

單寧酵素處理白芍之抗氧化活性研究

陳惠欣¹、謝衣鵬²、方信裕³、盧明傑^{4*}

¹元培醫事科技大學食品科學系

²敏實科技大學餐飲管理系

³中華醫事科技大學食品營養系

⁴元培醫事科技大學餐飲管理系

摘 要

白芍(*Paeonia lactiflora* Pall.)分佈在台灣南部，在中國廣泛種植。白芍的莖在東方醫學中長期以來一直用於治療腸炎，痢疾和瘙癢。本研究目的主要藉由單寧酶(Tannase)處理白芍乙醇萃取物來探討其化學組成和生理活性。白芍經乙醇萃取 25 °C，24小時後，在用單寧酶 37 °C 反應30分鐘。評估其抗氧化能力包括DPPH清除能力、超氧離子、總還原力(TEAC)、氫過氧化物和金屬離子的結合力。結果水解後的白芍在200ppm超氧離子、氫過氧化物、DPPH清除能力是92 %，85 %，65 %明顯較未水解白芍液為高。在濃度為100ppm時總還原力(TEAC)結果顯示水解後的白芍較高(2.4 % vs. 1.0 %)。同時在銅離子和鐵離子比較上，結果顯示水解後的白芍較高 (42.6/33.5 % vs. 14.6/7.6 %)。在RAW 264.7細胞毒性測試經144小時結果顯示水解後的白芍細胞存活較高。以上結果證明水解後的白芍分子沒食子酸後能有效提升抗氧化活性，對毒性影響較低。

關鍵詞：白芍、單寧酶、抗氧化活性

*通訊作者：盧明傑 E-mail: mimje@mail.ypu.edu.tw

元培醫事科技大學餐飲管理系

新竹市元培街306號

Study on antioxidant activities of enzyme hydrolysis *Paeonia lactiflora* Pall

Hui-Hsin Chen¹, I-Chuan Sheih², Hsin Yu Fang³, Min-Jer Lu^{4*}

¹Department of Food Science, Yuanpei University of Medical Technology¹

²Department of Food and Beverage Management, Minsh University of Science and Technology

³Department of Food Nutrition, Chung-Hwa University of Medical Technology

⁴Department of Food and Beverage Management, Yuanpei University of Medical Technology

ABSTRACT

Paeonia lactiflora Pall. is distributed in southern Taiwan and widely cultivated in China. The stems of *Paeonia lactiflora* Pall. have long been used for the treatments of enteritis, dysentery and itch in oriental medicine. Investigations were conducted to the effects of tannase-modified *Paeonia lactiflora* Pall. on the chemical compositions and biological activities. *Paeonia lactiflora* Pall. stems were extracted with ethanol at 25 °C for 24 hours, and the *Paeonia lactiflora* Pall. was hydrolyzed with tannase at 37 °C for 30 mins. The antioxidant capacity of antioxidants in vitro was evaluated by using the assays of DPPH, superoxide anion, TEAC, hydrogen peroxide, and chelating metal ions. The results show that tannase-treated *Paeonia lactiflora* Pall has a higher antioxidant capacity than the untreated analog at a concentration of 200 ppm, with greater superoxide anion, hydrogen peroxide and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging effects (92%, 85% and 65%, respectively). At a concentration of 100 ppm, the tannase-treated *Paeonia lactiflora* Pall also had significantly higher TEAC antioxidant activity compared to the untreated *Paeonia lactiflora* Pall (2.4 % vs. 1.0 %). Furthermore, at 150 ppm the chelating activity of the treated *Paeonia lactiflora* Pall. for Fe⁺²/Cu⁺² ions was higher compared to the untreated (42.6/33.5 % vs. 14.6/7.6 %, respectively). The viability of RAW 264.7 cells incubated with tannase-treated *Paeonia lactiflora* Pall. for 144 h was higher compared to analogs incubated with untreated *Paeonia lactiflora* Pall. Our results demonstrated that antioxidant activity in flavonoids varies, and that the presence of galloyl residues decreased the antioxidant activity of *Paeonia lactiflora* Pall., and more low toxicity effects.

Key words: *Paeonia lactiflora* Pall; Tannase; Antioxidant capacity

壹、前言

白芍的特性和生理功能，芍藥在夏商時期即已被中國人視為觀賞植物，遍佈於中國北方，其根部可做藥用，不剝皮的為赤芍，剝皮的白芍所以漢語稱為芍藥。白芍為毛茛科，亦稱芍藥。主要分佈於中國、日本、韓國。其特徵生於山坡、山谷的灌木或草叢中。為多年生的草本，高 60-80 厘米，根肥大(劉，1995)。白芍在近代研究指出具有抗發炎、止痛及關節炎輔助藥物、降低腦部栓塞、降血脂、誘導肝癌細胞凋亡(Xu et al., 2007; Hseih et al., 2006; Yang et al., 2004; Lee et al., 2002)等作用。大陸學者研究指出白芍甲醇萃取物具有抗氧化作用。所以白芍粗萃取液不僅是保健佳品，亦是一種治病良藥。白芍主要成分為5GG (1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-beta-d-glucose)，為以 glucose 為中心在 1, 2, 3, 4, 6 以酯鍵和沒食子酸 (gallic acid) 鍵結，屬於Hydrolysable 單寧的一種。Basavraj 等 (2012) 研究指出，利用微生物培養產生單寧酶水解綠茶，提高沒食子酸產量。有鑑於以往文獻上對白芍生理功能探討相當多。發現結構白芍的主成分為5GG 本身為一種單寧酸。由不同類的單寧酸在文獻上明顯指出生理上會有不同的影響。故以何種型態單寧較易被人體吸收利用，同時何類單寧酸對人體生理功能性較好將是本實驗研究重點。因此藉由商業化生產的單寧酶處理白芍中的5GG，可以比較水解後gallate的5GG是否能加強抗氧化效果及對細胞無毒性。藉由白芍的萃取液經酵素處理後，未來將能應用在機能食品上將更能提高生理功能。

貳、研究方法

一、白芍萃取液的製備

依照 Lu 等 (2007; 2008) 取新鮮的白芍根100 g，加以磨碎成粉末之後加入100 ml的乙醇。於 25 °C 下萃取24小時，再以濾紙過濾，將濾液收集、其濾渣再以 100 ml 乙醇萃取重複萃取兩次，所得的萃取液在進行減壓濃縮，之後在進行冷凍乾燥即可得到白芍粗萃粉末，配置成100 mg溶液。

二、白芍粗萃取液的水解反應

(一) 酵素水解反應

依照 Qizhen 等 (1994) 取單寧酶 (250 U/mg)，以檸檬酸緩衝液配置成 (100 mg/100 ml)濃度，後加入配置好白芍萃取液，在37°C 水浴下反應30分鐘直到水解完成，以HPLC測定白芍的水解情形。於4°C 下儲藏水解後的白芍，測定對抗氧化活性及對細胞存活的影響。

(二) 以高效能液相層析儀分析酚類化合物

依照 Richard 等(1999)將白芍水解液分析，經 KUBOTA KS-5200C 型離心機離心25 分鐘（2270 x g）後以 Whitman # 1 濾紙過濾，取部分澄清液經 0.45 μ m 過濾膜過濾後，直接以高效能液相層析分析。高效能液相層析採用日本 JASCO 公司 LC-10A 系統控制儀，偵測器(SPD-10A)及 LC-10AD/S 幫浦並連接訓華公司積分程式。

高效能層析儀分析條件：

移動相：5 % acetic acid (SolventA) acetonitrile(SolventB)

流速：0.8 ml /min

偵測器：UV 280 nm

分離管：Hypersil C18 column (5 μ m, 25 × 0.46 cm i.d.)

移動相梯度：如下所示

Time (min)	A%	B%
0	100	0
10	87	13
60	60	40

三、水解後的白芍對抗氧化活性的測定

(一) 清除 DPPH 能力的測定

依照 Shimada 等(1992)的方法。取白芍水解萃取物稀釋成不同濃度，加入 1 ml 新鮮配製 100 μ M α,α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH $\cdot$)之乙醇溶液，均勻混合靜置 30 分鐘後，以分光光度計測其 517 nm 的吸光值，吸光值越低表示清除(DPPH $\cdot$)自由基的能力越強。未添加單寧酶白芍萃取物做空白實驗之吸光值為 100 %。

(二) 清除過氧化氫 H₂O₂ 的能力測定

依照 Ruch 等(1989)方法。取白芍水解萃取液稀釋成不同濃度，加入 0.4 ml 以 pH7.4 之 phosphate buffer saline 配製 4mM 之 hydrogen peroxide (H₂O₂)溶液反應 20 分鐘後，再加入 0.6 ml HRPase-phenol (peroxidase-phenol-red)反應液，混合均勻後反應10分鐘，將其冰浴10 分鐘終止反應。後以分光光度計測其 610 nm 的吸光值。吸光越低表示清除過氧化氫能力越強。以未酵素處理白芍之吸光值為100%。 $\text{Scavenging effects \%} = \frac{[(\text{absorbance of control at 610 nm}) - (\text{absorbance of sample at 610 nm})]}{(\text{absorbance of control at 610 nm})} \times 100$ 。

(三) 清除超氧陰離子的測定

依照 Robak and Gryglewski (1988)方法。以 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 配製 120 μ M 之 phenazinemethosulfate (PMS)、936 μ M 之 dihydronicotinamadenin dinucleotide (NADH)及 300 μ M 之 nitro bluetrazolium (NBT)。然後取不同濃度之白芍水解液與 PMS、NADH、及 NBT 溶液等體積均勻混合。在室溫下靜置 5 分鐘後立即以 560 nm 測吸光值。吸光值越低表示清除能力越強。以未添加單寧酵素萃取物為100%。

(四) 總抗氧化能力的測定

依照Ruch等 (1989)方法，將 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)溶解於去離子水中，使濃度為 7 mM，將此溶液與與 2.45 mM potassium persulfate 溶液充分混合，並於黑暗的適溫下反應 12-16 小時，使其產生穩定的藍綠色 ABTS^{•+} 陽離子自由基，測定前利用無水乙醇將 ABTS^{•+} 陽離子自由基溶液稀釋至 734nm 吸光值為 0.7(A₇₄₃=0.700±0.020)。以 1 ml 的 ABTS^{•+} 陽離子自由基溶液，加入不同的 樣品反應 6 分鐘，測 734 nm 吸光值，觀察藍綠色脫色程度。其中以不同濃度 Trolox 抗氧化清除 ABTS^{•+} 陽離子自由基能力做為標準曲線，測試之樣品同樣以不同濃度做一標準曲線，計算 Trolox 及樣品濃度隻標準曲線的斜率並比較之。亦即以樣品相當於多少 Trolox 濃度來表示值，單位為每 1 mg/mL 的樣品相當於多少 μ M 的 Trolox 清除 ABTS^{•+} 陽離子自由基之能力。

(五) 鐵離子之螯合能力

參考 Shimida 等(1992)的方法。取白芍萃取液稀釋成不同濃度(0-150 ppm)的樣品，加入 3.7 ml 的去離子水及 0.1mLFeCl₂.4H₂O (2 mM)，30 秒後再加入 0.2 mL 的 ferrozine(5 mM)，反應10分鐘後，使用分光光度計檢測 562nm 的吸光值。樣品螯合亞鐵離子的能力以清除率表示，其計算方式為：Scavenging effects (%) = (1-(absorbance of sample at 562 nm)/(absorbance of control at 562 nm))x 100

四、水解後的白芍對細胞存活的影响—MTT 染色法

(一) 巨噬細胞細胞株 RAW 264.cell line 之培養

依照 Lin 等 (2006)方法將長滿 80%之 RAW 264.7 巨噬細胞以 PBS 洗一次，從 25 平方公分的培養瓶中 刮下，以 1000rpm 離心 10 分鐘，吸除上清液，加入 1mL 培養液將細胞打散後，取 100 μ L 細胞懸浮液於含有 FBS/DMEM 之 25 平方公分培養瓶，置於 37 °C、5 % CO₂ 培養箱中培養。

(二) 細胞之保存解凍

選取細胞生長達 90% confluence 之 75 T flask 細胞培養皿，經 3mL Trypsin-EDTA 消化作用 3-5 分鐘，將消化下來的細胞取至離心管中，以離心方式(1000 rpm， 5 min) 收集沈澱的細胞以 DMEM medium (含 10 %FBS， 10 % DMSO) 均勻懸浮後，分裝至 cryotube 中(1.5 mL / tube)，置於-80 °C 之超低溫冰櫃中冷凍保存，隔天則放置液態氮 中長期保存。

(三) 添加不同濃度(50, 75, 100 ppm)單寧酵素處理白芍萃取液

將長滿80 %之RAW264.7巨噬細胞株，從 25 平方公分的培養瓶中刮下，以 10% FBS/DMEM 調整濃度為 1X10⁶/ml。分別於 96 微量培養盤中，注入 100ul 調整好細胞濃度的細胞液。於 37°C、5 %CO₂ 培養箱中培養 24 小時後，吸除培養液，以 200ul 的 PBS 洗一次，更換新鮮培養液，此新鮮培養液添加樣品濃度1 ug/mL Cu²⁺ 於於 37 °C、5% CO₂ 培養箱中培養 24, 48, 72, 144 小時後，吸除培養液，並對培養盤中的細胞進行MTT染色，測定細胞存活率。

(四) 細胞存活率測定-MTT 染色法

MTT 為一種活細胞染色法。活細胞粒線體中之 dehydrogenase，可將 MTT 之tetrazolium ring 打斷，形成 formazan。此使由黃色轉變成深藍色，再由 acidic isopropanol將 formazan(水不溶性)溶出，以 ELISA reader 測定 540nm 吸光值，並對照標準曲線，計算活細胞數目。

五、統計分析

使用統計分析系統(Statistical Analysis，SPSS)處理各項分析數據，進行變異數分析(ANOVA，analysis of variance)與 Duncan's multiple range test 分析，顯著差異為 $\alpha < 0.05$ ，以比較結果之統計顯著性。

參、結果與討論

一、單寧酶水解白芍對抗氧化的影響

(一)、金屬離子的螯合反應

除了自由基之外，金屬離子亦是造成脂質過氧化作用最常發生的導火線之一。具有螯合金屬能力之化合物，可與金屬離子螯合，防止脂質的氧化。Ferrozine 可與鐵離子結合產生 ferrozine-Fe²⁺ complex，於 562 nm 有最大的吸收峰，藉吸光值的大小可測定對鐵之螯合能力。本實驗參考 Shimida 等(1992)的方法，測試酵素處理的白芍對鐵離子及銅離子的螯合能力，當測試溶液在吸光值 562 nm 下

的吸光度越低，表示對金屬離子的螯合作用越佳。鐵及銅離子在多種金屬離子中對於促進脂質氧化作用的進行是最具有影響力的最佳氧化劑。因此酵素處理的白芍如果能增強對金屬離子的螯合作用，則對其抗氧化作用將有助益。Celander & Ceh (1990) 指出二價鐵離子易和細胞 DNA, RNA 結合引起細胞基因突變，導致腫瘤產生。本實驗白芍經酵素處理由表一結果顯示酵素處理的白芍（實驗組）和白芍（控制組）對鐵離子及銅離子之測定結果。由結果顯示添加劑量(0-150ppm)實驗組和控制組在 562 nm 的吸光值皆逐漸下降($p<0.05$)顯示對金屬離子皆具有螯合能力。但比較二者清除的效率發現當在 150ppm 的劑量時控制組在銅和鐵離子清除效率為 7.6 %, 14.6 %，而在實驗組為 33.5%, 42.6 %二者比較發現實驗組為控制組清除效率的三倍強。

（二）對 DPPH 清除的影響

油脂在氧化過程會產生自由基，造成自由基連鎖反應之進行而加速油脂之氧化速率，抗氧化劑可清除這些自由基而抑制油脂氧化作用的進行。常見的抗氧化物是藉由提供氫來清除脂質過氧化物自由基，進而達到抑制連鎖反應的進行。在抗氧化的研究，最常使用 DPPH· 來評估抗氧化劑的供氫能力。DPPH· 為一相當安定的自由基，其乙醇溶液在 517nm 下有強的吸光，當 DPPH· 與抗氧化劑反應時其吸光值會消失(Williams et al., 1995)，因此在 517nm 吸光值越低即表示氧化劑供氫能力越強，可藉此判斷樣品是否具有提供氫原子以清除自由基之能力。圖一為單寧酶處理的白芍液對 DPPH 自由基清除的效率。由圖中可看出隨著濃度的增加，對 DPPH 的清除效應也隨之增加。當添加劑量在 200ppm 時比較未經單寧酶處理的白芍，清除率為 62 %和 33 %顯示經單寧酶處理的白芍清除 DPPH 能力約為控制組的兩倍。Shimida 等(1992) 指出 ascorbic acid 等具有強之抗氧化性，係來自還原酮本身提供氫原子至氫過氧化自由基上($\text{RCOO}\cdot$)，因而中斷自由基的連鎖反應，達到抗氧化效果。此作用和合成抗氧化劑 BHA, BHT 亦是以提供氫原子的方式而達成抗氧化效果是相同。本實驗結果清除 DPPH 能力增強其可能原因，水解完的白芍 Gallic acid 明顯的增加。沒食子酸結構上的羥基能提供氫原子至氫過氧化自由基上($\text{RCOO}\cdot$)具有很強清除自由基的能力，同時更具有保護細胞防止 UV 的傷害(Richards & Adams 1987 ; Jun et al., 2003)。由此結果顯示酵素處理的白芍具有很強的自由基清除效果，是一種良好自由基的抑制劑。

（三）對超氧離子清除的影響

在正常的生理情況下，如遇細菌、黴菌、病毒或異物等侵入時，體內的防禦系統會通知吞噬細胞經由相關的酵素催化，產生超氧離子自由基，以清除細菌或受感染的細胞；換言之體內必須具備一定量的自由基作為預防、抵禦疾病的武器。若受到異物環境的影響，例如輻射或紫外線、抽煙、農藥、空氣污染等、甚至心理壓力、生活不正常、熬夜也會產生自由基。一旦人體自由基超過人體的正

常防禦範圍，就會產生自由基連鎖反應，促使蛋白質、碳水化合物、脂質等細胞基本構成物質，遭受氧化而形成新的自由基，則人體的功能因此逐漸損傷，各種疾病接踵而至(Tsai and Lee, 1997)。雖然超氧離子較穩定毒性較小，但若轉成羥自由基則對細胞造成嚴重傷害。圖二顯示在 200 ppm 時比較未經單寧酶處理的白芍，清除率為 97 %和 59 %顯示經單寧酶處理的白芍清除超氧離子自由基較控制組為高。

(四) 對過氧化氫的清除效果

雖然過氧化氫本身對其他生物巨分子(如 DNA、蛋白質與細胞膜之脂質成分等)僅有中程度的傷害，但因其具有轉變成更為活潑的 $\cdot\text{OH}$ 之潛能，在銅或鐵的存在下會產生 Fenton 反應，會對細胞造成嚴重的傷害(Halliwell,1991)。由於過氧化氫屬於活性氧的一種，經由金屬離子的氧化作用形成具強氧化性之 $\cdot\text{OH}$ 會攻擊細胞中 DNA 造成組織傷害以及加速脂質氧化反應的進行。由圖三的結果顯示在 200 ppm 時比較未經單寧酶處理的白芍，清除率為 83 %和 32 %顯示經單寧酶處理的白芍液清除過氧化氫能力約為控制組的兩倍高。當濃度為 500 ppm 時則清除過氧化氫約達 100 %。單寧酶處理的白芍顯示清除過氧化氫能力較控制組為強。

(五) 總抗氧化力的活性

探討萃取物或飲料等食品抗氧化之方法相當多，每種方法皆已形成不同自由基，利用物質對清除自由基之不同機制評估其抗氧化能力。由於本實驗白芍為水溶性，因此使用 ABTS(2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline]-6-sulfonic acid)，一種水溶性自由基作為評估抗氧化性的方法，以 peroxidase/ABTS/ H_2O_2 系統來誘導 ABTS 產生藍綠色 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 陽離子自由基 (Ruch et al.,1989)，若加入之樣品能使呈藍綠色，則表示抗氧化能力越強。測定不同濃度之抗氧化能力，換算成樣品抑制率對濃度反應曲線，最後以樣品對清除 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 能力相當多少 mM 濃度 trolox 來表示總抗氧化能力。圖四為單寧酶處理的白芍液對 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 自由基清除的效率。由圖中可看出隨著濃度的增加，對 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的清除效應也隨之增加。當添加劑量在 100 ppm 時比較未經單寧酶處理的白芍，清除率為 2.4 %和 0.7 %，顯示經單寧酶處理的白芍液清除 TEAC 能力較控制組為佳。Chen & Chan (1996)指出綠茶中的兒茶素較 BHA 清除脂質過氧化物更有效率，其中以 EGC 最好，而其次為 EGCG>EC>ECG。故由各種活性氧清除的結果發現都是以單寧酶處理的白芍最好，因此測定 TEAC 也具有相同的結果。而由圖六的結果得知水解後的白芍 Gallic acid 為水解前約上升四倍。而沒食子酸 (Gallic acid)本身具有很強抗氧化能力 (Soong et al., 2006; Richards et al., 1987; Soarea et al., 1986)。因此我們由實驗證明酵素處理白芍 TEAC 值明顯增加。

(六) 細胞在銅離子存在下對細胞存活的影响

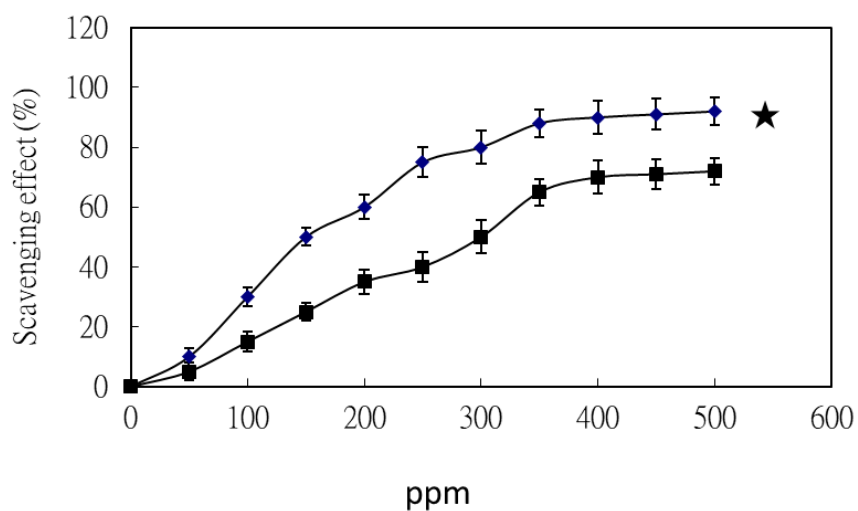
圖六單寧酶濃度為 3.0 (mg/ml) 白芍 Gallic acid 將完全水解完成，單寧酶處理的白芍和未經酵素處理的白芍對 RAW264.7 細胞在銅離子存在下存活的影响。由實驗結果證明控制組當培養在 Cu^{2+} (1 $\mu\text{g/ml}$) 則細胞存活率低於 40 %。比較 50-100 ppm 不同濃度單寧酶處理的白芍，添加於 Cu^{2+} (1 $\mu\text{g/ml}$) 實驗樣品。未經酵素處理的白芍實驗組，經過 144 小時發現控制組細胞存活只達 35 %，在 100 ppm 濃度單寧酶處理的白芍（實驗組）卻達 80 %。由此結果證明酵素水解的白芍能有效保護細胞免於受 Cu^{2+} 破壞。此結果推測由於水解的白芍含較多的 Gallic acid，故能有效的清除金屬離子因此 RAW264.7 細胞才有較高的存活率。本實驗水解後的白芍含多量的 Gallic acid，故在清除金屬離子上明顯的較有效率和 Mori 等(1978)針對紅茶有高抗氧化性，發現紅茶含有多量 Gallic acid 能有效清除自由基與本實驗相符。因此實驗結果也發現細胞添加 100 ppm 單寧酶處理白芍液細胞存活上明顯較高。

表一、使用不同濃度單寧酶(0-150 ppm)水解的白芍液和實驗組對銅離子和鐵離子螯合的影响

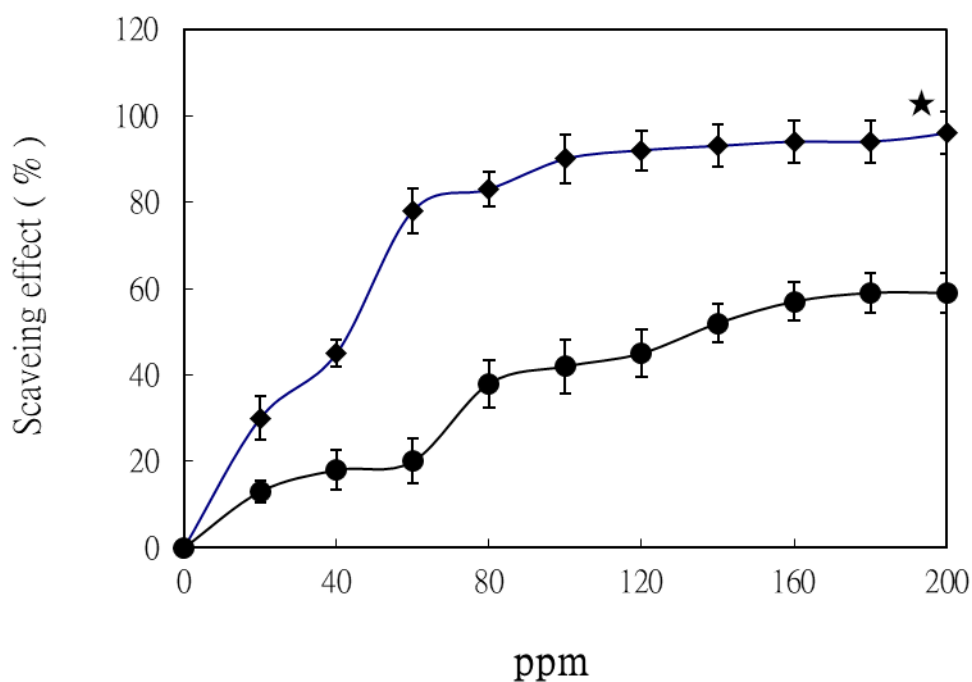
Samples (<i>Paeonia</i> <i>lactiflora</i> Pall)	Concentration (ppm)	Absorbance (chelating effects ¹ , %)	
		Fe^{2+}	Cu^{2+}
Control ²	0	0.623±0.08 (0.0) ^g	0.803±0.11 (0.0) ^g
	50	0.601±0.11 (3.5) ^f	0.788±0.20 (1.9) ^f
	100	0.571±0.07 (8.3) ^e	0.771±0.12 (4.0) ^e
	150	0.532±0.05 (14.6) ^d	0.742±0.09 (7.6) ^d
Tannase-treated	0	0.613±0.12 (0.0) ^g	0.798±0.07(0.0) ^g
	50	0.502±0.14 (18.1) ^c	0.701±0.12(12.1) ^c
	100	0.411±0.10(33.0) ^b	0.612±0.08(23.3) ^b
	150	0.352±0.13(42.6) ^a	0.531±0.21(33.5) ^a

¹ 螯合率 (%) = [(Abs. blank - Abs. sample) / Abs. blank] x 100.

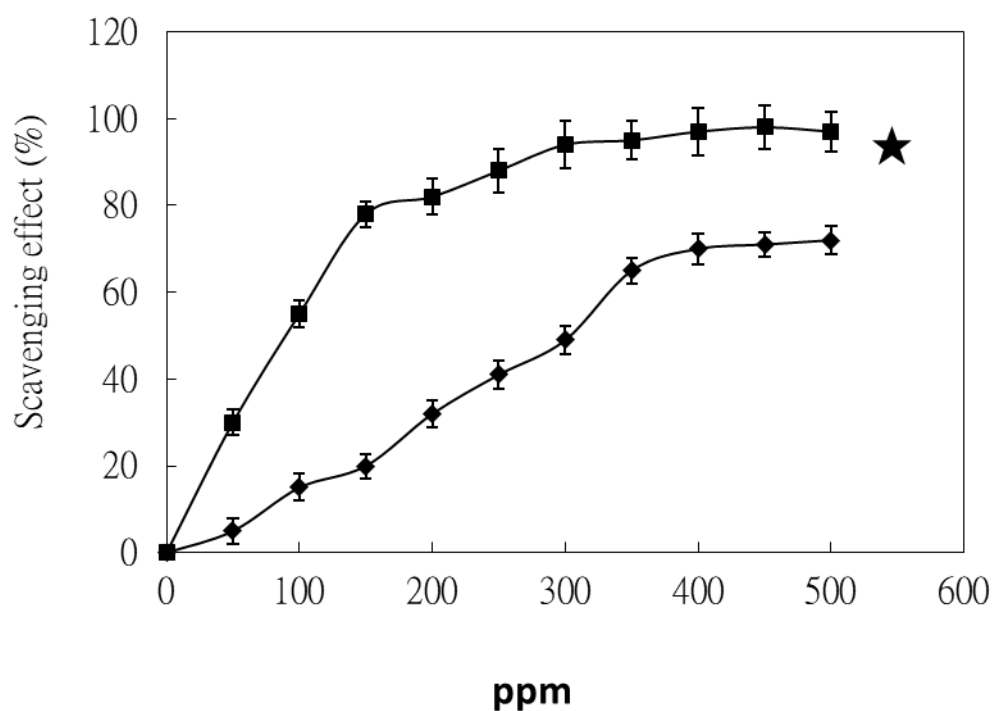
² 同一欄英文字母相同表示各組間無顯著差異，實驗三重複，差異水準 ($p < 0.05$)



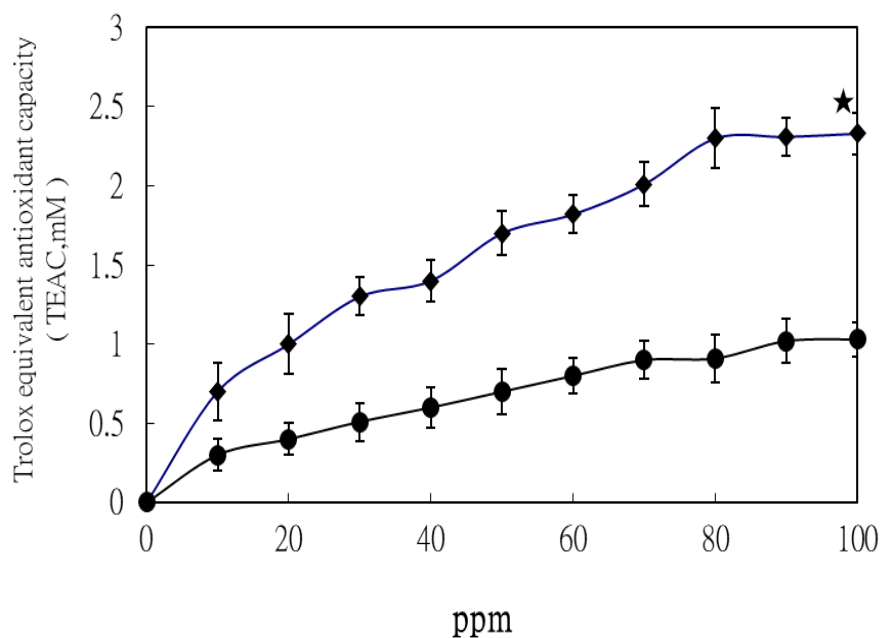
圖一、使用不同濃度單寧酶(0-600 ppm)水解的白芍液對 DPPH 清除率(%)的影響 (◆添加單寧酶 ■ 控制組, ★表示兩組間有顯著差異, 實驗三重複)



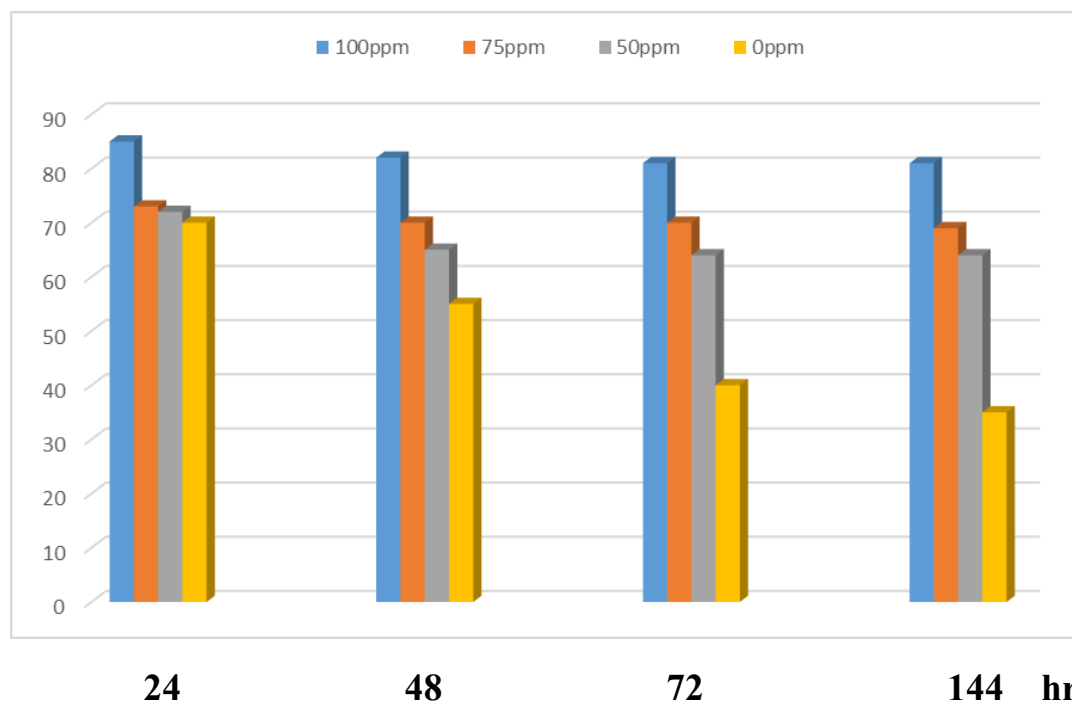
圖二、使用不同濃度單寧酶(0-200 ppm)水解的白芍液對超氧離子清除率(%)的影響 (◆添加單寧酶 ●控制組, ★表示兩組間有顯著差異, 實驗三重複)



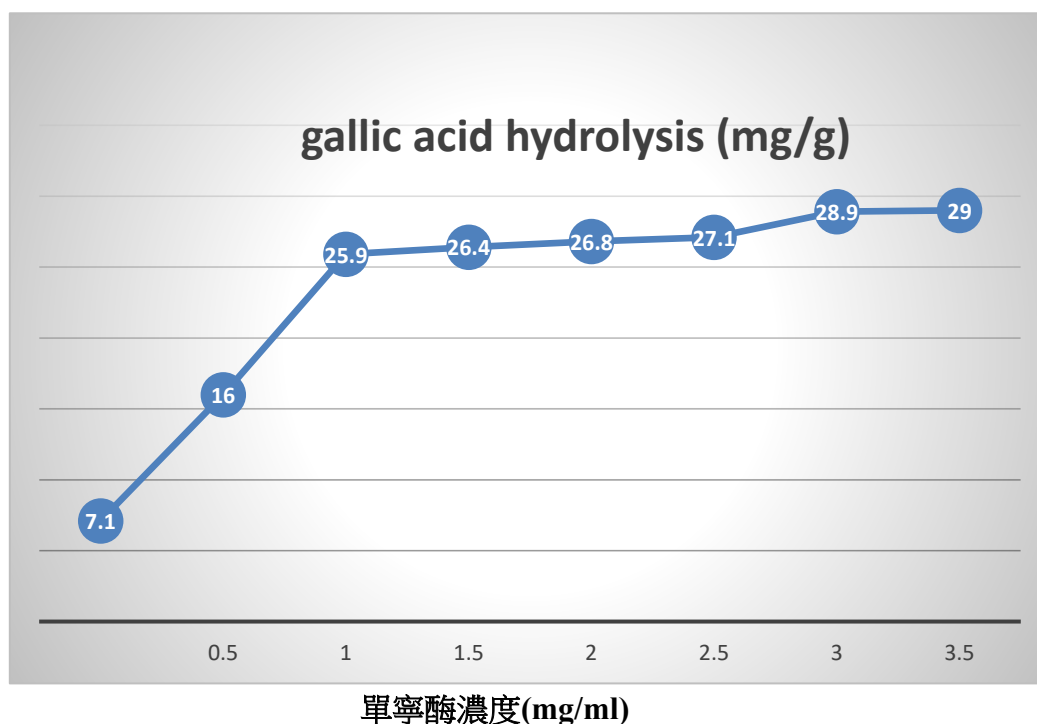
圖三、使用不同濃度單寧酶(0-600 ppm)水解的白芍液對氫過氧化物清除率(%)的影響(■添加單寧酶 ◆控制組, ★表示兩組間有顯著差異, 實驗三重複)



圖四、使用不同濃度單寧酶(0-100 ppm)水解的白芍液對 TEAC 清除率(%)的影響(◆添加單寧酶 ●控制組, ★表示兩組間有顯著差異, 實驗三重複)



圖五、實驗組用不同濃度單寧酶(50-100 ppm)，處理水解的白芍液，和控制組(0 ppm)添加在銅離子存在下培養基對 RAW 264.7 細胞存活的影响



圖六、使用不同濃度單寧酶(0.5-3.5 mg/ml)水解的白芍液沒食子酸生成量

參考文獻

- Basavaraj P. and Praannad B. (2012), Enhancing gallic acid content in green tea extract by using novel cell-associated tannase of *Bacillus massiliensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 1745-4514.
- Chih-Cheng Lin, Su-Chen He, Min-Jer Lu, Shen-Jen Chen, (2006), "Heavy Fermentation Impacts NO-Suppressing Activity of Tea in Lps activated RAW 264.7 Macrophages," *Food Chemistry*, 98, No. 3. 483-489.
- Celander, D.W. and Ceh, T.R., (1990), Iron(II)-ethylenediaminetetraacetic acid catalyzed cleavage of RNA and DNA oligonucleotides: similar reactivity toward single- and double- stranded forms. *Biochemistry*, 29, 1355-1361.
- Chen, Z.Y. and Chan, P.T., (1996), Antioxidative activity of green tea catechins in canola oil. *Chemistry and Physics of Lipids*, 82, 163-172.
- Hsieh, CL., Cheng, CY., Ysa., et al., (2006), Paeonol reduced cerebral infarction involving the superoxide anion and microglia activation in ischemia reperfusion injured rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 208-215.
- Halliwell, B., (1991), Reactive oxygen species in living system: Source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine* 91, 14-22.
- Lee, SM., Tse, YC., et al., (2002), Panonai Radix, a Chinese herbal extract, inhibition hepatoma cells growth by inducing apoptosis in a p53 independent pathway. *Life Science*, 71, 2267-2277.
- Min-Jer Lu., Chinshuh Chen., (2007), "Enzymatic treatment of green tea by tannase increases the in vitro inhibitory activity against N-nitrosation of dimethylamine," *Process Biochemical*, 42, 1285-1290.
- Min-Jer Lu., Chinshuh Chen., (2008), "Enzymatic modification by tannase increases the antioxidant activity of green tea," *Food Research International*, 41, 130-137
- Mori, Y. and Mitani, A., (1978). Antioxidative activity in black tea. *Kaessigaku Zasshi*, 29: 148.
- Richards, J. and Adams, F., (1987), Study of reaction rates of the antioxidant gallic acid, BHA and BHT using the technique of pulse radiolysis. *International Journal of Food Science and Technology* 22, 501-508.
- Ruch, R. J., Cheng, S.J. and Klauning, J.E., (1989), Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese tea. *Carcinogenesis*, 10, 1003-1008.
- Richards, J. and Adams, F., (1987), Study of reaction rates of the antioxidant gallic acid, BHA and BHT using the technique of pulse radiolysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 22, 501-508.
- Shimida, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T., (1992), Antioxidative

- properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945-953.
- Soong, Y. Y. and Barlow, P. J., (2006), Quantification gallic acid and ellagic from longan seed and mango kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 97, 524-530.
- Soares, J.R., Dins, T.C.P. and Cunha, A.P., (1997), Antioxidant activity of some extracted of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, 26, 669-678.
- Tsai, L. Y. and Lee, K. T., (1997), Evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in experimental obstructive jaundice of rats. *Free Radical Biology and Medicine* 24, 732-737.
- Xu, HM., Wei., W., Jia, XY., Chang, Zhang, L., (2007), Effect and mechanisms of total glucosidase of paeony on adjuvant arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 442-448.