型類胰島素生長因子(plasma insulin-like growth factor I)，因而降低癌症之發展(Rickard *et al.*, 2000)。

木酚素屬於酚類化合物，因此具有自由基清除能力之特性，可以預防心血管疾病、延遲糖尿病發病及影響癌症的發生等。Amarowicz *et al.* (1993)証實亞麻籽乙醇粗萃物在亞麻油酸乳化液系統中具有預防脂質過氧化之能力。Prasad (1997b)探討亞麻籽中木酚素SDG之抗氧化力，證實SDG具有氫氧自由基($\cdot\text{OH}$)捕捉能力且有濃度依賴性，在36.4–2912 μM 之SDG濃度下，其氫氧自由基捕捉能力為4–82%。Kitts *et al.* (1999)分別探討10 μM 及100 μM 的SDG、END及ENL之抗氧化力，結果顯示在亞麻油酸乳化液系統中SDG、END及ENL皆顯著地抑制脂質過氧化，於100 μM 時抑制率分別為58.7%、55.2%及39%；然而在氫氧自由基捕捉能力，結果顯示END及ENL之抗氧化能力皆較SDG強。Prasad (2000b)利用酵母聚醣(zymosan)活化的多核型白血球之化學發光(PMNL-CL)來探討SDG、SECO、END及ENL之抗氧化能力，結果顯示SDG及其所衍生的代謝物皆具有抗氧化能力且較維生素E高，其中SECO和END的抗氧化效力最高，其次為ENL，而SDG最低。Prasad (2005)指出木酚素複合物含34–37% SDG、15–21% cinnamic acid glucoside及9.6–11% HMGA具有降低膽固醇之效果，這是因為SDG及cinnamic acid glucoside具有抗氧化性，且HMGA具有降低血脂之作用(Lupien *et al.*, 1979; Padova *et al.*, 1982; Niekerk *et al.*, 1984)。

三、脫脂亞麻籽萃取物之製備

不同的萃取及水解方法導致木酚素的產量有很大的變異。文獻研究證實 SDG 大多以寡聚合物型態存在，SDG 之間分別與 HMGA 形成酯鍵而連結在一起(圖三)。Bakke 和 Klosterman (1956)最早以 95% ethanol 及 1,4-dioxane 萃取出亞麻籽寡聚合物，隨後亦有文獻利用乙醇水溶液(65–75% ethanol) (Westcott & Muir, 1996; Heintzman *et al.*, 2003; Shukla *et al.*, 2003) 或甲醇水溶液(70% methanol)萃取出亞麻籽寡聚合物(Degenhardt *et al.*, 2002; Charlet *et al.*, 2002)，此外，在美國專利中也有利用丙酮及水將亞麻籽寡聚合物萃取出(Dobbins *et al.*, 2003)，其中以乙醇水溶液進行萃取所得的產量較高。因此，本研究參考 Shukla *et al.* (2003)之方法，利用 70%乙醇水溶液萃取脫脂亞麻籽粉末，所得到的脫脂亞麻籽乙醇萃取物定義為產品 2，簡稱 pd 2，主要組成為寡聚合物。

但是利用有機溶劑萃取並無法獲得 SDG 單體，因此需再經由鹼水解(Muir & Westcott, 1996; Charlet *et al.*, 2002) 或利用甲氧基鈉(sodium methoxide)進行甲醇分解作用(methanolysis)，破壞 SDG 與 HMGA 之間的酯鍵，釋放出 SDG 單體(Rickard *et al.*, 1996; Schwartz & Sontag, 2006)。Eliasson *et al.* (2003)利用兩種方法來萃取 SDG 及其他酚類化合物，分別為先用 dioxane–ethanol 萃取後再作鹼水解或是直接進行鹼水解，結果顯示直接鹼水解可得到較高量的 SDG。因此，本研究參考直接鹼水解法，利用 NaOH 來水解脫脂亞麻籽粉末，所得到的脫脂亞麻籽鹼萃取物定義為產品 3，簡稱 pd 3，其組成以配醣體酚類化合物為主如 CAG、FAG 和 SDG。此外，本研究也利用酵素處理

或熱處理方法來取代鹼液水解以釋出 SDG，但酵素處理的 SDG 釋放率較低，因此本研究以熱處理方法來取代鹼液水解以釋出 SDG。利用熱處理方法製備出脫脂亞麻籽熱處理產物定義為產品 4，簡稱 pd 4。

但 SDG 仍為雙配醣體形式，因此若要將 SECO 釋放出來需牽涉到醣苷鍵的水解，通常是利用酵素(β -glucuronidase from *Helix pomatia*) (Obermeyer *et al.*, 1995)或在高溫下進行酸水解(Mazur *et al.*, 1996; Mazur & Adlercruetz, 1998; Liggins *et al.*, 2000)去除碳水化合物的部份。然而 β -glucuronidase 價格昂貴且酸水解易產生有毒物質，因此本研究利用其他商業酵素來取代 β -glucuronidase，水解亞麻籽以釋出不含醣基的酚類化合物如 CA、FA 和 SECO，定義為產品 5，簡稱 pd 5。

也有文獻利用微生物發酵代謝及轉換出哺乳類木酚素 END 及 ENL。Thompson *et al.* (1991)以間接的體外發酵法模擬腸道內發酵，將不同食物的植物木酚素轉換成哺乳類木酚素 END 及 ENL，隨後用氣相層析質譜儀(GC-MS)及火焰離子偵測器來分析及定量 END 及 ENL，然而這種方法必須倚賴多種腸道厭氧菌的存在且很難維持相同的發酵條件，因此無法廣泛地被應用。

四、木酚素及其他酚酸之分析方法

木酚素和酚酸在紫外線區內皆有吸收光，因此目前的分析常以 HPLC 來偵測及定量，常使用的管柱為逆相管柱如 RP-C18 (Obermeyer *et al.*, 1995; Westcott & Muir, 1996; Johnson *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Charlet *et al.*, 2002; Saarinen *et al.*, 2002; Eliasson *et al.*, 2003; Nurmi *et al.*, 2003; Smeds *et al.*, 2004; Knust *et al.*, 2006; Smeds *et al.*, 2006; Schwartz & Sontag, 2006)。且也有利用 GC 來偵測及定量，其靈

敏度較HPLC佳，但是大多數木酚素至少含一個氫氧基團，因此需透過衍生化來增加其揮發性，常以trimethylsilyl (TMS) ether來進行衍生化(Thompson *et al.*, 1991; Mazur *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1997; Mazur *et al.*, 1998; Mazur & Adlercruetz, 1998; Liggins *et al.*, 2000; Bowey *et al.*, 2003)。因此，本研究參考 Eliasson *et al.* (2003)的方法，以HPLC法來偵測及定量木酚素及其他酚類化合物的含量。

五、抗氧化之評估

(一) 自由基、活性氧及活性氮對生物體之影響

自由基(free radical)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)及活性氮(reactive nitrogen species, RNS)已被公認在許多疾病、癌症與老化的發生過程中，扮演相當重要的角色(Cayuella-Martinez, 1995; Bergendi *et al.*, 1999)。自由基為含有一個或多個不成對電子的原子或分子(Halliwell & Gutteridge, 1989a)，化性大部分處於極不穩定的狀態，反應性較其他分子高，會搶奪鄰近分子的電子形成電子對，使其達到穩定的狀態，相反的被搶奪電子的分子則會變得不穩定，若又具有高度的反應性則會造成連鎖反應(chain reaction)，促使更多自由基的產生(Halliwell, 1994)。活性氧則是反應性較強的含氧分子，泛指含氧的自由基與非自由基。非自由基分子受到氧化作用時，會快速轉變成自由基。活性氧包括超氧陰離子自由基(superoxide anion radical, $O_2^{\cdot-}$)、單重態氧(singlet oxygen, 1O_2)、羥自由基(hydroxyl radical, $\cdot OH$)、過氧化自由基(peroxy radical, $ROO\cdot$)、烷氧自由基(alkoxyl radical, $RO\cdot$)及過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)等(Halliwell *et al.*, 1995)。活性氮包括一氧化氮(nitric oxide, $NO\cdot$)、二氧化氮(nitric oxide, $NO_2\cdot$)等自由基與

HN₂、N₂O₃、ONOO⁻等非自由基的分子(Halliwell *et al.*, 1995)。

在多種自由基與活性氧中，羥自由基($\cdot\text{OH}$)反應性最高，反應速率為 $10^{9-10} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ，因此極容易與食品及生物體分子反應，引起DNA斷裂及細胞氧化損傷等現象(Halliwell & Gutteridge, 1990)。超氧陰離子是生物體中含量最多的自由基，其活性很強，但是半衰期短，不穩定性高，易轉變成過氧化氫及水，所以很少直接造成生物體嚴重的氧化傷害，但因其本身具有氧化還原的能力，容易轉變成其他毒性較高的產物，如 $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ 、 H_2O_2 ，或是與NO \cdot 生成peroxynitrite (ONOO⁻)，因而增強了生物體的傷害程度(Halliwell & Gutteridge, 1990)。過氧化氫是生物體內多種造成氧化壓力物質的中間產物，其活性雖然不強，但是半衰期長，可以穿過生物體的細胞膜進入細胞內，且與過渡金屬作用，轉變為毒性極強的羥自由基，因而對細胞造成氧化傷害(Martinez-Cayuela, 1995)。另外，經由光敏感反應(photo-sensitization reaction)，或臭氧及蛋白質等分子作用，形成活性極強的單重態氧。單重態氧容易與其他分子如蛋白質、多元不飽和脂肪酸等結合，或與氫原子反應而產生自由基，造成脂質的過氧化傷害(Halliwell & Gutteridge, 1989b)。由於自由基反應性極高，可與胞器產生反應，導致細胞的變性、損傷及基因突變或死亡，而引起組織器官的病變。因此許多報告均指出自由基與許多疾病的發生有極為密切的關係，如心血管疾病、癌症、白內障、紅斑性狼瘡及免疫系統失調等(Gutteridge & Halliwell, 1994; Martinez-Cayuela, 1995)。

(二) 抗氧化劑之作用機制

Maxwell (1995)指出抗氧化劑為一種在低濃度下能有效抑制氧化

速率的物質。抗氧化劑可以延緩自氧化之起始期(initiation phase)或抑制增殖期(propagation)，但不能阻止氧化的產生(Bonorden & Pariza, 1994)。最理想的抗氧化劑可由溫和的還原劑使它再生或是自身氧化還原(disproportionation)到其原來的抗氧化劑形式(郭，1995)。此外，凡可保護生物體內基質對抗或延遲氧化傷害的化合物也稱為抗氧化劑。而這裡所稱的基質不單指脂質，也包括任何自由基或活性氧所能攻擊的目標，如蛋白質、DNA 或細胞內分子等。

抗氧化劑之作用機制，可分為：

1. 自由基抑制劑 (free radical inhibitor)

主要提供電子或氫原子給自由基，如酚類化合物、butylated hydroxyanisole (BHA)、butylated hydroxytoluene (BHT)、propyl gallates (PG) 及生育醇 (α -tocopherol) 等，屬於一級抗氧化劑(primary antioxidants) (Labuza, 1971; Shahidi & Wanasundara, 1992; Giese, 1996)。

2. 還原劑或氧清除劑 (oxygens scavenger)

主要在於捕捉氧原子，提供還原狀態的環境或還原已氧化的過氧化物，減緩氧化進行，如核黃素(riboflavin)及抗壞血酸等(拱，1997)。

3. 金屬螯合劑 (metal chelator)

此種物質本身不具抗氧化功能，但因其結構上有一未共用電子對，能與促氧化過渡金屬(Fe^{2+} 、 Cu^{2+})結合，形成穩定的化合物而抑制油脂的自氧化反應及延緩氧化反應之進行，如檸檬酸、聚磷酸鹽及 EDTA 等，可輔助抗氧化劑，使其效果更佳(Kochnar & Rossel, 1990)。

4. 單重態氧抑制劑 (singlet oxygen inhibitor)

能吸收光敏感劑所釋放的過多能量，使單重態氧恢復成反應性較低的三重態氧型態，如 β -carotene 和 triethylamine (Kellogg & Fridovich, 1975; Bando *et al.*, 2004)。

5. 過氧化分解劑 (peroxide decomposer)

又稱二級抗氧化劑(secondary antioxidant)，其作用機制為將脂質過氧化物分解成安定的終止產物，如 dilauryl thiopropionate 和 thiodipropionic acid (Kochnar & Rossel, 1990)。

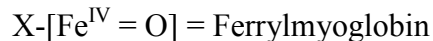
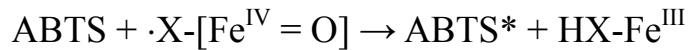
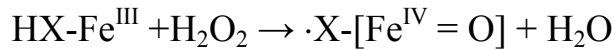
(三) 抗氧化活性之測定

抗氧化活性之評估，一般可分為體外及體內試驗，體內試驗較具說服力與代表性，但所耗的時間及成本皆高於體外試驗。因此欲評估樣品是否有抗氧化活性應先從體外試驗著手，有良好的抗氧化活性再進行體內試驗。鑒於前述的 5 種抗氧化機制，本研究利用 TEAC 法及硫氰酸鐵法來評估樣品是否為自由基抑制劑，能提供電子或氫原子給自由基或是減緩脂質自氧化反應之進行。也利用螯合亞鐵離子能力之測定法來評估樣品是否為金屬螯合劑，及還原力之測定來評估樣品是否為還原劑。此外，亦評估樣品是否具有清除氫氧自由基($\cdot\text{OH}$)及超氧陰離子自由基($\text{O}_2\cdot^-$)之能力。

1. Trolox 當量抗氧化能力(TEAC)之測定

利用 2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenthiazoline sulfonic acid] (ABTS) 與 H_2O_2 及 peroxidase 反應，來誘導 ABTS 產生藍綠色的陽離子自由基 ($\text{ABTS}^{\cdot+}$)，於波長 734 nm 有吸收波峰。樣品若具有抗氧化能力，它的加入會抑制此顏色的產生，因此吸光值愈低，抗氧化效果愈佳。以

不同濃度的 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic acid (Trolox) 做成檢量線，換算出樣品清除的能力相當於多少 μM 濃度的 Trolox 清除能力，此即為樣品的 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)。



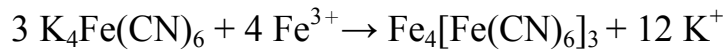
2. 螯合亞鐵離子能力之測定

金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要因素，藉由氧化還原循環(redox cycle)反應，僅需少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並加速脂質氧化的進行(Gordon, 1990)。在多種金屬離子中， Fe^{2+} 經常是最具影響力的助氧化劑，會促進脂質氧化作用的進行(Yamaguchi *et al.*, 1988)。利用 Fe^{2+} 與 ferrozine 的複合物呈色反應，可測得樣品對 Fe^{2+} 離子的螯合能力，若樣品具有螯合 Fe^{2+} 離子時，可減少該複合物的生成或降低呈色造成 562 nm 吸光值的降低。



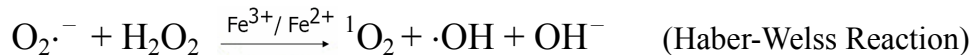
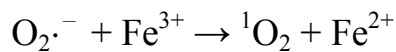
3. 還原力之測定

利用普魯士藍(prussian blue; $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)的生成量作為樣品還原過氧化物的能力，進而分析樣品的抗氧化性效果。其原理是藉由赤血鹽(potassium ferricyanide; $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)還原成黃血鹽($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$)，黃血鹽再和 Fe^{3+} 作用形成普魯士藍，在700 nm波長測定吸光值，以檢測普魯士藍之生成量，作為樣品的還原力評估，吸光值愈高，表示樣品還原力愈強。



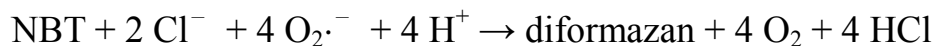
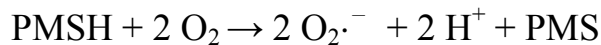
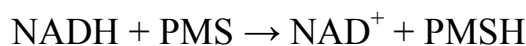
4. 氫氧自由基清除能力之測定

在微量金屬離子存在下誘導 Fenton reaction 產生氫氧自由基，然後間接誘發去氧核糖的氧化，氧化的去氧核糖會與 2-thiobarbituric acid (TBA)反應產生 TBA 活性發光團，在 532 nm 可偵測到；吸光值愈低，表示樣品之氫氧自由基清除能力愈強。



5. 超氧陰離子(SOD-like)清除能力之測定

利用非酵素系統來產生超氧陰離子($\text{O}_2\cdot^-$)，再以 nitro blue tetrazolium (NBT)來檢測樣品清除超氧陰離子之能力。在非酵素系統中 phenazine methosulphate (PMS)與 NADH 作用會產生超氧陰離子，進一步以 NBT 還原成 diformazan，此化合物在 560 nm 有最大吸收波峰，故可藉由測定 560 nm 處吸光值的變化，得知超氧陰離子的產生量。倘若所添加的樣品能使吸光值下降，則表示其具有清除超氧陰離子之能力。



(Yellow)

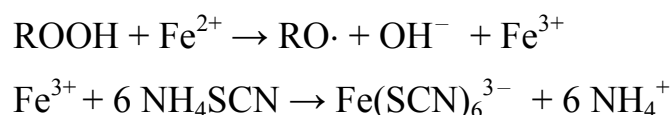
(Blue)

** PMS = phenazine methosulphate

NBT = nitro blue tetrazolium

6. 抑制脂質氫過氧化物生成之測定

抑制脂質過氧化率之測定是採用硫氰酸鐵法(ferric thiocyanate method)，以評估樣品之抗氧化性，其原理是利用脂質氧化初期生成高能的氫過氧化物，將 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} ， Fe^{3+} 又會與 SCN^- 反應而生成紅色的硫氰酸鐵錯合物 $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$ ，此錯合物於 500 nm 波長有最大吸收波峰。當脂質氧化程度越高，氫過氧化物亦生成越多，呈色也跟著加深。因此，藉由測量 500 nm 波長處的吸光值大小，便可得知樣品的抗氧化性。



(四) 天然抗氧化劑 (natural antioxidants)

研究報告顯示，體外抗氧化成分的補充是減少氧化傷害最有效的方法(Cutler, 1991)。因此若是能直接由飲食中攝取對生物體無毒性傷害、具有降低胞內活性氧、減緩細胞脂質氧化及預防 DNA 損害等抗氧化的食品成分，將可減少人體病變發生的機率，達到預防疾病的保健能力。天然食品中最常見的抗氧化成分有抗壞血酸、生育醇、 β -胡蘿蔔素以及酚類化合物。其中，酚類化合物具有多種生理功能性，包括抗氧化、抗癌、抗腫瘤、抗微生物、抗病毒以及降低心血管疾病的機能等。亞麻籽含豐富的酚類化合物如木酚素、酚酸等，文獻證實皆具有抗氧化的潛力。因此本研究將利用前述的這些測定方法來評估不同處理方法所製備的脫脂亞麻籽萃取物之抗氧化能力，期望藉由各項抗氧化力的多寡推測其抗氧化作用機制。

參、材料與方法

一、實驗材料與藥品

美國有機褐色亞麻籽購自於東霖洋行，以磨粉機磨碎成粉末，並通過 0.5 mm 的篩網收集，所獲得亞麻籽粉末再經由正己烷脫脂，為脫脂亞麻籽粉末，置於-20°C 下保存備用。

分析用的標準品 secoisolariciresinol diglucoside (SDG) 純度約 90.8% (HPLC Grade)，購自美國 CHROMADDEX 公司 (Santa Ana, USA)。secoisolariciresinol (SECO) 純度大於 95.0% (HPLC Grade)、*p*-coumaric acid (CA) 純度大於 98.0% (HPLC Grade) 及 ferulic acid (FA) 純度大於 99.0% (HPLC Grade)，購自瑞士 Fluka 公司 (Buchs, Switzerland)。

其它試藥及溶劑 linoleic acid、ammonium thiocyanate (NH₄SCN)、peroxidase、3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt (ferrozine)、2,2'-azino-bis(3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)、phenazine methosulphate (PMS)、β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)、nitro blue tetrazolium (NBT)、L-ascorbic acid、ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA-Na₂)、2-thiobarbituric acid (TBA)、polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20) 及 butylated hydroxytoluene (BHT) 購自美國 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。sodium carbonate (Na₂CO₃)、hydrogen peroxide (H₂O₂, 30%)、trichloroacetic acid (TCA)、potassium hexacyanoferrate (III) (K₃Fe(CN)₆)、sodium acetate trihydrate (CH₃COONa·3H₂O) 購自德國

Riedel-de Haën 公司(Seelze, Germany) 。 gallic acid 及 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 購自瑞士 Fluka 公司 (Buchs, Switzerland) 。 2-deoxy-D-ribose 及 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic acid (Trolox)購自美國 Aldrich 化學公司 (Milwaukee, WI, USA) 。 sodium hydroxide (NaOH) 及 boric acid (H_3BO_3)購自西班牙 Panreac Quimica S.A.公司(Barcelona, Spain) 。 sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)購自 J.T. Baker 公司 (USA) 。 ferric chloride ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 購自日本片山試藥株式會社 (Osaka, Japan) 。 iron (II) chloride tetrahydrate ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)購自日本林純藥工業株式會社 (Osaka, Japan) 。 methyl alcohol (CH_3OH , HPLC Grade)購自 Mallinckrodt 公司 (USA) 。 acetonitrile (CH_3CN , HPLC Grade)購自德國默克公司 (Darmstadt, Germany) 。 95% 乙醇(ethanol)購自康芙貿易行 。 glacial acetic acid (CH_3COOH)、sulfuric acid (H_2SO_4)及 hydrochloric acid (HCl) 購自台灣聯工化學廠股份有限公司 (Taiwan) 。 n-hexane (C_6H_{14} , HPLC Grade)購自美國 TEDIA (USA) 。

水解亞麻籽所需之商業酵素 Bakezyme L 40 BG、Bakezyme PH800 及 Lipopan™ 50 BG 購自台灣韋冠實業有限公司。商業酵素 En 4、En 5、En 6、En 7 及 En 8 購自 NOVO Industry A/S (Copenhagen, Denmark) 。 En 1 (β -glucuronidase from *Escherichia coli*, EC 3.2.1.31) 、 En 2 (β -glucosidase from almonds, EC 3.2.1.21) 、 En 3 (α -glucosidase from bakers yeast, EC 3.2.1.20) 、 β -glucuronidase/sulfatase (type H-2 from *Helix pomatia*, EC 3.2.1.31) 、 β -glucuronidase/sulfatase (type HP-2 from *Helix pomatia*, EC 3.2.1.31)及 esterase (from porcine Liver, EC

3.1.1.1)購自美國 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。

二、儀器設備

(一) 脫脂所需之儀器設備

磨粉機：RT-08，台灣榮聰精密科技有限公司。

往復式震盪恆溫水浴槽：SB-302，台灣雙鷹企業股份有限公司。

5L 凹溝三角錐型瓶：購自台灣慶發玻璃儀器商行。

分析篩網(35 mesh; 0.5 mm)：Bunsekifurui, Kuang Yang, Taiwan。

(二) 萃取及水解脫脂亞麻籽粉末所需之儀器設備

電子天平：B120S, Sartorius, Germany。

振盪器(Vortex-mixer)：Type 37600, Thermolyne, USA。

pH meter：pH 213, HANNA, USA。

恆溫水浴槽：B206-T1, Firstek, Taiwan。

200 mL 雙層(jacked)玻璃反應槽：購自台灣慶發玻璃儀器商行。

高速冷凍離心機：CF 15R, Hitachi, Japan。

減壓濃縮機：RE111, Büchi, Switzerland。

恆溫冷卻循環裝置：B403, Firstek, Taiwan。

水流抽氣幫浦：A-3S, Eyela, Japan。

超音波洗淨機：Power sonic 420, Hwashin, Korea。

冷凍乾燥機：FD-5N, Eyela, Japan。

(三) 高效能液相層析儀 (HPLC)

HPLC 用幫浦(HPLC pump)：LC-10AT, Shimadzu, Japan。

線上除氣裝置(On-line degasser)：DG-4400, Phenomenex, USA。

樣品自動注射器(Autoinjector)：SIL-9A, Shimadzu, Japan。

光電二極體陣列檢測器(Prominence diode array detector)：

SPD-M20A, Shimadzu, Japan。

資料處理(Data processor)：Class-VP chromatography data system,
Shimadzu, Japan。

分析管柱(Analytical column)：Luna 5 μ C18(2) column (250 \times 4.6
mm), Phenomenex, USA。

(四) 總酚類化合物含量及抗氧化性測定所需之儀器設備

振盪恆溫培養箱：S300, Firstek, Taiwan。

分光光度計：Cary 50Conc., Varian, USA。

三、實驗方法

(一) 脫脂亞麻籽粉末的製備

秤取 3 kg 褐色亞麻籽置於-80°C 冷凍冰箱中，24 小時後取出，以磨碎機磨碎成粉末，然後將磨碎的褐色亞麻籽粉末倒入 0.5 mm 篩網中過篩，過篩的褐色亞麻籽粉末秤重後，置於-80°C 冷凍冰箱中保存備用，並計算樣品之產率。

從-80°C 冷凍冰箱中每次秤取 500 g 褐色亞麻籽粉末，置於 5 L 凹溝三角錐型瓶中，加入 5 倍之 n-hexane (v/w)，於震盪恆溫水浴槽中室溫攪拌 1 小時，轉速為 125 rpm，進行油脂萃取，攪拌 1 小時後，進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000 \times g 離心 15 分鐘，取下層物再倒回凹溝三角錐型瓶中，依上述步驟再加入同量之 n-hexane 攪拌、油脂萃取、離心，重覆三次的萃取及離心動作後，將粉末置於抽風櫃去除 n-hexane，之後再以真空熱風乾燥機進行乾燥，40°C 下乾燥 5 小時，乾燥後秤重，所得的樣品為脫脂亞麻籽粉末(defatted flaxseed flour,

DFF)，置於-20°C 冷凍冰箱中保存備用，並計算樣品之產率。

(二) DFF 萃取物的製備

DFF 萃取物的製備流程如圖七，將分述如下：

1. 水溶性萃取物 (pd 1)

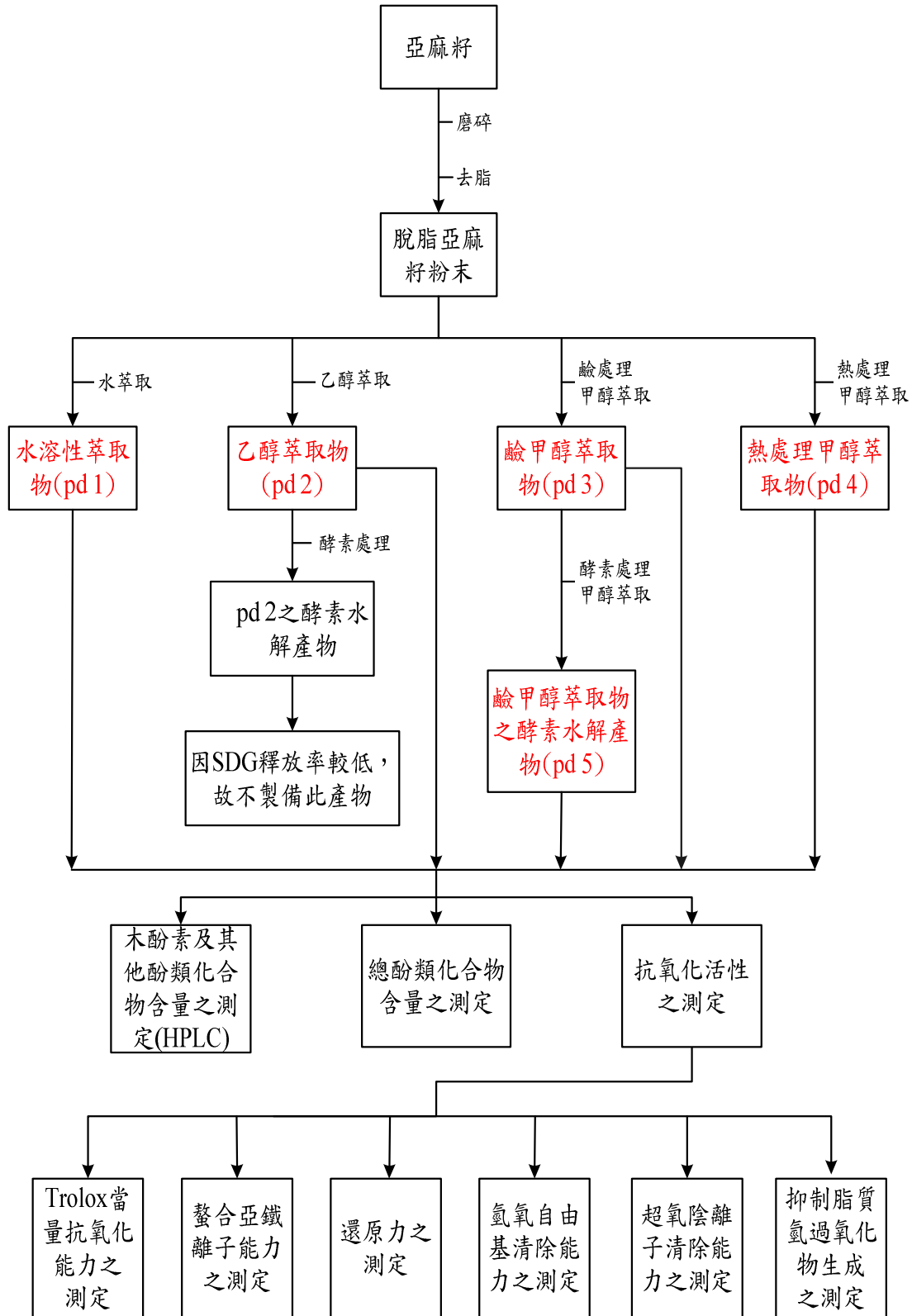
秤取 10 g DFF，加入 1000 mL 去離子水，於室溫下磁石攪拌 1 小時，之後進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，上澄液取出置於樣品瓶，用真空冷凍乾燥機凍乾，所得的樣品為水溶性萃取物。

2. 乙醇萃取物 (pd 2)

參考 Shukla *et al.* (2003) 的方法並加以修飾之。秤取 100 g DFF，加入 668 mL 70% 乙醇混合均勻，置於振盪水浴槽中，溫度維持 55°C，以轉速 100 rpm 振盪 6 小時，之後進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，上澄液收集至收集瓶中，下層物再加入 294 mL 70% 乙醇均勻混合，振盪 1 小時，然後進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，上澄液都收集在一起，以減壓濃縮去除乙醇後，進行真空冷凍乾燥，所得的樣品為乙醇萃取物。

3. 鹼甲醇萃取物 (pd 3)

參考 Eliasson *et al.* (2003) 的方法並加以修飾之。秤取 100 g DFF，加入 5000 mL 1N NaOH，在室溫下攪拌 1.5 小時，之後用濃 H₂SO₄ 調整 pH 值至 7.0，再以去離子水定量到 6000 mL，然後加入 18000 mL 甲醇，在室溫下攪拌 30 分鐘之後，倒入冷凍離心瓶中進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，收集上澄液，以減壓濃縮去除甲醇後，進行真空冷凍乾燥，所得的樣品為鹼甲醇萃取物。



圖七、脫脂亞麻籽粉末萃取物的製備及抗氧化活性測定之流程圖。

Figure 7. Scheme on the preparation of extracts from defatted flaxseed flour and determination of their antioxidative activities.

4. 熱處理甲醇萃取物 (pd 4)

(1) 熱處理條件之探討

秤取 0.1 g DFF，加入 10 mL 不同 pH 值之 0.2 M 緩衝溶液(pH 6、pH 8、pH 9 及 pH 10)，於不同溫度(30°C、40°C、60°C、80°C 及 100°C) 下攪拌 2 小時，冷卻至室溫後進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，上澄液取出，以 0.45 μm 的過濾膜過濾後進行 HPLC 分析，以 DFF 直接鹼處理所得的 SDG 總量為 100%，換算出不同熱處理條件對 DFF 之 SDG 釋放率。找到 SDG 釋放率最高的條件後，再進一步探討最適的加熱時間(0、0.5、1、2、4 及 6 小時)。

(2) 熱處理甲醇萃取物的製備

依據上述之實驗，以最適的熱處理條件進行 pd 4 之製備。秤取 10 g DFF，加入 1000 mL 0.2 M 硼酸鈉緩衝溶液(pH 9)，在 80°C 下攪拌 4 小時，冷卻至室溫後，再加入 1000 mL 甲醇，然後進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，收集上澄液，以減壓濃縮去除甲醇後，進行真空冷凍乾燥，所得的樣品為熱處理甲醇萃取物。

5. pd 2 之酵素水解產物

以富含寡聚合物的乙醇萃取物(pd 2)為原料，探討不同酵素水解作用對 pd 2 釋放 SDG 之影響；秤取 0.1 g pd 2，溶於 100 mL 0.2 M 緩衝溶液，添加 10% 酵素 (w/w of pd 2)，所使用的酵素包括 Bakezyme L 40 BG、Bakezyme PH800、Lipopan™ 50 BG 及 esterase，酵素的最適水解條件依據廠商所提供的資料如表一所示，反應 8 小時後，置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活後，冷卻至室溫，然後進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，收集上澄液，利用 0.45 μm

表一、酵素之特性

Table 1. General characteristics of enzymes used in this study

Enzyme ¹	Optimum pH & temperature	Type of enzyme	Active
Bakezyme L 40 BG	pH 7, 50°C	lipase	0.04 PLI/mg ²
Bakezyme PH800	pH 8, 50°C	lipase/phospholipase	13 PLI/mg
Lipopan™ 50 BG	pH 7, 50°C	lipase	50 units/mg solid
Esterase	pH 7, 50°C	esterase	184 units/mg protein
En 1	pH 6.8, 37°C	β-glucuronidase	1724.4 units/mg solid
En 2	pH 5, 37°C	β-glucosidase	2.1 units/mg solid
En 3	pH 6.8, 37°C	α-glucosidase	5.7 units/mg solid
En 4	pH 5, 37°C	cellulase	1600 EGU/mL ³
En 5	pH 5, 37°C	carbohydrases	83.3 FBG/g ⁴
En 6	pH 5, 37°C	pectolytic enzyme	26000 PG/mL ⁵
En 7	pH 6.5, 37°C	β-galactosidase	0.1 units/g
En 8	pH 5, 65°C	cellulase	700 EGU/g
HP-2	pH 5, 37°C	β-glucuronidase, sulfatase	104800 units/mL, ≤ 1000 units/mL
H-2	pH 5, 37°C	β-glucuronidase, sulfatase	98800 units/mL, 702 units/mL

¹ Esterase, En 1, En 2, En 3, HP-2 and H-2 are esterase (from porcine Liver), β-glucuronidase (from *Escherichia coli*), β-glucosidase (from almonds), α-glucosidase (from bakers yeast), β-glucuronidase (from *Helix pomatia*, type HP-2) and β-glucuronidase (from *Helix pomatia*, type H-2), respectively. Bakezyme L 40 BG, Bakezyme PH800 and Lipopan™ 50 BG are commercial enzymes. En 4, En 5, En 6, En 7 and En 8 are commercial deglycosylated enzymes.

² PLI unit is the amount of enzyme needed to produce 1mol free acid per minute at pH 7.5 and 37°C for a neutral olive oil/water mulsion.

³ EGU means endo-glucanase units.

⁴ FBG means fungal beta-glucanase activity.

⁵ The standard activity PG is determined by the measurement of the viscosity reduction of a solution of pectic acid at pH 3.5 and 20°C.

的過濾膜過濾後進行 HPLC 分析，以 pd 2 直接鹼處理所得的 SDG 總量為 100%，換算出不同酵素處理對 pd 2 之影響。由結果可知這 4 種酵素對 SDG 的釋放率皆很低，因此，本研究不製備 pd 2 之酵素水解產物。

6. 鹼甲醇萃取物之酵素水解產物 (pd 5)

(1) 配醣體去除醣基之酵素篩選

利用不同酵素來水解富含 CAG、FAG 及 SDG 的脫脂亞麻籽鹼萃取物，以篩選具有切除醣基轉換出 CA、FA 及 SECO 之酵素。秤取 0.1 g DFF，加入 5 mL 1N NaOH，在室溫下攪拌 1 小時後，再加入 3 mL 0.2 M 緩衝溶液，之後用濃 H₂SO₄ 調整至酵素適合之 pH，再以去離子水定量到 10 mL。然後在適當溫度下分別添加酵素 En 1、En 2、En 3、En 4、En 5、En 6、En 7 和 En 8 反應 8 小時，酵素的最適水解條件依據廠商所提供的資料如表一所示，然後置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活後，冷卻至室溫，再加入 30 mL 甲醇以超音波震盪 10 分鐘，然後進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，收集上澄液，利用 0.45 μm 的過濾膜過濾後進行 HPLC 分析。

(2) 以 β-glucuronidase from *Helix pomatia* (HP-2) 進行酵素水解

參考 Obermeyer *et al.* (1995) 的方法並加以修飾之。秤取 0.1 g DFF 及 0.02 g pd 3，分別加入 4 mL 0.2 M 醋酸鈉緩衝溶液(pH 5)，然後添加 200% β-glucuronidase from *Helix pomatia* (HP-2) (v/w of DFF or pd 3)，在 37°C 下反應 24 小時，置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活後，冷卻至室溫，再加入 4 mL 甲醇，然後進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，收集上澄液，利用 0.45 μm 的過濾膜過濾

後進行 HPLC 分析。

(3) 所篩選到的酵素與 HP-2 作比較

由前述實驗結果得知 5% En 4 (v/w) 具有切除醣基之能力，可將 CAG 和 FAG 轉換成無醣基的 CA 和 FA，然而對於 SDG 而言，其含量有顯著的降低，但仍無法轉換成 SECO；而 200% HP-2 (v/w) 則可將 CAG、FAG 和 SDG 進一步切除其醣基而轉換成 CA、FA 和 SECO。因此進一步改變 En 4 和 HP-2 之酵素使用濃度，探討不同酵素使用濃度對 DFF 和 pd 3 之影響，以及比較這兩種酵素之去醣效率。秤取 0.1 g DFF 或 0.1 g pd 3，加入 10 mL 0.2 M 醋酸鈉緩衝溶液(pH 5)，然後分別添加 10%、20%、200% (v/w of DFF or pd 3) 的 En 4 或 HP-2，在 37°C 下反應 24 小時，置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活後，冷卻至室溫，再加入 10 mL 甲醇，然後進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，收集上澄液，利用 0.45 μm 的過濾膜過濾後進行 HPLC 分析。

(4) 以不同的 En 4 酵素濃度進行酵素水解

秤取 0.1 g DFF 或 0.1 g pd 3，加入 10 mL 0.2 M 醋酸鈉緩衝溶液 (pH 5)，然後分別添加 50%、100%、200% (v/w of DFF or pd 3) 的 En 4，在 37°C 下反應 24 小時，置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活後，冷卻至室溫，再加入 10 mL 甲醇，然後進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，收集上澄液，利用 0.45 μm 的過濾膜過濾後進行 HPLC 分析，找到最適當的酵素使用濃度。

(5) 鹼甲醇萃取物之酵素水解產物的製備

秤取 10 g pd 3，加入 1000 mL 0.2 M 醋酸鈉緩衝溶液(pH 5)，然

後添加 200% (v/w of pd 3) 的 En 4，在 37°C 下反應 24 小時，置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活後，冷卻至室溫，再加入 1020 mL 甲醇，然後進行低溫離心，在 4°C 下以轉速 10000×g 離心 15 分鐘，收集上澄液，以減壓濃縮去除甲醇後，進行真空冷凍乾燥，所得的樣品為鹼甲醇萃取物之酵素水解產物。

(三) DFF 萃取物中木酚素及其他酚類化合物含量之測定

木酚素及其他酚類化合物的含量參考 Eliasson *et al.* (2003) 的方法測定之；將 5 種 DFF 萃取物以 50% 乙醇復溶，配製濃度約為 1 mg/mL 的樣品溶液，再利用 HPLC 分析之，所使用的管柱為 Luna 5 μ C18(2) 層析管柱，其內徑為 250×4.6 mm，偵測器波長設定為 280 nm，流速 1 mL/min，注射體積為 20 μ L，移動相溶液包括 A=5% acetonitrile in 0.01 M phosphate buffer, pH 2.8 及 B=100% acetonitrile，進行梯度分析，0 至 30 分鐘以線性梯度的方式逐漸的增加 B 溶液使得 100% A 降低至 70% A，30 至 32 分鐘再增加 B 溶液使得 70% A 降低至 30% A，32 至 45 分鐘維持 30% A，45 分鐘終止分析。樣品中 SDG、SECO、CA 和 FA 之含量是與標準品對照所得的，其標準品溶液是以 50% 甲醇配製成濃度為 50 μ g/mL。然而 CAG 和 FAG 之標準品無法購得，因此以 CA 和 FA 之標準品檢量線來估算樣品中 CAG 和 FAG 之含量 (Cacace & Mazza, 2006)；將 CA 和 FA 之標準品溶液 (1 mg/mL) 以 50% 甲醇做系列稀釋，配製成濃度為 25、50、100、200 μ g/mL，再進行 HPLC 分析，將積分面積數值帶入 Excel 做成標準曲線，並計算出回歸曲線之方程式用來估算樣品中 CAG 和 FAG 之含量。

(四) DFF 萃取物中總酚類化合物含量之測定

總酚類化合物的含量參考 Julkunen-Titto (1985) 的方法測定之；將 5 種 DFF 萃取物以 50% 乙醇復溶，配製濃度約為 1 mg/mL 的樣品溶液，再進行總酚類化合物含量之測定。取 50 μ L 樣品溶液(1 mg/mL)，加入 1 mL H₂O 和 0.5 mL Folin-Ciocalteu's phenol reagent 後，再加入 2.5 mL 20% Na₂CO₃ 均勻混合，於室溫下靜置 20 分鐘再以分光光度計測 735 nm 之吸光值。以不同濃度的 gallic acid 做成檢量線。樣品中總酚類化合物之含量由檢量線換算成 gallic acid 之當量濃度，其單位為每克樣品含 gallic acid 之當量毫克數(mg GAE/g Sample)。

(五) DFF 萃取物中抗氧化活性之測定

將 5 種 DFF 萃取物以 50% 乙醇復溶，配製濃度約為 1 mg/mL，再以 50% 乙醇做系列稀釋配製成濃度為 50、100、150、200、250 μ g/mL 之樣品溶液，進行下列抗氧化活性之測定。

1. Trolox 當量抗氧化能力(TEAC)之測定

DFF 萃取物的 TEAC 測定是參考 Arnao *et al.* (1996) 的方法並加以修飾之；依序加入 1.5 mL 去離子水、0.25 mL 1000 μ M ABTS 溶液、0.25 mL 500 μ M H₂O₂ 及 0.25 mL peroxidase (44 unit/mL) 均勻混合，於暗室下靜置 1 小時產生穩定藍綠色之 ABTS⁺·陽離子自由基後，再加入 0.25 mL 之不同濃度的 Trolox 樣品，靜置 10 分鐘再以分光光度計測 734 nm 之吸光值，做成 Trolox 之檢量線，DFF 萃取物的檢測同上，測得後再由 Trolox 的檢量線，換算其相當的濃度。一般 TEAC 常以 mM 為單位，若樣品的 TEAC 為 2 mM，意味 1 mM 的測試樣品相當於 2 mM 的 Trolox。TEAC 愈高，代表化合物的抗氧化性愈高。

2. 螯合亞鐵離子能力之測定

DFE 萃取物的螯合亞鐵離子能力是參考 Dinis *et al.* (1994)的方法測定之；取 0.25 mL 樣品溶液，加入 0.8 mL 甲醇均勻混合，再加入 0.025 mL 2 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，震盪 30 秒後，再加入 0.05 mL 5 mM ferrozine，於室溫下靜置 10 分鐘再立即以分光光度計測 562 nm 之吸光值。控制組以 50%乙醇取代樣品。 Fe^{2+} 和 ferrozine 形成的複合物在 562 nm 有強烈的吸光，若吸光值越低，表示樣品螯合亞鐵離子能力愈強。

Chelating effects % (capacity to chelating the ferrous ions)

$$= [1 - (A_{\text{sample at 562 nm}} - A_{\text{blank at 562 nm}}) / (A_{\text{control at 562 nm}} - A_{\text{blank at 562 nm}})] \times 100\%$$

3. 還原力之測定

DFE 萃取物的還原力是參考 Oyaizu (1986)的方法測定之；取 0.25 mL 樣品溶液，加入 0.25 mL 0.2 M 磷酸鹽緩衝液(pH 6.6)及 0.25 mL 1% potassium hexacyanoferrate (III)，於 50°C 水浴反應 20 分鐘，快速冷卻後加入 0.25 mL 10% TCA 溶液(溶於 95%乙醇)，以 10000×g 離心 3 分鐘，取上澄液 0.5 mL 加入 0.5 mL 去離子水及 0.1 mL 1% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液(溶於 3.5% HCl)混合均勻，靜置 10 分鐘再以 10000×g 離心 3 分鐘，以分光光度計測 700 nm 之吸光值，吸光值愈高表示還原力愈強。

4. 氫氧自由基清除能力之測定

DFE 萃取物的氫氧自由基清除能力是參考 Ghieselli *et al.* (1998)的方法測定之；取 0.1 mL 樣品溶液，加入 0.69 mL 含 2.5 mM 2-deoxyribose 之 0.2 M 磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)，再加入 0.1 mL 含 1.04

mM EDTA 之 1.0 mM FeCl₃ 水溶液，均勻混合，於 37°C 水浴下加入 0.1 mL 10 mM ascorbic acid 及 10 μL 0.1 M H₂O₂，反應 10 分鐘，再加入 0.5 mL 1% TBA 及 1 mL 冷 2.8% TCA，均勻混合後，置入沸水浴中加熱 8 分鐘，冰浴冷卻，再以分光光度計測 532 nm 之吸光值。控制組以 50%乙醇取代樣品。

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (A_{\text{sample at 532 nm}}) / (A_{\text{control at 532 nm}})] \times 100\%$$

5. 超氧陰離子(SOD-like)清除能力之測定

DFE 萃取物的超氧陰離子清除能力是參考 Robak 和 Gryglewski (1988)的方法測定之；以 0.1 M 磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)配製 240 μM 之 PMS、1872 μM 之 NADH 及 600 μM 之 NBT 等溶液，然後取稀釋一定倍數的樣品溶液 0.5 mL 依序與等體積之 PMS、NADH 及 NBT 溶液均勻混合，在室溫下靜置 5 分鐘再立即以分光光度計測其 560 nm 的吸光值。控制組以 50%乙醇取代樣品，吸光值愈低表示清除能力愈強。

Scavenging effect % (抑制NBT還原的能力)

$$= [1 - (A_{\text{sample at 560 nm}}) / (A_{\text{control at 560 nm}})] \times 100\%。$$

清除率(%)愈高表清除超氧陰離子能力愈強。

6. 抑制脂質氫過氧化物生成之測定

DFE 萃取物的抑制脂質氫過氧化物生成是參考 Mitsuda *et al.* (1996)的方法測定之；取0.5 mL不同濃度的樣品溶液，加入2.5 mL 0.02 M linoleic acid emulsion溶液及 2 mL 0.2 M磷酸鹽緩衝液(pH 7.0)，混合後於37°C培育，每隔一段時間取出，依硫氰酸鐵法(ferric thiocyanate)測定其氫過氧化物。其測定方法如下：取上述之樣品混合液0.1 mL，

依序加入4.7 mL 75%乙醇溶液、0.1 mL 30% ammonium thiocyanate及0.1 mL 0.02 M FeCl₂溶液(溶於3.5% HCl)，振盪使其均勻混合，靜置3分鐘再以分光光度計測500 nm之吸光值。控制組以50%乙醇取代樣品，吸光值越低則表示樣品抗氧化性越強。樣品的抗氧化能力以抑制脂質氫過氧化物生成之百分比(Inhibition of lipid peroxidation; IP %)表示，其值越高表示樣品抗氧化能力越強。計算公式如下(Duh *et al.*, 1999)：

Inhibition of peroxidation (IP %)

(capacity to inhibit the peroxide formation in linoleic acid)

$$= [1 - (A_{\text{sample at 500 nm}} / (A_{\text{control at 500 nm}}))] \times 100\%.$$

四、統計分析

試驗結果所得之數據均為三重複，以平均值 ± 標準偏差(Mean ± SD)表示，並採用 Statistical Analysis System (SAS) 8.0 版之統計軟體進行變異數分析(ANOVA)與 Duncan's multiple range test 分析，比較組間的顯著差異程度。

肆、結果與討論

一、脫脂亞麻籽粉末(DFF)的製備

結果如表二，3000 g 的亞麻籽經過磨碎過篩後得到 2260.71 g 的亞麻籽粉末，產率為 75.36%，因部份磨碎之亞麻籽殼粉末較不易通過 0.5 mm 的篩網，所以損失了約 25% 的產率。亞麻籽粉末經過正己烷萃取出油脂，再加熱減壓真空(40°C)乾燥後得到 1212.19 g DFF，產率為 40.41%，亞麻籽粉末中油脂含量約為 46.38%。

二、DFF 萃取物的製備條件探討

自然界中 SDG 大多以寡聚合物型態存在，SDG 之間分別與 HMGA 形成酯鍵而連結在一起，一條直鏈寡聚合物的結構通常是由 5 個 SDG 及 4 個 HMGA 殘基相互連接組成的(Kamal-Eldin *et al.*, 2001)。寡聚合物需再經由鹼處理破壞 SDG 與 HMGA 之間的酯鍵，才能釋放出 SDG 單體，而 SDG 仍為雙配醣體形式，所以若要將 SECO 釋放出來需牽涉到醣苷鍵的水解。因此本研究分別以水萃取、乙醇萃取、鹼處理、熱處理和酵素水解等方法將 DFF 中的酚類化合物萃製出來，得到產物分別為 pd 1、pd 2、pd 3、pd 4 和 pd 5。其中 pd 1 為在常溫下經水萃取 1 小時後離心所得上澄液經冷凍乾燥而得，pd 2 為參考 Shukla *et al.* (2003) 的方法而製備，pd 3 為參考 Eliasson *et al.* (2003) 的方法而製備，至於 pd 4 及 pd 5 的製備條件探討將分述如下：

(一) pd 4 製備條件探討

利用鹼處理雖可以有效的萃取出單體 SDG，然而亦可能發生胺基酸消旋及產生 lysinoalanine 等毒素(Schwass & Finnley, 1984)，若樣

表二、脫脂亞麻籽粉末之製備

Table 2. Preparation of defatted flaxseed flour

Sample	Weight (g)	Yield ¹ (%)
Whole flaxseed	3000	100
Milled and sieved flaxseed flour	2260.71	75.36
Defatted flaxseed flour	1212.19	40.41

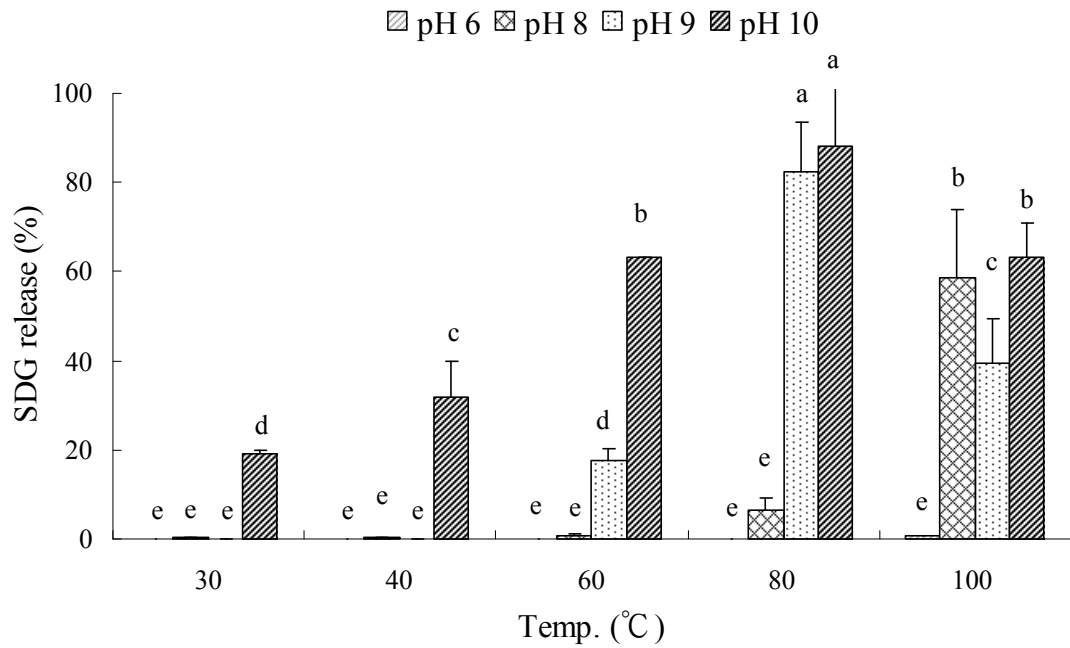
¹ Yield (%) = (sample weight/whole flaxseed weight)×100%.

品含有 cysteine 及 serine，於 pH >10 下會產生 dehydroalanine，此中間產物會再與 lysine 反應而形成 lysinoalanine，它具有金屬螯合能力，因此會破壞蛋白質的功能性，造成蛋白質消化性降低，且也會抑制某些合成酵素如 lysyl-tRNA-synthetase。在 pd 3 的製備過程中除了鹼處理尚包括酸中和及甲醇處理，雖然可將大多數的蛋白質沉澱下來，能降低 lysinoalanine 的殘留，但本研究仍期望能以溫和的處理方法如熱處理或酵素處理來取代鹼處理以釋出配醣體木酚素及酚類化合物等單體。

1. 熱處理條件之探討

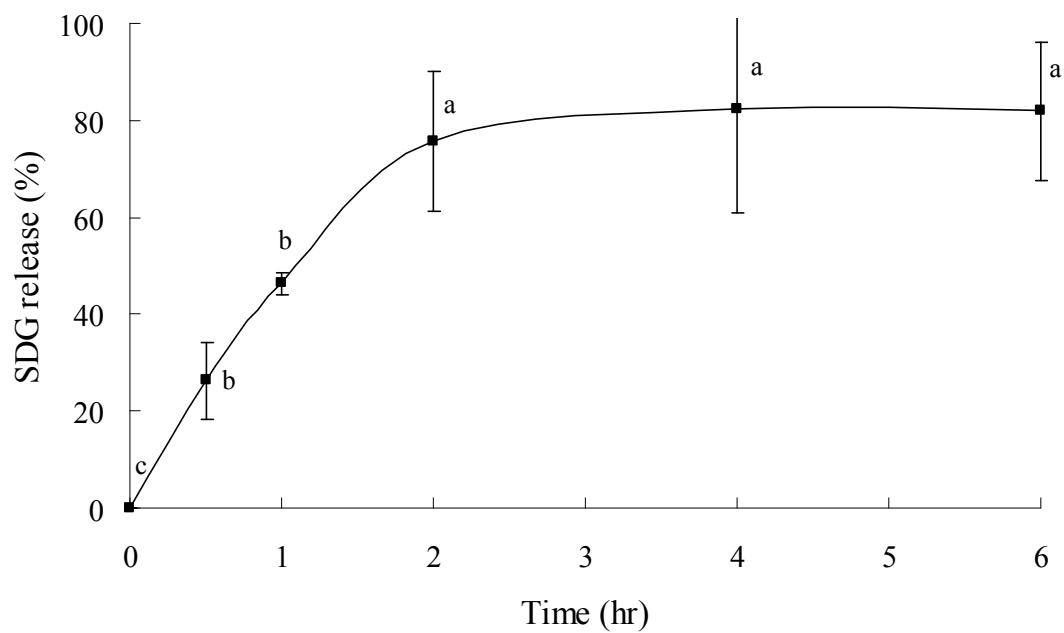
圖八為探討不同溫度及 pH 值對 DFF 中 SDG 釋放率之影響，以磷酸鹽或硼酸鈉配製不同 pH 之 0.2 M 緩衝溶液(pH 6、pH 8、pH 9 及 pH 10)，於不同溫度(30°C、40°C、60°C、80°C 及 100°C)下反應 2 小時，離心取上澄液進行 HPLC 分析，以 DFF 直接鹼處理所得的 SDG 總量為 100%，以此換算出不同熱處理條件對 DFF 之 SDG 釋放率，結果顯示，於 pH 6 時隨著加熱溫度的增加其 SDG 釋放率無顯著的增加；於 pH 8 時僅有 100°C 的處理組其 SDG 釋放率顯著($P < 0.05$)的高於其他加熱溫度；而於 pH 9 與 pH 10 時隨著加熱溫度的增加其 SDG 釋放率先增後減，在 80°C 時 SDG 釋放率顯著高於其他的溫度，分別為 82.25%與 88.2%，其中以 pH 10 的 SDG 釋放率最高，但此兩組處理之間並無顯著的差異，因此後續將以 pH 9、80°C 探討最佳加熱所需時間。

圖九為探討在 pH 9、80°C 下不同加熱時間對 DFF 中 SDG 釋放率之影響，DFF 於 0.2 M 硼酸鈉緩衝溶液(pH 9)及 80°C 下，經不同加熱



圖八、不同溫度及 pH 值對脫脂亞麻籽粉末中 SDG 釋放率之影響。

Figure 8. Effects of different temperature and pH on the release of SDG from defatted flaxseed flour (DFF). The heating time is 2 hours. The amount of SDG released from DFF using alkaline treatment is defined as 100%. Each value is mean \pm standard derivation of three replicate analyses. Means with different letters are significant differences ($P < 0.05$) by the Duncan's multiple range test.



圖九、在 pH 9、80°C 下加熱時間對脫脂亞麻籽粉末中 SDG 釋放率之影響。

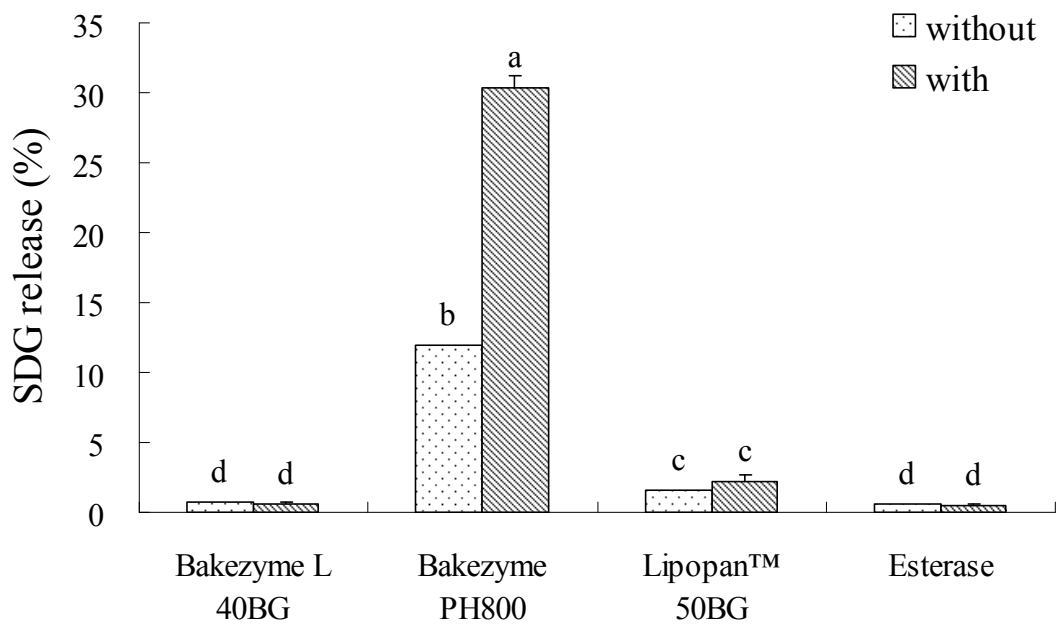
Figure 9. Effect of heating time on the release of SDG from defatted flaxseed flour (DFF) in pH 9, 80°C. The amount of SDG released from DFF using alkaline treatment is defined as 100%. Each value is mean \pm standard derivation of three replicate analyses. Means with different letters are significant differences ($P < 0.05$) by the Duncan's multiple range test.

時間(0、0.5、1、2、4 及 6 小時)後，離心取上澄液進行 HPLC 分析，以 DFF 直接鹼處理所得的 SDG 總量為 100%，以此換算出不同加熱時間對 DFF 之 SDG 釋放率，結果顯示，隨著加熱時間的增加其 SDG 釋放率也隨著遞增，於兩個小時後達到平衡，SDG 釋放率為 75.61%，因此本研究製備 pd 4 的條件為 pH 9、80°C 加熱 2 小時。

10 g DFF 經 pH 9、80°C 加熱 2 小時及甲醇萃取、離心、上澄液冷凍乾燥後，所得的產物進行 HPLC 分析，其 SDG 含量僅有 3.48 mg/g，釋放率約 21.79% (data not show)，比前述條件探討的結果(0.1 g DFF)相差甚多，推測攪拌不均勻或中心溫度未達 80°C 即開始反應，使得 DFF 中 SDG 未能在兩小時內充分的釋放出來，因此將延長其加熱時間至 4 小時，於 pH 9、80°C 下加熱 4 小時，再經甲醇萃取、離心、上澄液冷凍乾燥後，所得的產物為 pd 4，其 SDG 含量約 7.48 mg/g，釋放率約 46.84%。

2. 酵素處理條件之探討

本研究篩選 4 種不同的脂解酵素，以富含寡聚合物的 pd 2 為原料，探討不同酵素處理對 pd 2 中 SDG 釋放率之影響。圖十為不同酵素處理對 pd 2 中 SDG 釋放率之影響，將 0.1% (w/v) pd 2 溶於各別酵素最適 pH 值之緩衝溶液後，分別添加 4 種不同 10% 脂解酵素(w/w of pd 2)，包括 Bakezyme L 40 BG、Bakezyme PH800、Lipopan™ 50 BG 及 esterase，在適當溫度下反應 8 小時，置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活後，離心取上澄液進行 HPLC 分析，以 pd 2 直接鹼處理所得的 SDG 總量為 100%，以此換算出不同酵素處理對 pd 2 之 SDG 釋放率，結果顯示，此 4 種未添加酵素的控制組其 SDG 之釋放率約



圖十、不同酵素處理對脫脂亞麻乙醇萃取物中 SDG 釋放率之影響。

Figure 10. Effects of different enzyme treatments on the release of SDG for ethanol extracts from defatted flaxseed flour (pd 2). The amount of SDG released from pd 2 using alkaline treatment is defined as 100%. Optimum pH and temperature for enzymes: Bakezyme L 40 BG, pH 7, 50°C; Bakezyme PH800, pH 8, 50°C; Lipopan™ 50 BG, pH 7, 50°C; Esterase (from porcine Liver, EC 3.1.1.1), pH 7, 25°C. Each value is mean \pm standard derivation of three replicate analyses. Means with different letters are significant differences ($P < 0.05$) by the Duncan's multiple range test.

0.56–11.9%，其中以不添加 Bakezyme PH800 的控制組顯著高於其它酵素的控制組，這是因為此 4 組控制組皆有置入沸水浴中加熱 15 分鐘，且不添加 Bakezyme PH800 控制組是在 pH 8 下反應，而其他酵素的控制組之反應則是在 pH 7，由前述圖八的熱處理結果可知高溫及微鹼能破壞寡聚合物間的酯鏈而釋放出單體 SDG，因此使不添加 Bakezyme PH800 的控制組其 SDG 之釋放率顯著高於其它控制組。Bakezyme L 40 BG、Lipopan™ 50 BG 及 esterase 的酵素處理組與其控制組(without enzyme)比較，兩者之間無顯著的差異；而 Bakezyme PH800 的酵素處理組與控制組(without Bakezyme PH800)比較，前者的 SDG 釋放率顯著的高於後者，分別為 30.37%與 11.99%。綜合以上結果可知 Bakezyme PH800 具有切除寡聚合物中酯鏈之能力，但 SDG 轉換率低於 19%，因此本研究不以酵素處理的方式製備 pd 4，而採用熱處理，其加熱條件為 pH 9、80°C 下加熱 4 小時。

(二) pd 5 製備條件探討

文獻指出去配醣體木酚素 SECO 的抗氧化效力較配醣體木酚素 SDG 高(Prasad, 2000b)，而 SDG 為雙醣體形式，因此若要將 SECO 釋放出來需牽涉到醣苷鍵的水解，通常是利用 β -glucuronidase (from *Helix pomatia*) 進行酵素水解(Obermeyer *et al.*, 1995) 或在高溫下進行酸水解(Mazur *et al.*, 1996) 去除碳水化合物部份，然而此酵素價格昂貴且酸水解易產生有毒物質，因此本研究將利用其他商業酵素來取代 β -glucuronidase (from *Helix pomatia*)，水解脫脂亞麻籽鹼萃物以釋放出去醣基的酚類化合物如 CA、FA 及 SECO。

1. 配醣體去除醣基之酵素篩選

表三為探討不同酵素水解脫脂亞麻籽鹼萃物(DFFa)對其酚類化合物濃度之影響，DFFa 為 DFF 直接進行鹼處理後所得的萃取物，DFFa 含配醣體 CAG、FAG 及 SDG，可作為酵素之受質，將 1% (w/v) DFFa，於各別酵素最適 pH 值及溫度下(如表一)，分別添加 En 1、En 2、En 3、En 4、En 5、En 6、En 7 及 En 8，其中 En 4、En 5、En 6、En 7 及 En 8 為商業酵素，添加的濃度為 5% (v/w of DFFa)，而 En 1、En 2 及 En 3 分別為 β -glucuronidase (from *Escherichia coli*)、 β -glucosidase (from almonds)及 α -glucosidase (from bakers yeast)，添加的濃度為 0.1% (w/w of DFFa)；DFFa 與酵素反應 8 小時後，置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活，再經甲醇萃取及離心取上澄液進行 HPLC 分析，其結果如表三，En 1、En 3 及 En 7 的水解作用，對酚類化合物 CAG、FAG、SDG、CA、FA 和 SECO 之含量與控制組比較均無顯著的差異。而 En 2、En 5 及 En 6 的水解則能去除 CAG 及 FAG 醣基而轉換成 CA 及 FA；En 2 的水解作用使得 CAG 及 FAG 的含量與控制組比較顯著的降低，減少了 90.72%及 100%，相對的 CA 及 FA 的含量也顯著的增加，由此可知 En 2 能有效去除 CAG 及 FAG 醣基而轉換成 CA 及 FA；同樣的 En 5 也可使 CAG 及 FAG 的含量與控制組比較顯著的降低，減少了 100%及 18.49%，相對的 CA 及 FA 的含量也顯著的增加，由此可知 En 5 能有效去除 CAG 醣基而轉換成 CA，但對 FAG 則是部分去除醣基而轉換成 FA；同樣的 En 6 也可使 CAG 及 FAG 的含量與控制組比較顯著的降低，減少了 69.14%及 5.34%，相對的 CA 及 FA 的含量也顯著的增加，由此可知 En 6 則是部分去除

表三、利用不同酵素水解脫脂亞麻籽鹼萃物對其酚類化合物濃度之影響

Table 3. Effect of different enzymes hydrolysis of 1% (w/v) DFFa¹ on the content of phenolic compounds

Enzyme ²	Phenolic compounds ³ (µg/mL)					
	CAG	FAG	SDG	CA	FA	SECO
En 1						
without	7.24 ± 0.19 ^a	3.06 ± 0.07 ^a	33.06 ± 0.75 ^a	ND ⁴	1.23 ± 0.04 ^b	ND
with	7.40 ± 0.19 ^a	3.55 ± 0.08 ^a	34.03 ± 0.81 ^a	ND	1.40 ± 0.04 ^a	ND
En 2						
without	6.57 ± 0.22 ^a	2.76 ± 0.09 ^a	31.83 ± 1.03 ^a	ND	1.11 ± 0.12 ^b	ND
with	0.61 ± 0.01 ^b	ND	32.10 ± 1.01 ^a	5.12 ± 0.14 ^a	3.71 ± 0.10 ^a	ND
En 3						
without	6.28 ± 0.06 ^a	2.87 ± 0.06 ^a	27.95 ± 0.71 ^a	ND	1.14 ± 0.03 ^a	ND
with	6.21 ± 0.10 ^a	2.82 ± 0.01 ^a	27.87 ± 0.58 ^a	ND	1.22 ± 0.01 ^a	ND
En 4						
without	5.67 ± 0.04 ^a	2.61 ± 0.03 ^a	31.41 ± 0.51 ^a	ND	1.23 ± 0.01 ^b	ND
with	ND	1.38 ± 0.01 ^b	26.48 ± 0.20 ^b	6.53 ± 0.03 ^a	2.54 ± 0.02 ^a	ND
En 5						
without	5.20 ± 0.15 ^a	2.38 ± 0.07 ^a	29.50 ± 0.92 ^a	ND	1.13 ± 0.03 ^b	ND
with	ND	1.94 ± 0.03 ^b	28.95 ± 0.52 ^a	5.85 ± 0.16 ^a	1.62 ± 0.03 ^a	ND
En 6						
without	5.80 ± 0.23 ^a	2.62 ± 0.12 ^a	27.28 ± 1.17 ^a	ND	1.12 ± 0.06 ^b	ND
with	1.79 ± 0.03 ^b	2.48 ± 0.01 ^b	27.92 ± 0.25 ^a	4.49 ± 0.03 ^a	1.66 ± 0.01 ^a	ND
En 7						
without	5.99 ± 0.04 ^a	2.79 ± 0.03 ^a	27.38 ± 0.24 ^a	ND	1.08 ± 0.02 ^a	ND
with	6.21 ± 0.16 ^a	2.77 ± 0.05 ^a	27.15 ± 0.33 ^a	ND	1.14 ± 0.03 ^a	ND
En 8						
without	5.67 ± 0.31 ^a	2.74 ± 0.16 ^a	27.44 ± 1.39 ^a	ND	1.10 ± 0.07 ^a	ND
with	4.20 ± 0.10 ^b	2.60 ± 0.07 ^b	21.48 ± 0.40 ^b	0.68 ± 0.02 ^a	1.02 ± 0.03 ^a	ND

¹ DFFa means defatted flaxseed flour (DFF) by direct alkaline hydrolysis (1N NaOH, 25°C, 1hr).

² En 1, En 2 and En 3 are β-glucuronidase (from *Escherichia coli*), β-glucosidase (from almonds) and α-glucosidase (from bakers yeast) which use 0.1% (w/w), respectively. En 4, En 5, En 6, En 7 and En 8 are commercial deglycosylated enzymes which use 5% (v/w). The hydrolysis time is 8 hours.

³ Each value is mean ± standard derivation of three replicate analyses. Means with different superscript letters between the without enzyme versus the with enzyme are significant differences (P<0.05) by the Duncan's multiple range test.

⁴ ND means not detectable.

CAG 及 FAG 醴基而轉換成 CA 及 FA。至於 En 4 及 En 8 的水解可使 CAG、FAG 及 SDG 的含量與控制組比較顯著的降低，En 4 的水解能減少了 100%、47.13%及 15.7%，相對的 CA 及 FA 的含量也顯著的增加，但 SECO 的含量仍無法偵測到；同樣的 En 8 也可使 CAG、FAG 及 SDG 的含量減少了 25.93%、5.11%及 21.72%，但僅有 CA 的含量顯著的增加，而 FA 的含量無顯著的差異，SECO 的含量也仍無法偵測到。由此可知 En 4 能有效去除 CAG 醴基而轉換成 CA，部分去除 FAG 醴基而轉換成 FA，但仍無法將 SDG 轉換成 SECO；而 En 8 能部分去除 CAG 醴基而轉換成 CA，但卻無法將 FAG 及 SDG 轉換成 FA 及 SECO。比較此八種不同酵素，由於 En 4 及 En 8 的水解作用均能顯著的降低 CAG、FAG 及 SDG 之含量，相對的 CA 及 FA 的含量也提升，但 SDG 的降低卻未能相對偵測出 SECO，推測可能是酵素濃度太低，轉換的 SECO 濃度太低，因此將進一步增加其酵素濃度，探討不同濃度的 En 4 及 En 8 對酚類化合物濃度之影響。

表四為探討不同濃度的 En 4 及 En 8 水解 DFF 或 pd 3 對其酚類化合物濃度之影響，DFF 為寡聚合物，而 pd 3 含配醴體 CAG、FAG 及 SDG，將 1% (w/v) DFF 或 pd 3，於酵素最適 pH 值及溫度下(如表一)，添加 En 4 或 En 8，其濃度分別為 10%和 20% (v/w of DFF or pd 3)，反應 24 小時，置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活後，再經甲醇萃取及離心取上澄液進行 HPLC 分析，結果顯示，當以 En 4 及 En 8 水解 DFF 時，其酚類化合物含量與控制組比較，無顯著的差異，表示此兩種酵素皆無法將寡聚合物中的酚類化合物水解出來。當以 En 4 水解 pd 3 時，隨著酵素濃度的增加，其 CAG、FAG 及 SDG 的含量

表四、利用不同濃度的 En 4 及 En 8 水解脫脂亞麻籽粉末或脫脂亞麻籽鹼甲醇萃取物對其酚類化合物濃度之影響

Table 4. Effect of hydrolyzing 1% (w/v) DFF or 1% (w/v) pd 3 by En 4 and En 8 with different concentrations on the content of phenolic compounds¹

Enzyme ²	Phenolic compounds ³ (µg/mL)					
	CAG	FAG	SDG	CA	FA	SECO
En 4						
DFF						
without	ND ⁴	ND	ND	ND	ND	ND
with (10%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
with (20%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pd 3						
without	38.99 ± 0.47 ^a	17.26 ± 0.09 ^a	198.39 ± 2.55 ^a	5.08 ± 0.04 ^b	3.47 ± 0.12 ^b	ND
with (10%)	ND	7.20 ± 0.03 ^b	152.87 ± 0.72 ^b	15.68 ± 0.00 ^a	5.05 ± 0.02 ^a	19.93 ± 0.01 ^b
with (20%)	ND	3.04 ± 0.00 ^c	121.88 ± 0.13 ^c	17.61 ± 0.04 ^a	4.75 ± 0.00 ^a	41.10 ± 0.24 ^a
En 8						
DFF						
without	ND	ND	ND	ND	ND	ND
with (10%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
with (20%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pd 3						
without	41.10 ± 0.33 ^a	20.49 ± 0.33 ^a	198.98 ± 0.42 ^a	6.13 ± 0.01 ^b	2.34 ± 0.58 ^a	ND
with (10%)	28.39 ± 0.01 ^b	19.77 ± 0.01 ^b	187.51 ± 0.79 ^b	7.53 ± 0.07 ^a	1.43 ± 0.03 ^b	ND
with (20%)	17.32 ± 0.06 ^c	17.32 ± 0.06 ^c	178.58 ± 0.94 ^c	7.36 ± 2.02 ^a	1.91 ± 0.03 ^{ab}	ND

¹ DFF means defatted flaxseed flour; pd 3 means alkaline and methanol extract from DFF.

² En 4 and En 8 are commercial deglycosylated enzymes. The hydrolysis time is 24 hours. Percentage (% v/v) in the bracket means (volume of enzyme)/(weight of DFF or pd 3).

³ Each value is mean ± standard derivation of three replicate analyses. Means with different superscript letters between the without enzyme versus the with enzyme or between the with (10%) versus the with (20%) are significant differences (P<0.05) by the Duncan's multiple range test.

⁴ ND means not detectable.

有遞減的趨勢，以 10% En 4 而言，分別降低了 100%、58.29%及 22.94%，相對的 CA、FA 及 SECO 含量也顯著的增加，即表示 10% En 4 能有效去除 CAG 醣基而轉換成 CA，部分去除 FAG 及 SDG 醣基而轉換成 FA 及 SECO；再進一步探討以 20% En 4 水解 pd 3，其 CAG、FAG 及 SDG 含量與控制組比較，分別顯著的降低 100%、82.39%及 38.57%，相對的 CA、FA 及 SECO 的含量也顯著的增加，若將 10% 與 20% En 4 比較，兩者之間所轉換出的 CA、FA 含量無顯著的差異，但 SECO 的含量分別為 19.93 及 41.10 $\mu\text{g/mL}$ ，後者顯著的高於前者，因此可知 10% En 4 具有將此 3 種配醣體酚類化合物去醣基的能力，且隨著 En 4 濃度的增加其轉換出的 SECO 含量跟著遞增，但 FA 含量則無顯著的增加，可能是太高濃度的 En 4 會進一步水解 FA；當以 En 8 水解 pd 3 時，隨著酵素濃度的增加，其 CAG、FAG 及 SDG 的含量有遞減的趨勢，相對的 CA 含量也顯著的增加，但 FA 及 SECO 的含量與控制組比較卻無顯著差異，且仍無法轉換出 SECO，即表示 En 8 只能部分去除 CAG 醣基而轉換成 CA，但無法將 FAG 及 SDG 去除醣基而轉換成 FA 及 SECO。

綜合表三及表四的結果，篩選出 En 4 具有將配醣體酚類化合物去除醣基之效力。5% En 4 只能將 CAG 完全轉換成 CA，FAG 部分轉換成 FA，無法將 SDG 轉換成 SECO，但 10% En 4 就能將 SDG 部分轉換成 SECO，且隨著酵素濃度的增加其 SECO 含量也顯著的增加。

2. HP-2 去醣基的效率

文獻報導指出利用 200% (v/w) β -glucuronidase from *Helix pomatia* (type HP-2)來水解 2.5% (w/v) DFF，可將 SECO 釋放出來

(Obermeyer *et al.*,1995)，所以本研究參考其方法以 HP-2 來水解 DFF 或 pd 3。此外，也利用 β -glucuronidase from *Helix pomatia* (type H-2) 來進行酵素水解，比較不同型態的 β -glucuronidase 之去醣效率，H-2 與 HP-2 為相同來源但不同型態的 β -glucuronidase，皆為低純度的酵素，其酵素活性分別為 98800 units/mL 與 104800 units/mL。而 En 1 為 β -glucuronidase (from *Escherichia coli*)，屬高純度的酵素，其酵素活性為 1724.4 units/mg solid，因此也將進一步比較 HP-2 及 En 1 之去醣基效率，探討不同來源的 β -glucuronidase 之去醣效率，及 HP-2 能轉換出 SECO 之可能原因。

首先，本研究參考 Obermeyer *et al.* (1995)的方法，以 HP-2 及 H-2 來水解 DFF 或 pd 3，探討此兩種酵素對其酚類化合物濃度之影響，其結果如表五，此兩種酵素皆可將 DFF 中寡聚合物型態的酚類化合物轉換成去醣基的型態如 CA、FA 及 SECO，且以 HP-2 水解所轉換出的含量高於 H-2；其次，以富含 CAG、FAG 及 SDG 的 pd 3 作為酵素之受質時，可發現此兩種酵素均能將配醣體酚類化合物去醣基，轉換成 CA、FA 及 SECO，且 HP-2 去醣的效率高於 H-2，因 SDG 含量分別減少了 96.19%及 92.22%，由此可知 200% HP-2 的確能有效的去除 CAG、FAG 及 SDG 醣基而轉換成 CA、FA 及 SECO，但 HP-2 價格昂貴且使用量大，因此本研究進一步探討不同濃度的 HP-2 對酚類化合物濃度之影響，試圖降低 HP-2 的使用濃度，且也進一步與高純度 β -glucuronidase 之 En 1 做比較，探討 β -glucuronidase 是否為能將 SDG 配醣體去除的關鍵酵素。

表五、利用 β -glucuronidase 水解脫脂亞麻籽粉末或脫脂亞麻籽鹼甲醇萃取物對其酚類化合物濃度之影響

Table 5. Effect of hydrolyzing DFF or pd 3 by β -glucuronidase on the content of phenolic compounds¹

β -glucuronidase ²	Phenolic compounds ³ ($\mu\text{g/mL}$)					
	CAG	FAG	SDG	CA	FA	SECO
H-2						
DFF						
without	ND ⁴	ND	ND	ND	ND	ND
with (2.5% S, 200% E)	ND	ND	ND	0.37 ± 0.01^a	3.81 ± 0.06^a	19.60 ± 0.28^a
pd 3						
without	20.82^a	11.07^a	101.38^a	0.96^b	5.53^b	ND
with (0.5% S, 200% E)	ND	ND	7.89 ± 0.04^b	15.06 ± 0.12^a	9.49 ± 0.10^a	62.21 ± 0.51^a
HP-2						
DFF						
without	ND	ND	ND	ND	ND	ND
with (2.5% S, 200% E)	ND	ND	ND	0.30 ± 0.01^a	4.08 ± 0.22^a	26.46 ± 0.11^a
pd 3						
without	23.628^a	12.68^a	109.93^a	1.13^b	6.05^b	ND
with (0.5% S, 200% E)	ND	ND	4.19 ± 0.05^b	15.56 ± 0.15^a	10.35 ± 0.10^a	68.16 ± 0.55^a

¹ DFF means defatted flaxseed flour; pd 3 means alkaline and methanol extract from DFF.

² The hydrolysis time is 24 hours. 2.5% S means (weight of DFF)/(volume of buffer), 200% E means (volume of enzyme)/(weight of DFF). 0.5% S means (weight of pd 3)/(volume of buffer), 200% E means (volume of enzyme)/(weight of pd 3). Both H-2 and HP-2 are β -glucuronidase from *Helix pomatia*.

³ Means with different superscript letters between the without enzyme versus the with enzyme are significant differences ($P < 0.05$) by the Duncan's multiple range test.

⁴ ND means not detectable.

表六為探討不同濃度的 En 1 及 HP-2 水解 DFF 或 pd 3 對其酚類化合物濃度之影響，DFF 為寡聚合物，而 pd 3 含配醣體 CAG、FAG 及 SDG，將 1% (w/v) DFF 或 pd 3，於酵素最適 pH 值及溫度下(如表一)，添加 En 1 或 HP-2，其濃度分別為 1% En 1 (w/w of DFF or pd 3) 及 10%和 20% HP-2 (v/w of DFF or pd 3)，受質與酵素反應 24 小時後，置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活，再經甲醇萃取及離心取上澄液進行 HPLC 分析，結果顯示，當以 1% En 1 或 10%、20% HP-2 來水解 DFF 時，皆無法將寡聚合物中的酚類化合物水解出來；當以 1% En 1 來水解 pd 3 時，其 CAG、FAG 及 SDG 的含量顯著的減少，分別降低了 9.34%、58.31%及 64.26%，但相對的卻無法偵測到 CA、FA 及 SECO，由此可知 En 1 中尚含有催化 CA、FA 及 SECO 分解的酵素；當以 10% HP-2 來水解 pd 3 時，能有效去除 CAG 及 FAG 的醣基而轉換成 CA 及 FA，且 SDG 的含量降低了 19.72%，相對的轉換出 30.01 $\mu\text{g/mL}$ SECO；當以 20% HP-2 來水解 pd 3 時，其 SDG 的含量降低了 35.37%，相對的轉換出 45.9 $\mu\text{g/mL}$ SECO，即表示隨著酵素濃度的增加，其 SDG 的含量跟著遞減，而 SECO 的含量跟著遞增，但 20% HP-2 仍無法將 SDG 完全轉換成 SECO。比較 1% En 1 及 10% HP-2，其 β -glucuronidase 之酵素活性分別為 690 units 及 419.2 units，前者能顯著降低 CAG、FAG 及 SDG 的含量，但卻無法偵測到 CA、FA 及 SECO，而後者卻能使 CAG 及 FAG 完全轉換成 CA 及 FA，且 SDG 部分轉換成 SECO，因此推測 β -glucuronidase 並非轉換出 CA、FA 及 SECO 的關鍵酵素，可能是來自於 *Helix pomatia* 中的其它酵素活性，此結果與 Milder *et al.* (2004)所作的研究相似，比較 500 units

表六、利用不同濃度的 En 1 及 HP-2 水解脫脂亞麻籽粉末或脫脂亞麻籽鹼甲醇萃取物對其酚類化合物濃度之影響

Table 6. Effect of hydrolyzing 1% (w/v) DFF or 1% (w/v) pd 3 by En 1 and HP-2 with different concentrations on the content of phenolic compounds¹

Enzyme ²	Phenolic compounds ³ (µg/mL)					
	CAG	FAG	SDG	CA	FA	SECO
En 1						
DFF						
without	ND ⁴	ND	ND	ND	ND	ND
with (1%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pd 3						
without	14.03 ± 0.02 ^a	8.30 ± 0.03 ^a	195.24 ± 0.64 ^a	4.94 ± 0.02 ^a	2.85 ± 0.01 ^a	ND
with (1%)	12.72 ± 0.01 ^b	3.46 ± 0.01 ^b	69.78 ± 0.05 ^b	ND	ND	ND
HP-2						
DFF						
without	ND	ND	ND	ND	ND	ND
with (10%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
with (20%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pd 3						
without	39.29 ± 0.30 ^a	18.89 ± 0.11 ^a	197.30 ± 0.75 ^a	5.59 ± 0.08 ^b	2.59 ± 0.15 ^b	ND
with (10%)	ND	1.29 ± 0.01 ^b	158.39 ± 0.73 ^b	19.56 ± 0.19 ^a	5.27 ± 0.08 ^a	30.01 ± 0.32 ^b
with (20%)	0.34 ± 0.01 ^b	ND	127.51 ± 0.34 ^c	19.75 ± 0.47 ^a	5.46 ± 0.32 ^a	45.99 ± 1.97 ^a

¹ DFF means defatted flaxseed flour; pd 3 means alkaline and methanol extract from DFF.

² En 1 and HP-2 are β-glucuronidase (from *Escherichia coli*) and β-glucuronidase (from *Helix pomatia*, type HP-2), respectively. The hydrolysis time is 24 hours. 1% (w/w) means (weight of enzyme)/(weight of DFF or pd 3). 10% (v/w) means (volume of enzyme)/(weight of DFF or pd 3). 20% (v/w) means (volume of enzyme)/(weight of DFF or pd 3).

³ Each value is mean ± standard derivation of three replicate analyses. Means with different superscript letters between the without enzyme versus the with enzyme or between the with (10%) versus the with (20%) are significant differences (P<0.05) by the Duncan's multiple range test.

⁴ ND means not detectable.

之HP-2與500 units之 β -glucuronidase (from bovine liver)，發現HP-2能轉換出90%的SECO，而不同來源的 β -glucuronidase則無法轉換出SECO。

3. 比較所篩選到的酵素 En 4 與 HP-2 之去醣基效率

綜合以上結果得知 En 4 及 HP-2 皆具有將 CAG、FAG 及 SDG 去醣基轉換成 CA、FA 及 SECO 之能力，因此將進一步比較此兩種酵素之去醣基效率。表七為探討不同濃度的 En 4 及 HP-2 水解 pd 3 對其酚類化合物濃度之影響，將 1% (w/v) pd 3，於酵素最適 pH 值及溫度下(如表一)，添加 En 4 或 HP-2，其濃度分別為 10%、20%和 200% (v/w of pd 3)，反應 24 小時，置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活後，再經甲醇萃取及離心取上澄液進行 HPLC 分析，結果顯示，對 CAG 而言，En 4 及 HP-2 的去醣基效率相當，當以 10% En 4 及 10% HP-2 水解 pd 3 時，皆能有效去除 CAG 的配醣體而轉換成 CA，但當以 200% En 4 水解 pd 3 時，其 CA 含量與 20% En 4 比較無顯著差異，即表示太高濃度的 En 4 會進一步水解 CA；對 FAG 而言，HP-2 的去醣效率顯著的高於 En 4，10% HP-2 能降低 93.17%的 FAG 含量及部分轉換成 FA，而 10% En 4 只能降低 58.29%的 FAG 含量及部分轉換成 FA，隨著 En 4 濃度的增加，FAG 含量遞減，但相對的 FA 含量卻無顯著的增加，即表示高濃度的 En 4 會進一步水解 FA；對 SDG 而言，En 4 及 HP-2 的去醣基效率相當，隨著酵素濃度的增加，SDG 含量遞減，相對的 SECO 含量遞增，200% HP-2 與 200% En 4 所轉換出的 SECO 含量分別為 136.32 及 130.48 $\mu\text{g/mL}$ 。雖然 En 4 的去醣基能力與轉換率較 HP-2 稍差，且濃度太高會進一步水解 CA 及 FA，但 200% En 4

表七、利用不同濃度的 En 4 及 HP-2 水解脫脂亞麻籽鹼甲醇萃取物對其酚類化合物濃度之影響

Table 7. Effect of hydrolyzing 1% (w/v) pd 3 by En 4 and HP-2 with different concentrations on the content of phenolic compounds¹

Enzyme ²	Phenolic compounds ³ (µg/mL)					
	CAG	FAG	SDG	CA	FA	SECO
En 4						
without	38.66 ± 0.46 ^a	17.26 ± 0.10 ^b	198.39 ± 2.55 ^a	5.07 ± 0.04 ^f	3.46 ± 0.12 ^d	ND
with (10%)	ND ⁴	7.20 ± 0.03 ^c	152.87 ± 0.72 ^c	15.68 ± 0.00 ^d	5.05 ± 0.02 ^{bc}	19.93 ± 0.01 ^f
with (20%)	ND	3.04 ± 0.00 ^d	121.88 ± 0.13 ^e	17.61 ± 0.04 ^c	4.75 ± 0.00 ^c	41.10 ± 0.24 ^d
with(200%)	ND	ND	ND	17.35 ± 0.04 ^c	3.59 ± 0.33 ^d	130.48 ± 0.06 ^b
HP-2						
without	39.29 ± 0.30 ^a	18.89 ± 0.11 ^a	197.30 ± 0.75 ^a	5.59 ± 0.08 ^e	2.59 ± 0.15 ^d	ND
with (10%)	ND	1.29 ± 0.01 ^e	158.39 ± 0.73 ^b	19.56 ± 0.19 ^b	5.27 ± 0.08 ^b	30.01 ± 0.32 ^e
with (20%)	0.34 ± 0.01 ^b	ND	127.51 ± 0.34 ^d	19.75 ± 0.47 ^b	5.46 ± 0.32 ^b	45.99 ± 1.97 ^c
with(200%)	ND	ND	8.38 ± 0.10 ^f	31.04 ± 0.30 ^a	20.70 ± 0.10 ^a	136.32 ± 1.09 ^a

¹ pd 3 means alkaline and methanol extract from DFF.

² En 4 and HP-2 are commercial deglycosylated enzyme and β-glucuronidase (from *Helix pomatia*, type HP-2), respectively. The hydrolysis time is 24 hours. Percentage (% v/w) in the bracket means (volume of enzyme)/(weight of pd 3).

³ Each value is mean ± standard derivation of three replicate analyses. Means with different superscript letters in the same column are significant differences (P<0.05) by the Duncan's multiple range test.

⁴ ND means not detectable.

卻能有效的去除 SDG 之醣基而轉換成 SECO，而且 En 4 為商業酵素，其價格為 HP-2 的 1/190，因此爾後的研究可以利用所篩選到的酵素 En 4 來取代 HP-2 將配醣體木酚素 SDG 轉換成去醣基木酚素 SECO，以降低生產成本。

4. 不同的 En 4 酵素濃度對 DFF 及 pd 3 之影響

根據上述結果篩選出 En 4 適合用來水解 pd 3 以釋出 CA、FA 及 SECO，但酵素濃度仍太高，因此進一步探討最適 En 4 酵素濃度，且也探討不同的酵素濃度對 DFF 之影響。表八為利用不同濃度的 En 4 水解 DFF 或 pd 3 對其酚類化合物濃度之影響，DFF 為寡聚合物，而 pd 3 含配醣體 CAG、FAG 及 SDG，將 1% (w/v) DFF 或 pd 3，於 pH 5 及 37°C 下，添加 En 4，其濃度分別為 50%、100%和 200% (v/w of DFF or pd 3)，反應 24 小時，置入沸水浴中加熱 15 分鐘使酵素失活後，再經甲醇萃取及離心取上澄液進行 HPLC 分析，結果顯示，當以 DFF 作為酵素之受質時，隨著 En 4 濃度的增加，能釋放出酚類化合物的種類越多，當添加 En 4 濃度達 200%時，雖可釋放出 CAG、CA、FA 及 SECO，但含量並不高，由此可見直接以含寡聚合物的原料來進行酵素水解，其轉換效率並不佳；當以 pd 3 作為酵素之受質時，50% En 4 能有效的將 CAG 及 FAG 去醣基轉換成 CA 及 FA，且 SDG 含量顯著的降低 61.89%，其中部分轉換成 SECO，當 En 4 添加 100%時，SDG 含量與控制組比較顯著的降低 86.81%，相對的 SECO 含量顯著的增加，但 CA 及 FA 的含量與 50% En 4 比較顯著的減少，當 En 4 添加 200%時，能有效的將 SDG 去醣基轉換成 SECO，其 SECO 含量為 130.48 $\mu\text{g/mL}$ 。由此可知，100% En 4 會進一步水解 CA 及 FA，但卻

表八、利用不同濃度的 En 4 水解脫脂亞麻籽粉末或脫脂亞麻籽鹼甲醇萃取物對其酚類化合物濃度之影響

Table 8. Effect of hydrolyzing 1% (w/v) DFF or 1% (w/v) pd 3 by En 4 with different concentrations on the content of phenolic compounds

Substrate ¹	Phenolic compounds ² (µg/mL)					
	CAG	FAG	SDG	CA	FA	SECO
DFF						
without	ND ³	ND	ND	ND	ND	ND
with (50%)	2.35 ± 0.01 ^a	ND	ND	1.04 ± 0.11 ^b	ND	ND
with(100%)	2.68 ± 0.33 ^a	ND	ND	2.48 ± 0.44 ^a	2.35 ± 0.01 ^a	ND
with(200%)	2.58 ± 0.01 ^a	ND	ND	4.01 ± 0.38 ^a	2.64 ± 0.29 ^a	2.26 ± 0.39 ^a
pd 3						
without	43.68 ± 0.83 ^a	21.83 ± 0.18 ^a	204.96 ± 1.66 ^a	5.66 ± 1.09 ^c	1.84 ± 0.19 ^c	ND
with (50%)	1.78 ± 0.07 ^b	ND	78.11 ± 5.01 ^b	36.55 ± 0.33 ^a	15.54 ± 0.57 ^a	81.20 ± 8.05 ^c
with(100%)	1.79 ± 0.12 ^b	ND	27.04 ± 0.04 ^c	17.05 ± 0.41 ^b	3.78 ± 0.46 ^b	116.94 ± 2.77 ^b
with(200%)	ND	ND	ND	17.35 ± 0.04 ^b	3.59 ± 0.33 ^b	130.48 ± 0.06 ^a

¹ DFF means defatted flaxseed flour; pd 3 means alkaline and methanol extract from DFF. En 4 is a commercial deglycosylated enzyme. The hydrolysis time is 24 hours. Percentage (% v/w) in the bracket means (volume of enzyme)/(weight of pd 3).

² Each value is mean ± standard derivation of three replicate analyses. Means with different superscript letters between the without enzyme versus the with enzyme or between the different concentrations of enzyme are significant differences (P<0.05) by the Duncan's multiple range test.

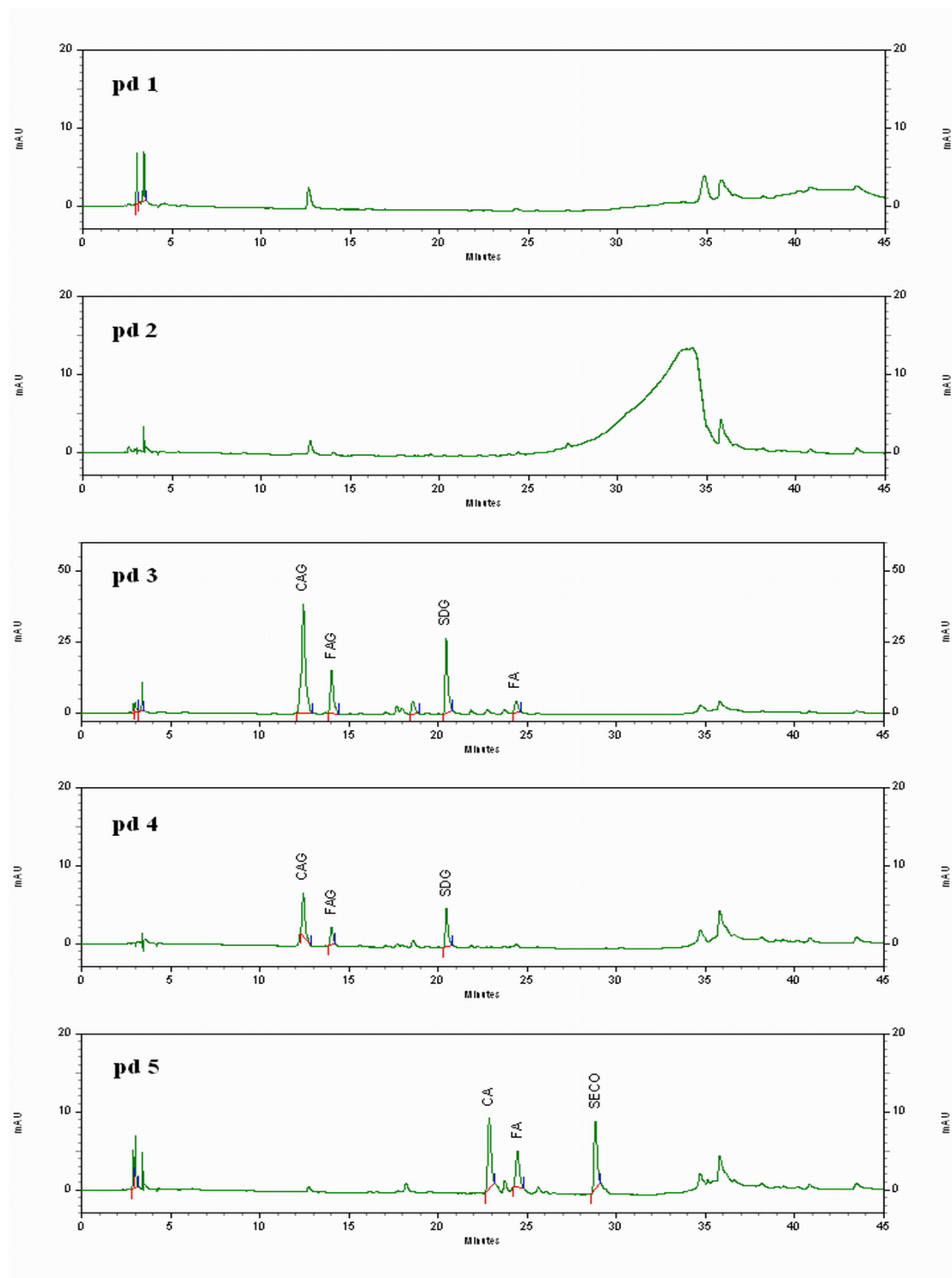
³ ND means not detectable.

不會水解 SECO;隨著 En 4 濃度的增加,SECO 含量顯著的增加,200% En 4 能完全將 SDG 去醣基而轉換成 SECO。因此,利用 200% En 4 來水解 pd 3,製備出 pd 5。

三、五種 DFF 萃取物中酚類化合物及總酚類化合物之含量

萃取物中木酚素及其他酚類化合物的含量參考 Eliasson *et al.* (2003)的方法,利用 HPLC 測定之,圖十一為此 5 種 DFF 萃取物的層析圖譜,pd 1 為水溶性萃取物,pd 2 為乙醇萃取物,pd 3 為鹼甲醇萃取物,pd 4 為熱處理甲醇萃取物,pd 5 為鹼甲醇萃取物之酵素水解產物,由圖可知,pd 1 在波長 280 nm 下無法偵測到;pd 2 在滯留時間約 25 至 35 分鐘之間有明顯突起的面積,為未被分離的寡聚合物,含木酚素及酚類化合物之複合物,此結果與 Westcott 和 Paton (2001)所作的結果相似;pd 3 及 pd 4 的成分如我們預期的,主要以配醣體酚類化合物為主,如 CAG、FAG 和 SDG,其中以 pd 3 的酚類化合物含量較高;而 pd 5 的成分也如我們預期的,主要以去醣基酚類化合物為主,如 CA、FA 和 SECO。

表九為此 5 種 DFF 萃取物中主要酚類化合物及總酚類化合物之含量,在主要酚類化合物的結果顯示,pd 1 及 pd 2 無法偵測到游離態的酚類化合物;pd 3 的成分以 CAG、FAG 和 SDG 為主,其含量分別為 10.73、5.91 和 42.26 mg/g dry matter;pd 4 的成分也是以 CAG、FAG 和 SDG 為主,其含量分別為 5.11、3.11 和 7.48 mg/g dry matter,顯著的低於 pd 3,即表示利用熱處理方法只能部份切斷寡聚合物的酯鏈,而鹼處理則能有效的切斷其酯鏈,使配醣體酚類化合物釋放出來;pd 5 的成分以去醣基的 CA、FA 和 SECO 為主,其含量分別為



圖十一、脫脂亞麻籽萃取物溶液之高效能液相層析圖。

Figure 11. HPLC chromatogram (280 nm) of extract solutions (1 mg/mL) from defatted flaxseed flour (DFF). Extracts include pd 1, pd 2, pd 3, pd 4 and pd 5. Pd 1: water extract from DFF; pd 2: ethanol extract from DFF; pd 3: alkaline and methanol extract from DFF; pd 4: heat treatment and methanol extract from DFF; pd 5: enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4.

表九、DFF 萃取物中酚類化合物及總酚類化合物之含量

Table 9. Phenolic compounds and total phenolic contents of the DFF extracts

Sample ¹	Phenolic compounds ² (mg/g dry matter)						Total phenolic content ³ (mg GAE/g dry matter)
	CAG	FAG	SDG	CA	FA	SECO	
Pd 1	ND ⁴	ND	ND	ND	ND	ND	11.30 ± 2.05 ^d
Pd 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	31.70 ± 2.17 ^b
Pd 3	10.73 ± 0.03 ^b	5.91 ± 1.23 ^b	42.26 ± 2.23 ^b	ND	3.20 ± 0.08 ^b	ND	13.89 ± 0.72 ^d
Pd 4	5.11 ± 0.01 ^c	3.11 ± 0.01 ^c	7.48 ± 0.01 ^d	ND	ND	ND	3.61 ± 1.12 ^f
Pd 5	ND	ND	ND	5.70 ± 0.01 ^a	3.85 ± 0.02 ^a	7.32 ± 0.08 ^a	6.59 ± 0.46 ^e
Pd 1-AT	3.31 ± 0.29 ^d	1.41 ± 0.12 ^d	15.97 ± 1.16 ^c	ND	ND	ND	27.07 ± 2.09 ^c
Pd 2-AT	21.85 ± 0.09 ^a	11.77 ± 0.06 ^a	60.33 ± 6.15 ^a	ND	ND	ND	66.04 ± 3.57 ^a

¹ Samples include pd 1, pd 2, pd 3, pd 4 and pd 5. Pd 1: water extract from DFF; pd 2: ethanol extract from DFF; pd 3: alkaline and methanol extract from DFF; pd 4: heat treatment and methanol extract from DFF; pd 5: enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4. Pd 1-AT or Pd 2-AT means pd 1 or pd 2 by direct alkaline treatment (1N NaOH, 25°C, 1hr).

² Phenolic compounds include coumaric acid glucoside (CAG), ferulic acid glucoside (FAG), secoisolariciresinol diglycoside (SDG), coumaric acid (CA), ferulic acid (FA) and secoisolariciresinol (SECO). Each value is mean ± standard derivation of three replicate analyses. Means with different superscript letters in the same column are significant differences (P<0.05) by the Duncan's multiple range test.

³ Total phenolic content is expressed as milligram of gallic acid equivalent (GAE) per gram dry matter.

⁴ ND means not detectable.

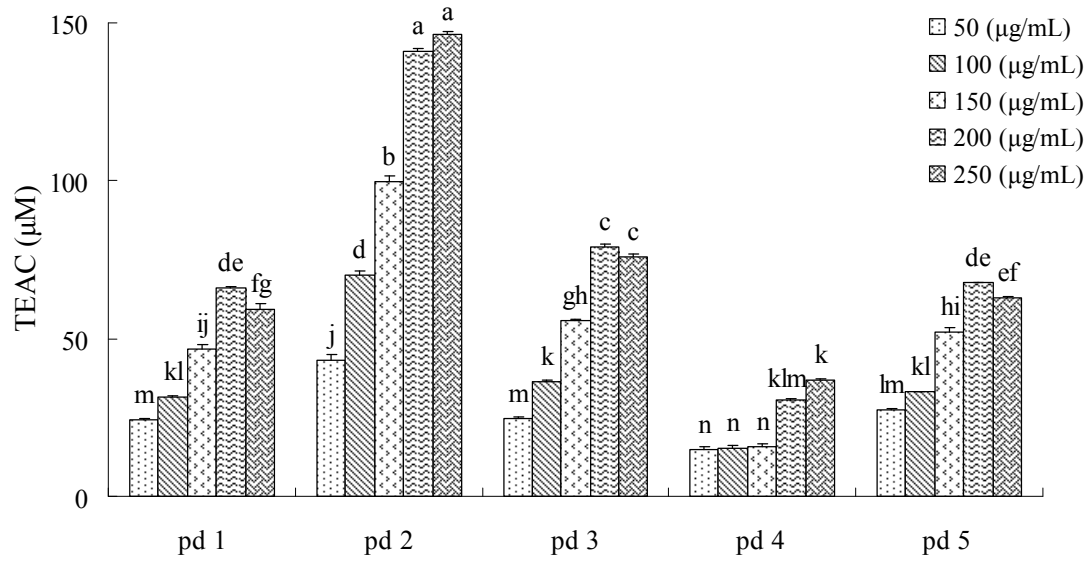
5.70、3.85 和 7.32 mg/g dry matter，證實 En 4 的確可將配醣體酚類化合物轉換成去醣基酚類化合物。

酚類化合物普遍存於植物中，主要為植物的二級代謝產物，不同植物含有不同酚類化合物，導致各種植物抗氧化活性之差異 (Catherine *et al.*, 1997)。研究報導指出酚類化合物具有良好抗氧化 (Osawa, 1999)、抗突變 (de Mejía *et al.*, 1999) 及抗腫瘤 (Soleas *et al.*, 2002) 等特性，其中以具有苯環及雙鍵結構的多酚類抗氧化活性最強。當植物的多酚類含量越高，清除自由基的能力就越強 (Robak & Gryglewski, 1988)。本實驗利用 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 可與酚類化合物之 OH 基反應之原理測定此 5 種 DFF 萃取物之總酚類化合物含量，以不同濃度的 gallic acid 做成檢量線，樣品中總酚類化合物的含量由檢量線換算其相當的 gallic acid 之含量，單位以每克樣品含 gallic acid 之當量毫克數表示。由表九結果顯示，此 5 種萃取物中，pd 2 的總酚類化合物含量最高達 31.70 mg GAE/g dry matter；其次依序為 pd 3 的 13.89 mg GAE/g dry matter，pd 1 的 11.30 mg GAE/g dry matter，pd 5 的 6.59 mg GAE/g dry matter，而 pd 4 的總酚類化合物含量最低，僅有 3.61 mg GAE/g dry matter。

四、五種 DFF 萃取物之抗氧化活性

(一) Trolox 當量的抗氧化能力 (Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC)

圖十二為此 5 種 DFF 萃取物在不同濃度下其 Trolox 當量的抗氧化能力，主要是探討樣品清除 $ABTS^+$ 陽離子自由基之能力，以評估樣品的總抗氧化活性，利用不同濃度的 Trolox 做成檢量線，換算出



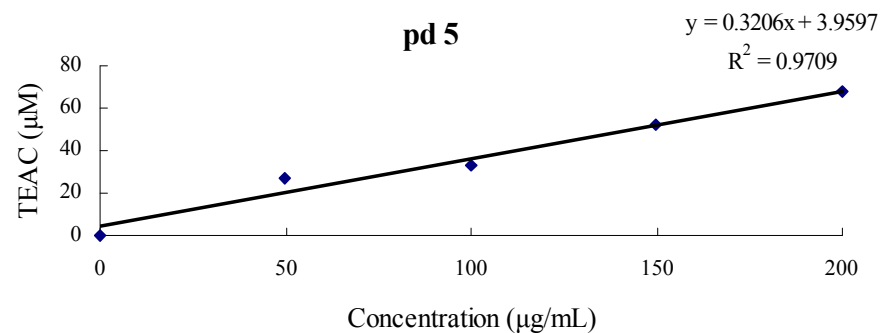
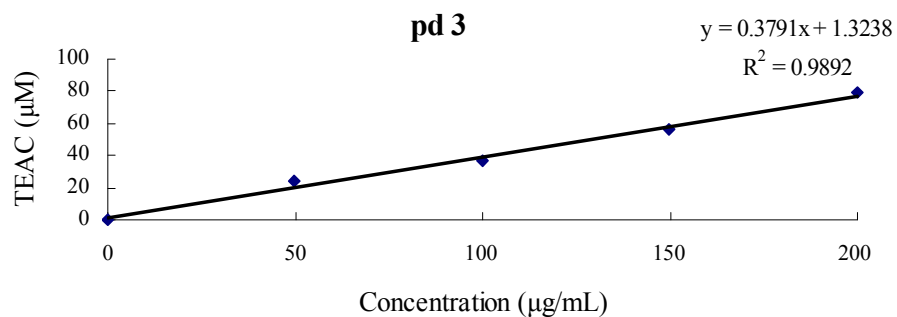
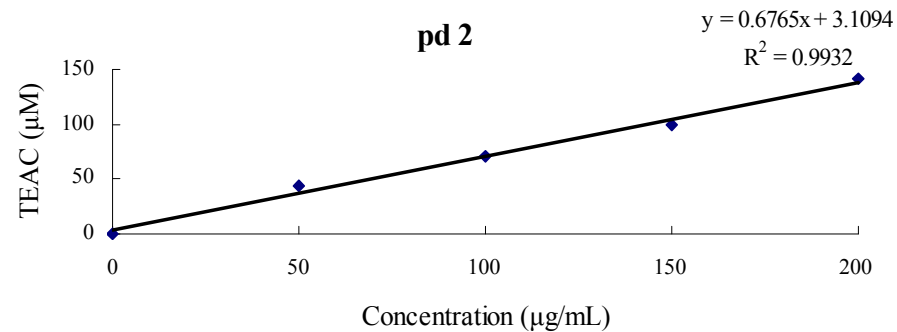
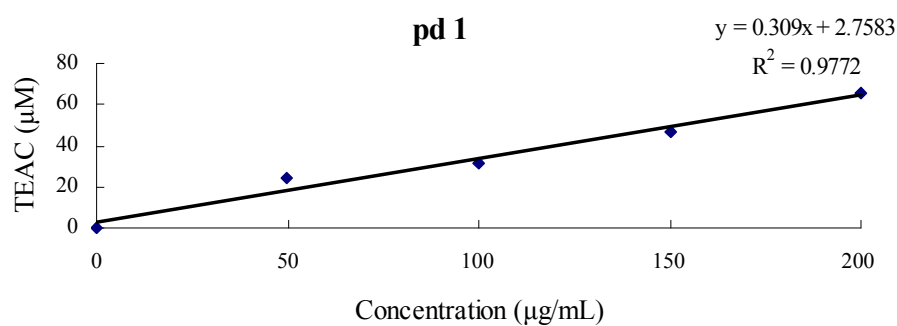
圖十二、不同濃度 DFF 萃取物其 Trolox 當量的抗氧化能力。

Figure 12. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of the DFF extracts with different concentrations. Pd 1: water extract from DFF; pd 2: ethanol extract from DFF; pd 3: alkaline and methanol extract from DFF; pd 4: heat treatment and methanol extract from DFF; pd 5: enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4. Each value is mean \pm standard derivation of three replicate analyses. Means with different superscript letters are significant differences ($P < 0.05$) by the Duncan's multiple range test.

樣品清除的能力相當於多少 μM 的 Trolox 清除的能力，此即為樣品的 TEAC，TEAC 愈高代表樣品的抗氧化性愈高，結果顯示，除了 pd 4 之外，其餘 4 種 DFF 萃取物在 50–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度時，隨著濃度增加，其 TEAC 也有增加的趨勢，呈線性關係如圖十三，其中 pd 2 的 TEAC 最高，在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下其 TEAC 約為 $140.84 \pm 4.43 \mu\text{M}$ ；pd 4 的 TEAC 最低，在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下其 TEAC 約為 $30.52 \pm 2.16 \mu\text{M}$ ，此結果與總酚類化合物含量成正相關，總酚類化合物含量越高，清除自由基的能力就越強。同一種萃取物當濃度大於 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，其 TEAC 無顯著差異，即表示萃取物的抗氧化能力在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度時已維持穩定。圖十四為不同濃度 BHT 及 Vit. C 其 Trolox 當量的抗氧化能力，結果顯示，隨著 BHT 及 Vit. C 濃度增加，其 TEAC 也呈線性關係增加，利用其回歸方程式將此 5 種 DFF 萃取物在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下的 TEAC，換算出樣品清除的能力相當於多少濃度的 BHT 及 Vit. C 清除的能力。表十為此 5 種 DFF 萃取物在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下之 BHT 及 Vit. C 當量的抗氧化能力，結果顯示，所有萃取物均具有不同程度的抗氧化活性，其中以 pd 2 的活性最高，其抗氧化能力相當於 25.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 BHT 或 30.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 Vit. C，雖然其抗氧化能力不如 BHT 及 Vit. C，但仍是一種良好的天然抗氧化劑。

(二) 螯合亞鐵離子之能力

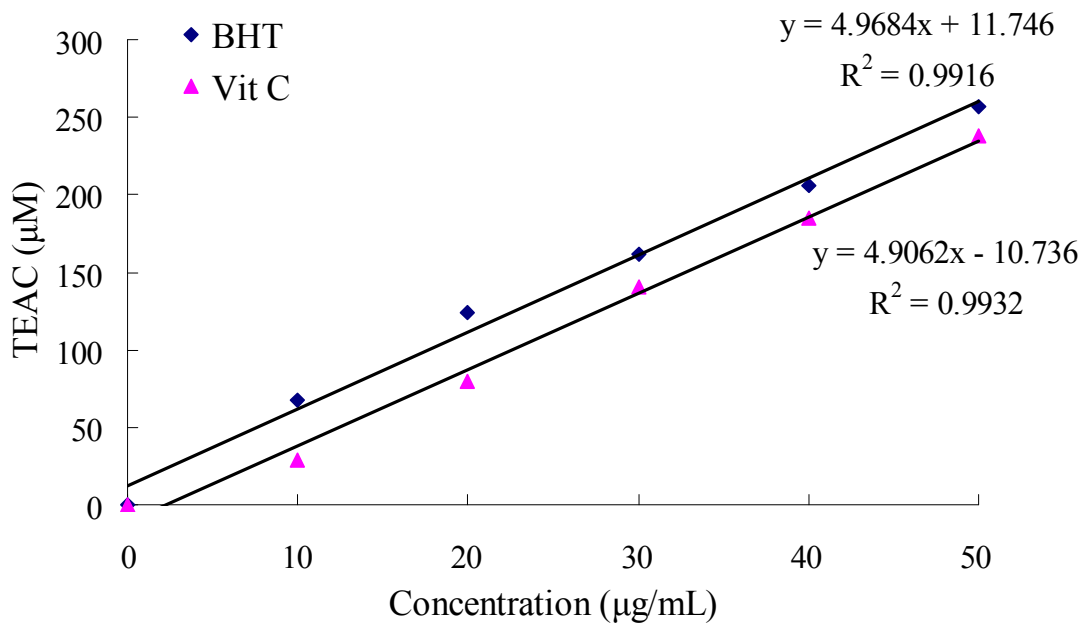
圖十五為不同濃度 DFF 萃取物、EDTA、BHT 及 Vit. C 的螯合亞鐵離子之能力， Fe^{2+} 經常是最具影響力的促氧化劑，它會促進脂質氧化作用的進行，若樣品具有螯合 Fe^{2+} 離子時，會造成 562 nm 吸光值的降低，吸光值越低代表樣品螯合亞鐵離子能力愈強，常以螯合能力



圖十三、不同濃度 pd 1、pd 2、pd 3 及 pd 5 其 Trolox 當量的抗氧化能力。

Figure 13. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of the pd 1, pd 2, pd 3 and pd 5 with different concentrations.

Pd 1: water extract from DFF; pd 2: ethanol extract from DFF; pd 3: alkaline and methanol extract from DFF; pd 5: enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4.



圖十四、不同濃度 BHT 及 Vit. C 其 Trolox 當量的抗氧化能力。

Figure 14. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of the BHT and Vit. C with different concentrations.

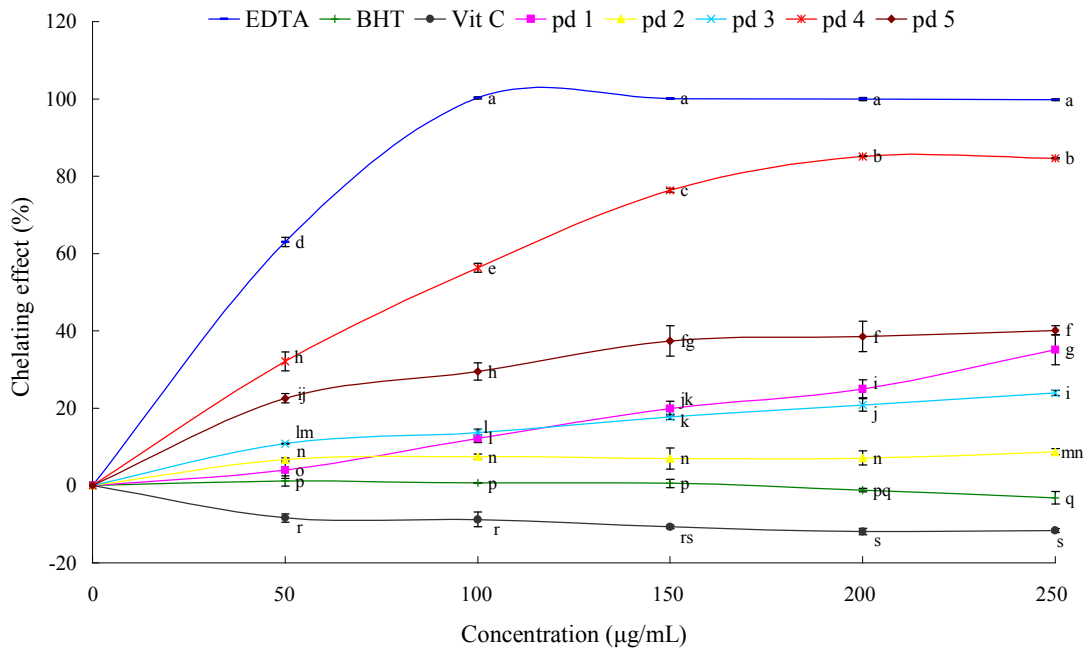
表十、DFF 萃取物在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下之 BHT 及 Vit. C 當量的抗氧化能力

Table 10. BHT and Vit. C equivalent antioxidant capacity of the DFF extracts at the same concentration (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Sample ¹	Equivalent antioxidant capacity ² ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	BHT	Vit. C
<u>200 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)</u>		
pd 1	10.93 \pm 0.39 ^c	15.62 \pm 0.40 ^c
pd 2	25.99 \pm 0.89 ^a	30.90 \pm 0.90 ^a
pd 3	13.58 \pm 0.47 ^b	18.34 \pm 0.47 ^b
pd 4	3.78 \pm 0.43 ^d	8.41 \pm 0.44 ^d
pd 5	11.26 \pm 0.21 ^c	15.99 \pm 0.21 ^c

¹ Pd 1: water extract from DFF; pd 2: ethanol extract from DFF; pd 3: alkaline and methanol extract from DFF; pd 4: heat treatment and methanol extract from DFF; pd 5: enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4.

² Each value is mean \pm standard derivation of three replicate analyses. Means with different superscript letters in the same column are significant differences ($P < 0.05$) by the Duncan's multiple range test.



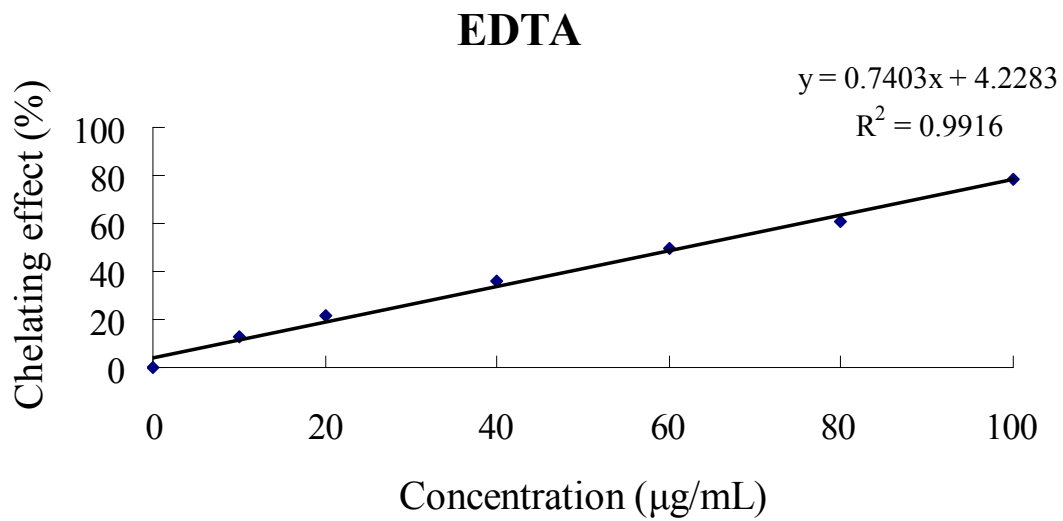
圖十五、不同濃度 DFF 萃提取物、EDTA、BHT 及 Vit. C 的螯合鐵離子之能力。

Figure 15. Chelating effects of the DFF extracts, EDTA, BHT and Vit. C with different concentrations. Chelating effect (%) = $[1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100\%$. Pd 1: water extract from DFF; pd 2: ethanol extract from DFF; pd 3: alkaline and methanol extract from DFF; pd 4: heat treatment and methanol extract from DFF; pd 5: enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4. Each value is mean \pm standard derivation of three replicate analyses. Means with different superscript letters are significant differences ($P < 0.05$) by the Duncan's multiple range test.

百分比(%)=[1-($A_{\text{sample at 562 nm}} - A_{\text{blank at 562 nm}}$) / ($A_{\text{control at 562 nm}} - A_{\text{blank at 562 nm}}$)] $\times 100\%$ 來表示，結果顯示，BHT、Vit. C 不具有螯合亞鐵離子之能力，但此 5 種 DFF 萃取物皆具有螯合亞鐵離子能力，在 250 $\mu\text{g/mL}$ 濃度下，pd 1、pd 2、pd 3、pd 4 及 pd 5 其螯合能力分別為 $35.16 \pm 3.84\%$ 、 $8.73 \pm 0.78\%$ 、 $23.90 \pm 0.65\%$ 、 $84.60 \pm 0.18\%$ 及 $40.14 \pm 1.22\%$ ，其中以 pd 4 的螯合能力最高，pd 2 的螯合能力最低。而 pd 4 在 200 及 250 $\mu\text{g/mL}$ 濃度下，其螯合亞鐵離子之能力無顯著差異，即表示 pd 4 螯合亞鐵離子之能力在 200 $\mu\text{g/mL}$ 濃度時已維持穩定，其螯合能力為 85.14%。圖十六為不同濃度 EDTA 的螯合亞鐵離子之能力，結果顯示，隨著 EDTA 濃度增加，其螯合能力也呈線性關係增加，利用其回歸方程式將 pd 4 在 200 $\mu\text{g/mL}$ 濃度下的螯合能力，換算出相當於 109.30 $\mu\text{g/mL}$ 的 EDTA 之螯合能力。Arora *et al.* (1998)認為酚類化合物抗氧化性之貢獻主要是來自於提供氫原子的能力以清除自由基；另一方面亦可螯合金屬離子，藉由不活化鐵離子而抑制活性氧的生成，進而降低氧化的發生，但由結果可得知 DFF 萃取物的螯合亞鐵離子能力與總酚類化合物含量為負相關，因此推測亞鐵離子螯合能力較好的 pd 4 樣品，不是來自於酚類化合物的貢獻，可能是配位基的分子或離子中至少有一個原子具有一對或一對以上未共用電子對，能與促氧化過渡金屬(Fe^{2+})結合，形成穩定的錯合物而抑制油脂的自氧化反應及延緩氧化反應之進行(Kochnar & Rossel, 1990)。

(三) 還原力

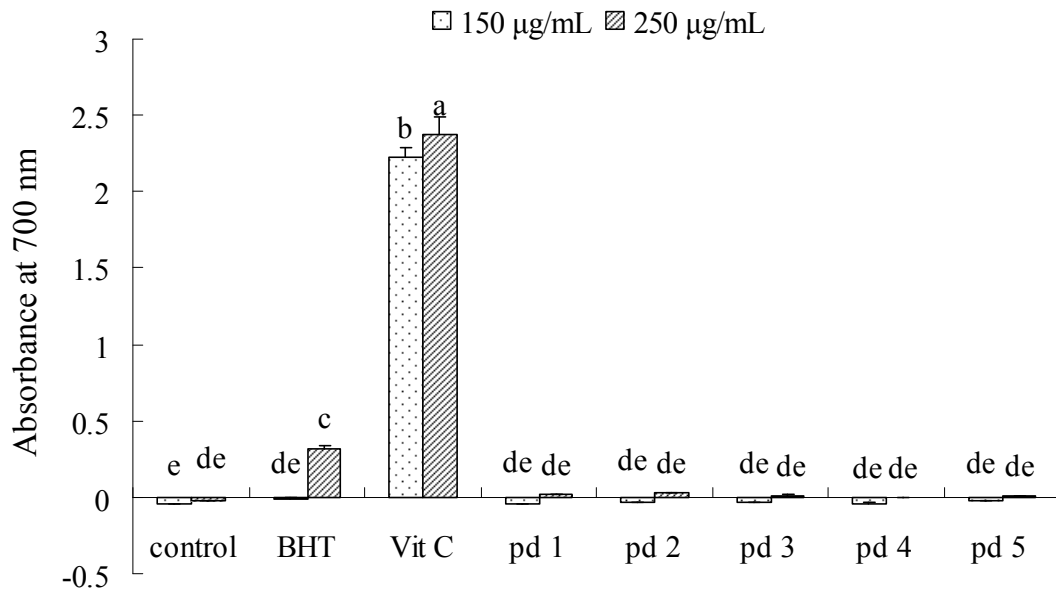
圖十七為不同濃度 DFF 萃取物、BHT 及 Vit. C 的還原能力，還原力的測定是以樣品能否做為良好電子供應者為指標，結果顯示，



圖十六、不同濃度 EDTA 的螯合亞鐵離子之能力。

Figure 16. Chelating effects of the EDTA with different concentrations.

$$\text{Chelating effect (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100\%$$



圖十七、不同濃度 DFF 萃取物、BHT 及 Vit. C 的還原能力。

Figure 17. Reducing power of the DFF extracts, BHT and Vit. C with different concentrations (150 µg/mL, 250 µg/mL). Pd 1: water extract from DFF; pd 2: ethanol extract from DFF; pd 3: alkaline and methanol extract from DFF; pd 4: heat treatment and methanol extract from DFF; pd 5: enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4. Each value is mean \pm standard derivation of three replicate analyses. Means with different superscript letters are significant differences ($P < 0.05$) by the Duncan's multiple range test.

Vit.C 具有很強的還原力，但 pd 1–pd 5 皆不具有還原能力，即表示此 5 種 DFF 萃取物皆無法提供電子進行還原反應。

(四) 清除氫氧自由基及超氧陰離子自由基之能力

表十一為不同濃度 DFF 萃取物、BHT 及 Vit. C 之清除氫氧自由基與超氧陰離子自由基之能力。由氫氧自由基清除能力之結果顯示，於 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度，除了 pd 5 和 pd 3 具有些許氫氧自由基清除能力，分別為 $14.96 \pm 1.44 \%$ 和 $0.03 \pm 2.87 \%$ ，其他萃取物皆不具有清除氫氧自由基之能力；於 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下，pd 3 的氫氧自由基清除能力為 $2.53 \pm 1.04 \%$ ，與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比較無顯著的差異，然而 pd 5 的氫氧自由基清除能力為 $4.29 \pm 1.07 \%$ ，卻顯著的降低，造成此結果的原因不確定。Prasad (1997b)指出 SDG 可以有效地清除氫氧自由基，在 36.4–2912 μM 之 SDG 濃度下，其氫氧自由基捕捉能力為 4–82%，然而從本實驗的結果中卻無法觀察到，可能是萃取物中的 SDG 含量太低，以 pd 3 之樣品溶液的濃度為 250 和 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 而言，其 SDG 濃度約僅有 15.39 μM 和 61.54 μM 。由表十一的超氧陰離子自由基清除能力之結果顯示，此 5 種 DFF 萃取物皆不具有清除超氧陰離子之能力，許多報告指出酚類化合物羥基數量與配置，尤其是具有雙羥基結構，才具有清除超氧陰離子的能力(Nakamura *et al.*, 1998; Gaulejac *et al.*, 1999; Lu & Foo, 2000)，因此可能是萃取物中的酚類化合物羥基數量與配置不具有此清除能力，而且本試驗的樣品皆溶於 50%乙醇水溶液中，除了 pd 1 外，其餘皆屬於脂溶性抗氧化劑，根據文獻指出水溶性抗氧化劑清除超氧陰離子的能力較佳，而脂溶性抗氧化劑如 BHT、 α -Tocopherol 等反而會促進超氧陰離子的形成，因此其清除超

表十一、不同濃度 DFF 萃取物、BHT 及 Vit. C 之清除氫氧自由基與超氧陰離子自由基能力

Table 11. Scavenging effects of the DFF extracts, BHT and Vit. C on hydroxyl radical and superoxide anion radical with different concentrations

Sample ²	Scavenging effect (%) ¹			
	Hydroxyl radical		Superoxide anion radical	
	<u>250 µg/mL</u>	<u>1000 µg/mL</u>	<u>250 µg/mL</u>	<u>1000 µg/mL</u>
BHT	— ³	—	25.43 ± 2.93 ^a	—
Vit. C	—	—	21.48 ± 2.27 ^a	20.30 ± 20.29 ^a
pd 1	—	—	—	—
pd 2	—	—	—	—
pd 3	0.03 ± 2.87 ^c	2.53 ± 1.04 ^{bc}	—	—
pd 4	—	—	—	—
pd 5	14.96 ± 1.44 ^a	4.29 ± 1.07 ^b	—	—

¹ Scavenging effects % (capacity to scavenging the radical) = $[1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100\%$. Each value is mean ± standard derivation of three replicate analyses. Means with different superscript letters are significant differences (P<0.05) by the Duncan's multiple range test.

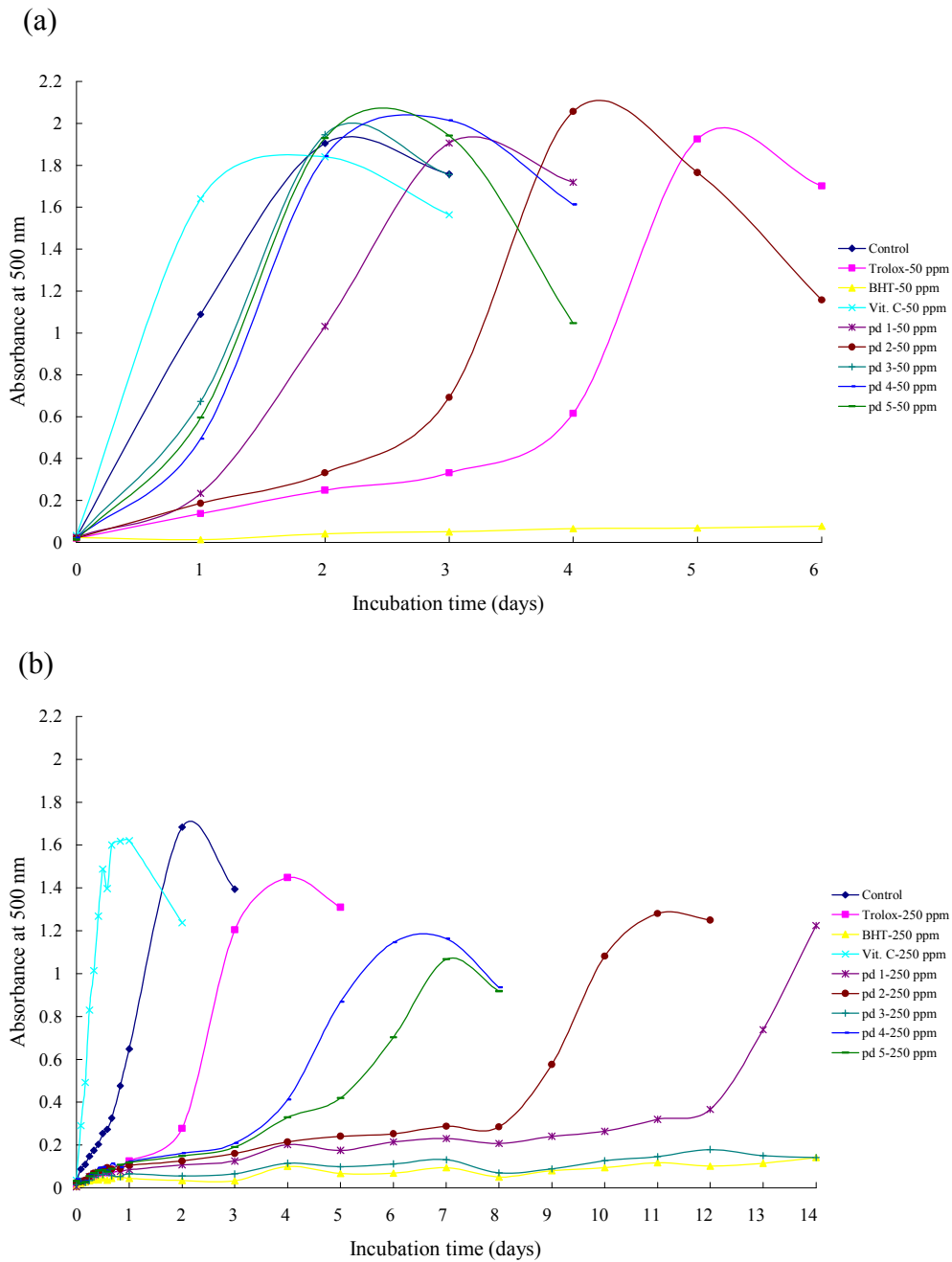
² Pd 1: water extract from DFF; pd 2: ethanol extract from DFF; pd 3: alkaline and methanol extract from DFF; pd 4: heat treatment and methanol extract from DFF; pd 5: enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4.

³ — means no scavenging effect

氧陰離子的能力較差(Kim *et al.*, 1995)。

(五) 抑制脂質氫過氧化物生成之能力

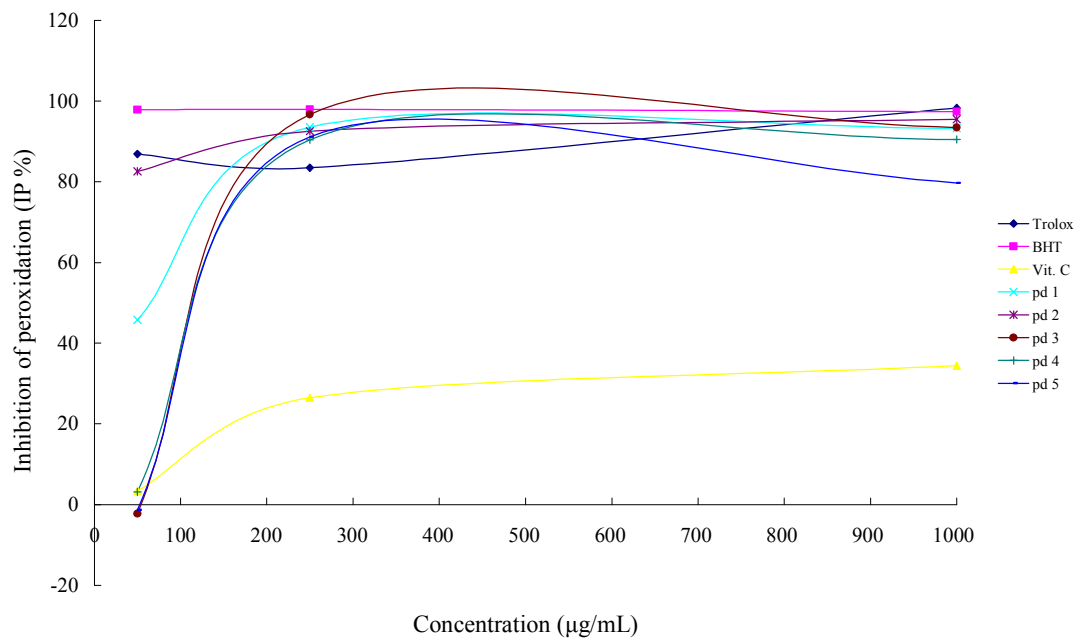
抑制脂質氫過氧化物生成的能力其測定是採用硫氰酸鐵法(ferric thiocyanate method)，以評估樣品之抗氧化性，當脂質的氧化程度愈高，氫過氧化物生成就愈多，隨即紅色硫氰酸鐵錯化合物濃度也就愈多，呈色也就愈深，因此由吸光值的大小可推而得知氧化程度，並可獲知抗氧化效力強弱。圖十八(a)為低濃度(50 $\mu\text{g/mL}$)下DFF萃取物、Trolox、BHT及Vit. C在亞麻油酸乳化液系統中的抗氧化能力，結果顯示，在沒有添加樣品之控制組，其氫過氧化物之累積於第2天達到高峰，從第3天起濃度開始下降，這是因為在氧氣充足的環境下，氫過氧化物會進一步反應轉換成二次代謝物，並減緩氫過氧化物生成所致，而且可發現Vit. C會促進脂質過氧化，於第1天時過氧化物之累積達到高峰，其抑制脂質氫過氧化物生成的能力較控制組差，而其他樣品抑制脂質氫過氧化物生成的能力為BHT > Trolox > pd 2 > pd 1 > pd 4 = pd 3 = pd 5 > Vit. C；BHT能有效的抑制脂質氫過氧化物生成，經過6天其抑制效果仍然沒有改變；Trolox其氫過氧化物之累積於第5天達到高峰；pd 2與pd 1分別於第4天及第3天達到高峰；而pd 4、pd 3及pd 5則與控制組相似，即表示低濃度下pd 4、pd 3及pd 5不具有抑制脂質氫過氧化物生成的能力，但仍優於Vit. C。圖十八(b)為高濃度(250 $\mu\text{g/mL}$)下DFF萃取物、Trolox、BHT及Vit. C在亞麻油酸乳化液系統中的抗氧化能力，控制組及Vit. C的結果與圖十八(a)同，而其他樣品之抑制脂質氫過氧化物生成的能力為BHT = pd 3 > pd 1 > pd 2 > pd 5 > pd 4 > Trolox > Vit. C。BHT及pd 3能有效的抑制脂質氫過氧化物生成，



圖十八、在亞麻油酸乳化液系統中不同濃度 DFF 萃提取物、Trolox、BHT 及 Vit. C 之抗氧化能力。

Figure 18. Antioxidant activity of the DFF extracts, Trolox, BHT, Vit. C with different concentrations in the linoleic acid emulsion system: (a) 50 µg/mL, (b) 250 µg/mL by the thiocyanate method-linoleic acid emulsion system. The reaction without sample was as the control. Pd 1: water extract from DFF; pd 2: ethanol extract from DFF; pd 3: alkaline and methanol extract from DFF; pd 4: heat treatment and methanol extract from DFF; pd 5: enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4.

經過14天其抑制效果仍然沒有改變，且pd 3其氫過氧化物之累積於第70才達到高峰(data not show)；pd 1、pd 2、pd 5、pd 4及Trolox則分別於第14、11、7、6及4天達到高峰，均優於Vit. C。圖十九為不同濃度DFF萃取物、Trolox、BHT及Vit. C在亞麻油酸乳化液系統中第二天的脂質氧化抑制率，在低濃度50 $\mu\text{g/mL}$ 時，BHT、Trolox、pd 2、pd 1及pd 4之油脂氧化抑制率分別為97.82%、86.93%、82.91%、45.81%及3.20%；在高濃度250 $\mu\text{g/mL}$ 時，抗氧化力為BHT = pd 3 > pd 1 > pd 2 > pd 5 > pd 4 > Trolox，其抑制率分別為97.89%、96.69%、93.57%、92.57%、91.12%、90.38%及83.49%，其中pd 3與同濃度下BHT之抑制率相當；而在更高濃度1000 $\mu\text{g/mL}$ 時，BHT、Trolox、pd 1、pd 2、pd 3及pd 4，其抑制率皆高於90%，但pd 5則降低至79.71%。綜合圖十八與圖十九，在低濃度(50 $\mu\text{g/mL}$)下，pd 2及pd 1優於其它DFF萃取物，可能歸因於pd 2及pd 1含有較高量的總酚類化合物；在高濃度(250 $\mu\text{g/mL}$)下，此5種DFF萃取物皆具有抑制脂質氫過氧化物生成的能力且皆優於Trolox，以pd 3最強，其SDG濃度約含有15.39 μM ，可能歸因於SDG所提供的抗氧化力(Kitts *et al.*, 1999)；其次為pd 1，其抗氧化力可能來自於酚類化合物的貢獻；pd 2為寡聚合物，已被證實具有抗氧化力(Prasad, 2005)；pd 5是以去醣基酚類化合物為主，其SECO濃度約含有5.05 μM ，SECO也被證實具有抗氧化能力(Prasad, 2000b)；而pd 4，其SDG濃度僅有2.73 μM ，遠低於pd 3，所以導致其抗氧化力較pd 3差，但仍顯著的高於Trolox及Vit. C；當在更高濃度(1000 $\mu\text{g/mL}$)下，除了pd 5外，其他DFF萃取物的抑制率皆維持穩定，即表示pd 1、pd 2、pd 3及pd 4其抑制脂質氫過氧化物生成的能力在250–1000 $\mu\text{g/mL}$



圖十九、在亞麻油酸乳化液系統中不同濃度 DFF 萃取得物、Trolox、BHT 及 Vit. C 之抗氧化能力。

Figure 19. Antioxidant activity of the DFF extracts, Trolox, BHT, Vit. C with different concentrations in the linoleic acid emulsion system. Inhibition of peroxidation (IP %) (capacity to inhibit the peroxide formation in linoleic acid at 48 h) = $[1 - (A_{\text{sample at 500 nm}} / (A_{\text{control at 500 nm}}))] \times 100\%$. The reaction without sample was as the control. Pd 1: water extract from DFF; pd 2: ethanol extract from DFF; pd 3: alkaline and methanol extract from DFF; pd 4: heat treatment and methanol extract from DFF; pd 5: enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4.

之濃度範圍內已維持穩定，但pd 5在1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度下其抑制率反而下降，其原因不明確。

綜合上述結果，此5種DFF萃取物在所測試的各項抗氧化能力並無一致的趨勢。以TEAC測定而言，此5種DFF萃取物皆具有清除 ABTS^+ ·陽離子自由基之能力，皆可作為一種提供氫原子的一級抗氧化劑，其中以pd 2的抗氧化活性最強；在200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下其TEAC範圍介於30.52–140.84 μM ，以pd 2為最高，而pd 4為最低，此結果與總酚類化合物含量成正相關，且pd 2在200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下，其抗氧化能力相當於25.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之BHT及30.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之Vit. C。以螯合亞鐵離子能力而言，此5種DFF萃取物皆具有螯合能力，其中以pd 4為較強的金屬螯合劑；在250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下其螯合力範圍介於8.73–84.60%，以pd 4為最高，而pd 2為最低，且pd 4在200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度時已維持穩定，其螯合能力相當於109.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之EDTA。就還原力而言，此5種DFF萃取物皆無法提供電子進行還原反應，皆不屬於還原劑。對於清除氫氧自由基及超氧陰離子自由基而言，此5種DFF萃取物之清除效果皆不明顯。於亞麻油酸乳化液系統中，在高濃度(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)下，此5種DFF萃取物皆具有良好的抗氧化性，於48小時下其脂質氧化的抑制率皆高於90%，其中pd 3與同濃度下BHT之抑制率相近；在低濃度(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)下，抗氧化力為 $\text{BHT} > \text{pd 2} > \text{pd 1} > \text{pd 4} = \text{pd 3} = \text{pd 5}$ ，前四者之抑制亞麻油酸氧化的能力於48小時下抑制率分別為97.82%、82.91%、45.81%及3.20%，pd 2及pd 1之脂質氧化的抑制率高於其它DFF萃取物，可能歸因於pd 2及pd 1含有較高量的總酚類化合物。

伍、結論

在 pd 4 製備條件探討中，SDG 釋放率以 pH 9、80°C、加熱 4 小時之熱處理條件顯著的高於以 Bakezyme PH800 酵素處理，分別為 46.84 和 18.38%，因此本研究以熱處理的方式製備 pd 4，雖然只能部份切斷寡聚合物的酯鍵而釋放出 SDG，但仍為鹼處理外的替代萃取方法之一；在 pd 5 製備條件探討中，篩選到的商業酵素 En 4 可用來取代 HP-2 將 SDG 去醣基轉換成 SECO，前者酵素使用成本為後者的 1/190，然而 En 4 為混合酵素，且含有破壞 CA 和 FA 的水解酵素，若能進一步純化出切除醣基的酵素，不但可減少酵素使用的濃度，亦可保留完整的 CA 和 FA。

依據 HPLC 分析，pd 1 及 pd 2 不具有游離態的酚類化合物；pd 3 及 pd 4 以配醣體酚類化合物 CAG、FAG 和 SDG 為主，其中以 pd 3 的酚類化合物含量較高；而 pd 5 以去醣基酚類化合物 CA、FA 和 SECO。另外，依據比色法分析，pd 2 的總酚類化合物含量最高達 31.70 mg GAE/g dry matter；其次依序為 pd 3、pd 1、pd 5；而 pd 4 的總酚類化合物含量最低，僅有 3.61 mg GAE/g dry matter。

依據抗氧化活性分析的結果，此 5 種 DFF 萃取物皆具有清除 ABTS⁺·陽離子自由基之能力，為一級抗氧化劑，且皆具有金屬螯合能力，此外，在高濃度(250 µg/mL)下，亦能抑制脂質氫過氧化物生成。以 pd 2 具有較高的清除 ABTS⁺·陽離子自由基能力，且在低濃度下(50 µg/mL)也具有減緩脂質過氧化之能力，主要歸因於高含量的總酚類化合物；pd 3 於高濃度下(250 µg/mL)具有較強的抑制脂質氫過氧化

物生成之能力，其抑制率與同濃度的 BHT 相近，可能歸因於木酚素 SDG 之貢獻；pd 4 為良好的金屬螯合劑，在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度時，其螯合能力相當於 109.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 EDTA；雖然 pd 5 清除 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 陽離子自由基之能力、金屬螯合能力及減緩脂質過氧化能力稍差，但卻具有些許的氫氧自由基清除能力，可能歸因於木酚素 SECO 之貢獻。

在未來實驗上，將進一步進行 En 4 的區分純化，將切除醣基的酵素區分出來，亦可避免 CA 和 FA 受到其他酵素水解破壞；且進一步純化 DFF 萃取物，生產高純度且抗氧化活性強的機能性成分，未來可用於量化生產，也可望做為未來運用於動物模式上探討生理功能之基礎。

陸、參考文獻

- 拱玉郎。1997。天然抗氧化劑發展近況。食品工業，29(3):29-37。
- 洪千雅。2000。仙草抗氧化機能性之研究。國立中興大學食品科學系博士論文。
- 郭悅雄。1995。自由基、活性氧與抗氧化劑。台灣科學，48(2):164-177。
- Adlercreutz, H., Mousavi, Y., Clark, J., Höckerstedt, K., Hämäläinen, E., Wähälä, K., Mäkelä, T. and Hase, T. (1992). Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 41:331-337.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Lampe, J., Wähälä, K., Mäkelä, T., Brunow, G. and Hase, T. (1993a). Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas-chromatography mass-spectrometry. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 53:5-18.
- Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wähälä, K., Mäkelä, T., Brunow, G., Hase, T., Arosemena, P.J., Kellis, J.T. and Vickery, L.E. (1993b). Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 44:127-153.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Kurzer, M.S., Wähälä, K., Mäkelä, T. and Hase, T. (1995). Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of unconjugated lignans and isoflavonoids in human feces, with preliminary results in omnivorous and vegetarian women. *Analytical Biochemistry*, 225:101-108.
- Amarowicz, R., Wanasundara, U., Wanasundara, J. and Shahidi, F. (1993). Antioxidant activity of ethanolic extracts of flaxseed in a β -carotene-linoleate model system. *Journal of Food Lipids*, 1:111-117.
- Arnao, M.B., Cano, A., Hernandez-Ruiz, J., Garcia-Canovas, F. and Acosta, M. (1996). Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Analytical Biochemistry*,

236:255-261.

- Arora, A., Nair, M.G. and Strasburg, G.M. (1998). Structure-Activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine*, 24:1355-1363.
- Axelsson, M. and Setchell, K.D.R. (1980). Conjugation of lignans in human urine. *FEBS Letters*, 122:49-53.
- Axelsson, M. and Setchell, K.D.R. (1981). The excretion of lignans in rats – evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. *FEBS letters*, 123:337-342.
- Axelsson, M., Sjövall, J., Gustafsson, B.E. and Setchell, K.D.R. (1982a). Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature*, 298:659-660.
- Axelsson, M., Kirk, D.N., Farrant, R.D., Cooley, G., Lawson, A.M. and Setchell, K.D.R. (1982b). The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-4'-hydroxyphenylchroman] in human urine. *Biochemical Journal*, 201:353-357.
- Axelsson, M., Sjövall, J., Gustafsson, B.E. and Setchell, K.D.R. (1984). Soya – a dietary source of the nonsteroidal oestrogen equol in man and animals. *Journal of Endocrinology*, 102:49-56.
- Ayres, D.C. and Loike, J.D. (1990). Lignans: Chemical, biological, and clinical properties, Cambridge University Press, Cambridge, pp 1-11; 85-112.
- Bakke, J.E. and Klosterman, H.J. (1956). A new diglucoside from flaxseed. *Proceedings of the North Dakota Academy of Science*, 10:18-22.
- Bambagiotti-Alberti, M., Coran, S.A., Ghiara, C., Giannellini, V. and Raffaelli, A. (1994). Revealing the mammalian lignan precursor secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed by ionspray mass-spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8:595-598.
- 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 Radical Biology and Medicine*, 37:1854-1863.
- Begum, A.N., Nicolle, C., Mila, I., Lapierre, C., Nagano, K., Fukushima, K., Heinonen, S.M., Adlercreutz, H., Rémésy, C. and Scalbert, A. (2003). Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats.

- Journal of nutrition, 134:120-127.
- BeMiller, J.N. (1973). Quince seed, psyllium seed, flaxseed and okra gums. In: R.L. Whistler and J.N. BeMiller (Eds.), Industrial gums. Academic Press, New York, pp. 331-337.
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z. and Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sciences, 65:1865-1874.
- Bhatty, R.S. (1997). Nutrient composition of whole flaxseed and flaxseed meal. In: S.C. Cunnane and L.U. Thompson (Eds.), Flaxseed in human nutrition. AOCS Press, Champaign, IL, pp. 22-42.
- Bonorden, W.R. and Pariza, M.W. (1994). Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: F.N. Kostsonis, M. Mackey, and J. Hjelle (Eds.), Nutr. Toxicol. Raven press, New York, pp. 19-48.
- Borriello, S.P., Setchell, K.D.R., Axelson, M. and Lawson, A.M. (1985). Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. Journal of applied bacteriology, 58:37-43.
- Bowey, E., Adlercreutz, H. and Rowland, I. (2003). Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. Food and Chemical Toxicology, 41:631-636.
- Cacace, J.E. and Mazza, G. (2006). Pressurized low polarity water extraction of lignans from whole flaxseed. Journal of Food Engineering, 77:1087-1095.
- Catherine, A., Rice-Evans, C., Miller, N.J. and George, P. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science, 2(4):152-159.
- Cayuella-Martinez, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. Biochimie, 77:147-161.
- Charlet, S., Bensaddek, L., Raynaud, S., Gillet, F., Mesnard, F. and Fliniaux, M.A. (2002). An HPLC method for the quantification of anhydrosecoisolariciresinol. Application to the evaluation of flax lignan content. Plant physiology and biochemistry, 40:225-229.
- Chen, J., Hui, E., Ip, T. and Thompson, L.U. (2004). Dietary flaxseed enhances the inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) in nude mice. Clinical Cancer Research, 10:7703-7711.
- Chen, H.H., Xu, S.Y. and Wang, Z. (2006). Gelation properties of flaxseed gum. Journal of Food Engineering, 77:295-303.

- Chung, M.W.Y., Lei, B. and Li-Chan, E.C.Y. (2005). Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chemistry*, 90:271-279.
- Coskuner, Y. and Karababa, E. (2007). Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food Engineering*, 78:1067-1073.
- Cui, W., Kenaschuk, E. and Mazza, G. (1996). Influence of genotype on chemical composition and rheological properties of flaxseed gums. *Food Hydrocolloids*, 10:221-227.
- Culter, R.G. (1991). Antioxidants and aging. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53:373s-379s.
- Czarnecki, S.K. and Kritchevsky, D. (1992). Dietary protein and atherosclerosis. In: G.U. Liepa, D.C. Bietz, A.C. Beynen, and M.A. Gorman (Eds.), *Dietary proteins: how they alleviate disease and promote better health*. Champaign, American Oil Chemists' Society, pp. 42-56.
- Dabrosan, C., Chen, J., Wang, L. and Thompson, L.U. (2002). Flaxseed inhibits metastasis and decreases extracellular vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts. *Cancer Letter*, 185:31-37.
- Dabrowski, K.J. and Sosulski, F.W. (1984). Composition of free and hydrolyzable acids in defatted flours of ten oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32:128-130.
- Daun, J.K. and DeClercq, D.R. (1994). Sixty years of Canadian flaxseed quality surveys at the Grain Research Laboratory. *Proceedings Flax Institute*, 55:192-200.
- Degenhardt, A., Habben, S. and Winterhalter, P. (2002). Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography. *Journal of chromatography A*, 943:299-302.
- Denis, L., Morton, M.S. and Griffiths, K. (1999). Diet and its preventive role in prostatic disease. *European Urology*, 35:377-387.
- Di Padova, C., Bosisio, E., Cighetti, G., Rovagnati, P., Mazzocchi, M., Colombo, C. and Tritapepe, R. (1982). 3-Hydroxy-3-methylglutaric acid (HMGA) reduces dietary cholesterol induction of saturated bile in hamster. *Life Sciences*, 30:1907-1914.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. and Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate)

- as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315:161-169.
- Dobbins, T.A. and Wiley, D.B. (2003). Process for recovering secoisolariciresinol diglycoside from de-fatted flaxseed. United States patent 20030216553.
- Duh, P.D., Tu, Y.Y. and Yen, G.C. (1999). Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32:269-277.
- Eliasson, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R. and Åman, P. (2003). High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction. *Journal of chromatography A*, 1012:151-159.
- Fedeniuk, R.W. and Biliaderis, C.G. (1994). Composition and physicochemical properties of linseed mucilage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 240-247.
- Freeman, T.P. (1995). Structure of flaxseed. In: S.C. Cunnane and L.U. Thompson (Eds.), *Flaxseed in human nutrition*. AOCS Press, Champaign, IL, pp. 11-21.
- Friedman, M., Brandon, D.L., Bates, A.H. and Hymowitz, T. (1991). Comparison of a commercial soybean cultivar and an isolate lacking the Kunitz trypsin inhibitor: composition, nutritional value, and effects of heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39:327-335.
- de Gaulejac, N.S.C., Provost, C. and Vivas, N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:425-431.
- Giese, J. (1996). Antioxidants: Tool for preventing lipid oxidation. *Food Technology*, 11:73-82.
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A. and Scaccini, C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:361-367.
- Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants in ageing and disease: fact or fantasy. In: B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Antioxidants in nutrition, health, and disease*. Oxford University press, Oxford New York Tokyo, pp. 111-135.
- Haggans, C.J., Hutchins, A.M., Olson, M.A., Thomas, W., Martini, M.C.

- and Slavin, J.L. (1999). Effect flaxseed consumption on urinary estrogen metabolites in postmenopausal women. *Nutrition and Cancer*, 33:188-195.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989a). Free radicals, ageing and disease. In: B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, pp. 484-487.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989b). Free radicals and toxicology. In: B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, pp. 299-365.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186:1-85.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52(8):253-265.
- Halliwell, B., Mutrcia, M.A., Chirico, S. and Aruoma, O. (1995). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35:7-20.
- Harris, R.K. and Haggerty, W.J. (1993). Assays for potentially anticarcinogenic phytochemicals in Flaxseed. *Cereal foods world*, 38:147-151.
- Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T., Nishibi, S. and Adlercreutz, H. (2001). In vitro metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:3178-3186.
- Heintzman, R. and Bennett, M.L. (2003). Process for extraction and stabilization of phytoestrogens from flaxseed and product therefrom. United States Patent 20030060420.
- Hosseinian, F. (2006). Antioxidant properties of flaxseed lignans using in vitro model system. *A PhD. thesis from College of Pharmacy and Nutrition*, Saskatoon, University of Saskatchewan, pp. 1-257.
- Hutchins, A.M., Martini, M.C., Olson, B.A., Thomas, W. and Slavin, J.L. (2000). Flaxseed influences urinary lignan excretion in a dose-dependent manner in postmenopausal women. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 9:1113-1118.
- Jenab, M. and Thompson, L.U. (1996). The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and beta-glucuronidase activity.

- Carcinogenesis, 17:1343-1348.
- Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Vidgen, E., Agarwal, S., Rao, A.V., Rosenberg, R.S., Diamandis, E.P., Novokmet, R., Mehling, C.C., Perera, T., Griffin, L.C. and Cunnane, S.C. (1999). Health aspects of partially defatted flaxseed, including effects on serum lipids, oxidative measures, and ex vivo androgen and progestin activity: a controlled crossover trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69:395-402.
- Johnsson, P., Kamal-Eldin, A., Lundgren, L.N. and Åman, P. (2000). HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:5216-5219.
- Johnsson, P., Peerlkamp, N., Kamal-Eldin, A., Andersson, R.E., Andersson, R., Lundgren, L.N. and Åman, P. (2002). Polymeric fractions containing phenol glucosides in flaxseed. *Food chemistry*, 76:207-212.
- Johnsson, P. (2004). Phenolic compounds in flaxseed: Chromatographic and spectroscopic analyses of glucosidic conjugates. *A PhD. thesis from Department of Food Science*, Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, pp. 1-36.
- Julkunen-Titto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33:213-217.
- Kamal-Eldin, A., Peerlkamp, N., Johnsson, P., Andersson, R., Andersson, R.E., Lundgren, L.N. and Åman, P. (2001). An oligomer from flaxseed composed of secoisolariciresinoldiglucoside and 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid residues. *Phytochemistry*, 58:587-590.
- Kellogg, E.W. and Fridovich, I. (1975). Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *Journal of Biological Chemistry*, 250:8812-8817.
- Kim, S.J., Han, D., Moon, K.D. and Rhee, J.S. (1995). Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59:822-826.
- Kitts, D.D., Yuan, Y.V., Wijewickreme, A.N. and Thompson, L.U. (1999). Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 202:91-100.
- Klosterman, H.J. and Smith, F. (1954). The isolation of β -hydroxy- β -methylglutaric acid from the seed of flax (*Linum*

- usitatissimum*). Journal of the American Chemical Society, 76:1229-1230.
- Klosterman, H.J., Smith, F. and Clagett, C.O. (1955). The constitution of Linocinnamarin. Journal of the American Chemical Society, 77:420-421.
- Knust, U., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Strowitzki, T. and Owen, R.W. (2006). Analysis of enterolignan glucuronides in serum and urine by HPLC-ESI-MS. Food and Chemical Toxicology, 44:1038-1049.
- Kochnar, S.P. and Rossel, J.B. (1990). Detection, estimation and evaluation of antioxidants in food systems. In: B.J.F. Huson (Eds.), Food antioxidant. Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 19-64.
- Kozłowska, H., Zadernowski, R. and Sosulski, F.W. (1983). Phenolic acids in oilseed flours. Nahrung, 27:449-453.
- Kritchevsky, D. (1995). Fibre effects on hyperlipidemia. In: S.C. Cunnane and L.U. Thompson (Eds.), Flaxseed in Human Nutrition. AOCS Press, Champaign, IL, pp. 174-186.
- Kuijsten, A., Arts, I.C., Vree, T.B. and Hollman, P.C. (2005). Pharmacokinetics of enterolignans in healthy men and women consuming a single dose of secoisolariciresinol diglucoside. Journal of Nutrition, 135:795-801.
- Kuijsten, A., Arts, I.C., Hollman, P.C., van't Veer, P. and Kampman, E. (2006). Plasma enterolignans are associated with lower colorectal adenoma risk. Cancer Epidemiology, Biomarker and Prevention, 15:1132-1136.
- Labuza, T.P. (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. CRC Critical Reviews in Food Science and Technology, 2:355-405.
- Lampe, J.W., Martini, M.C., Kurzer, M.S., Adlercreutz, H. and Slavin, J.L. (1994). Urinary lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder. American Journal of Clinical Nutrition, 60:122-128.
- Li, D., Yee, J.A., Thompson, L.U. and Yan, L. (1999). Dietary supplementation with secoisolariciresinol diglycoside (SDG) reduces experimental metastasis of melanoma cells in mice. Cancer Letters, 142:91-96.
- Li-Chan, E.C.Y. and Ma, C.Y. (2002). Thermal analysis of flaxseed (*Linum usitatissimum*) proteins by differential scanning calorimetry.

- Food Chemistry, 77:495-502.
- Liggins, J., Crimwood, R. and Bingham, S.A. (2000). Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples. *Analytical Biochemistry*, 287:102-109.
- Lin, X., Switzer, B.R. and Demark-Wahnefried, W. (2001). Effect of mammalian lignans on the growth of prostate cancer cell lines. *Anticancer Research*, 21:3995-4000.
- Lin, X., Gingrich, J.R., Bao, W., Li, J., Haroon, Z.A. and Demark-Wahnefried, W. (2002). Effect of flaxseed supplementation on prostatic carcinoma in transgenic mice. *Urology*, 60:919-924.
- Long, W. [Personal communication, 1997]. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Plant and Dairy Foods and Beverages. College Park, MD.
- Lu, Y. and Foo, L.Y. (2000). Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68:81-85.
- Lupien, P.J., Moorjani, S., Brun, D. and Biemann, I. (1979). Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid on plasma and low-density lipoprotein cholesterol levels in familial hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Pharmacology*, 19:120-126.
- MacRae, W.D. and Towers, G.H.N. (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry*, 23:1207-1220.
- Maxwell, S.R.J. (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49:345-361.
- Mazur, W.M., Fotsis, T., Wähälä, K., Ojala, S., Salakka, A. and Adlercreutz, H. (1996). Isotope-dilution gas-chromatographic mass-spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol and lignans in food samples. *Analytical Biochemistry*, 233:169-180.
- Mazur, W.M. and Adlercreutz, H. (1998). Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment: naturally occurring oestrogens in food. *Pure and Applied Chemistry*, 70:1759-1776.
- Mazur, W.M., Duke, J.A., Wähälä, K., Rasku, S. and Adlercreutz, H. (1998). Isoflavones and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. *Nutritional Biochemistry*, 9:193-200.
- Mazza, G. and Biliaderis, C.G. (1989). Functional properties of flaxseed mucilage. *Journal of Food Science*, 54:1302-1305.
- Mazza, G. and Oomah, B.D. (1995). Flaxseed, dietary fibre, and

- cyanogens. In: S.C. Cunnane and L.U. Thompson (Eds.), *Flaxseed in Human Nutrition*. AOCS Press, Champaign, IL, pp. 56-81.
- Meagher, L.P., Beecher, G.R., Flanagan, V.P. and Li, B.W. (1999). Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:3173-3180.
- de Mejía, E.G., Castaño-Tostado, E. and Loarca-Piña, G. (1999). Antimutagenic effect of natural phenolic compounds in beans. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 44:1-9.
- Milder, I.E.J., Arts, I.C.W., Venema, D.P., Lasaroms, J.J.P., Wähälä, K. and Hollman, P.C.H. (2004). Optimization of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol and pinoresinol in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:4643-4651.
- Mitsuda, H., Yuasumoto, K. and Iwami, K. (1996). Antioxidation action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo*, 19:210-214.
- Morris, D.H. *Flax - A Health and Nutrition Primer*. Web URL: <http://www.flaxcouncil.ca>. (accessed Sep 2004).
- Morton, M.S., Wilcox, G., Wahlqvist, M.L. and Griffiths, K. (1994). Determination of lignans and isoflavonoids in human female plasma following dietary supplementation. *Journal of Endocrinology*, 142:251-59.
- Nakamura, Y., Ohto, Y., Murakami, A. and Ohigashi, H. (1998). Superoxide scavenging activity of rosmarinic acid from *Perilla Frutescens* Britton Var. *acuta* f. *viridis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:4545-4550.
- Nesbitt, P.D., Lam, Y. and Thompson, L.U. (1999). Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69:549-555.
- van Niekerk, J.L., Hendriks, T., Gevers Leuven, J.A., Havekes, L. and de Boer, H.H. (1984). The lipid lowering effects of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid and bile acid drainage in WHHL rabbits. *Clinical Science*, 67:439-444.
- Nurmi, T., Voutilainen, S., Nyyssönen, K., Adlercreutz, H. and Salonen, J.T. (2003). Liquid chromatography method for plant and mammalian lignans in human urine. *Journal of Chromatography B*, 798:101-110.

- Obermeyer, W.R., Musser, S.M., Betz, J.M., Casey, R.E., Pohland, A.E. and Page, S.W. (1995). Chemical studies of phytoestrogens and related compounds in dietary supplements: Flax and Chaparral. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208:6-12.
- Oomah, B.D. and Mazza, G. (1993). Flaxseed proteins—A review. *Food Chemistry*, 48:109-114.
- Oomah, B.D., Kenaschuck, E.O. and Mazza, G. (1995). Phenolic acids in flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:2016-2019.
- Oomah, B.D., Mazza, G. and Kenaschuck, E.O. (1996). Flavonoid content of flaxseed. Influence of cultivar and environment. *Euphytica*, 90:163-167.
- Oomah, B.D. and Mazza, G. (2000). Bioactive components of flaxseed: occurrence and health benefits. In: F. Shahidi and C.T. Ho (Eds.), *Phytochemicals and phytopharmaceuticals*. AOCS Press, Champaign, pp. 105-120.
- Orcheson, L.J., Rickard, S.E., Seidl, M.M. and Thompson, L.U. (1998). Flaxseed and its mammalian lignan precursor cause a lengthening or cessation of estrous cycling in rats. *Cancer Letters*, 125:69-76.
- Osawa, T. (1999). Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress. *Mechanisms of Ageing and Development*, 111:133-139.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44:307-315.
- Park, M.S. and Liepa, G.U. (1982). Effects of dietary protein and amino acids on the metabolism of cholesterol-carrying lipoproteins in rats. *Journal of Nutrition*, 112:1892-1898.
- Phipps, W.R., Martini, M.C., Lampe, J.W., Slavin, J.L. and Kurzer, M.S. (1993). Effect of flax seed ingestion on the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 77:1215-1219.
- Prasad, K., Gupta, J.B., Kalra, J., Lee, P., Mantha, S.V. and Bharadwaj, B. (1996). Oxidative stress as a mechanism of cardiac failure in chronic volume overload in canine model. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 28:375-385.
- Prasad, K. (1997a). Dietary flax seed in prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 132:69-76.
- Prasad, K. (1997b). Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flax-seed. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 168:117-123.

- Prasad, K. (1999). Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerosis by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed. *Circulation*, 99:1355-1362.
- Prasad, K. (2000a). Oxidative stress as a mechanism of diabetes in diabetic BB prone rats: effect of secoisolariciresinol diglucoside (SDG). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 209:89-96.
- Prasad, K. (2000b). Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone. *International Journal of Angiology*, 9:220-225.
- Prasad, K. (2001). Secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed delays the development of type 2 diabetes in Zucker rat. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 138:32-39.
- Prasad, K. (2005). Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis*, 179:269-275.
- Pszczola, D.E. (2000). Genes and diet: the specialized role ingredients may play. *Food Technology*, 54:82-84, 96.
- Rickard, S.E., Orcheson, L.J., Seidl, M.M., Luyengi, L., Fong, H.S. and Thompson, L.U. (1996). Dose-dependent production of mammalian lignans in rats and in vitro from the purified precursor secoisolariciresinol diglycoside in flaxseed. *Journal of nutrition*, 126:2012-2019.
- Rickard, S.E. and Thompson, L.U. (1997). Health effects of flaxseed mucilage, lignans. *Inform*, 8:860-865.
- Rickard, S.E., Yuan, Y.V. and Thompson, L.U. (2000). Plasma insulin-like growth factor I levels in rats are reduced by dietary supplementation of flaxseed or its lignan secoisolariciresinol diglycoside. *Cancer Letters*, 161:47-55.
- Robak, J. and Gryglewski, I.R. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, 37:837-841.
- Saarinen, N.M., Smeds, A., Mäkelä, S.I., Ämmälä, J., Hakala, K., Pihlava, J.M., Ryhänen, E.L., Sjöholm, R. and Santti, R. (2002). Structural determinants of plant lignans for the formation of enterolactone in vivo. *Journal of Chromatography B*, 777:311-319.
- Sano, T., Oda, E., Yamashita, T., Shiramasa, H., Ijiri, Y., Yamashita, T. and Yamamoto, J. (2003). Antithrombotic and anti-atherogenic effects of partially defatted flaxseed meal using a laser-induced thrombosis test in apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor deficient

- mice. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 14:707-712.
- Schwass, D.E. and Finnley, J.W. (1984). Heat and alkaline damage to proteins: Racemization and lysinoalanine formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32:1377-1382.
- Schwartz, H. and Sontag, G. (2006). Determination of secoisolariciresinol, lariciresinol and isolariciresinol in plant foods by high performance liquid chromatography coupled with coulometric electrode array detection. *Journal of Chromatography B*, 838:78-85.
- Setchell, K.D.R., Lawson, A.M., Axelson, M. and Adlercreutz, H. (1979). The excretion of two new phenolic compounds during the human menstrual cycle and in pregnancy, endocrinological cancer, ovarian function and disease. In: H. Adlercreutz, R.D. Bulbroock, H.J. van der Molen, A. Vermeulen, and S. Sciarra (Eds.), *Proceedings of the IX meeting of the international study group for steroid hormones*, Rome, December 5-7, 515:207-215.
- Setchell, K.D.R., Lawson, A.M., Borriello, S.P., Harkness, R., Gordon, H., Morgan, D.M.L., Kirk, D.N., Adlercreutz, H. and Anderson, L.C. (1981). Lignan formation in man-microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *The Lancet*, 318:4-7.
- Setchell, K.D.R., Lawson, A.M., Borriello, S.P., Adlercreutz, H. and Axelson, M. (1982). Formation of lignans by intestinal microflora. In: R.A. Malt and R.C.N. Williamson (Eds.), *Falk Symposium 31, Colonic Carcinogenesis*. MTP Press Ltd., Lancaster, pp. 93-97.
- Shahidi, F. and Wanasundara, P.K. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32:67-103.
- Shukla, R., Hilaly, A.K. and Moore, K.M. (2003). Process for obtaining lignan. United States patent 20030055227.
- Sicilia, T., Niemeyer, H.B., Honig, D.M. and Metzler, M. (2003). Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:1181-1188.
- Simopoulos, A.P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(suppl):560S-569S.
- Smeds, A.I., Saarinen, N.M., Hurmerinta, T.T., Penttinen, P.E., Sjöholm, R.E. and Mäkelä, S.I. (2004). Urinary excretion of lignans after administration of isolated plant lignans to rats: the effect of single dose and ten-day exposures. *Journal of Chromatography B*, 813:303-312.
- Smeds, A.I., Hakala, K., Hurmerinta, T.T., Kortela, L., Saarinen, N.M.

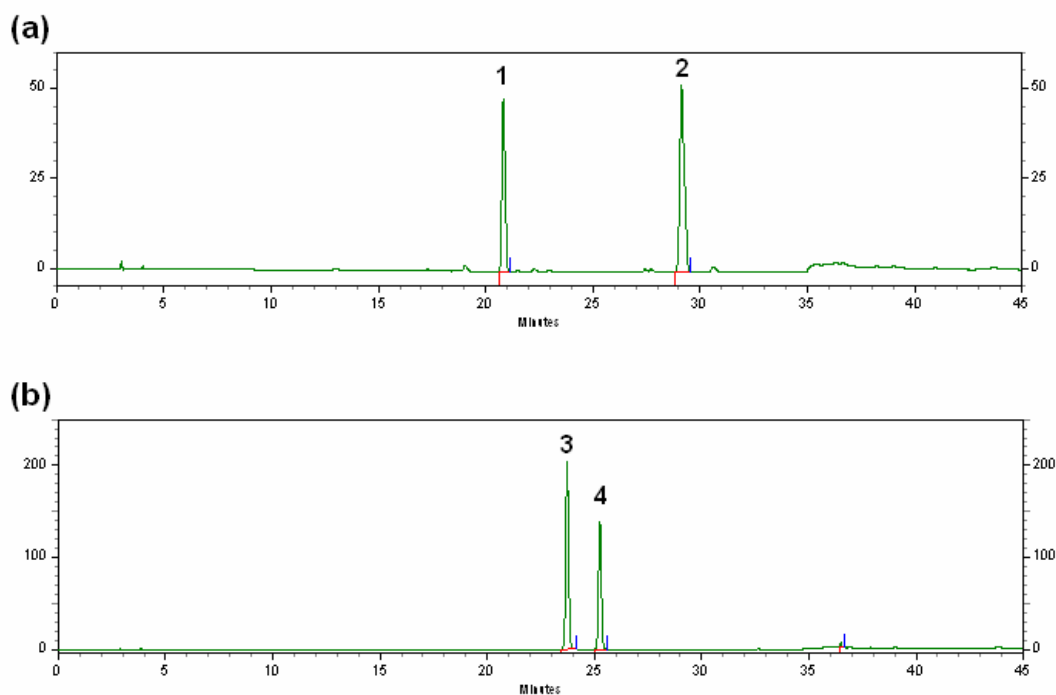
- and Mäkelä, S.I. (2006). Determination of plant and enterolignans in human serum by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41:898-905.
- Soleas, G.J., Grass, L., Josephy, P.D., Goldberg, D.M. and Diamandis, E.P. (2002). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35:119-124.
- Stitch, S.R., Toumba, J.K., Groen, M.B., Funke, C.W., Leemhuis, J., Vink, J. and Woods, G.F. (1980). Excretion, isolation and structure of a new phenolic constituent of female urine. *Nature*, 287:738-740.
- Sugano, M. and Beynen, A.C. (Eds.). (1990). *Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis*. New York: Basel.
- Sung, M.K., Lautens, M. and Thompson, L.U. (1998). Mammalian lignans inhibit the growth of estrogen-independent human colon tumor cells. *Anticancer Research*, 18:1405-1408.
- Thompson, L.U., Robb, P., Serraino, M. and Cheung, F. (1991). Mammalian lignan production from various foods. *Nutrition and Cancer*, 16:43-52.
- Thompson, L.U., Rickard, S.E., Cheung, F., Kenaschuk, E.O. and Obermeyer, W.R. (1997). Variability in anticancer lignan levels in Flaxseed. *Nutrition and Cancer*, 27:26-30.
- Thompson, L.U. (1998). Experimental studies on lignans and Cancer. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 12:691-705.
- Wang, C., Mäkelä, T., Hase, T., Adlercreutz, H. and Kurzer, M.S. (1994). Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocyte. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 50:205-212.
- Wang, L.Q. (2002). Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *Journal of Chromatography*, 777:289-309.
- Westcott, N.D. and Muir, A.D. (1996). Process for extracting and purifying lignans and cinnamic acid derivatives from flaxseed. PCT Patent WO9630468A2.
- Westcott, N.D. and Paton, D. (2001). A complex containing lignan, phenolic and aliphatic substances from flax and process for preparing. United States Patent 6,264,853.
- Xu, X., Harris, K.S., Wang, H.J., Murphy, P.A. and Hendrich, S. (1995). Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *Journal of Nutrition*, 125:2307-2315.

柒、附錄

附錄一、縮寫列表

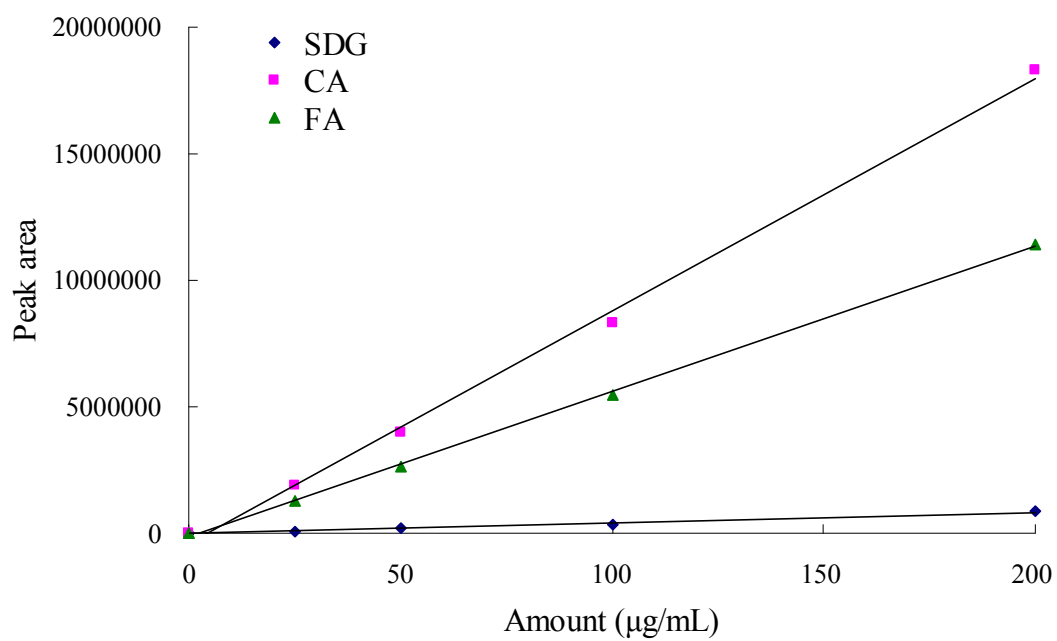
Appendix 1. List of abbreviations

Abbreviation	English name
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid)
BHT	butylated hydroxytoluene
CA	ρ -coumaric acid
CAG	coumaric acid glucoside
DFF	defatted flaxseed flour
END	enterodiol
ENL	enterolactone
En 1	β -glucuronidase from <i>Escherichia coli</i>
En 2	β -glucosidase from almonds
En 3	α -glucosidase from bakers yeast
En 4 – En 8	commercial deglycosylated enzymes
FA	ferulic acid
FAG	ferulic acid glucoside
GAE	gallic acid equivalent
H-2	β -glucuronidase/sulfatase (type H-2 from <i>Helix pomatia</i>)
HP-2	β -glucuronidase/sulfatase (type HP-2 from <i>Helix pomatia</i>)
NADH	β -nicotinamide adenine dinucleotide
NBT	nitro blue tetrazolium
pd 1	water extract from DFF
pd 2	ethanol extract from DFF
pd 3	alkaline and methanol extract from DFF
pd 4	heat treatment and methanol extract from DFF
pd 5	enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4
PMS	phenazine methousulphate
SDG	secoisolariciresinol diglycoside
SECO	secoisolariciresinol
TBA	2-thiobarbituric acid
TCA	trichloroacetic acid
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic acid
Vit. C	Vitamin C



附錄二、標準品溶液之高效能液相層析圖

Appendix 2. HPLC chromatogram (280 nm) of standard solutions (50 $\mu\text{g/mL}$): (a) SDG, SECO; (b) CA, FA. 1=secoisolariciresinol diglycoside (SDG); 2=secoisolariciresinol (SECO); 3=coumaric acid (CA); 4=ferulic acid (FA). Column Luna C18(2), 250 mm \times 4.6 mm, 5 μm particle size (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Eluent A: 5% acetonitrile in 0.01 M phosphate buffer (pH 2.8); B: 100% acetonitrile. Gradient elution of A–B: 0 min (100:0, v/v), 30 min (70:30, v/v), and 32 min (30:70, v/v) at a flow-rate of 1 mL/min.



附錄三、SDG、CA、FA 之標準品檢量線

Appendix 3. Standard curves of SDG, CA, and FA

附錄四、在 25-200 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內酚類化合物之標準品檢量線

Appendix 4. Standard calibration curves for phenolic compounds in the range of 25-200 $\mu\text{g/mL}$

Phenolic compound	Standard curve	R^2
SDG	$y = 4280.3x - 29082$	0.9829
CA	$y = 91949x - 404679$	0.9974
FA	$y = 57556x - 156837$	0.9993

Phenolic compounds contain secoisolariciresinol diglycoside (SDG), coumaric acid (CA) and ferulic acid (FA).

Correlation coefficients of equation $y = kx + m$, where x is yield ($\mu\text{g/mL}$), y is the peak area (mAu), k is the slope and m is the intercept.

附錄五、脫脂亞麻籽粉末萃取物之製備

Appendix 5. Preparation of extracts from defatted flaxseed flour

Sample ¹	Weight of DFF (g)	Weight of sample (g)	Yield ³ (%)
Pd 1	10	6.5	65
Pd 2	100	14.62	14.62
Pd 3	100	40.66	40.66
Pd 4	10	6.06	60.60
Pd 5	24.6 ²	8.99	36.58

¹ Samples (pd 1, pd 2, pd 3 and pd 4) were derived from defatted flaxseed flour by different processes; pd 5 was derived from 10g of pd 3. Pd 1: water extract from DFF; pd 2: ethanol extract from DFF; pd 3: alkaline and methanol extract from DFF; pd 4: heat treatment and methanol extract from DFF; pd 5: enzymatical hydrolysate from pd 3 by En 4.

² 10 g of pd 3 can be prepared from 24.6 g of DFF. Pd 5 was prepared from 10 g of pd 3.

³ Yield (%) = (sample weight/DFF weight)×100%.