

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒

之製備及特性研究

Preparation and Characterization of Chitosan-
Sodium Tripolyphosphate-Naringenin Nanoparticles

鄭閔鴻

Min-Hung Cheng

指導教授：徐詮亮 博士

阮進惠 博士

Advisor: Chuan-Liang Hsu, Ph.D.

Jin-Hwei Rwan, Ph.D.

中華民國一百零六年十一月

November, 2017

目錄

中文摘要.....	VII
英文摘要.....	IX
壹、前言.....	1
貳、文獻整理.....	3
一、幾丁質與幾丁聚醣.....	3
(一)幾丁質與幾丁聚醣簡介.....	3
(二)幾丁質與幾丁聚醣結構.....	4
(三)幾丁聚醣溶液之特性.....	6
二、幾丁聚醣及不同分子量幾丁聚醣之製備及檢測.....	8
(一)幾丁聚醣之製備及檢測.....	8
(二)不同分子量幾丁聚醣之製備及檢測.....	9
(三)臭氧氧化還原降解幾丁聚醣.....	12
三、幾丁聚醣奈米顆粒.....	17
(一)奈米科技簡介.....	17
(二)奈米技術應用於食品領域.....	18
(三)奈米顆粒.....	23
(四)奈米之安全性評估.....	27
(五)幾丁聚醣奈米顆粒之製備方法.....	28
(六)離子交聯法製備幾丁聚醣奈米顆粒之機制.....	40
(七)幾丁聚醣在藥物傳遞系統之應用.....	46
四、柚皮素.....	50
(一)柚皮素簡介.....	50
(二)柚皮素之生理機能.....	52
(三)柚皮素之安定性.....	55
(四)柚皮素之生物利用度.....	56

參、材料與方法	60
一、實驗材料與樣品	60
二、實驗儀器	61
三、樣品製備	62
(一)幾丁聚醣製備	62
(二)不同分子量幾丁聚醣之製備	63
(三)柚皮素溶液之製備	63
四、實驗方法	64
(一)幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒之製備	64
(二)幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒之安定性試驗	66
五、分析方法	67
(一)幾丁聚醣去乙醯度之測定	67
(二)降解之幾丁聚醣樣品分子量測定	68
(三)柚皮素包覆率、裝載率及奈米顆粒產率之測定	69
(四)柚皮素定量方式	70
(五)奈米顆粒粒徑及表面電位之測定	71
(六)掃描式電子顯微鏡觀察	72
(七)統計分析	72
肆、結果與討論	73
一、樣品製備	73
(一)幾丁聚醣製備	73
(二)不同分子量幾丁聚醣之製備	73
(三)柚皮素溶液之製備	74
二、不同製備條件對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒特性之影響	76
(一)柚皮素濃度之影響	76
(二)幾丁聚醣分子量之影響	88

(三)幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比之影響.....	101
三、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒之安定性試驗	113
四、掃描式電子顯微鏡觀察幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒外觀 型態	116
伍、結論.....	118
陸、參考文獻.....	122



圖目錄

圖一、幾丁質、幾丁聚醣及纖維素之基本結構.....	5
圖二、幾丁聚醣在酸性溶液中之結構.....	7
圖三、臭氧降解法實驗流程.....	11
圖四、臭氧分子共振之結構.....	13
圖五、臭氧在水中之反應型態.....	13
圖六、臭氧自分解反應機制.....	14
圖七、臭氧氧化降解多醣類之可能機制(一).....	15
圖七、臭氧氧化降解多醣類之可能機制(二).....	16
圖八、奈米科技應用於食品科學及工業對於其功能性、應用性及安全評估 之發展.....	21
圖九、生物活性之總口服生物利用度由三個主要因素決定:生物可及性、 吸收和轉換.....	22
圖十、奈米顆粒於吸收前所通過人體之消化系統.....	24
圖十一、奈米顆粒通過細胞膜或細胞間隙被吸收進入至上皮細胞.....	26
圖十二、幾丁聚醣奈米顆粒之若干製備方法.....	32
圖十三、離子交聯法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖.....	33
圖十四、共凝結及沉澱法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖.....	34
圖十五、乳化交聯法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖.....	35
圖十六、乳化液滴接合法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖.....	36
圖十七、乳化溶劑蒸發法製備固體脂質奈米顆粒之示意圖.....	37
圖十八、噴霧乾燥法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖.....	38
圖十九、逆微胞法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖.....	39
圖二十、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉之離子交聯反應.....	41
圖二十一、幾丁聚醣之特性對於多種藥物傳遞系統的發展幾丁聚醣與三聚 磷酸鈉於不同 pH 值下之鍵結型態.....	42
圖二十二、幾丁聚醣之特性對於多種藥物傳遞系統的發展.....	49

圖二十三、黃烷酮類化合物之化學結構.....	51
圖二十四、柚皮素及其衍生物之化學結構.....	51
圖二十五、柚皮素透過 HAT、SET-PT 及 SPLET 等三種機制作為多酚類 抗氧化劑之示意圖.....	54
圖二十六、黃烷酮類化合物在人體中代謝之情況.....	58
圖二十七、黃烷酮於小腸及大腸中之代謝示意圖.....	59
圖二十八、臭氧處理時間對幾丁聚醣降解程度之影響.....	75
圖二十九、柚皮素濃度對於柚皮素包覆率之影響.....	78
圖三十、柚皮素濃度對於柚皮素裝載率之影響.....	80
圖三十一、柚皮素濃度對於奈米顆粒產率之影響.....	82
圖三十二、柚皮素濃度對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒粒徑 大小之影響.....	84
圖三十三、幾丁聚醣分子量對於柚皮素包覆率之影響.....	89
圖三十四、幾丁聚醣分子量對於柚皮素裝載率之影響.....	92
圖三十五、幾丁聚醣分子量對於奈米顆粒產率之影響.....	94
圖三十六、幾丁聚醣分子量對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉及幾丁聚醣-三聚磷 酸鈉-柚皮素奈米顆粒粒徑大小之影響.....	96
圖三十七、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比對於柚皮素包覆率之影響..	102
圖三十八、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比對於柚皮素裝載率之影響..	104
圖三十九、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比對於奈米顆粒產率之影響..	106
圖四十、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉及 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒粒徑大小之影響....	109
圖四十一、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒於模擬胃液及模擬腸液 之柚皮素累積釋放率.....	114
圖四十二、掃描式電子顯微鏡之觀察.....	117

表目錄

表一、柚皮素對若干溶劑之溶解性.....	75
表二、柚皮素濃度對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒表面電位之 影響.....	86
表三、幾丁聚醣分子量對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉及幾丁聚醣-三聚磷酸鈉 -柚皮素奈米顆粒表面電位之影響	98
表四、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉及幾丁聚醣 -三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒表面電位之影響.....	111



中文摘要

本研究利用臭氧(Ozone, O₃)氧化降解幾丁聚醣(Chitosan, CS, 去乙酰度 $\geq 85\%$, Original Mw, 767 kDa)至 High Mw (596 kDa)、Medium Mw (265 kDa)及 Low Mw (50 kDa)之不同分子量後,分別以 1%醋酸配置成 0.2%(w/v)之 CS 溶液並調整 pH 至 4.7,接著將不同濃度(400 至 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之柚皮素溶液,與上述 CS 溶液混合均勻,再加入三聚磷酸鈉溶液(Sodium tripolyphosphate, TPP, pH 9.0),使 CS/TPP 重量比為 3/1、4/1、5/1 及 6/1,製備幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素(CS-TPP-Naringenin)奈米顆粒,並探討柚皮素濃度、幾丁聚醣分子量及 CS/TPP 重量比對於 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒之包覆率、裝載率、產率、粒徑大小、表面電位及其於模擬胃腸道之安定性,另外以掃描式電子顯微鏡(Scanning Electron Micrograph, SEM)拍攝觀察其外觀。

結果顯示,在包覆率方面,以柚皮素濃度為 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、High Mw CS 及 CS/TPP 重量比為 4/1 製備 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒,則有較佳的包覆率(27.5 至 29.2%);裝載率方面,隨著柚皮素濃度越高及幾丁聚醣分子量越大,裝載率越高(1.2 至 10.5%),而 CS/TPP 重量比在 4/1 至 6/1 時有較佳的裝載率(11.5 至 14.1%);產率方面,隨著柚皮素濃度及 CS/TPP 重量比的減少,產率呈現上升的趨勢(23.6 至

62.6 %)，而幾丁聚醣分子量對產率影響之變動在 40.5 至 50.2 %內；粒徑方面，柚皮素濃度的增加使其粒徑變大(528.8 至 597.4 nm)，幾丁聚醣之分子量越低其粒徑有變小的趨勢(663.5 至 534.6 nm)，但 CS/TPP 重量比的增加，其粒徑有明顯的增加(695.1 至 1066.9 nm)；表面電位方面，柚皮素濃度對電位的影響不大(+39 至+41 mV)，而隨著幾丁聚醣分子量及 CS/TPP 重量比的增加，表面電位有明顯增加的趨勢(+22 至+40 mV)；在模擬胃腸道之安定性方面，利用柚皮素濃度為 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，High Mw CS 及 CS/TPP 重量比為 4/1 所製備出之奈米顆粒，將其置入模擬胃液(pH 1.2, with pepsin)2 小時後，柚皮素之釋放率約 10 %，於模擬腸液(pH 7.4, with pancreatin)持續作用 6 小時後，其釋放率約 10 %，此結果顯示奈米顆粒十分安定；經由 SEM 觀察其顆粒型態為圓形球狀之奈米顆粒。

關鍵字:不同分子量幾丁聚醣、柚皮素、三聚磷酸鈉、奈米顆粒、

模擬胃腸道之安定性、掃描式電子顯微鏡觀察

Abstract

Chitosan(CS, deacetylation $\geq 85\%$, original Mw 767 kDa) was degraded into different molecular weights by O₃ oxidation (high Mw 596 kDa, medium Mw 265 kDa and low Mw 50 kDa), those chitosans were individually dissolved in 1 % acetic acid at 0.2 % (w/v) concentration and adjusted to pH 4.7, then mixed individually with naringenin solution of different concentrations (400-2000 $\mu\text{g/mL}$). The mixed solutions were slowly dripping with sodium triphosphate(TPP) solution (pH 9.0) by different CS/TPP mass ratios of 3:1, 4:1, 5:1 and 6:1 to prepare CS-TPP-Naringenin nanoparticles. Effective factors such as naringenin concentration, chitosan molecular weight and CS/TPP mass ratio on the encapsulation efficiency (EE), loading capacity (LC), process yield (PY), particle size and zeta potential of the nanoparticles were investigated. Scanning electron micrograph (SEM) and stability of the nanoparticles in the simulated gastric fluid (pH 1.2, with pepsin) for 2 hours and simulated intestinal fluid (pH 7.4, with pancreatin) for 6 hours were determined.

As a result, the high naringenin EE was obtained at the naringenin concentration of 1600 $\mu\text{g/mL}$, high Mw of CS and CS/TPP mass ratio of 4:1(27.5-29.2 %). LC of naringenin increased as naringenin concentration and CS Mw increased (1.2-10.5 %), while CS/TPP mass ratio of 4:1 to 6:1 showed increasing the LC (11.5-14.1 %). PY of the nanoparticles increased as naringenin concentration and CS/TPP mass ratio decreased

(62.6-23.6 %), CS Mw showed a little effect. On the CS-TPP-Naringenin nanoparticles size, high naringenin concentration and high CS Mw had a tendency of increasing its size at an inconsiderable range, while high CS/TPP mass ratio apparently increased its size (695.1-1066.9 nm). Zeta potential of CS-TPP-Naringenin nanoparticles decreased as CS Mw and CS/TPP mass ratio decreased (+40 - +22 mV), naringenin concentration showed a little effect (+39 - +40 mV). Simulated gastrointestinal stability of CS-TPP-Naringenin nanoparticles (prepared with naringenin concentration of 1600 $\mu\text{g/mL}$, high Mw CS (596 kDa) and CS/TPP mass ratio of 4:1) released about 10 % of naringenin in the simulated gastric fluid for 2 hours, and release about 10 % of naringenin in the simulated intestinal fluid. SEM showed that both CS-TPP and CS-TPP-Naringenin nanoparticles were spherical shape.

Key words: Different molecular weights Chitosan, Naringenin,

Sodium tripolyphosphate, Nanoparticles,

Simulated gastrointestinal stability, SEM observation.

壹、前言

柚皮素(naringenin)屬於類黃酮化合物當中的黃烷酮，其結構由苯環所組成，與酚類(phenol)物質相似，同樣為多酚類化合物，因此有學者表示柚皮素能夠取代維生素 E(α -tocopherol)當作抗氧化劑使用 (Van Acker *et al.*, 2000)。過去也有學者研究發現柚皮素能夠抑制巨噬細胞和微膠細胞的活化，藉由減少脂多醣(lipopolysaccharide)誘導的亞硝酸鹽產物與 iNOS 和 COX-2 的表現(Bodet *et al.*, 2008 ; Vafeiadou *et al.*,2009)，降低發炎傳遞物質的產生，藉此達到抗發炎的效果，並且透過抑制膽固醇酯的合成，減少 Hep G2 細胞分泌 Apo B，進而降低血管硬化的風險(Borradaile *et al.*, 1999 ; Kurowska *et al.*, 2000)。另外柚皮素還具有抗癌、抗突變、抗細胞增殖以及抗粥狀動脈硬化等功效。

然而，柚皮素以口服的方式進入人體過後，容易受到體內酵素的降解而快速排出體外，使其吸收效果較差(Manach *et al.*, 2004)。柚皮素對於水的溶解性也較低，使其應用性受到許多限制，而有學者研究指出柚皮素之生物利用率約為 5.8 %(Kanaze *et al.*, 2007)。

近年來有學者研究發現利用奈米技術包覆藥物，能保護藥物免於受到體內酵素代謝活性的影響，並且能夠調控藥物使其在體內持續地釋放，增加藥物之生物利用率(Pescina *et al.*, 2015)。文獻指出，以幾

丁聚醣(Chitosan)包覆藥物或活性物質(bioactive agents)製備奈米顆粒，可降低其在胃中受到強酸及酵素的破壞。幾丁聚醣具有帶正電及黏性等特性，使其黏附在帶負電之腸膜細胞上，增加其在腸道接觸的時間，有利於腸道吸附作用。另外，幾丁聚醣能夠輕易地短暫打開腸膜細胞之緊密連結(tight junctions)通道，亦有利於奈米物質進入血液內(Yamamoto *et al.*, 2005)。有些研究者如 Shah 等人(2009) 利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉(sodium tripolyphosphate)將藥物或活性物質包覆製成奈米顆粒，增強其吸收及調控其釋放效率；Kumar 等人(2015)以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉製備攜帶柚皮素之奈米顆粒，探討三種不同柚皮素濃度及兩種不同 CS:TPP 重量比分別對於奈米顆粒之特性影響，然而在不同分子量之幾丁聚醣卻尚未被探討，柚皮素於模擬消化道時的釋放情況也並未做更進一步的研究。

因此，本研究嘗試利用幾丁聚醣作為基材，與三聚磷酸鈉經由離子交聯作用，將柚皮素包覆於其中製備成奈米顆粒，並研究不同柚皮素濃度、不同分子量之幾丁聚醣及不同 CS:TPP 重量比對於奈米顆粒特性的影響，透過此奈米顆粒之特性，期望柚皮素在食用進入消化道時，不受到胃酸及酵素的破壞，減緩其在胃部的釋放，同時改善其在腸道之滯留時間，以達到提高柚皮素在人體之生物利用率。

貳、文獻整理

一、幾丁質與幾丁聚醣

(一) 幾丁質與幾丁聚醣簡介

幾丁質(Chitin)廣泛存在於自然界中甲殼動物(蝦、蟹)的外殼、節肢動物(昆蟲)的外皮、軟體動物(烏賊)的外殼和內骨骼，微生物如真菌、藻類及酵母菌等之細胞壁也有其存在。結構與纖維素相似，為自然界中含量次高的天然聚合物。

法國學者 Henri Braconnot 於 1811 年以低濃度之氫氧化鈉溶液加熱處理菇類時，發現有不溶於水的物質，當時稱之為 fungine。接著，在 1823 年學者 Odier 從昆蟲的表皮中分離出類似的物質，並將其命名為幾丁質。直到 1859 年學者 Rouget 將幾丁質以高濃度氫氧化鈉溶液加熱後，發現其可溶於有機酸。而該產物於 1894 年被學者 Hoppe-Seyler 正式命名為脫乙酰殼多醣(幾丁聚醣:Chitosan)(葉，2010)。

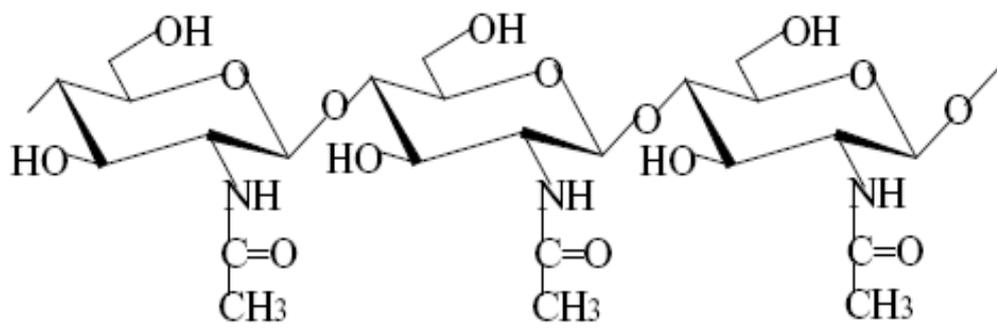
幾丁聚醣是藉由幾丁質去乙酰化(De-acetylation)反應後得到，通常以去乙酰度達 40 % 以上，可溶解於稀酸溶液者即可稱之。目前對於幾丁聚醣的應用相當廣泛，包括環保、生物醫學、農業、化工及食品等領域皆有相關的發展，而應用的效果與幾丁聚醣的去乙酰程度、分子量及濃度有關。

(二) 幾丁質與幾丁聚醣結構

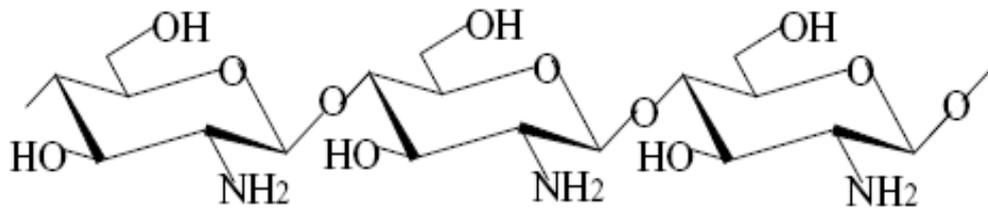
幾丁質(Chitin)由 1000 至 3000 個 N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)作為單元體,以 β -1,4 鍵結而成的高分子直鏈多糖聚合物。其聚合的方式在不同生物體中有著不同的構形,可分為 α -、 β -及 γ -chitin。 α -chitin 為斜方晶系(rhombic),兩股雙螺旋呈反向平行(antiparallel)排列,質地較硬,構形緊密,為自然界生物最普遍之構形。 β -chitin 為單斜晶系(monoclinic),兩股雙螺旋成平行(parallel)排列,質地鬆散,容易被酵素分解。 γ -chitin 為 α -chitin 與 β -chitin 之混合體,結構狀態介於兩者之間(Muzzarelli, 1977)。

幾丁質、幾丁聚醣與纖維素(Cellulose)三者具有相似的結構(圖一),其主要差別在於 C-2 所接的官能基不同,幾丁質在 C-2 位置上所接的為乙醯胺基(-NHCOCH₃),幾丁聚醣在 C-2 位置上接的為胺基(-NH₂),而纖維素在 C-2 位置上所接的則是氫氧基(-OH)。

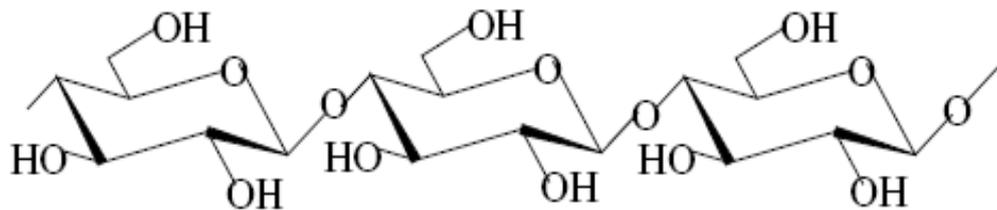
幾丁質經由高溫及強鹼的處理,即去乙醯(de-acetylation)反應,使其結構上之乙醯基被部分去除,露出胺基,因此可以得到不同去乙醯程度之幾丁聚醣。然而目前對於幾丁質與幾丁聚醣的差異並沒有明確的界定,有學者認為去乙醯程度大於 60 %且微溶於酸性溶液即可稱之(Aiba, 1992)。一般來說以去乙醯度 70-80 %之幾丁聚醣最為常見,而去乙醯度最高可達到 99 %。



Chitin



Chitosan



Cellulose

圖一、幾丁質、幾丁聚醣及纖維素之基本結構。

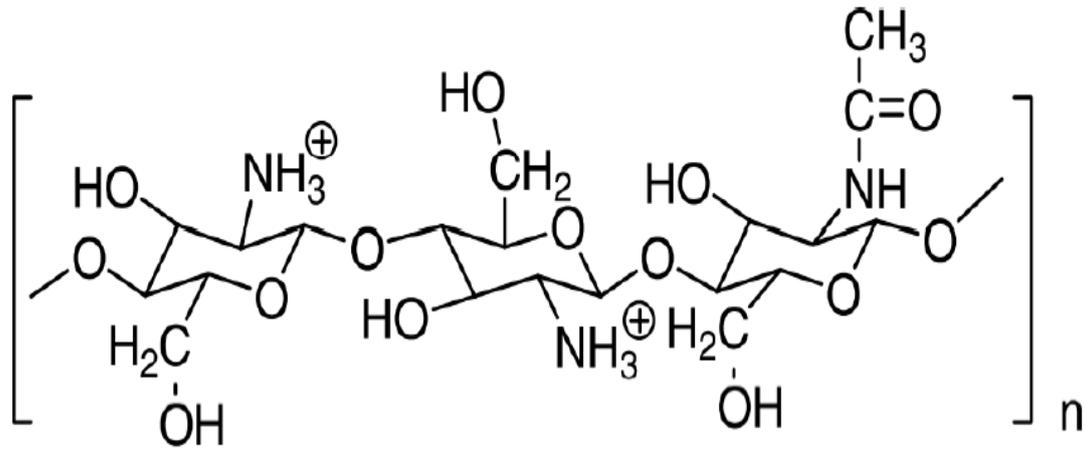
Fig. 1. Structure of chitin, chitosan and cellulose.

(Krajewska, 2004)

(三) 幾丁聚醣溶液之特性

幾丁質屬於難溶性物質，對溶劑的抗性很大，其不溶於水及一般無機或有機溶劑，也不溶於鹼液，僅溶於強無機酸。幾丁聚醣因具有較多的胺基，溶解性較佳，可溶於酸性或弱酸性之有機酸及無機酸，如醋酸、甲酸、乳酸、檸檬酸、丙酮酸、鹽酸及磷酸中，其中以甲酸為最佳溶劑。溶解性則是隨著去乙醯程度越高而增加，雖不溶於中性或鹼性溶劑，但可溶於酸化多醇(acidified polyols)，而醋酸則經常被作為測定幾丁聚醣溶液之溶劑(Knorr, 1984)。

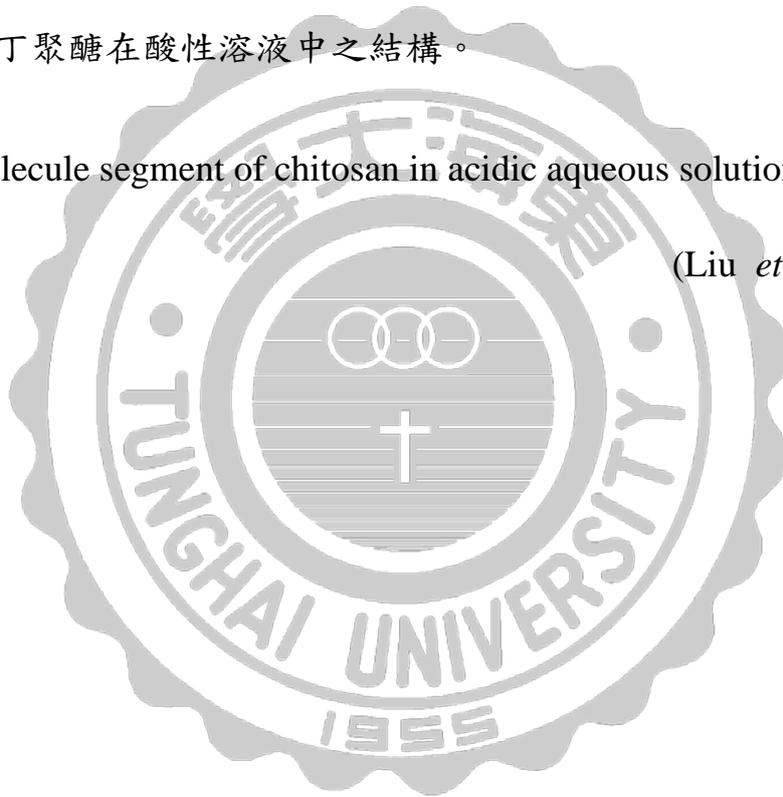
幾丁聚醣溶解於酸性溶液且 $pK_a(pH)$ 小於 6.3 時，其 C-2 位置上的胺基(NH_2)會形成 $-NH_3^+$ 的形式(圖二)，使幾丁聚醣成為帶正電之聚合物(Illum, 1998)。而其親水性則隨著 pH 值的變化有著不同的影響，當 pH 值較低時 $-NH_3^+$ 較多，親水性增加；反之 pH 值較高時， $-NH_3^+$ 變成 $-NH_2$ ，造成親水性降低。因此 pH 值對於幾丁聚醣溶液有著重要的影響，包括幾丁聚醣之帶電量、溶解性、黏度及應用性等。



圖二、幾丁聚醣在酸性溶液中之結構。

Fig. 2. Molecule segment of chitosan in acidic aqueous solution.

(Liu *et al.*, 2005)



二、 幾丁聚醣及不同分子量幾丁聚醣之製備及檢測

(一) 幾丁聚醣之製備及檢測

幾丁質可經由去乙醯作用得到幾丁聚醣，常見的方式有熱鹼法、酵素法及微生物法等。熱鹼法為目前最常使用的方法，特色為速率快、去乙醯程度高及製作成本低，而去乙醯程度則會受到鹼液濃度、作用時間及加熱溫度等因素影響，其缺點為會使其鏈鍵部分降解。(柯，2006)。酵素法為利用幾丁質去乙醯酶(chitin de-acetylase)，將幾丁質上的乙醯基去除而得到幾丁聚醣，此方法不會降解幾丁聚醣之分子量，但由於速率較差且成本高，因此較不實用(陳等，1999)。微生物法則是利用 *Aeromonas sp.* 中的幾丁質去乙醯生產菌，以發酵的方式製備幾丁聚醣，但製備的成本較高且速率差，也較少人使用(陳等，1999)。

先前提到幾丁聚醣之去乙醯程度對於其應用方面具有影響，例如去乙醯程度越高者其溶解性越好。而一般檢測幾丁聚醣之去乙醯程度有滴定法、氣相層析法、高效液相層析法、紅外線光譜及核磁共振光譜分析法等(葉，2010)。

(二) 不同分子量幾丁聚醣之製備及檢測

依照目前的發展來說，幾丁聚醣的應用已經相當廣泛，但由於其分子量高，使得溶解性較差，黏度也較高，故造成在應用上受到限制，因此需製備出較低分子量之幾丁聚醣，增加其應用性，常見降解幾丁聚醣的方法如酸水解法、酵素水解法及臭氧化還原降解法。

1. 酸水解法：

以亞硝酸、鹽酸及磷酸等將幾丁聚醣結構上之醣苷鍵打斷，使其分子變小。特色為處理量大且成本低，但此法容易造成環境汙染，且專一性低，較難以控制降解的程度。

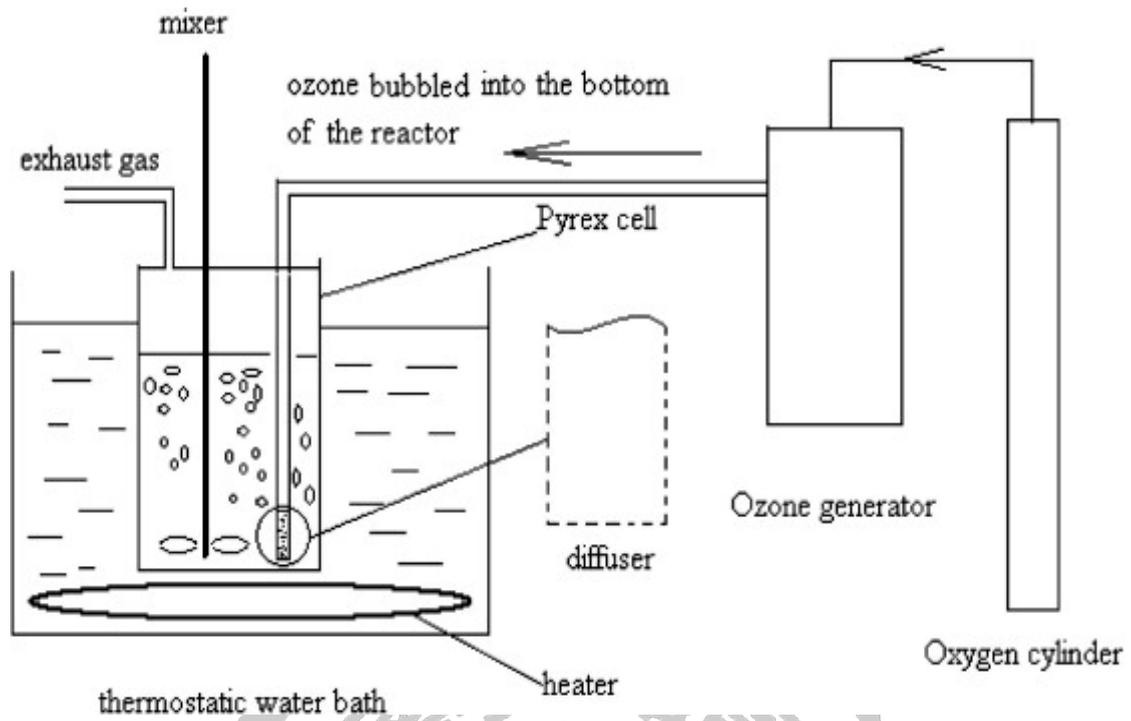
2. 酵素水解法：

常用的酵素如 chitosanase、cellulase 及 hemicellulase 等，可以直接對幾丁聚醣水解，特色為反應條件溫和且專一性高，但作用時間較長且酵素價格昂貴，經濟效益不大，因此限制其應用性 (Jeon *et al.*, 2000)。

3. 臭氧化還原降解法：

臭氣(Ozone)本身為強氧化劑，因此利用其特性來打斷幾丁聚醣結構上之醣苷鍵，特色為速率快、成本低，也無殘留之疑慮，故本實驗選擇以此法來降解幾丁聚醣分子量(圖三)，其缺點為使幾丁聚醣部分降解。

一般常見檢測幾丁聚醣分子量的方法有黏度平均法、光散射法及膠體滲透層析法等(葉, 2010)。黏度平均法為將幾丁聚醣溶於酸性溶液中, 以毛細管黏度計測其黏度, 並代入方程式推算出其平均分子量, 此法操作簡單, 但所得之分子量不夠精確。光散射法為透過折射儀先測得幾丁聚醣溶液折射率的變化, 再藉由光散射儀測定散射光子的數目, 最後代入公式計算得到平均分子量, 然而此法會受到幾丁聚醣高分子聚集而影響其分子量。膠體滲透層析法之原理為利用分子量大者, 其在管柱中之滯留時間較短, 故較快被沖提出管柱; 分子量小者則在管柱中的滯留時間較長, 因此較慢被沖提出管柱, 透過此方法與標準品進行對照後, 即可推算出其分子量, 此方法所得到之分子量的誤差較小, 因此本實驗選擇以膠體滲透層析法來檢測幾丁聚醣之分子量。



圖三、臭氧降解法實驗流程。

Fig. 3. Experiment procedure of degradation by ozone treatment.

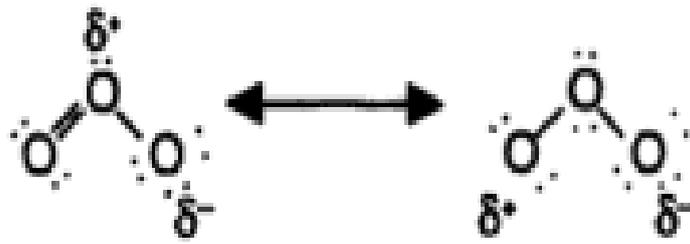
(Yue *et al.*, 2008)

(三) 臭氧氧化還原降解幾丁聚醣

在一般室溫下，臭氧為無色不安定之氣體，由三個氧原子構成，為氧氣之同素異形體(allotrope)，並具有兩種共振結構(圖四)。而在自然界中有兩種途徑來產生臭氧：一為閃電激發氧氣產生，二為陽光中之紫外線照射氧氣所產生，並存在於大氣層中。除了自然界可產生臭氧之外，以人為方式亦可製造臭氧，方法為利用高壓電板放電激發乾燥氧氣產生，臭氧製造機即為此原理所設計，並應用於工業或實驗室(Langlais *et al.*, 1991)。

臭氧與有機物之反應機制，在此以臭氧在水中之反應型態說明，可能反應途徑有兩種(圖五)：一為臭氧本身進行直接反應，即臭氧直接與有機物進行氧化反應，此反應具有選擇性。二為臭氧間接反應，以臭氧分解所產生之自由基進行反應(圖六)，此反應速率快但不具有選擇性(Hoigne *et al.*, 1983)。

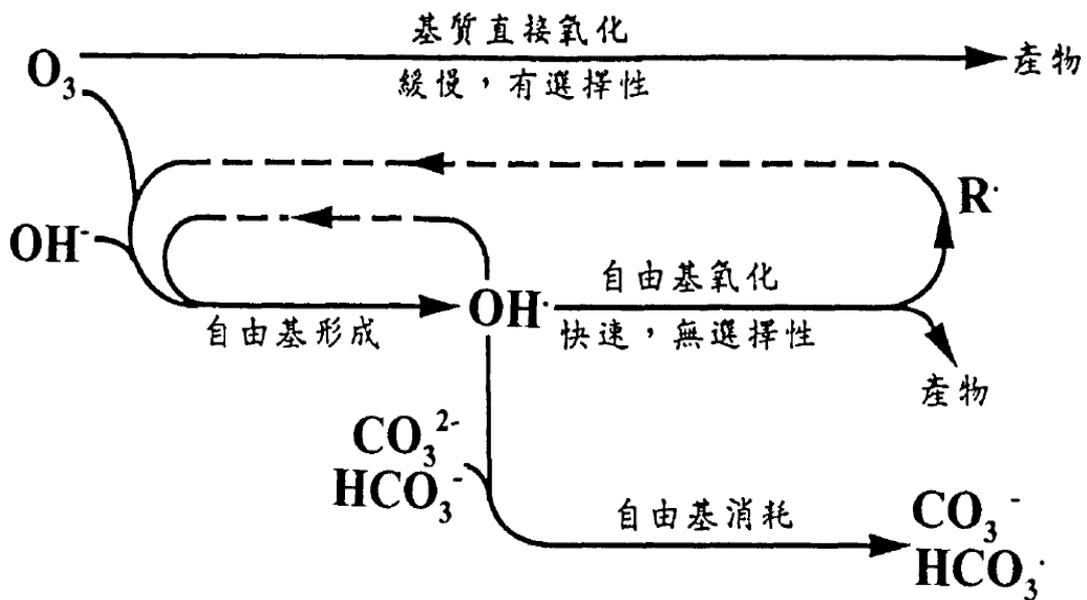
臭氧氧化多醣類之可能機制由 Kabal'nova 等人於 2001 年提出，其一為臭氧可能在不開環的情況下降解幾丁聚醣(圖七之一)，此為本實驗期望之反應機制。但臭氧較不具專一性，因此也有可能在不期望之位置氧化降解幾丁聚醣(圖七之二)。



圖四、臭氧分子共振之結構。

Fig. 4. Resonance structures in ozone molecules.

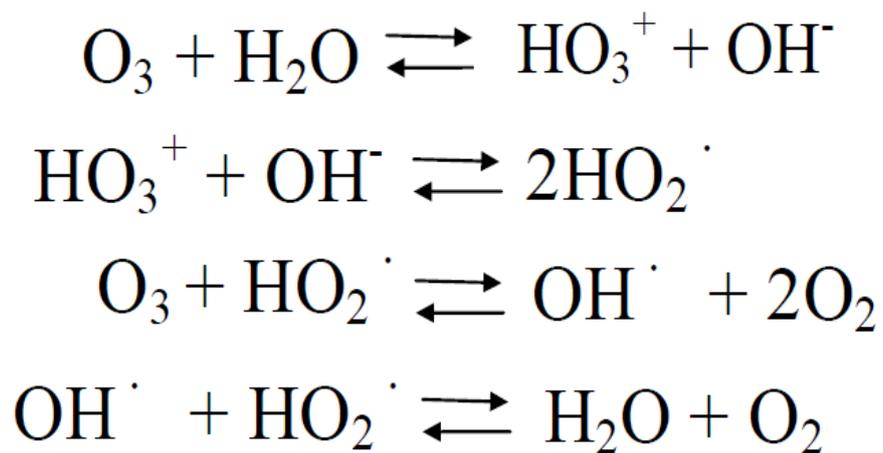
(Langlais *et al.*, 1991)



圖五、臭氧在水中之反應型態。

Fig. 5. Reaction types of ozone in aqueous solution.

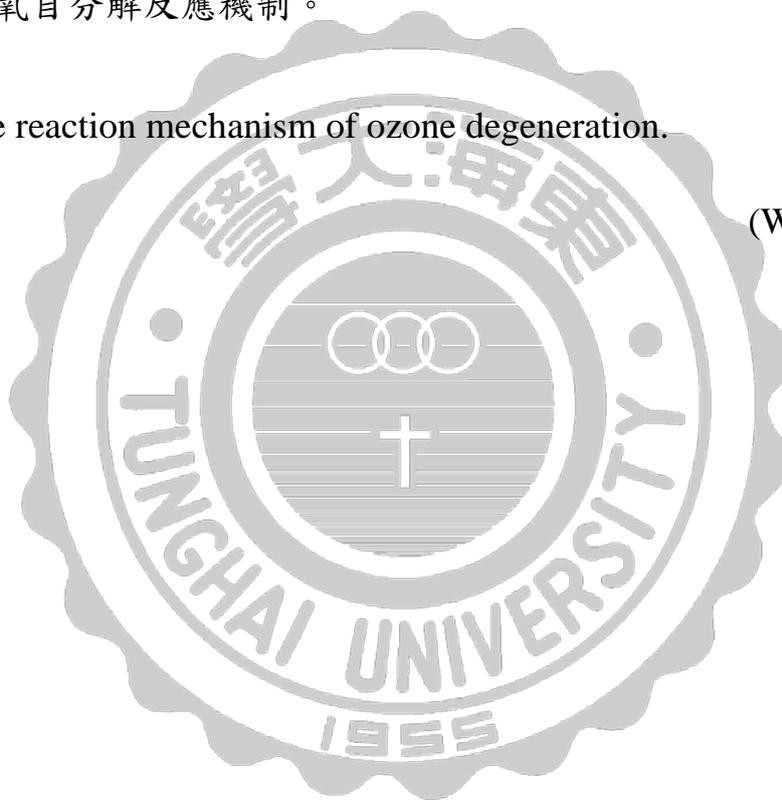
(刁，1993)

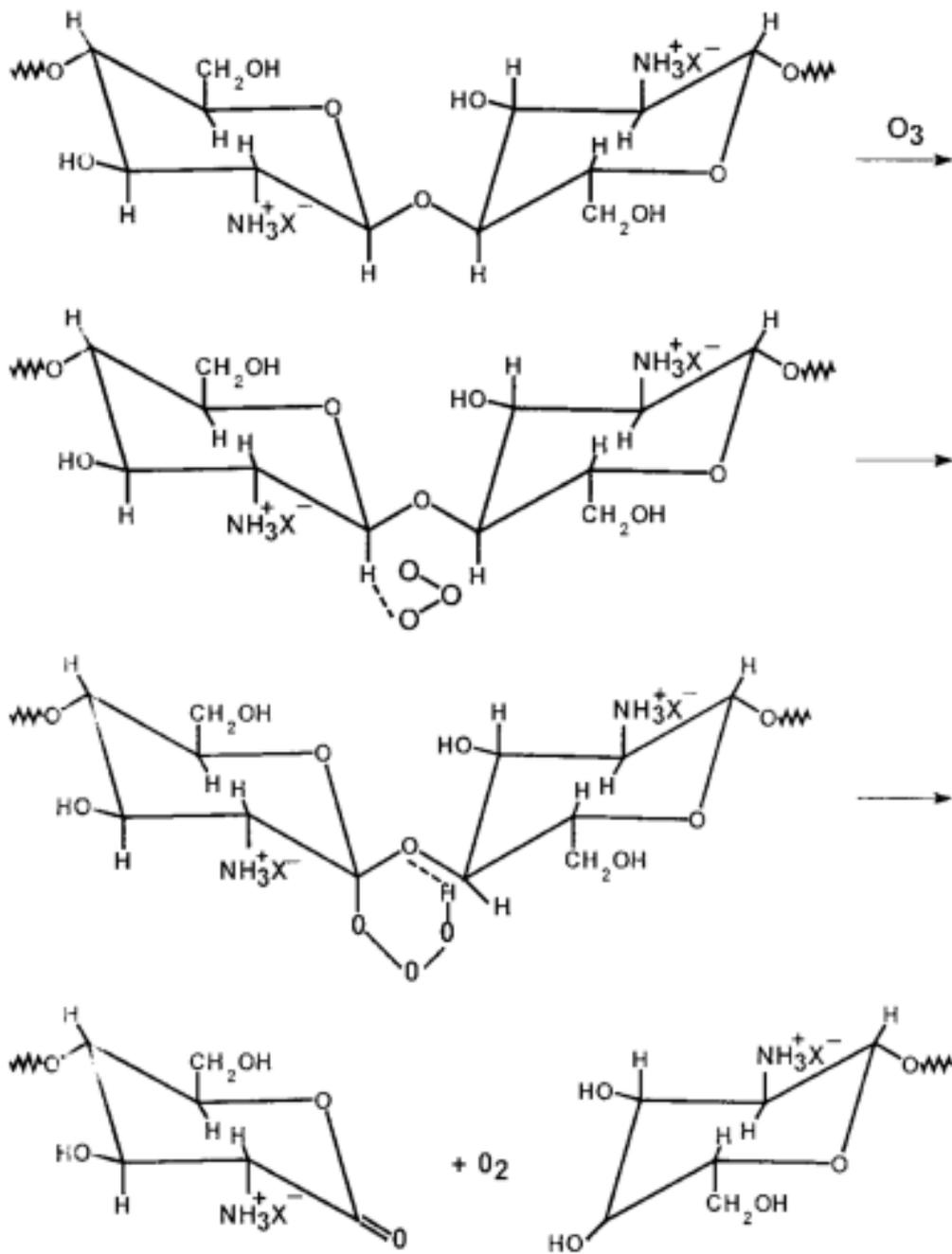


圖六、臭氧自分解反應機制。

Fig. 6. The reaction mechanism of ozone degeneration.

(Weiss, 1935)

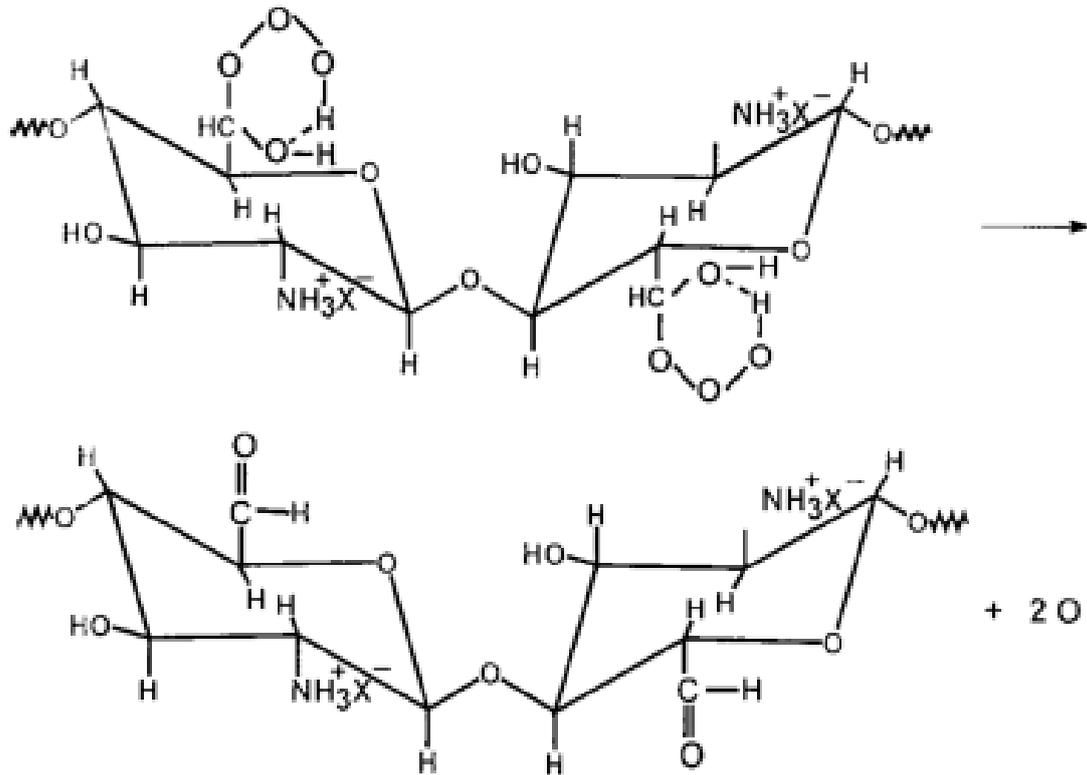




圖七、臭氧氧化降解多醣類之可能機制(一)。

Fig. 7-1. The mechanism for ozonolytic de-polymerization of polysaccharides.

(Kabal' nova *et al.*, 2001)



圖七、臭氧氧化降解多醣類之可能機制(二)。

Fig. 7-2. The mechanism for ozonolytic de-polymerization of polysaccharides.

(Kabal' nova *et al.*, 2001)

三、 幾丁聚醣奈米顆粒

(一) 奈米科技簡介

奈米的英文為 nanometer，是長度的單位，字首的 nano 在希臘文原意為[侏儒]的意思。一奈米為十億分之一公尺($1\text{ nm} = 1 \times 10^{-9}\text{ m}$)，也相當於三到四個原子串起來的長度。

奈米的尺寸介於巨觀(macro-scope，大於微米級的物質或物理現象)與微觀(micro-scope，指原子、分子與電子運動者)的範圍，而用於解釋奈米材料或奈米科技的新理論，稱之為介觀(meso-scope)。

奈米科技為在奈米尺寸下所進行的科學技術，在此範圍內，一般傳統科學理論、技術皆已不適用。因為在奈米尺寸的物理性質與普通尺寸的物理性質是截然不同的，當物質尺寸小到一奈米至一百奈米範圍，會產生出新的特性與現象，如蓮花表面之奈米結構使汙泥或水滴無法沾附、金的顆粒大小在五奈米時熔點大幅下降、奈米尺寸的二氧化鈦(TiO_2)其導電性會數倍大於普通尺寸的二氧化鈦等(馬，2002)。

(二) 奈米技術應用於食品領域

現今奈米技術應用於食品領域已經相當廣泛，奈米科技的功能也決定其應用範圍，像是利用奈米技術加強食品在加工或包裝等方面的應用，或是影響食品的營養價值和生物利用度等。以下將介紹食品經過奈米技術處理後之特性(圖八)：

1. 防止食物腐敗：

微生物對於食品的影響尤其重要，不管在生產、加工、運輸或儲存時，如果有微生物的存在皆會影響食品的品质，然而透過奈米技術改良食品包裝材料能有效降低微生物對於食品的影響。將銀(Silver)奈米化或製成奈米複合材料作為抗菌劑，藉由銀離子(Ag^+)與細胞膜蛋白結合，催化細菌細胞產生活性氧(reactive oxygen species, ROS)，最終細胞因氧化壓力而導致死亡(Kim *et al.*, 2007)，目前在美國已被FDA批准為消毒用的食品接觸材料。

2. 改善食品色澤

食品的外觀顏色對於消費者而言無疑是最重要的第一印象，因此透過食品添加物的協助下，使得食品色澤保持良好狀態是個迫切的需求。在美國FDA已經批准二氧化鈦(TiO_2)用於食品顏色上的添加，且規定其含量不得超過1%(w/w)。另外以奈米化之二氧化鈦作為食品添加物製成之食品，也可添加奈米化二氧化矽

(SiO_2)或氧化鋁(Al_2O_3)作為顏色的分散劑使用，而總含量不得超過整體的 2%。然而，目前已規定不得將碳黑(carbon black)當作添加物用於食品或化妝品當中(U.S. FDA., 2015)。

3. 改善食品風味

市場上的食品玲瓏滿目，總是使得消費者不知該從何下手，此時食品的風味扮演著重要的腳色，可將賣相差的食品藉由風味的提昇來吸引消費者。風味包括感官上的味覺與氣味，透過奈米技術的幫助下，可增加食品風味的釋放和保留。有學者表示二氧化矽(SiO_2)奈米材料可以作為香料或香氣的載體，應用在食品或非食品的產品(Dekkers *et al.*, 2011)。

4. 延長保存期限

食物(如蔬菜、水果等)經截切處理後，免不了受到氧氣的影響而產生不良變化，尤其是水果的褐變反應(Browning)最令人困擾，時常使得水果表面的顏色變深而造成賣相不佳。然而目前已有奈米材料能夠改善此情況，有學者研究利用奈米化的氧化鋅(ZnO)塗抹於截切後的富士蘋果(Fuji apple)表面，在 4 °C 的環境下儲存 12 天，發現顯著降低多酚氧化酶(polyphenol oxidase)和過氧化酶(oxidase)的活性，形成一種活性包裝來延長水果的保存期限，當作抗褐變劑使用(Li *et al.*, 2011)。

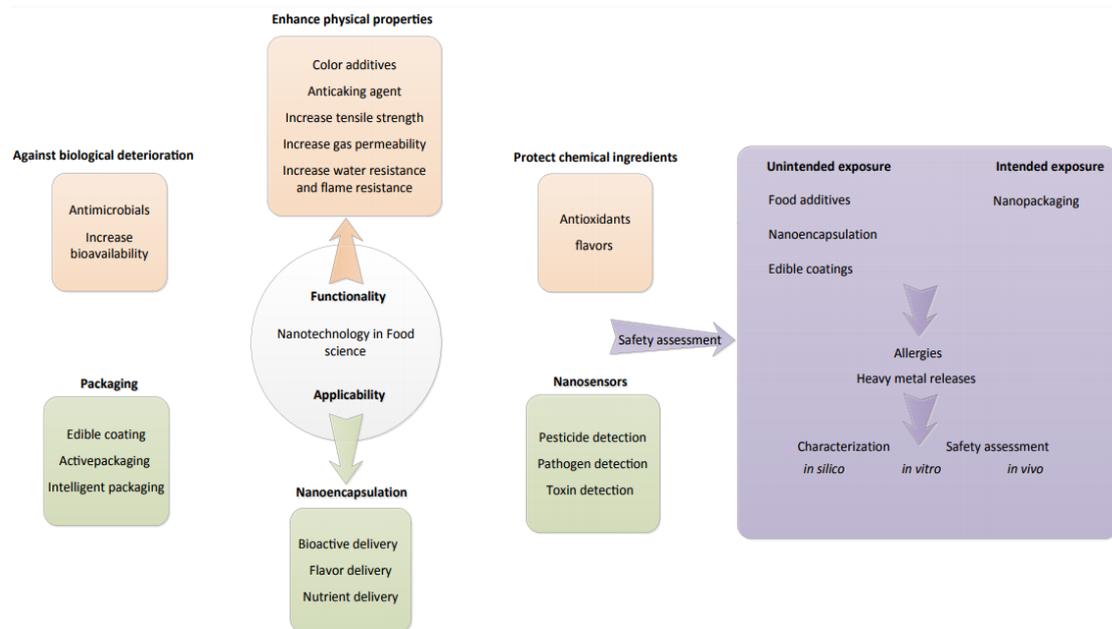
5. 防止食品結塊

粉末狀的食品(如奶粉、可可粉、香料等)最怕遇到受潮，形成結塊的情況，奈米化之二氧化矽(TiO_2)可幫助食品避免結塊的發生，保持其粉末狀之狀態。另外還可當作增稠劑使用，在歐盟已成功註冊為食品添加物(代碼為 E551)使用。

6. 提高生物利用度：

利用奈米技術改善生物活性物質(如輔酶 Q10、維生素、鐵、鈣、薑黃素等)之生物可利用度，已經廣泛地應用在各種奈米傳輸系統上，例如改變物質粒徑的大小，增加其表面積以提高溶解度，或是使物質在消化過程時改變其分子結構，另外也可選擇合適的介面活性劑來改良物質對於胃腸道的通透性，增加其吸收的效果(圖九)。奈米傳輸的方式如透過聯合膠體(association colloids)、奈米乳化液、生物聚合物奈米顆粒、奈米複合材料(nano-laminates)及奈米纖維等皆已被世人所發展使用(Sáiz-Abajo *et al.*, 2013)。

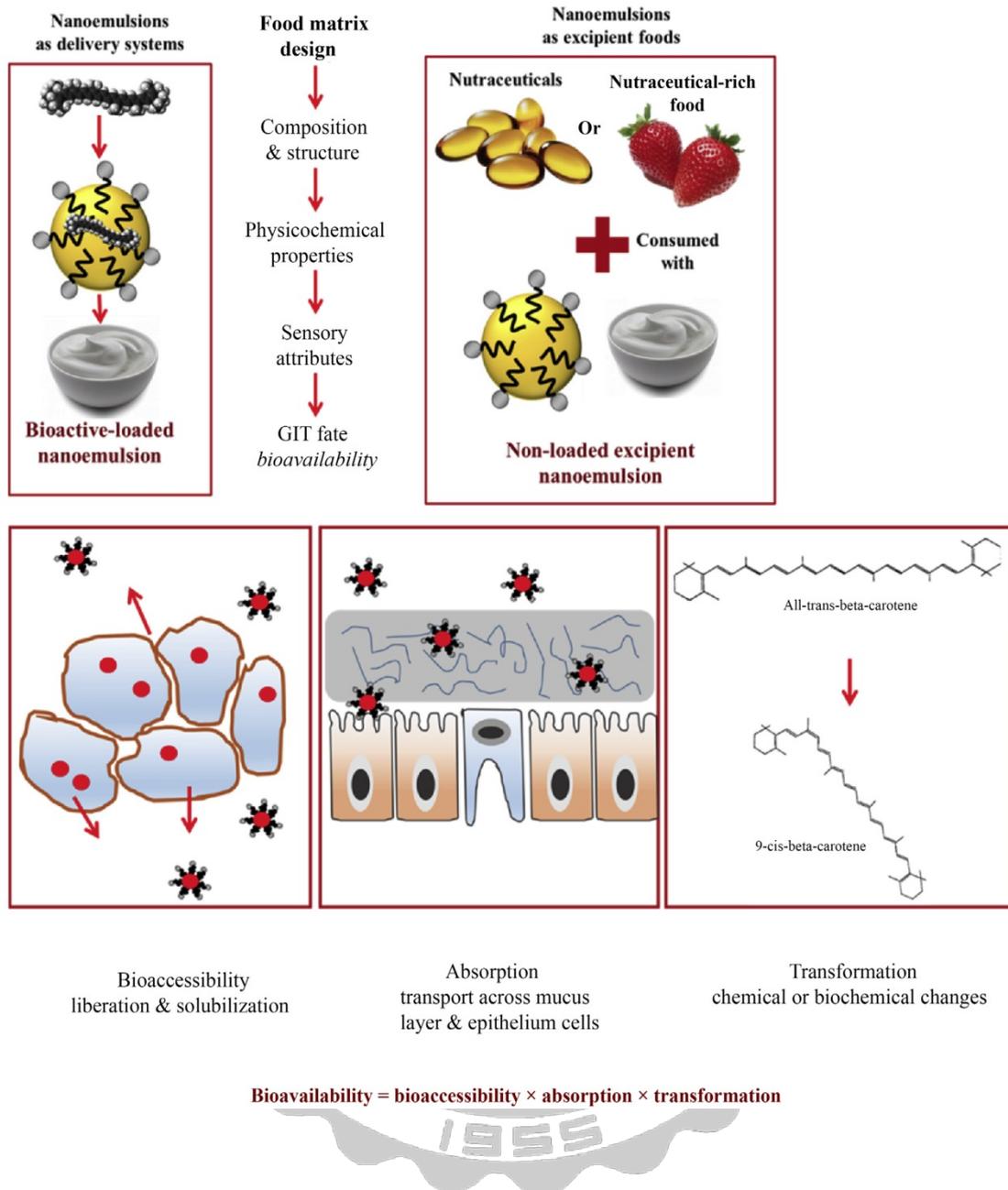
除了以上幾點特性之外，奈米技術還可加強食品包裝材料物理及機械特性，如伸縮性、剛性、透氣性、防水性、阻燃性等，這對於食品不管是在輸送、儲存等部分皆有很大的益處，也顯示奈米技術應用於食品包裝材料是具有很大的潛力(Youssef, 2013)。



圖八、奈米技術應用於食品科學及工業對於其功能性、應用性及安全評估之發展。

Fig. 8. The development of nanotechnology in food science/industry and its functionality, applicability, and safety assessments.

(He and Hwang, 2016)



圖九、生物活性之總口服生物利用度由三個主要因素決定：

生物可及性、吸收和轉換。

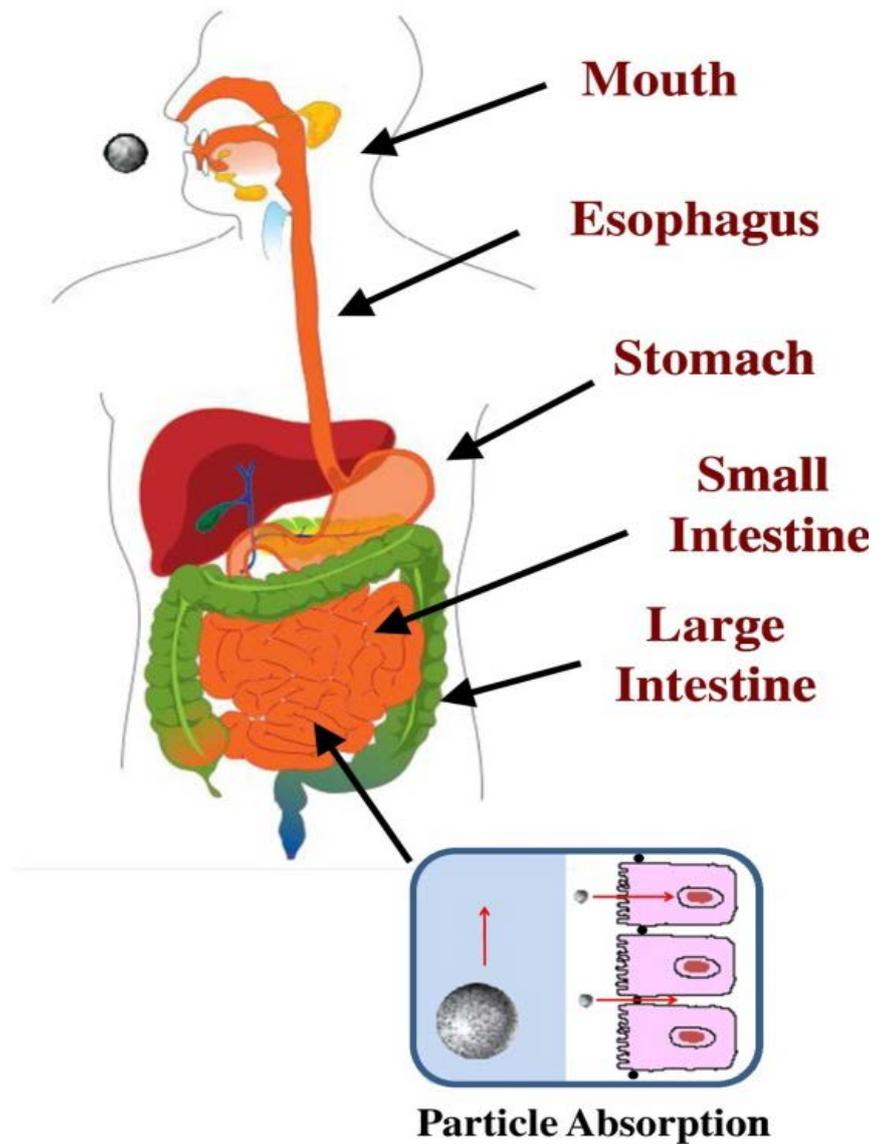
Fig. 9. The overall oral bioavailability of bioactives is governed by three main factors: bioaccessibility, absorption, and transformation.

(Salvia-Trujillo *et al.*, 2016)

(三) 奈米顆粒(nanoparticles)

對於非食品材料領域而言，粒子大小小於 1000 nm 為微米(次微米)顆粒，而奈米粒子大小小於 100 nm 則稱為奈米顆粒(Lan *et al.*,2005； Vo-Dinh, 2005)。然而在藥學領域中，認為粒子大小小於 1 μm (即 1000 nm)即可定義為[奈米顆粒](Kipp, 2004)，因此本研究認定奈米顆粒泛指尺寸大小介於數奈米至數百奈米之顆粒。

一般情況下物質經由口腔進入到人體，通過食道後接著進入到胃及腸道(小腸和大腸)，而物質必須通過消化道的消化作用後，才能夠被人體所吸收(圖十)。此過程中物質會受到不同消化器官的作用，以奈米顆粒為例，在口腔時具有接近中性的 pH 值環境及澱粉酶，依據食物的性質不同，停留在口腔的時間大概為數分鐘甚至數秒鐘；而胃則有 pH 2-3 高度酸性的環境及消化酵素(胃蛋白酶和脂肪酶)，此時奈米顆粒在胃中停留的時間，取決於一同食入之食物的性質狀態，液體的話即可快速通過，而固體的話則是較為緩慢，但通常在胃停留的時間大概為 30 分鐘至 2 個小時左右；接著進入到小腸，其環境約為 pH 5-7，且同樣含有消化酵素(胰酶、脂肪酶及蛋白酶)，因此當奈米顆粒與食物一同進入到體內時，藉由以上酵素分解食物，並透過腸道上皮細胞的特性來吸收食入之營養物質；最後代謝完之物質將進入到大腸，藉由特定系統排出體外。



圖十、奈米顆粒被吸收前所通過人體之消化系統。

Fig. 10. Nanoparticles must pass through the different regions of the human gastrointestinal tract before they can be absorbed.

(McClements *et al.*, 2017)

奈米顆粒在通過一系列消化系統後到達小腸，此時可利用兩種方式通過上皮細胞，進入到血液循環系統，經由血液循環系統將營養物質運送至人體各處(圖十一):

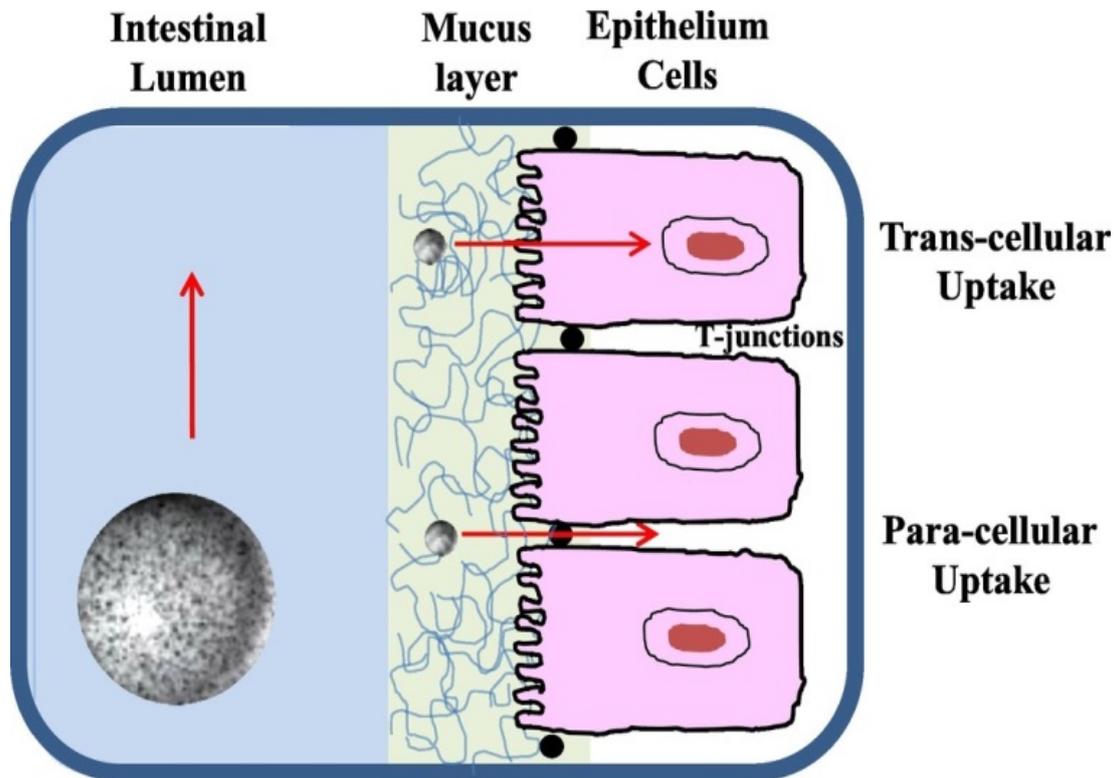
1. 穿透細胞膜(Trans-cellular Uptake):

此法為利用物質之濃度梯度原則，物質由高濃度往低濃度移動，使其穿透上皮細胞進入至血液。但此法為物質必須需具有上皮細胞之滲透性，否則無法藉由此法穿透上皮細胞，一般如脂肪即藉由此法運用。

2. 經由細胞間隙(Para-cellular Uptake):

此法藉由某些物質之特性，調控細胞與細胞之間的緊密連結，如多醣類(Lemmer and Hamman, 2013)。因此推測由多醣所製備之奈米顆粒，即可透過此法通過細胞間隙，進入至血液當中。

上述提到之緊密連結為一種封閉型連結，其存在於上皮細胞與內皮細胞間，如消化道上皮、鼻黏膜上皮、膀胱上皮及腦毛細管內皮之間。腸道上皮細胞之緊密連結主要功能為選擇性屏障及維持柵欄功能，其能阻止病原菌或有害物質進入至體內，同時調控營養物質進入體內。



圖十一、奈米顆粒通過細胞膜或細胞間隙被吸收進入到上皮細胞。

Fig. 11. Nanoparticles that reach the epithelium cells may be absorbed by trans-cellular or para-cellular mechanisms.

(McClements *et al.*, 2017)

(四) 奈米之安全性評估

如上述所提及，奈米科技與一般傳統科學理論、技術皆已不適用，因此對於奈米科技應用於食品領域之安全性問題，為目前必須探討的議題，不管是對於奈米顆粒之組成、形狀、表面積、尺寸大小、表面電荷、聚集與凝絮(flocculation)等特性，皆須進行安全性評估。

奈米食品依照規定，應用於食品之材料必須為營養物質，且對於人體無害，因此材料之選擇極為重要。然而除了研究營養物質本身之外，對於裝載營養物質之載體也相當重要，不管在接觸或是食用時皆有可能對人體產生影響，目前應用於奈米食品之材料大多為可食用及天然高分子材料，如白蛋白(albumin)、幾丁聚醣(chitosan)及膠原蛋白(collagen)等，以上物質經實驗確認可在人體內正常代謝，對於安全是無疑慮的。

奈米食品在檢測時已不能夠遵循過去傳統食品之檢測方式，因此對於劑量使用的多寡尤其重要，需透過實驗來得知劑量效果與生物體反應之相關性，才能得到明確的安全極限值，這部分尚須進行後續研究探討。

最後，近年來對於奈米顆粒之大小對於人體的危害性也頗具話題，人們似乎擔心著太小的顆粒有可能在人體中到處流竄，使得人體組織、器官甚至是細胞造成危害，有學者指出顆粒大小為 5 nm 的二氧化鈦

奈米顆粒能夠進入到小鼠肝細胞的 DNA 雙股螺旋，造成 DNA 分裂及細胞的損傷(Li *et al.*, 2010)。另外也有學者研究發現人體的防禦反應對於 10-50 nm 大小的奈米顆粒似乎有所降低，經實驗證實其可以通過呼吸或消化系統進入體內並擴散至全身(Watari *et al.*, 2008；Vinogradov *et al.*, 2002)，然而此奈米顆粒也能夠利用循環系統增加到達目標器官的可能性，因此危害性的問題，仍然有待討論。

(五) 幾丁聚醣奈米顆粒之製備方法

過去已有學者研究利用幾丁聚醣奈米顆粒用於口服胰島素傳送，在粒徑大小、表面電位、包覆率及裝載率等部分，其結果對於體內和體外實驗都具有明確的效用，奈米顆粒的粒徑大小約為 265 至 387 nm 左右(Pan *et al.*, 2002)。2004 年由歐洲科學基金會命名的奈米醫學(nano-medicine)表示奈米顆粒為應用於藥物傳送領域之新載體，並發現其尺寸大小約在微米或奈米的範圍，能保護蛋白質或胰島素等胜肽藥物，免於受到胃腸道中酵素的降解，進一步通過腸道上皮細胞達到吸收的效果(Reis *et al.*, 2007)，因此接下來介紹幾種製備幾丁聚醣奈米顆粒之方法(圖十二)：

1. 離子凝膠法(Iono-tropic gelation)：

離子凝膠法為較簡單、溫和且容易的製備方法(圖十三)。其原理

為將幾丁聚醣溶解於酸性溶液當中，此時幾丁聚醣之胺基將形成帶正電荷(NH_3^+)的形式，接著與溶於水中帶負電之三聚磷酸鈉(sodium tri-polyphosphate, TPP)，藉由攪拌將兩相反電荷的物質發生反應，透過離子交聯作用產生奈米顆粒。此方法為本實驗用於製備奈米顆粒之方法，詳細過程於下個章節進行探討。

2. 共凝結及沉澱法(Co-acervation or precipitation):

其原理為利用幾丁聚醣在鹼性條件下無法溶解之特性(pKa 6.3)，產生凝結及沉澱反應。方法為將幾丁聚醣噴入含鹼性溶液(如 sodium hydroxide、sodium hydroxide-methanol 或 ethanedi-amine)之環境中(圖十四)，此時因凝結及沉澱反應而產生沉澱物，接著將此沉澱物多次水洗及離心以去除殘留之鹼性溶液，即可得到幾丁聚醣奈米顆粒(Nishimura *et al.*, 1986)。

3. 乳化交聯法(Emulsion cross-linking):

此法特別適用於疏水性物質。方法為將幾丁聚醣溶液加入至油相溶液，藉由介面活性劑之乳化作用，使幾丁聚醣溶液於油相中形成 W/O(water-in-oil)，再加入交聯劑(如戊二醛)硬化乳滴及使其穩定，最後過濾顆粒並以正己烷及乙醇清洗後乾燥得之(圖十五)。原理為利用幾丁聚醣之胺基與交聯劑之醛基反應而結合，此法的缺點為加入之交聯劑可能無法完全地去除。

4. 乳化液滴接合法(Emulsion-droplet coalescence):

此方法是將乳化交聯法與沉澱法兩者做結合(圖十六)，除了可以利用交聯劑來穩定顆粒結構外，還可藉由幾丁聚醣與氫氧化鈉液滴所造成之沉澱反應來加強其結構。製備過程為先各別配置幾丁聚醣-藥物乳化劑(W/O)及幾丁聚醣-氫氧化鈉乳化液(W/O)，接著將兩乳化液以高速攪拌，使乳滴隨機碰撞並產生交聯反應，進而沉澱產生幾丁聚醣奈米顆粒(Tokumitsu *et al.*, 1999)。

5. 乳化溶劑蒸發法(Emulsification-solvent evaporation):

此方法是將油脂與大豆卵磷脂先進行混合，再溶解於有機溶劑(如氯仿)中作為油相，接著轉移到含有介面活性劑的水相當中，即幾丁聚醣，進行均質化(Homogenization)，形成 O/W(oil-in-water)乳化液，再透過超聲波處理(Sonication)形成奈米乳化液，最後以攪拌的方式將有機溶劑蒸發，得到固體脂質奈米顆粒(圖十七)。

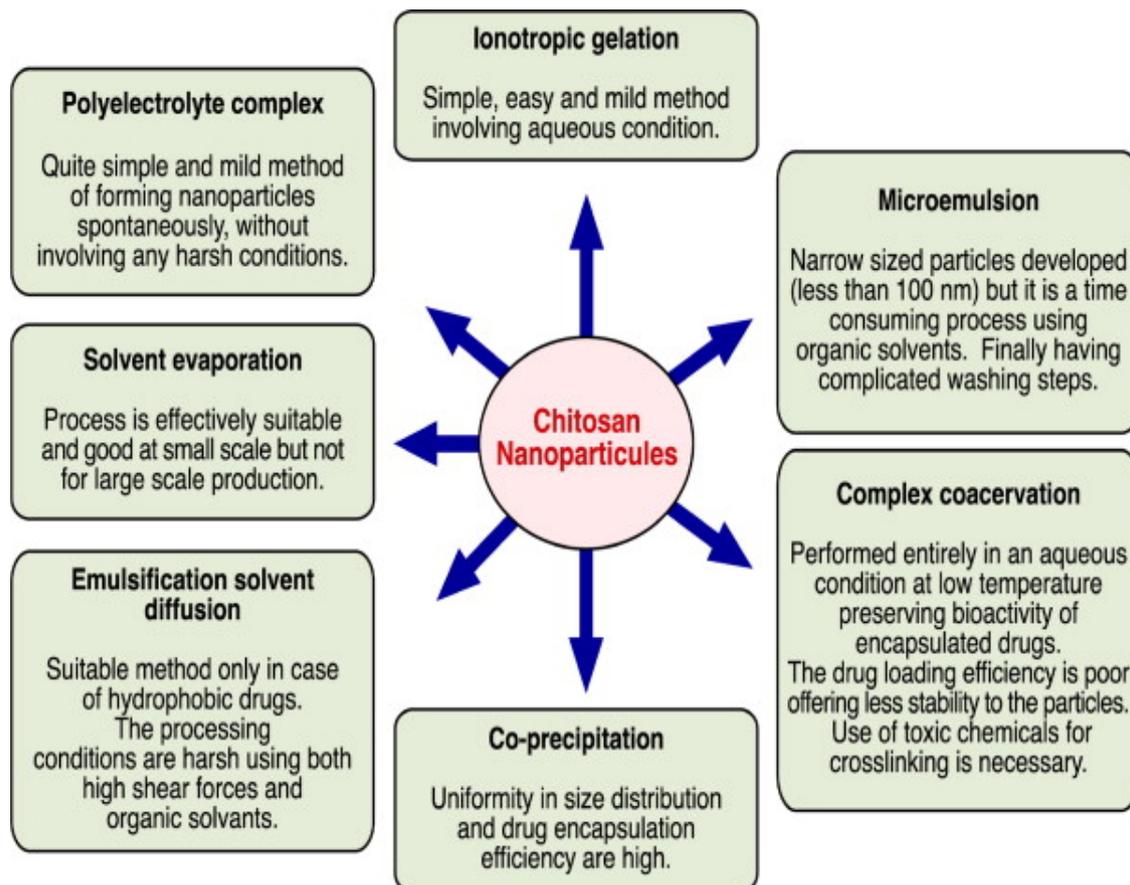
有學者研究發現，以此法製備之固體脂質奈米顆粒在口服藥物傳遞方面具有很大的優勢，包括良好的生物相容性、顆粒之粒徑較小、藥物裝載率高且長期使用下來較為穩定，唯一不同的是表面電位皆為負電荷，與本實驗所期望之結果並不相同，推測可能受到製備材料的影響(Dingler *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2007 ; Pooja *et al.*, 2015)。

6. 噴霧乾燥法(Spray drying):

此法原理為利用熱空氣將溶液水分瞬間蒸發，乾燥霧化後的液滴來得到乾燥之奈米顆粒(圖十八)，方法為將幾丁聚醣溶於酸性溶液，再將欲包覆之物質分散於幾丁聚醣溶液中，加入適當的交聯劑，最後以噴霧乾燥機經由噴嘴將溶液在熱空氣中噴發得之。此法之顆粒大小由噴嘴尺寸、噴發速度、霧化壓力及進氣時之溫度等因素的不同，而有不同的結果，然而因操作簡易又快速，在工業界被廣泛應用(He *et al.*, 1999)。

7. 逆微胞法(Reverse micellar):

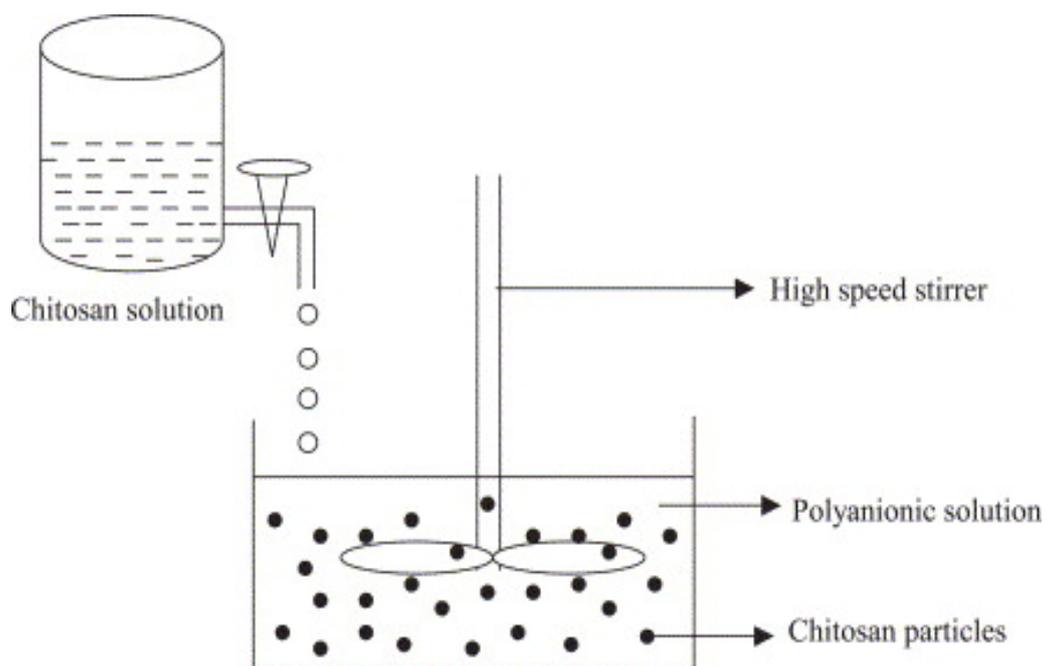
此法為將介面活性劑與有機溶劑混合(圖十九)，加入幾丁聚醣及欲包覆之物質後，調整水相使其與油相及介面活性劑組成穩定混合物，接著加入交聯劑攪拌過夜後，去除有機溶劑得到沉澱物，將此沉澱物分散於水溶液中，以合適的鹽類沉澱介面活性劑，離心後取其上清液並以透析膜作用約 1 個小時，最後將液體凍乾即可得到幾丁聚醣奈米顆粒(Leong and Candau, 1982)。



圖十二、幾丁聚醣奈米顆粒之若干製備方法。

Fig. 12. Methods for chitosan nanoparticle preparation.

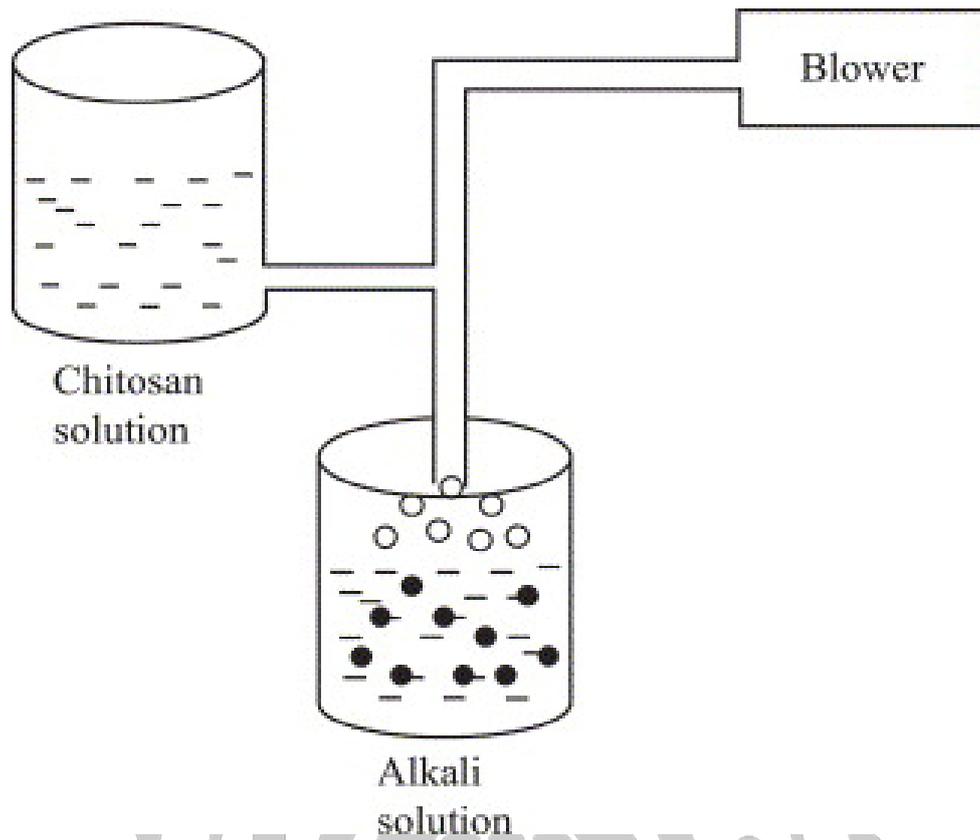
(Mukhopadhyay *et al.*, 2012)



圖十三、離子交聯法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖。

Fig. 13. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by ionic gelation method.

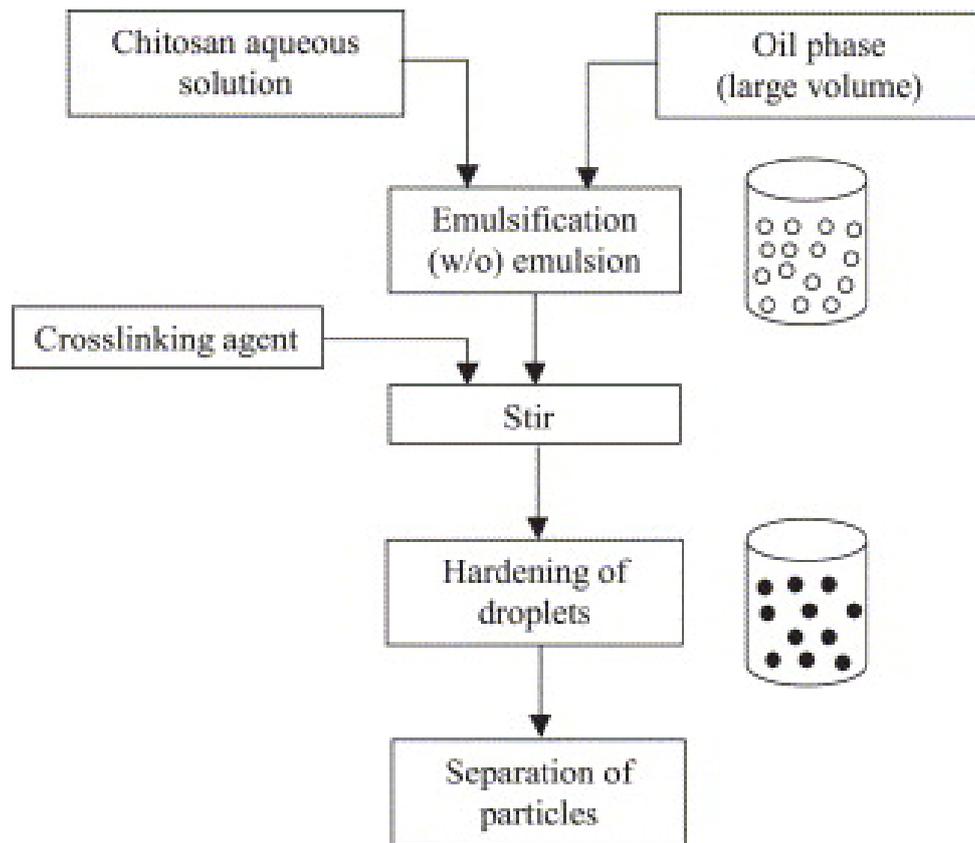
(Agnihotri *et al.*, 2004)



圖十四、共凝結及沉澱法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖。

Fig. 14. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by coacervation/precipitation method.

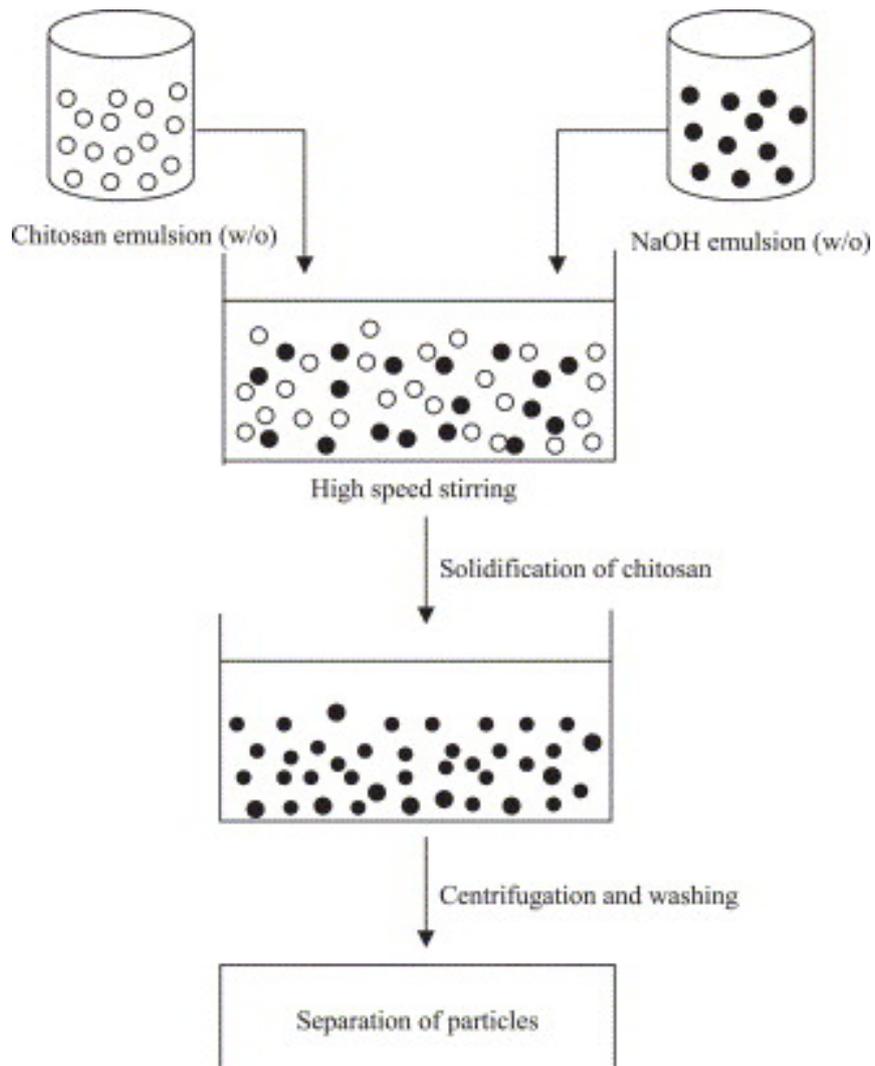
(Agnihotri *et al.*, 2004)



圖十五、乳化交聯法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖。

Fig. 15. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by emulsion cross-linking method.

(Agnihotri *et al.*, 2004)

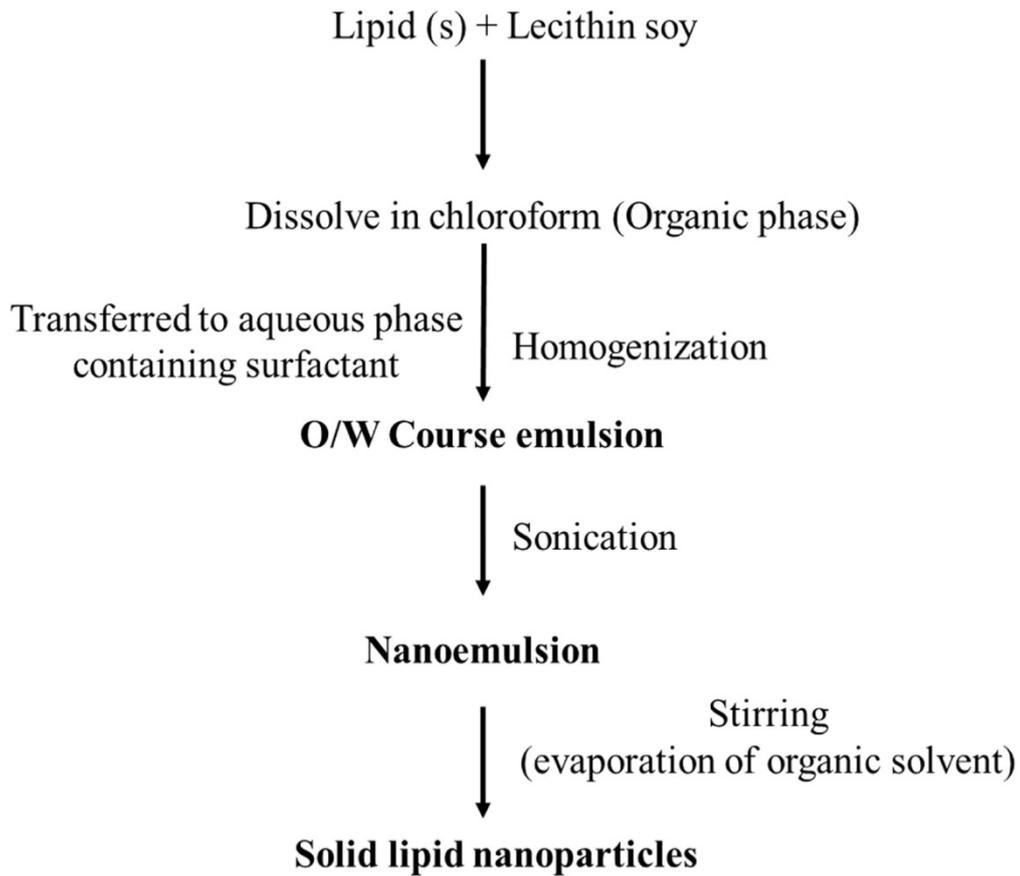


圖十六、乳化液滴接合法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖。

Fig. 16. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by emulsion-droplet coalescence method.

(Agnihotri *et al.*, 2004)

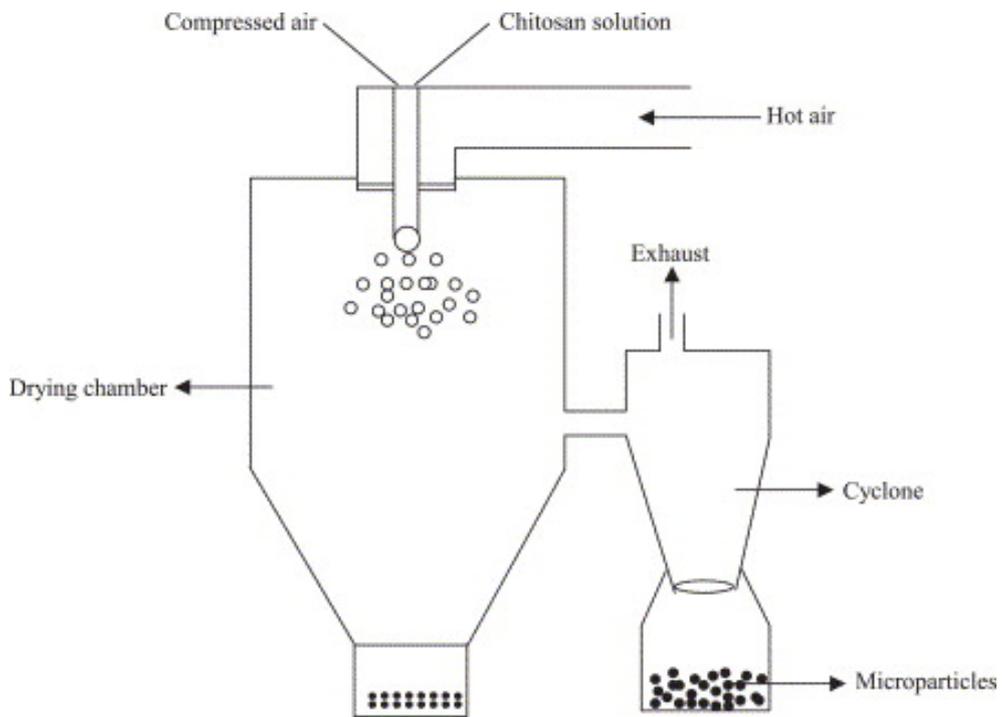
Single emulsification-solvent evaporation method



圖十七、乳化溶劑蒸發法製備固體脂質奈米顆粒之示意圖。

Fig. 17. Flow chart representing the preparation of solid lipid nanoparticles.

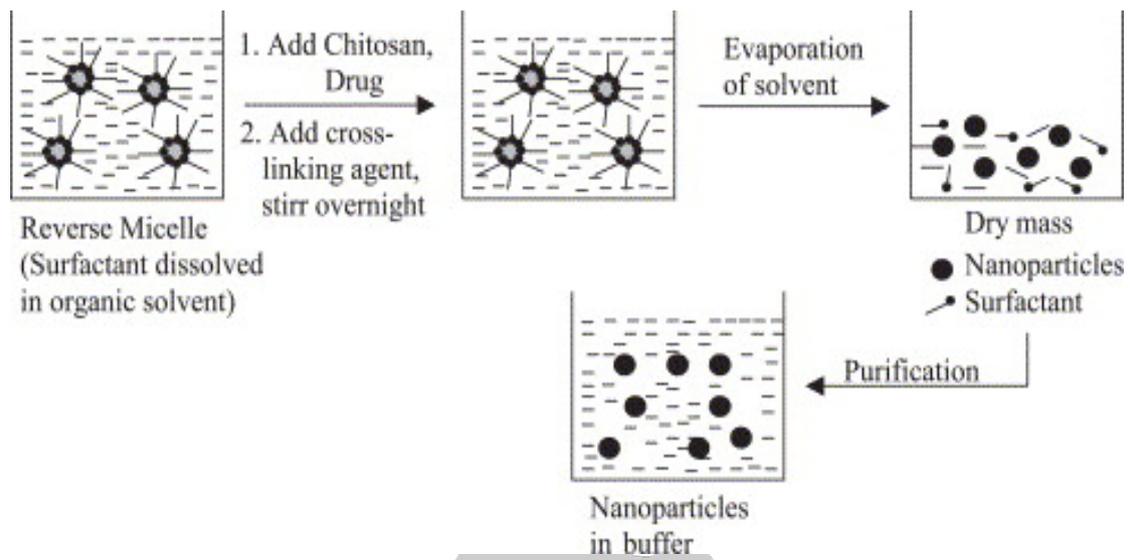
(Pooja *et al.*, 2016)



圖十八、噴霧乾燥法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖。

Fig. 18. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by spray drying method.

(Agnihotri *et al.*, 2004)



圖十九、逆微胞法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖。

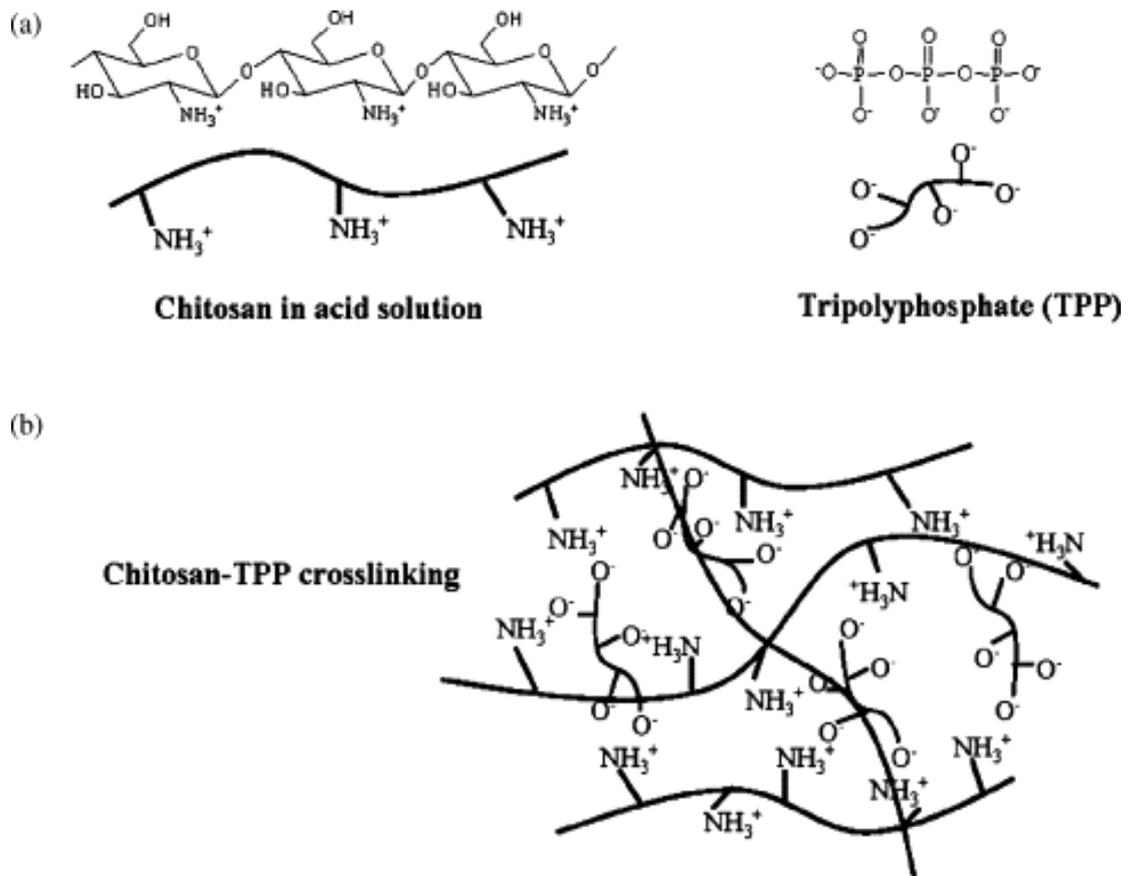
Fig. 19. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by reverse micellar method.

(Agnihotri *et al.*, 2004)

(六) 離子交聯法製備幾丁聚醣奈米顆粒之機制

幾丁聚醣溶解於酸性溶液，當 pH 值小於其 pKa (pH 6.3) 時，其結構上 C-2 位置上之胺基(NH₂)會轉變為 NH₃⁺的形式(圖二十 a)；三聚磷酸鈉為三個磷酸組合而成的化合物，帶有多種負電基團(P₃O₁₀⁵⁻、HP₃O₁₀⁴⁻及 OH⁻)。將三聚磷酸鈉溶於水中，使其磷酸根形成帶五個負電之陰離子基團，再將其陰離子基團溶液緩緩加入至幾丁聚醣溶液，與陽離子基團作用，此時 P₃O₁₀⁵⁻、HP₃O₁₀⁴⁻及 OH⁻與 NH₃⁺產生離子交聯，並伴隨氫鍵與親疏水交互作用，形成穩定的奈米顆粒(圖二十 b)。此作用力大小會受到幾丁聚醣之濃度、分子量、pH 值和三聚磷酸鈉之濃度的不同，而影響形成之奈米顆粒粒徑大小、表面電位、包覆率及安定性等特性，因此在製備奈米顆粒時需考慮以上因素所造成之影響(Kawashima, 1985)。

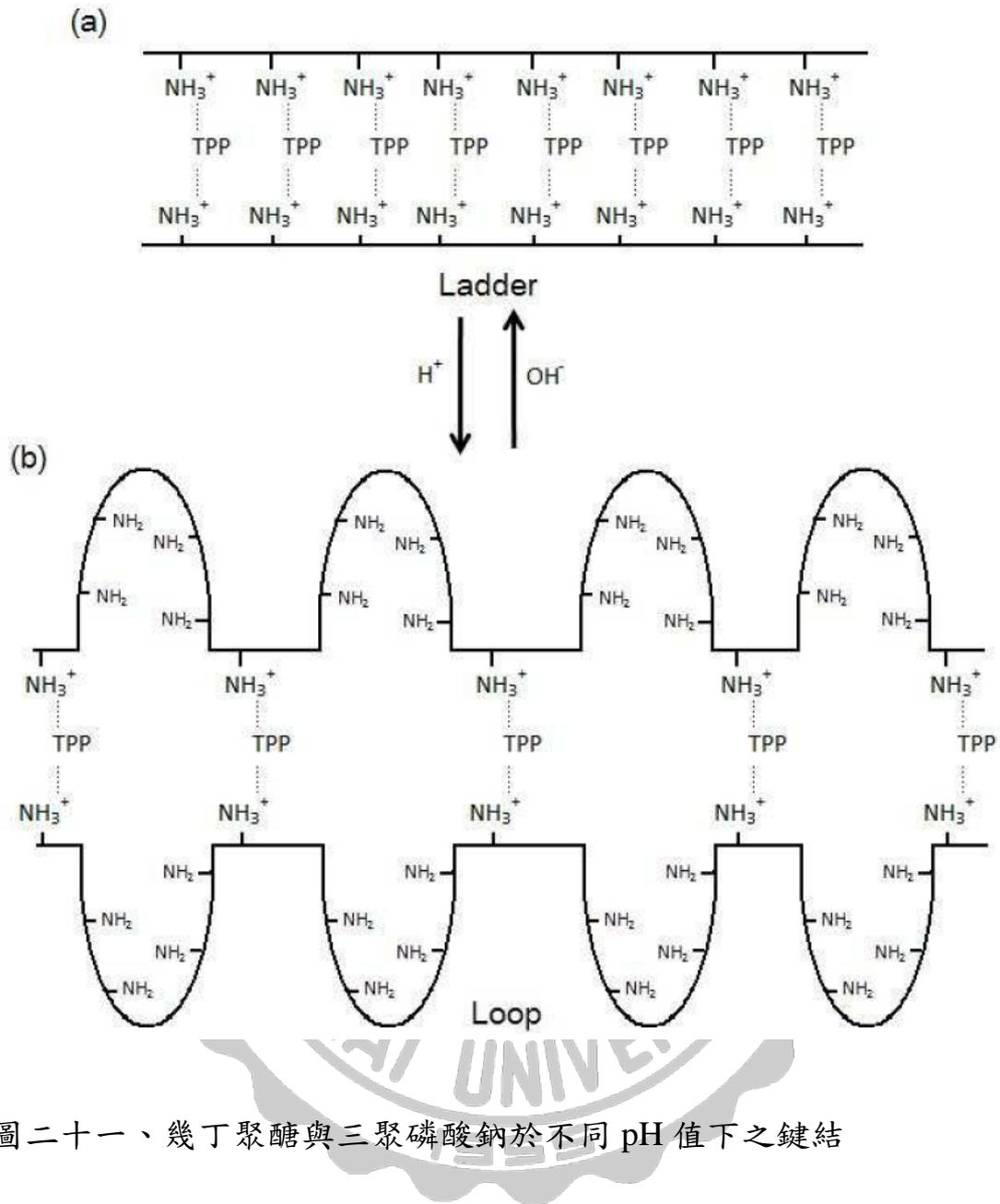
在不同 pH 值下，幾丁聚醣與三聚磷酸鈉皆有著不同的形態變化(圖二十一)。當幾丁聚醣於 pH 值小於 4.5 時因帶有較多的 NH₃⁺，導致分子之間受到靜電排斥作用，使幾丁聚醣結構呈現長條狀，此時與三聚磷酸鈉進行離子交聯時，其結構會形成梯形的狀態(Ladder)；然而當幾丁聚醣之 pH 值大於 4.5 時，NH₃⁺減少造成分子間靜電排斥作用變小，使幾丁聚醣結構呈現捲曲狀，與三聚磷酸鈉作用後呈環狀結構(Loop)，此環狀結構是較為安定的。而幾丁聚醣溶液之 pH 值在



圖二十、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉之離子交聯反應。

Fig. 20. (a) Molecular structure of chitosan in acid solution and that of tripolyphosphate (TPP). (b) Ionic crosslinking between chitosan and TPP.

(Hsieh *et al.*, 2008)



圖二十一、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉於不同 pH 值下之鍵結
型態。

Fig. 21. Ladder-loop transition of chitosan-TPP complex structures:

(a) ladder type; (b) loop type.

(Mi *et al.*, 1999)

接近其 pKa (pH 6.3) 時，其結構上之 NH_3^+ 又會轉變成 NH_2 的形式，因此在製備奈米顆粒時將幾丁聚醣溶液之 pH 值調整在 4.5 至 6.3 之間較為理想。另一方面，三聚磷酸鈉溶液在 pH 值為 3.0 時，負電荷僅有 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ ，上升至 pH 5.0 時，負電荷則有 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 及 $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ 兩種，而將其 pH 值調整至 9.0 時，負電荷基團變成 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 、 $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ 及 OH^- ，故為了使三聚磷酸鈉溶液帶有較多陰離子，會將其 pH 值調整至 9.0。

吳(2008)研究利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉，包覆牛血清蛋白及舞菇多醣分別製備奈米顆粒，探討幾丁聚醣之分子量、pH 值，CS/TPP 重量比，牛血清蛋白及舞菇多醣之濃度對於包覆率及粒徑大小之影響。結果發現幾丁聚醣 pH 值為 6.0 時能有較高之包覆率，牛血清蛋白為 7 mg/mL 時在與不同分子量之幾丁聚醣作用下皆有較高之包覆率，而隨著幾丁聚醣分子量的增加，其包覆牛血清蛋白之奈米顆粒粒徑有變小的趨勢；舞菇多醣隨著濃度的增加，包覆率則呈現下降的趨勢，奈米顆粒之粒徑大小則隨著幾丁聚醣分子量的下降而變小。

楊(2008)研究利用不同分子量之幾丁聚醣與三聚磷酸鈉，包覆兒茶素製備奈米顆粒，結果發現以 pH 值為 4.7 之低分子量幾丁聚醣與 pH 9.0 之三聚磷酸鈉進行離子交聯，在 CS/TPP 重量比為 6/1 時，能夠得到較高包覆率且粒徑大小較小奈米顆粒，而在模擬胃液中有較佳之安定性。

孫(2010)研究利用幾丁聚醣包覆分離大豆蛋白質水解物製備成奈米顆粒，探討幾丁聚醣分子量、CS/TPP 重量比及分離大豆蛋白質水解物之濃度，對於包覆率、粒徑大小及表面電位。結果發現以低分子量幾丁聚醣、分離大豆蛋白質水解物濃度為 5 mg/mL 及 CS/TPP 重量比為 3/1 和 4/1 時，能夠有較高之包覆率及高表面電位；而固定樣品濃度在 5 mg/mL ，以高分子量幾丁聚醣及 CS/TPP 重量比為 3/1 所製備之奈米顆粒，於模擬胃腸液時有較佳之安定性。

林(2012)研究利用幾丁聚醣包覆槲皮素製備奈米顆粒，探討不同臭氧濃度 (0.55 及 6.3 g/m^3) 對於幾丁聚醣降解之情形，以及幾丁聚醣分子量、槲皮素濃度及 CS/TPP 重量比對於奈米顆粒之外觀及安定性之影響。結果發現以臭氧濃度為 6.3 g/m^3 降解幾丁聚醣之效率較佳，而以未降解之幾丁聚醣及 CS/TPP 重量比為 3/1 所製備之奈米顆粒，外觀呈現球型，且於模擬胃腸液之安定性較為良好。

洪(2014)研究利用幾丁聚醣包覆鈣及維生素 D_3 製備奈米顆粒，探討幾丁聚醣分子量及 CS/TPP 重量比對於包覆率、粒徑大小及表面電位之影響。結果顯示以低分子量幾丁聚醣及 CS/TPP 重量比為 6/1 時，可得到包覆率約為 70 % 以上，且粒徑大小屬於奈米等級，並帶有正表面電位之奈米顆粒，作用於模擬胃腸道時也能得到較佳之安定性。

鄭(2015)研究利用幾丁聚醣包覆茄紅素製備奈米顆粒，探討幾丁

聚醣分子量、茄紅素濃度及 CS/TPP 重量比對於奈米顆粒之影響。結果發現以中分子量幾丁聚醣及 CS/TPP 重量比為 3/1 時，得到約 50 % 的包覆率，外觀上呈現圓形球狀，經由熱處理及儲存試驗後，幾丁聚醣奈米顆粒可有效保護茄紅素，降低其受到溫度及氧化作用的影響，於模擬胃腸道時茄紅素之累積釋放率更不到 1 %，顯示其離子交聯網狀結構十分緊密。

陳(2016)研究利用幾丁聚醣包覆薑黃素製備奈米顆粒，探討薑黃素濃度、幾丁聚醣分子量及 CS/TPP 重量比對於奈米顆粒之影響。結果顯示以中分子量幾丁聚醣及 CS/TPP 重量比為 3/1 時，能製備出奈米等級之顆粒，表面電位也有正 30 mV 以上，此結果推測能助於奈米顆粒在腸道上的吸收情況，於模擬胃液時也能有效保護薑黃素，其累計釋放不到 10 %，表示奈米顆粒較為安定。

(七) 幾丁聚醣在藥物傳遞系統之應用

近年來，有越來越多的研究對於以生物聚合特性之材料，製備成奈米顆粒並應用於多種藥物以口服方式使用感興趣，因其為固體凝膠顆粒，能夠將藥物成分包埋於其中，而具有生物降解特性之奈米顆粒更能有效地控制藥物的釋放速率。幾丁聚醣為一種具有生物相容、生物降解，且帶有陽離子之天然聚合物，其已在藥物、基因、組織工程及食品科技等領域有著廣泛的研究。以下介紹幾丁聚醣對於藥物傳遞系統之應用：

1. 控制藥物釋放：

藥物在經過溶解之後，以擴散、侵蝕、膜控制或滲透等方式並無法持續地在體內釋放藥物，然而透過離子交聯的方式，例如以聚丙烯酸酯 (polyacrylates)、羧甲基纖維素鈉 (sodium carboxymethylcellulose) 或是藻酸鹽 (alginate) 等陰離子聚合物與陽離子聚合物作用時，可以達到藥物的控制釋放，幾丁聚醣即為不錯的陽離子材料。Bhise 等學者(2008)為了陰離子藥物萘普生 (naproxen)，設計一個能夠持續釋放藥物的系統，即以幾丁聚醣做為離子交聯的藥物載體。並且藉由離子交聯所形成的複合物，使其結構能夠更加穩定，即使在長時間內依舊持續地釋放藥物。Sun 等學者(2010)將幾丁聚醣與依諾肝素 (enoxaparin) 製備成奈

米顆粒，發現其結構穩定並且有效地提升藥物的攝取。

2. 黏膜黏附性

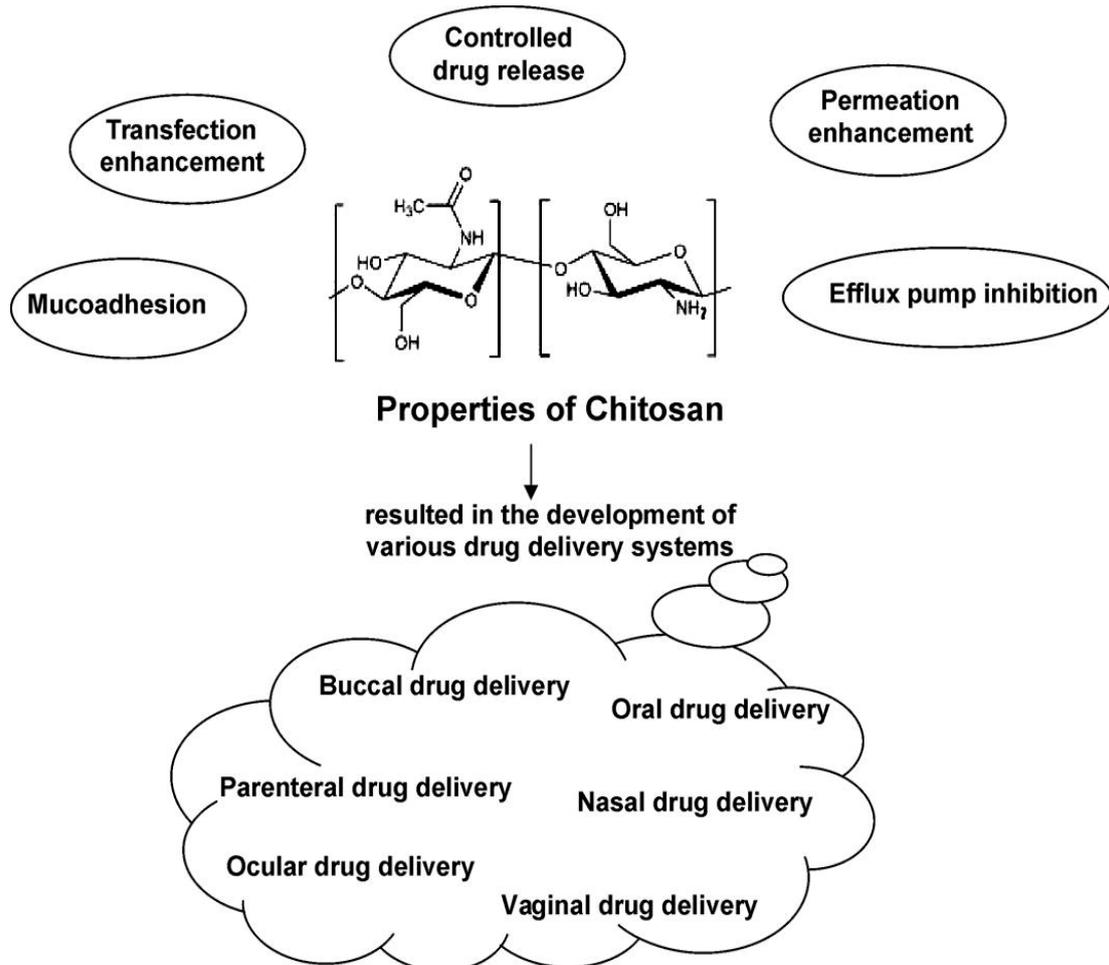
由於幾丁聚醣具有陽離子的特性，並且溶於水中帶有黏性，以上兩點能夠增加藥物在腸道之滯留時間。Lueßen 等學者(1996)研究大鼠口服幾丁聚醣與陰離子材料卡波姆(carbomer)結合包覆治療不孕症之藥物 buserelin，發現顯著地提高藥物的生物利用度(bioavailability)。Jintapattanakit 等學者(2009)更進一步發現將幾丁聚醣之胺基經過三甲基化(Tri-methylation)後，能夠增強其陽離子之特性，黏膜黏附性甚至增加到原本的 3 到 4 倍。

3. 增強滲透性

幾丁聚醣之去乙醯程度及分子量大小皆共同影響著滲透性，Schipper 等學者(1996)發現去乙醯程度高且高分子量之幾丁聚醣，其在上皮細胞之滲透性是相對較高的。Trapani 等學者(2010)表示幾丁聚醣奈米顆粒對於小胜肽(small peptides)在十二指腸(duodenum)的第一片段，其滲透效果是增強的，如果此時再加入環狀糊精(cyclodextrin)，其滲透的效果會擴大至整個十二指腸。另外也有學者表明幾丁聚醣之所以能夠增強藥物的滲透性，是因為其表面帶正電的緣故，能夠緊密的與上皮細胞結合，即緊密連結(Tight-junction)的影響所致(Schipper *et al.*, 1997)。

緊密連結為兩個細胞之細胞膜所連結，共同構成一個物質所無法任意穿透的屏障，其結構由奈米大小之跨膜蛋白(transmembrane protein)不斷重複排列形成鎖鏈狀網絡，最後嵌入兩個相鄰細胞膜中。其存在於上皮細胞和內皮細胞間，主要功能為封閉細胞間隙，以保護重要器官及組織避免受到異物侵入傷害，另外也有防止分子或離子穿過細胞間隙的功能，來維持滲透壓平衡。

幾丁聚醣對於藥物傳遞的方式也不僅止於以口服(Oral)的方式(圖二十二)，還有透過口腔(Buccal)、腸胃外的(Parenteral)、鼻內(Nasal)、眼部(Ocular)以及女性陰道(Vaginal)等方式傳遞藥物，由此可知幾丁聚醣為一良好材料，利用上述介紹之特性，使得藥物發揮其最大功效。



圖二十二、幾丁聚醣之特性對於多種藥物傳遞系統的發展。

Fig. 22. Properties of chitosan resulted in the development of various drug delivery systems.

(Bernkop-Schnürch and Dünnhaupt, 2012)

四、 柚皮素

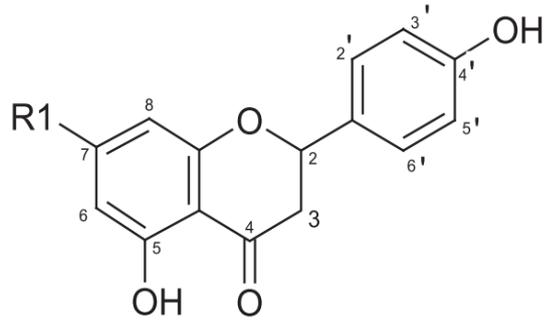
(一) 柚皮素(Naringenin)簡介

類黃酮為植物二級代謝產物(Secondary metabolites)，臨床研究指出具有抗氧化和抗微生物活性，包括抗真菌、抗病毒及抗細菌等效果(Yigit *et al.*, 2009)。目前已有超過一萬種的類黃酮被發現。

柚皮素(Naringenin; 4',5,7-trihydroxyflavone)為類黃酮化合物當中的黃烷酮(flavanones)，其分子式為 $C_{15}H_{12}O_5$ ，分子量為 272.257 g/mol，熔點介於 247-250 °C，可溶於乙醇、乙醚和苯，幾乎不溶於水。其結構由苯環所組成，並且在 R1 的位置(圖二十三)接上羥基，此為非糖體，也就是糖苷配基(aglycones)。另外，在 R1 位置接上不同的糖類則會有不同的衍生物(圖二十四)，即配糖類(glycosides)，包括櫻桃苷(Prunin)、柚皮苷(Naringin)以及芸香柚皮苷(Narirutin)。

葡萄柚、檸檬、橘子等柑橘類水果中含有高濃度的柚皮素，然而番茄及其製品中也含有低濃度的柚皮素(Erlund, 2004)，特別是番茄的果皮中含有高達 95 至 98 %的柚皮素查耳酮(naringenin chalcone)，在番茄醬的加工過程中可將其轉化為柚皮素(Krause and Galensa, 1992; Slimstad *et al.*, 2008)。

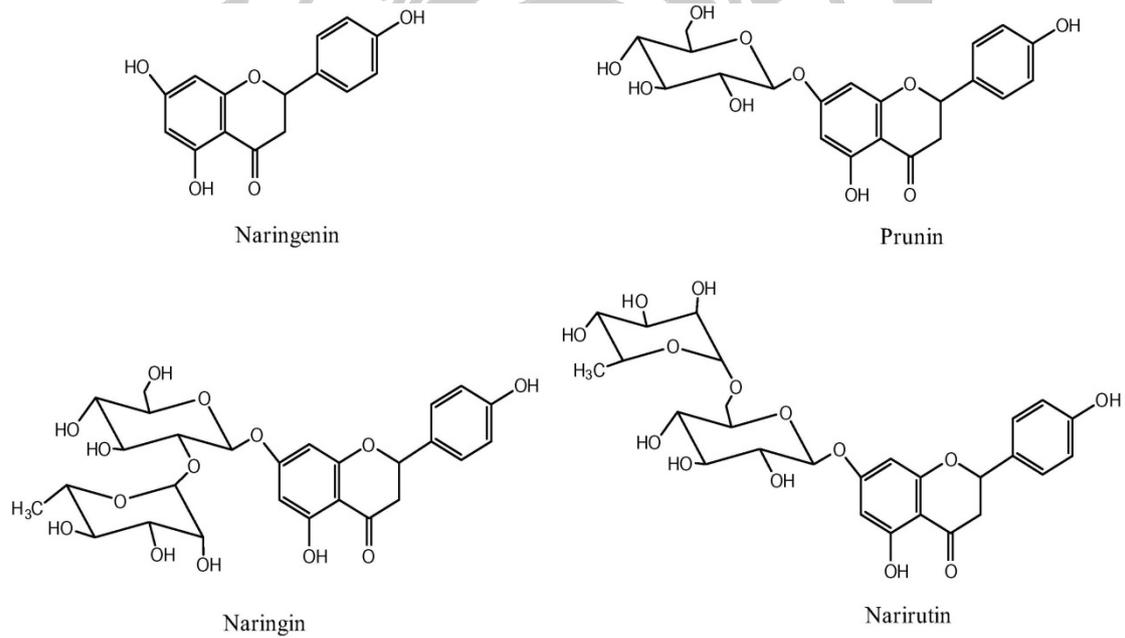
在自然界中，類黃酮化合物通常會以 glycoside，即芸香柚皮苷、柚皮苷或櫻桃苷的形式存在於柑橘類水果當中，其結構因與糖類結合



圖二十三、黃烷酮類化合物之化學結構。

Fig. 23. Chemical structures of flavanones.

(Erlund, 2004)



圖二十四、柚皮素及其衍生物之化學結構。

Fig. 24. Chemical structures of naringenin and its glycosylated derivatives (prunin, naringin, and narirutin).

(Jung *et al.*, 2017)

故帶有苦味，而苦味的來源為葡萄糖(glucose)，其中柚皮苷的苦味程度為櫻桃苷的 3 倍(Puri *et al.*, 1996)。

柚皮苷在經過複合型酵素:柚皮苷酶(Naringinase)的作用，將水解成較無味的柚皮素，過程如下: α -L-rhamnosidase 負責將柚皮苷水解成櫻桃苷和鼠李糖(rhamnose)，再由 β -D-glucosidase 將櫻桃苷水解即可得到柚皮素以及葡萄糖。

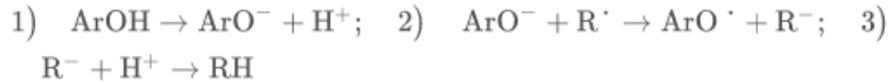
(二) 柚皮素之生理機能

柚皮苷與柚皮素具有相似的生理活性，然而有學者表示其生理活性主要與 aglycone 的部分有關，即柚皮素(Ribeiro *et al.*, 2008)，因此柚皮苷在經過柚皮苷酶的水解過後仍然保有其生理活性成分。

1. 抗氧化

柚皮素因結構與酚類(phenol)相似，同樣為多酚類化合物，因此有學者表示柚皮素能夠取代維生素 E(α -tocopherol)當作抗氧化劑使用(Van Acker *et al.*, 2000)。另外，也有學者研究發現當其存在於中性(pH 7)水溶液時，其結構上 A 環的第七號碳上的羥基會形成解離的狀態(pKa = 6.84)，而另外兩個羥基在此情況下則具有清除 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基的能力，提供氫原子來還原 DPPH 自由基(Nahmias *et al.*, 2008；Farajtabar *et al.*, 2013)。

而在 2014 年 Jabbari 等人整理柚皮素清除自由基的三個機制 (Torres *et al.*, 2007 ; Wright *et al.*, 2001 ; Butkovi *et al.*, 2004)

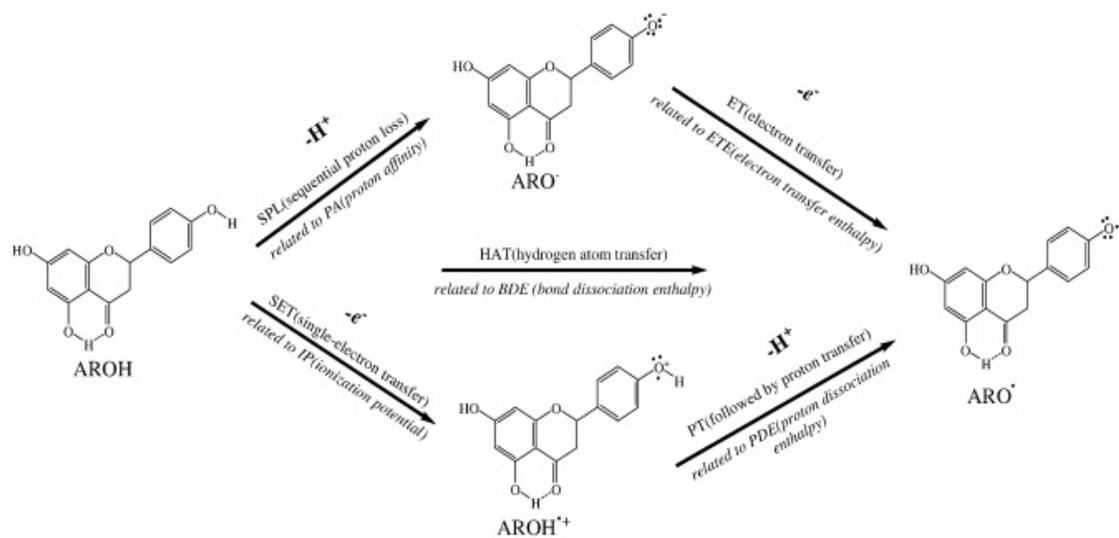


以及相關之示意圖(圖二十五)。

2. 降血脂

Apolipoprotein B(ApoB)為低密度脂蛋白(Low Density Lipoprotein , LDL)中的主要結構蛋白，在脂肪代謝及運送中扮演重要的腳色，負責運送膽固醇及三酸甘油脂。當人體血液中 Apo B 濃度上升會增加冠狀動脈硬化的機率，因此也有人將 Apo B 代表造成血管硬化的指標。

先前有學者利用兔子餵食含有酪蛋白(Casein)的飼料並且將柳橙汁或葡萄柚汁取代飲用水，實驗證實可降低其血清中低密度脂蛋白膽固醇及肝臟膽固醇酯(hepatic cholesteryl ester)的濃度，因此柚皮素能夠透過抑制膽固醇酯的合成，來減少 Hep G2 細胞分泌 Apo B，進而降低血管硬化的風險(Borradaile *et al.*, 1999 ; Kurowska *et al.*, 2000)。



圖二十五、柚皮素透過 HAT、SET-PT 及 SPLET 等三種機制作為多酚類抗氧化劑之示意圖。

Fig. 25. Depicts simplified presentation of HAT, SET-PT and SPLET mechanisms for naringenin as a polyphenolic antioxidant (ArOH).

(Jabbari *et al.*, 2014)

3. 抗發炎反應

發炎反應是藉由發炎細胞與其傳遞物(mediators)在心臟及腦組織缺血時所累積。當心臟及腦組織開始缺血時，發炎細胞如巨噬細胞和微膠細胞被活化並累積在心臟及腦組織，導致進一步的發炎性損害(Denker *et al.*, 2007)。在發炎的過程中，誘導型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和環氧合酶(cyclooxygenase-2, COX-2)負責增加發炎傳遞物的產生，如過量的一氧化氮及前列腺素(Wang *et al.*, 2007)。

過去已有學者研究發現柚皮素能夠抑制巨噬細胞和微膠細胞的活化，藉由減少脂多醣(lipopolysaccharide)誘導的亞硝酸鹽產物與iNOS和COX-2的表現(Bodet *et al.*, 2008; Vafeiadou *et al.*, 2009)。在動物實驗的研究中已表明對於iNOS和COX-2的抑制，能夠減少心臟及腦組織在急性缺血後所造成的組織損害(Ribeiro *et al.*, 2009)。

(三) 柚皮素之安定性

學者研究發現，類黃酮羥基的數量對於其安定性是具有影響，當數量較多時造成其降解的機率是逐漸增加的。而醣類及甲氧基則能夠減少類黃酮在萃取時所造成的降解(Biesaga, 2011)。柚皮素之結構中含有三個羥基，其結構上也無醣類或甲氧基的保護，再與柚皮苷相較之下，柚皮素是較容易受到降解的影響。

(四) 柚皮素之生物利用度

Hollman 等人(1999)研究發現類黃酮之 glycosides 的親水性與在人體中吸收效果皆優於 aglycones，即柚皮素除了親水性較差之外，在人體中的吸收情況也較弱。Manach 等人(2004)研究發現柚皮素在食用進入到人體過後，容易受到體內酵素的影響，使其結構發生降解，因此導致柚皮素快速地被排出體外。

黃烷酮類化合物在人體中代謝的情況如圖二十六，首先在口腔中提供味道，進入小腸後由腸內的 β -glucosidases 水解 glycosides 來形成 aglycones，接著進入大腸由細菌的酵素水解剩餘的 glycosides，並更進一步地分解代謝 aglycones，使其形成酚酸(phenolic acids)，然後進入到肝臟進行更進一步的代謝，將 aglycones 及 phenolic acids 轉換為各自的代謝物，並送往其相對能夠利用的位置，最後未能利用的 aglycones 及其代謝物則由尿液排出。

Khan 等人(2014)更進一步研究黃烷酮於腸道的代謝情況，當黃烷酮進入到小腸時， β -glucosidases 主要是水解 mono-glycosides 形成 aglycones；接著進入到大腸時，腸道的菌叢如 rhamnosidases 或 rutinoidases 則水解 di-glycosides 形成 aglycones(圖二十七)。

Felgines 等人(2000)研究大鼠餵食柚皮素與柚皮苷，比較兩者在經過消化道中酵素的作用後，其尿液中柚皮素之含量。結果發現餵食

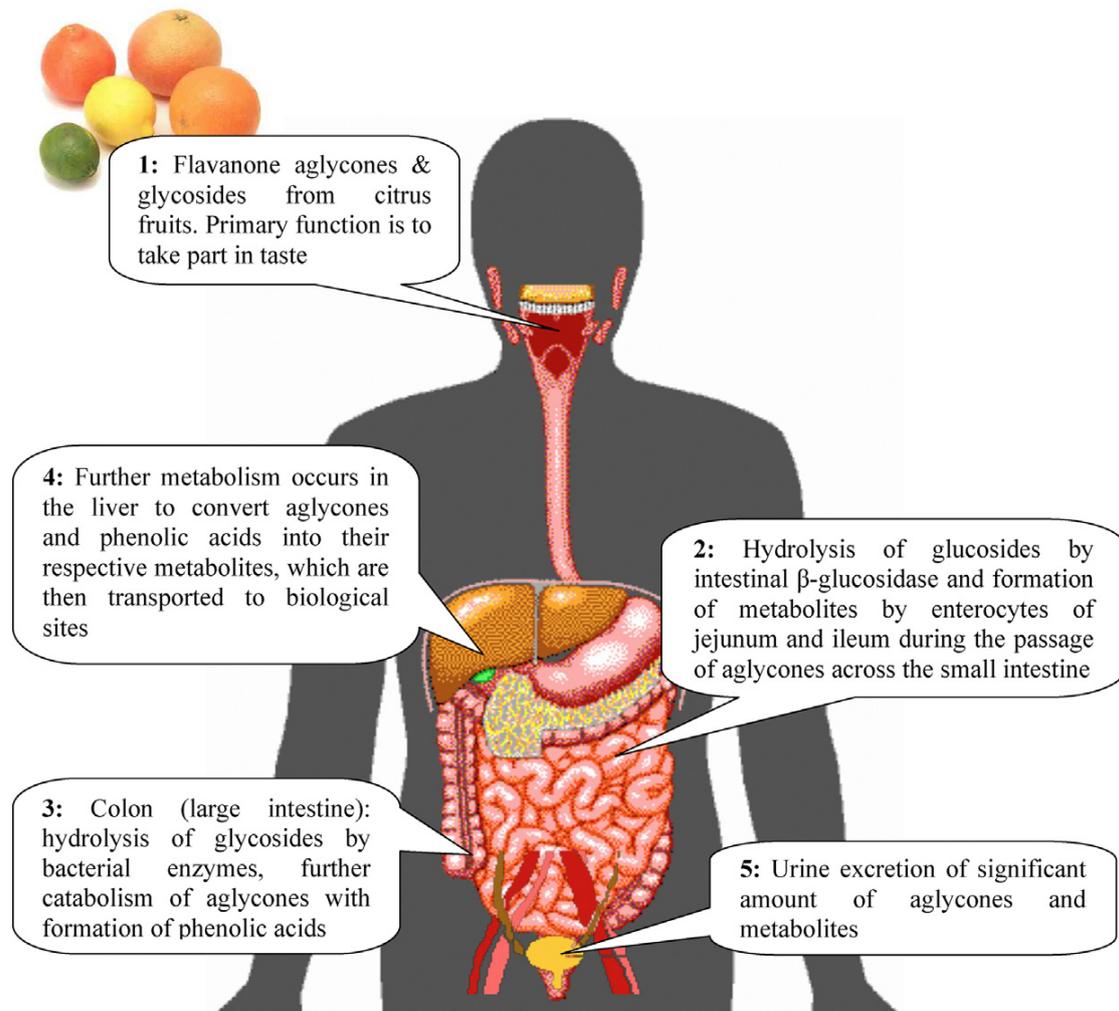
柚皮素之尿液排出量為另一組的兩倍，即柚皮素的吸收效果較柚皮苷來的差。

Erlund 等人(2001)研究人體飲用葡萄柚汁(8 mL/kg of body weight)測其血液中柚皮素的濃度，發現血液中柚皮素濃度為 $6.0 \pm 5.4 \mu\text{mol/L}$ ，換算下來柚皮素最高濃度僅有約 $3.1 \mu\text{g/mL}$ 。

Manach 等人(2003)研究人體飲用 1 L 橘子汁，其含有 96.4 mg 的 narirutin，24 小時過後測得其血液中含有柚皮素最高濃度為 $0.20 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$ ，即約為 $0.0544 \mu\text{g/mL}$ 。而其尿液中含有之柚皮素約為 $7.87 \pm 1.69\%$ ，作者還表示柚皮素之尿液排泄量與攝取劑量無顯著關係，換句話說，無論攝取多少量的柚皮素，在人體中皆有固定比例的損失量。

Kanaze 等人(2007)透過六位自願者，每人服用 135 mg 的柚皮素，在 3.5 個小時過後測其血液中柚皮素的濃度，結果發現柚皮素最大濃度為 $7.4 \mu\text{mol/L}$ ，換算得到柚皮素最大濃度僅有 $2 \mu\text{g/mL}$ 。

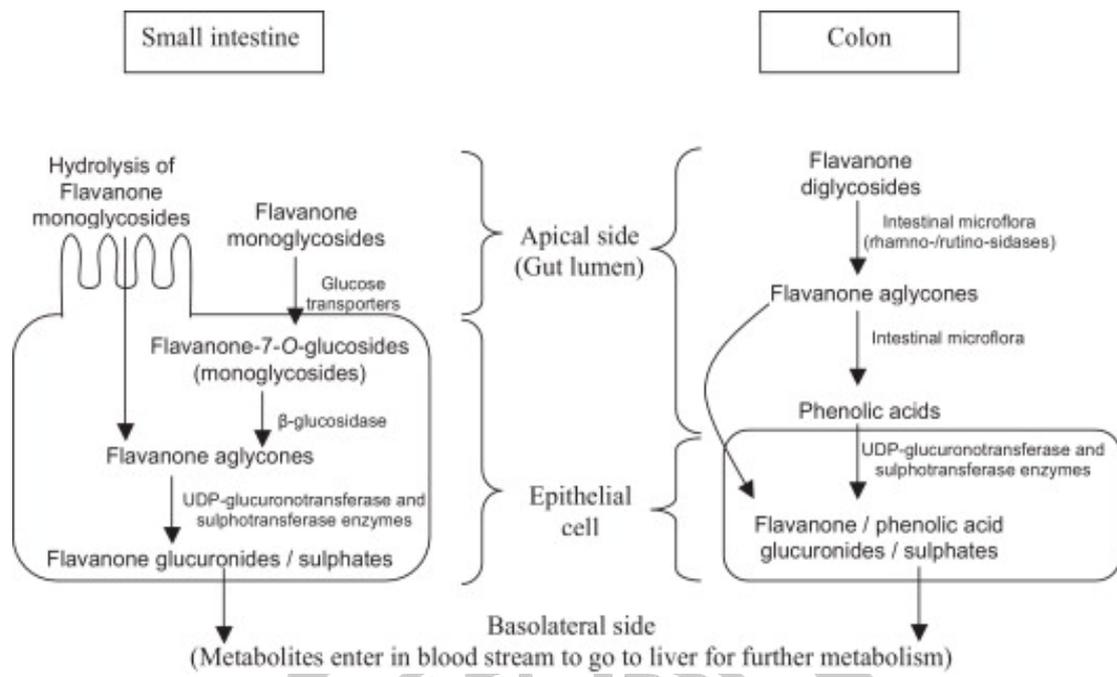
上述結果顯示柚皮素在人體中的吸收情況，即便大量食用含有柚皮素之食物，仍然有固定比例的柚皮素會被排出體外，而真正吸收進入血液的含量又是少之又少，顯示出柚皮素較低的生物利用度，有學者研究指出柚皮素之生物利用率約為 5.8% (Kanaze *et al.*, 2007)。



圖二十六、黃烷酮類化合物在人體中之代謝情形。

Fig. 26. Metabolic fate of flavanones.

(Khan *et al.*, 2014)



圖二十七、黃烷酮於小腸及大腸中之代謝示意圖。

Fig. 27. Presentation of flavanone metabolism in small and large intestine.

(Khan *et al.*, 2014)

參、材料與方法

一、實驗材料與樣品

1. Acetic acid: 聯工化學廠股份有限公司，台灣。
2. Acetonitrile: J.T.Baker，美國。
3. Chitin: 高雄應化公司，台灣。
4. Ethanol absolute: 景明化工，台灣。
5. GPC standard(Pullulan): Shodex，日本。
6. Hydrochloric acid: Riedel-de Haën，美國。
7. Methanol alcohol,anhydrous: MACRON，美國。
8. Naringenin: Sigma-Aldrich，美國。
9. Oxygen: 昞暉氣體有限公司，台灣。
10. Pancreatin: Sigma-Aldrich，美國。
11. Pepsin(≥ 250 units/mg): Sigma-Aldrich，美國。
12. Potassium dihydrogen phosphate: 和光純藥，日本。
13. Potassium polyvinyl solution(P.V.S.K): 和光純藥，日本。
14. Sodium acetate: Ferak Berlin GmbH，德國。
15. Sodium chloride: 聯工化學股份有限公司，台灣。
16. Sodium hydroxide: 聯工化學廠股份有限公司，台灣。

17. Sodium tripolyphosphate: 和光純藥，日本。

18. Toluidine blue: Sigma-Aldrich，美國。

二、 實驗儀器

1. pH meter: SP701 型，Suntex，台灣。

2. 磨粉機: 1hp 型，群策電機工業股份有限公司，台灣。

3. 分析篩網: Tyler 標準規格篩網，Endecotts，英國。

4. 電磁式過篩器: OCTAGON DIGITAL 2000 型，Endecotts，英國。

5. 雷射奈米粒徑及界面電位分析儀: Zetasizer Nano 3000HS 型，
Malvern Instrument，英國。

6. 高效率套組式臭氧機: OW-K1/O 型，易暘儀器，台灣。

7. 高速低溫離心機: CR22GII 型，Hitachi，日本。

8. 高效率液相層析儀:

(a) L-6200A pump，Hitachi，日本。

(b) RI-Detector8110，Bischoff，德國。

(c) D-2500 chromato-integrator 積分儀，Hitachi，日本。

(d) Column: PolySep GFC-P 4000，日本。

9. 高效率液相層析儀:

(a) L-6200A pump，Hitachi，日本。

- (b) L-4200 UV/VIS Detector, Hitachi, 日本。
- (c) D-2500 chromato-integrator 積分儀, Hitachi, 日本。
- (d) Column: Inertsil ODS-2, GL Sciences Inc, 日本。
10. 烘箱(多用途): 500 型, MEMMERT, 德國。
11. 真空冷凍乾燥機: FD-5N 型, EYELA, 日本。
12. 超音波細胞打碎機: Sonifier 250 型, Branson, 日本。
13. 超音波震盪器: S100 型, ELMA, 德國。
14. 掃描式電子顯微鏡: JSM-6500F 型, JEOL, 日本。
15. 微量超高速離心機: CS120GX 型, Hitachi, 日本。
16. 往復式恆溫震盪器: BT-350 型, Yih Der, 台灣。

三、 樣品製備

(一) 幾丁聚醣製備

取片狀幾丁質，將其磨成粉末，經篩網反覆過篩，取得 40 至 60 *mesh* 之幾丁質粉末備用。隨後參考沈(2004)方法，將幾丁質粉末倒入 57% (w/v) NaOH 溶液於 102 ± 2 °C 加熱攪拌處理 2 小時，而後將幾丁聚醣以蒸餾水沖洗數次至 pH 值達到中性，並置入烘箱進行乾燥(80 °C, 8 小時)。利用 Toei 及 Kohara(1976)方法測定幾丁聚醣之去乙酰程度，並選擇去乙酰程度者大於 85 % 之幾丁聚醣作為後續實驗之樣品。

(二) 不同分子量幾丁聚醣之製備

參考 Yue 等人(2008)及林(2012)利用臭氧降解幾丁聚醣作法。

以 1 %醋酸溶液(v/v)配置幾丁聚醣溶液(w/v)，經過濾膜去除顆粒較大之雜質及鹽類，接著取 100 mL 之幾丁聚醣溶液置於 50 至 55 °C 水浴中，並以高效率套組式臭氧機通入臭氧，其濃度為 6.3 g/m³，氧化降解處理至不同時間(0 至 60 min)。處理完之幾丁聚醣溶液以 NaOH 溶液調整 pH 值至 7，使得幾丁聚醣析出(幾丁聚醣之 pKa 值為 6.3)，經由離心(22,200 x g，20 °C，30 min)並以去離子水反覆水洗數次，去除鹽類或者多餘的鹼，最後以冷凍乾燥備用。接著利用膠體層析管柱(Gel Permeation Chromatography，GPC)測定不同時間降解處理之幾丁聚醣分子量，篩選出未經臭氧降解處理者 767kDa (Original Mw)、596 kDa (High Mw)、265 kDa (Medium Mw)以及 50 kDa (Low Mw)作為後續試驗之樣品。

(三) 柚皮素溶液之製備

取 1 mg 之柚皮素粉末，分別加入不同溶劑(去離子水、冰醋酸、1 %冰醋酸、甲醇及絕對酒精)以及不同比例測試之。選擇適當溶劑後，測試不同溶劑與幾丁聚醣溶液之比例並觀察其溶解性，以利尋找奈米顆粒之製備條件。

四、 實驗方法

(一) 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒之製備

參考吳(2008)及楊(2008)之方法，將不同分子量之幾丁聚醣(CS)溶於 1 %醋酸溶液(v/v)中，濃度為 0.2 % (w/v)並調整 pH 值至 4.7；不同濃度之三聚磷酸鈉(TPP)溶於去離子水中，調整 pH 值至 9.0；將柚皮素(Naringenin)溶於絕對酒精中。樣品添加次序為先將 Naringenin 溶液加入到 CS 溶液攪拌均勻，再將 TPP 溶液緩緩滴入混合液中攪拌。此試驗目的為探討 Naringenin 濃度、CS 之分子量及 CS/TPP 重量比對 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒之柚皮素包覆率(Encapsulation efficiency)、裝載率(Load capacity)，奈米顆粒產率(Process yield)、粒徑大小(Particle size)及表面電位(Zeta potential)之影響。

(註:製備過程中皆避光，目的為防止柚皮素因光照受到影響)，其細節如下:

1. 柚皮素濃度之影響

將 5 mL 不同濃度(400、800、1200、1600 及 2000 $\mu\text{g/mL}$)之 Naringenin 溶於絕對酒精中，接著與 5 mL CS 溶液(Original Mw, 0.2 % (w/v), pH 4.7)兩者混合攪拌 10 min，再將 2 mL TPP 溶液(1.667 mg/mL, pH 9.0)緩慢逐滴加入到 CS 與 Naringenin 之混合溶液中並攪拌 30 min，使得反應液中 CS/TPP 重量比為 3/1，以離心的方式(32,000

x g, 20 °C, 30 min)將上清液測定 Naringenin 含量並計算包覆率及裝載率，沉澱物的部分(CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒)則測定其產率、粒徑大小及表面電位。

2. 幾丁聚醣分子量之影響

將 5 mL Naringenin 溶液(conc. 1600 µg/mL)與 5 mL 不同分子量之 CS 溶液(Original Mw、High Mw、Medium Mw 及 Low Mw, 0.2 %(w/v), pH 4.7)兩者混合攪拌 10 min, 再將 2 mL TPP 溶液(1.667 mg/mL, pH 9.0)緩慢逐滴加入到 CS 與 Naringenin 之混合溶液中並攪拌 30 min, 使得溶液中 CS/TPP 重量比為 3/1, 以離心的方式(32,000 x g, 20 °C, 30 min)將上清液測定 Naringenin 含量並計算包覆率及裝載率, 沉澱物的部分(CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒)則測定其產率、粒徑大小及表面電位。

3. 幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比之影響

將 5 mL Naringenin 溶液(conc. 1600 µg/mL)與 5 mL CS 溶液(High Mw, 0.2 %(w/v), pH 4.7)兩者混合攪拌 10 min, 再將 2 mL 不同濃度之 TPP 溶液(1.667、1.25、1.00 及 0.84 mg/mL, pH 9.0)緩慢逐滴加入到 CS 與 Naringenin 之混合溶液中並攪拌 30 min, 使得溶液中 CS/TPP 重量比分別為 3/1、4/1、5/1 及 6/1, 以離心的方式(32,000 x g, 20 °C, 30 min)將上清液測定 Naringenin 含量並計算包覆率及裝載率, 沉澱

物的部分(CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒)則測定其產率、粒徑大小及表面電位。

(二) 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒之安定性試驗

參考 USP(美國藥典, 2004)方法配置 simulated gastric fluid(將 2 g NaCl、7 mL 37 % HCl、3.2 g pepsin(≥ 250 units/mg solid)與 1000 mL double-distilled water 混合, pH 1.2)及 simulated intestinal fluid(將 6.8 g KH_2PO_4 溶於 250 mL double-distilled water, 加入 190 mL 0.2 N NaOH 及 10 g pancreatin 混合後, 以 0.2 N NaOH 調整 pH 值至 7.4, 再以 double-distilled water 定量至 1000 mL)。

製備奈米顆粒, 將 5 mL Naringenin 溶液(conc. 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)與 5 mL CS 溶液(High Mw, 0.2 % (w/v), pH 4.7)混合攪拌 10 min, 再與 2 mL TPP 溶液(1.25 mg/mL, pH 9.0)緩慢逐滴加入至 CS 與 Naringenin 之混合溶液中攪拌 30 min, 使得溶液中 CS/TPP 重量比為 4/1, 以離心機(32,000 x g, 20 °C, 30 min), 得到沉澱物即為 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒。參考范(2003)及美國藥典委員會官方方法(2004), 將此奈米顆粒置於 6 mL simulated gastric fluid 中, 以恆溫水浴槽 37 °C 震盪培養(60 rpm), 於 0.5、1、1.5 及 2 小時取樣 1 mL 之模擬液(隨即補回)測量其中 Naringenin 濃度。而後將此含有奈米顆粒之模擬液調整 pH 至 7.4, 並加入 3 mL simulated intestinal fluid 繼續以恆溫水浴槽 37

°C震盪培養(60 rpm)，於3、4、5、6、7及8小時取樣1 mL之模擬液(隨即補回)測量其中 Naringenin 濃度。最後利用公式及測量之濃度結果計算 Naringenin 之累積釋放率，其計算公式如下：

$$W_n = C_n \times V + V_s \times \sum [C_{(a-1)}]$$

$$W_n / W \times 100 = \text{時間累積 Naringenin 釋放率}(\%)$$

W_n : 時間累積 Naringenin 總含量

W : CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒中 Naringenin 總含量

n, a : 取樣次數

C : 測定 Naringenin 之濃度

V : 總溶液體積

V_s : 採取樣品體積

五、 分析方法

(一) 幾丁聚醣去乙醯度之測定

參考 Toei 與 Kohara(1976)之方法，精秤 0.02 g 幾丁聚醣標準品及樣品並記錄其重量。將標準品及樣品溶於 10 mL 之 0.1 M 醋酸溶液，置於室溫下攪拌 1 小時待其溶解，再以蒸餾水定量至 50 mL，攪拌 30 min。取 5 mL 標準品及樣品溶液於三角錐形瓶中，加入 0.05 mL toluidine blue 指示劑，以 N / 400 potassium polyvinyl sulfate solution (P.V.S.K) 進行滴定，滴定至溶液由藍色轉變成紅紫色時，即為滴定終

點，利用標準品滴定量與重量和樣品之重量及滴定量做計算，即可得到去乙醯度。

(二) 降解之幾丁聚醣樣品分子量測定

參考吳(2008)之方法，精秤 5 mg pullulan 標準品及幾丁聚醣樣品，分別溶於 5 mL 之去離子水及 1 % 醋酸水溶液中，以 0.45 μ m filter 進行過濾。以 Gel Permeation Chromatography(GPC)方法分析幾丁聚醣樣品之分子量。先以 pullulan 標準品建立檢量線，pullulan 標準品分子量分別為 6000、10000、21700、48800、113000、210000、366000 及 805000 Dalton。測定樣品遲滯時間(retention time)並與檢量線互相對照，即可推算幾丁聚醣樣品之平均分子量。

系統：L-6200A intelligent pump、D-2500 chromato-integrator 積分儀
(Hitachi，日本)

偵測器：RI-Detector 8110 (Bischoff，德國)

管柱：PolySep GFC-P 4000 (Waters；7.8 mm * 300 mm)

移動相：0.2 M 醋酸 / 0.1 M 醋酸鈉

流速：1 mL / min

溫度：45 °C

樣品濃度：1 mg / mL

注射量：20 μ L

偵測時間：15 min

(三) 柚皮素包覆率、裝載率及奈米顆粒產率之測定

製備 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒，將 CS-TPP-Naringenin 反應液離心，取上清液，以高效能液相層析法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)測定 Naringenin 含量，並對照 Naringenin 標準品建立之檢量線，計算其包覆率(Encapsulation efficiency)。

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{Total Naringenin amount} - \text{supernatant Naringenin amount}}{\text{Total Naringenin amount}} \times 100$$

另外離心所得之沉澱物即 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒，利用烘箱烘乾至恆重後秤重，可得到 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒之乾重，計算其裝載率(Loading capacity)。

$$\text{Loading capacity (\%)} = \frac{\text{Total Naringenin amount} - \text{supernatant Naringenin amount}}{\text{Nanoparticle weight (dry weight)}} \times 100$$

產率(Process yield)則是以 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒之乾重，除以所添加之固形物總重量，即 CS、TPP 及 Naringenin 起始添加之重量(w/w)。

$$\text{Process yield (\%)} = \frac{\text{Nanoparticle weight (dry weight)}}{\text{Total solid weight (dry weight)}} \times 100$$

(四) 柚皮素定量方式

參考 Ishii、Furuta 及 Kasuya(1996)利用高效能液相層析法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)測定柚皮素之含量。

其原理為利用移動相通過固定相時，樣品中成分與固定相之間分離係數的不同，親和性小的物質較快被沖提出來，親和性大的則反之，使其在管柱之遲滯時間不同進而達到分離之目的，再以積分面積與濃度之關係，進行定量分析。

• HPLC 測定條件：

主機體：L-6200A intelligent pump (Hitachi，日本)

積分儀：D-2500 chromato-integrator (Hitachi，日本)

偵測器：L-4200 UV/VIS Detector (Hitachi，日本)

管柱：ODS-2 column 250*4.6 mm (GL Sciences，日本)

移動相：Acetonitrile-0.1 M Ammonium acetate solution-Glacial acetic acid (30:69:1, v/v; pH 4.9)

偵測波長：292 nm

流速：1.0 mL/min

注射量：20 μ L

偵測時間：25 min

• HPLC 測定方法:

首先配製柚皮素標準溶液(Sigma-Aldrich, 美國), 濃度為 6.25、12.5、25、50、75、100、150 及 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 建立柚皮素之檢量線, 樣品與標準品皆以 0.45 μm filter 進行過濾, 利用 HPLC 分析柚皮素之含量。測定樣品之遲滯時間(retention time)與檢量線互相對照, 即可計算出樣品中柚皮素之濃度, 推算其柚皮素之含量。另外, 在進行 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒之安定性試驗時, 胃腸道模擬試驗的部分, 奈米顆粒經由離心後, 取 1 mL 上清液並加入 4mL 絕對酒精回溶, 以標準品溶液積分面積與樣品溶液積分面積做比較, 計算樣品濃度並推算其累積釋放率。

(五) 奈米顆粒粒徑及表面電位之測定

使用雷射光散射法粒徑及界面電位分析儀(Zetasizer 3000HS, Malvern, UK)測定奈米顆粒粒徑大小及表面電位。製備奈米顆粒之實驗容器務必清洗乾淨, 使用之溶液皆以 0.45 μm 過濾膜過濾始可進行實驗。將 CS-TPP 及 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒懸浮於適量之去離子水中, 以超音波細胞粉碎機將聚集之顆粒震碎(40 % duty cycle, 20 secs), 靜置 5 min 後, 取上層溶液, 以動態光散射法(dynamic light scattering method)測定顆粒之粒徑大小。另外, 將 CS-TPP 及

CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒以去離子水稀釋至適當濃度，測定其表面電荷。所有樣品皆測定三次，求其平均值(mean \pm SD)。

(六) 掃描式電子顯微鏡觀察

CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒以去離子水多次反覆水洗離心，去除樣品中之鹽類，而後將顆粒懸浮於 1 mL 去離子水中，利用超音波細胞粉碎機分散樣品後，將樣品滴在 4 mm \times 4 mm 經裁切後之蓋玻片上，避光靜置於室溫風乾 24 小時，利用離子附膜機在樣品鍍上一層白金，再以熱場掃描式電子顯微鏡觀察幾丁聚醣顆粒之表面型態。

(七) 統計分析

本實驗數據皆以平均 \pm 標準誤差(means \pm SD)表示。所有組別之試驗數據皆以 SAS 9.4 軟體進行全隨機設計(completely randomized design)、變異分析(ANOVA)及 Duncan's new multiple Range test 分析，當機率值小於 0.05 ($p < 0.05$)表示各組於統計上有顯著性差異。並使用 SigmaPlot 10.0 軟體進行作圖。

肆、結果與討論

一、樣品製備

(一) 幾丁聚醣製備

參考沈(2004)之方法，將幾丁質粉末經由高溫($102 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)及強鹼(57 % (w/v) NaOH)處理 2 小時，進行去乙醯作用，目的為使其結構上之乙醯基(acetyl group)被去除，讓胺基(amino group)裸露出來。

過去許多研究指出幾丁聚醣之去乙醯程度是決定其應用性之重要因素，影響的部分包括溶解度、電荷及黏度等性質。去乙醯程度愈高之幾丁聚醣愈易溶解於酸性溶液，並具有高度陽離子之特性(NH_3^+)，可以提高與腸道中帶負電腸黏膜之吸附力，並短暫打開腸黏膜上之緊密連結(tight junctions)，此有助於被其包覆之藥物易進入人體或動物血液中。故本研究選擇去乙醯程度大於 85 %之幾丁聚醣作為實驗材料。

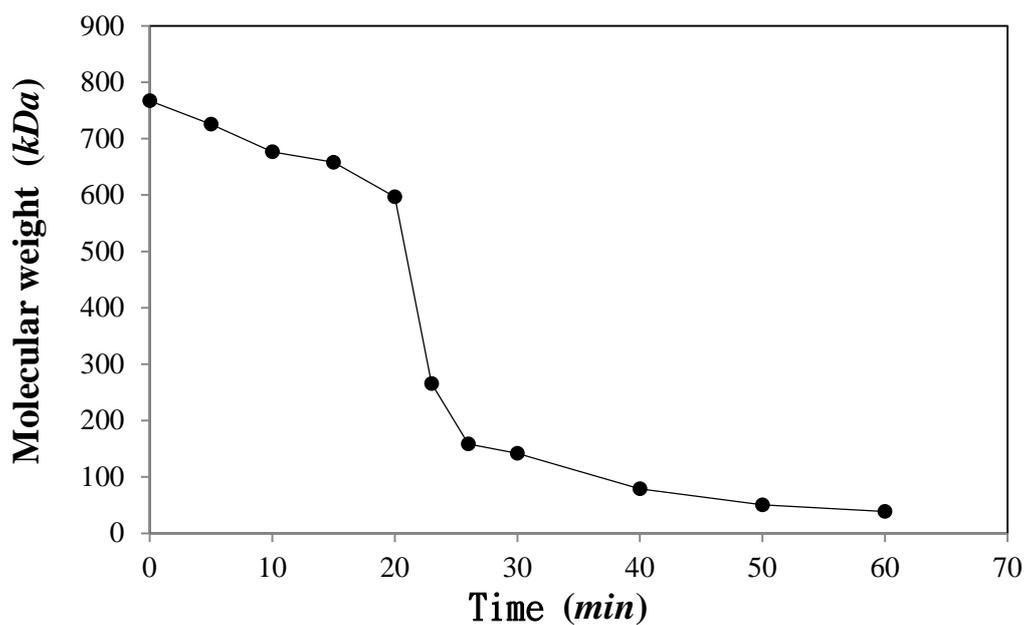
(二) 不同分子量幾丁聚醣之製備

參考林(2012)製備不同分子量之幾丁聚醣，以臭氧濃度為 6.3 g/m^3 於 50 至 55 $^\circ\text{C}$ 之溫度條件下處理不同時間，由圖二十八得知，當臭氧氧化降解時間越長，幾丁聚醣之分子量越小，經 60 分鐘作用後可得到 38.7 kDa 之幾丁聚醣。

許多研究指出，幾丁聚醣的分子量與其生物活性有著密切的關係，包括幾丁聚醣的溶解度及其對微生物活性的影響。當幾丁聚醣分子量較低時，其溶解性較高且黏度較低(Tikhonov *et al.*, 2006)。另外，幾丁聚醣對於微生物之活性也有著相對的影響，Tokura 等學者(1997)發現 9.3 *kDa* 之幾丁聚醣能夠抑制大腸桿菌的生長，然而 2.2 *kDa* 之幾丁聚醣卻能夠促進其生長。本研究擬選出四種分子量: Original Mw (767 *kDa*)、High Mw (596 *kDa*)、Medium Mw (265 *kDa*)及 Low Mw (50 *kDa*)之幾丁聚醣進行包覆柚皮素製備奈米顆粒並探討其特性。

(三) 柚皮素溶液之製備

表一為柚皮素置於水、1 %冰醋酸、冰醋酸、甲醇及乙醇溶劑之溶解情形。由結果得知，柚皮素完全不溶於水及 1 %冰醋酸，冰醋酸則是部分溶解，而甲醇及乙醇則是完全溶解的狀態，但由於甲醇對於人體具有毒性，因此本研究選擇乙醇做為柚皮素之溶劑。



圖二十八、臭氧處理時間對幾丁聚醣降解程度之影響。

Fig. 28. Effect of ozone treatment time on the degree of chitosan degradation. (Ozone concentration: 6.3 g/m^3).

表一、柚皮素對若干溶劑之溶解性。

Table. 1. Solubility of naringenin in a number of solvents.

水	1 % 冰醋酸	冰醋酸	甲醇	乙醇
▲	▲	◆	●	●

▲: precipitate (完全不溶解)

◆: precipitate and creamy suspension (部分溶解)

●: creamy suspension, no precipitate (完全溶解)

二、 不同製備條件對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素 奈米顆粒特性之影響

本研究將柚皮素(naringenin)溶於乙醇後，分別加入不同分子量之幾丁聚醣溶液(CS)，混合均勻，再加入不同量之三聚磷酸鈉溶液(TPP)，進行包覆柚皮素製備 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒，並探討 naringenin 濃度、CS 分子量及 CS/TPP 重量比對於 naringenin 之包覆率及裝載率，奈米顆粒之產率、粒徑及電位的影響。

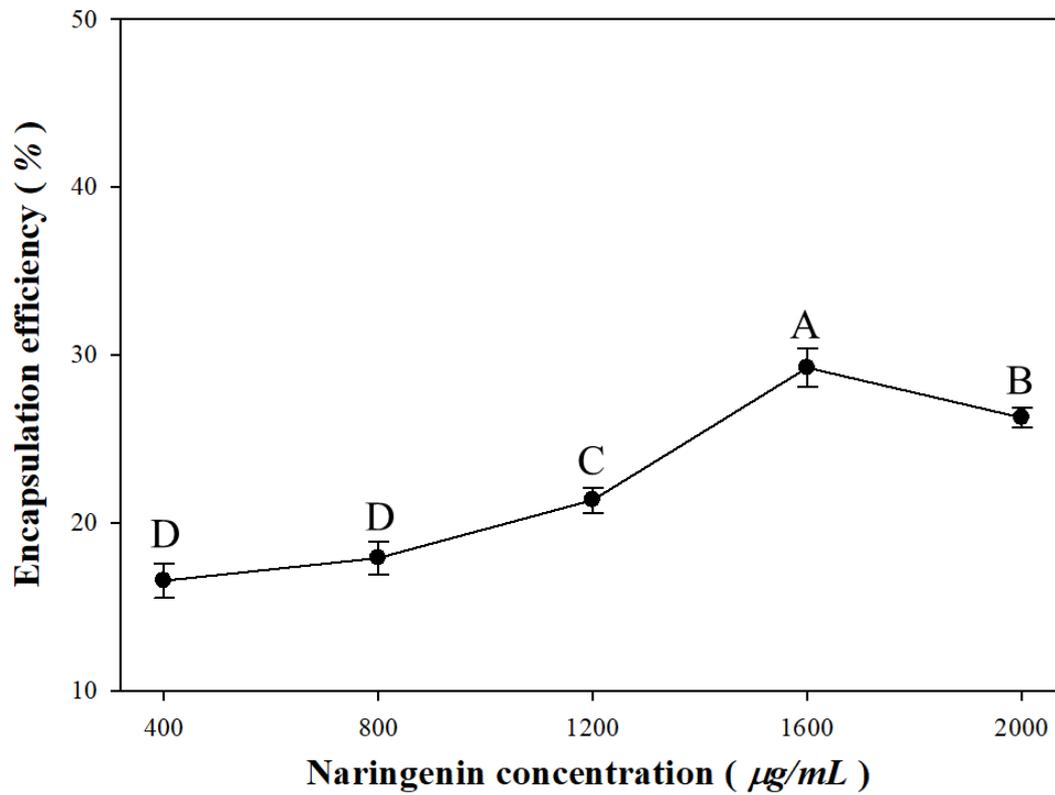
(一) 柚皮素濃度之影響

參考孫(2010)之研究，利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆分離大豆蛋白質水解物(Isolated Soy Protein Hydrolysate, ISPH)，發現當幾丁聚醣分子量越高，CS/TPP 重量比越低時，製備出來的奈米顆粒在胃腸道模擬試驗之安定性越高。林(2012)利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆槲皮素(Quercetin)，發現以原分子量幾丁聚醣、CS/TPP 重量比為 3/1 時，所製備之奈米顆粒於胃腸道安定性的效果較佳。因此本實驗先以未降解之幾丁聚醣(Original MwCS, 767 kDa)，CS/TPP 重量比為 3/1，探討不同柚皮素濃度(400 至 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)對於 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒特性之影響，其中包括柚皮素之包覆率及裝載率，奈米顆粒之產率、粒徑大小及表面電位等。

1. 柚皮素包覆率之影響

圖二十九為不同柚皮素濃度對於 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒包覆率之影響。從圖可知當柚皮素濃度在 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 時，包覆率約為 16.5%，隨著濃度的提高包覆率呈現上升的趨勢，當濃度為 $1600 \mu\text{g}/\text{mL}$ 時，其包覆率上升至 29.2%，推測原因為當柚皮素在低濃度時，溶質密度較低使得幾丁聚醣無法有效地捕捉柚皮素，造成包覆率較低，而隨著柚皮素濃度的增加，幾丁聚醣能捕捉到柚皮素的機會也增加，使得包覆率隨著濃度的增加而上升。但其濃度增加至 $2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 時，包覆率開始下降，推測原因為此時幾丁聚醣奈米顆粒可包覆之容量已達飽和，無法再包覆之故。

林(2012)以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆槲皮素製備奈米顆粒，其結果隨著槲皮素濃度由 $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ 上升至 $450 \mu\text{g}/\text{mL}$ 時，包覆率逐漸上升，而濃度上升至超過 $450 \mu\text{g}/\text{mL}$ 時，包覆率反而逐漸下降。其原因推測與本實驗相似，在低濃度時溶質密度低造成包覆率不高，隨著濃度的上升包覆率開始提高，而至較高濃度時因奈米顆粒可包覆之容量已達飽和，故造成包覆率開始下降。



圖二十九、柚皮素濃度對於柚皮素包覆率之影響。

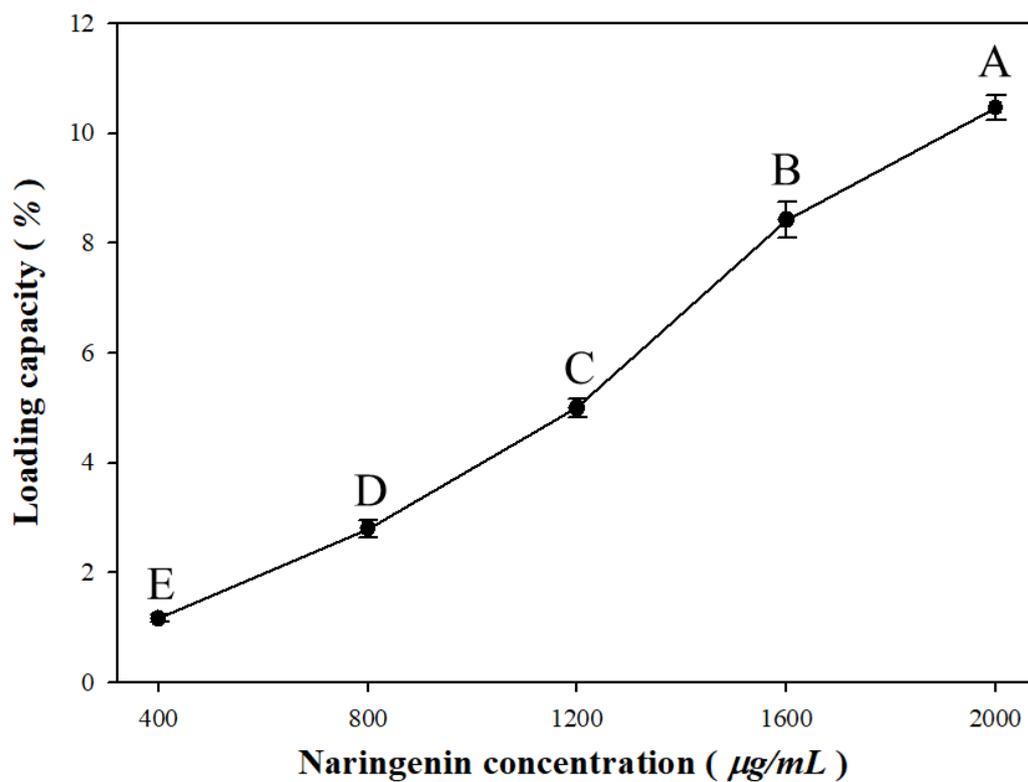
Fig. 29. Effect of naringenin concentration on the naringenin encapsulation efficiency. (Original Mw CS ; CS / TPP mass ratio : 3/1).

* A-D mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, $n=3$.

Ilk(2017)等人研究以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆 kaempferol (山柰酚)形成奈米顆粒，結果發現山柰酚濃度自 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 上升至 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 時，山柰酚之包覆率從 80 % 上升至 90 %。其實驗結果與本實驗相同，包覆率隨著山柰酚濃度增加而上升，作者推測因山柰酚其結構上帶有羥基(hydroxyl groups)，故能利用氫鍵增強與幾丁聚醣之鍵結，使得包覆率上升。而本實驗樣品柚皮素與山柰酚同為黃酮類化合物，在結構上極為相似，故推測柚皮素之包覆率上升之原因與山柰酚相同。

2. 柚皮素裝載率之影響

柚皮素裝載率的概念為單位奈米顆粒內攜帶多少量之柚皮素。圖三十所示，柚皮素之裝載率隨著濃度低至高有逐漸上升的趨勢，濃度自 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 增加至 $2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，裝載率由 1.5 % 提升至 11 %，推測原因為柚皮素於低濃度時，因溶質於溶液中的密度較低，柚皮素無法輕易地被幾丁聚醣所捕捉到，造成奈米顆粒裝載率較低；而隨著濃度上升，溶質於溶液中的密度也逐漸增加，使得柚皮素更輕易地被裝載至奈米顆粒當中。



圖三十、柚皮素濃度對於柚皮素裝載率之影響。

Fig. 30. Effect of naringenin concentration on the naringenin loading capacity. (Original Mw CS ; CS/TPP mass ratio : 3/1).

* A-E mean with different letters are significantly different (p<0.05). Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.

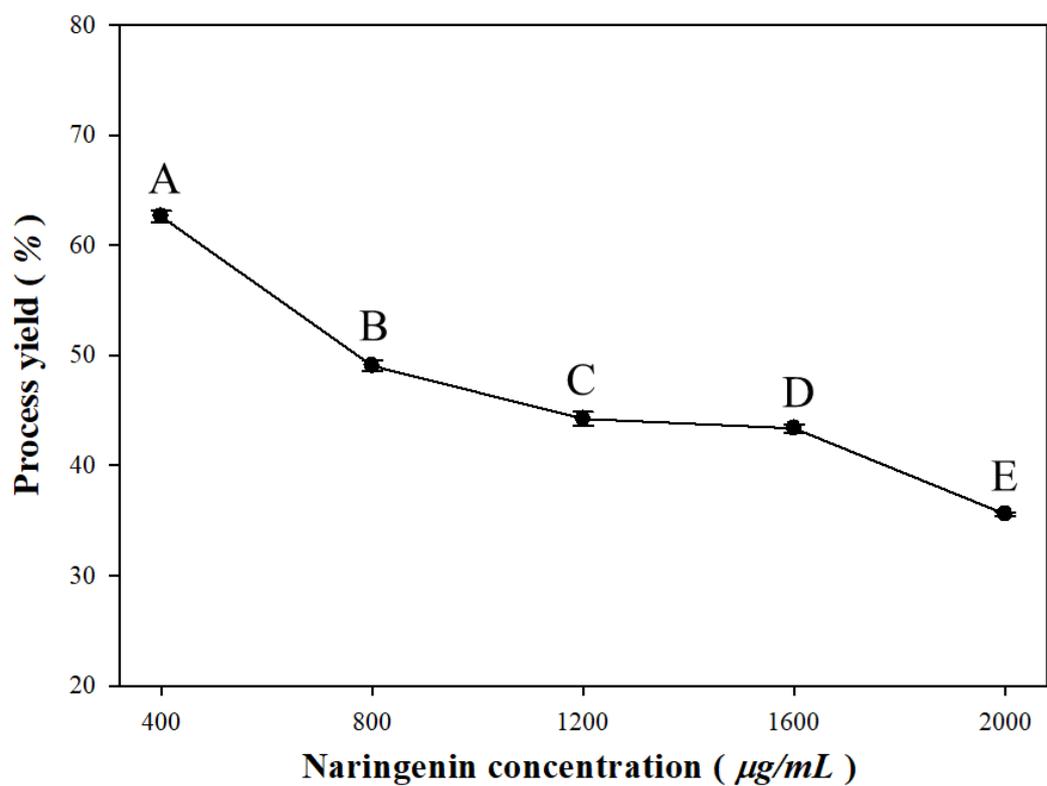
Wu(2005)等人研究以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆甘草酸銨(ammonium glycyrrhizinate)製備奈米顆粒，發現其裝載率隨著甘草酸銨濃度的增加而有上升的趨勢，作者推測藉由甘草酸銨之羧基與幾丁聚醣之胺基，兩者之間的靜電交互作用使得鍵結增強，導致裝載率上升。陳(2016)研究利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆薑黃素製備奈米顆粒，探討不同薑黃素濃度對於其裝載率之影響。研究發現隨著薑黃素濃度的增加，其裝載率有逐漸增加的趨勢，作者推測薑黃素在低濃度時於溶液中的密度較低，奈米顆粒無法有效捕捉，而增加薑黃素濃度使其密度增加助於其包覆率增加。

3. 奈米顆粒產率之影響

奈米顆粒產率由以下公式計算：

$$\text{Process yield (\%)} = \frac{\text{Nanoparticle weight (dry weight)}}{\text{Total solid weight (dry weight)}} \times 100$$

圖三十一為不同柚皮素濃度對於奈米顆粒產率之影響。從圖可知奈米顆粒產率隨著柚皮素濃度的增加而減少，即自 400 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 2000 $\mu\text{g/mL}$ 時由 60 % 下降至 35 %。原因為雖然柚皮素隨著濃度增加其裝載率增加，但此增加率較低(1 至 11 %)，其奈米顆粒經乾燥後其乾重之增加有限。但總固體重量理論上隨著柚皮素濃度的增加而上升，而產生上述之結果。



圖三十一、柚皮素濃度對於奈米顆粒產率之影響。

Fig. 31. Effect of naringenin concentration on the nanoparticle process yield. (Original Mw CS ; CS/TPP mass ratio : 3/1).

* A-E mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$). Each value is expressed as mean \pm SD, $n=3$.

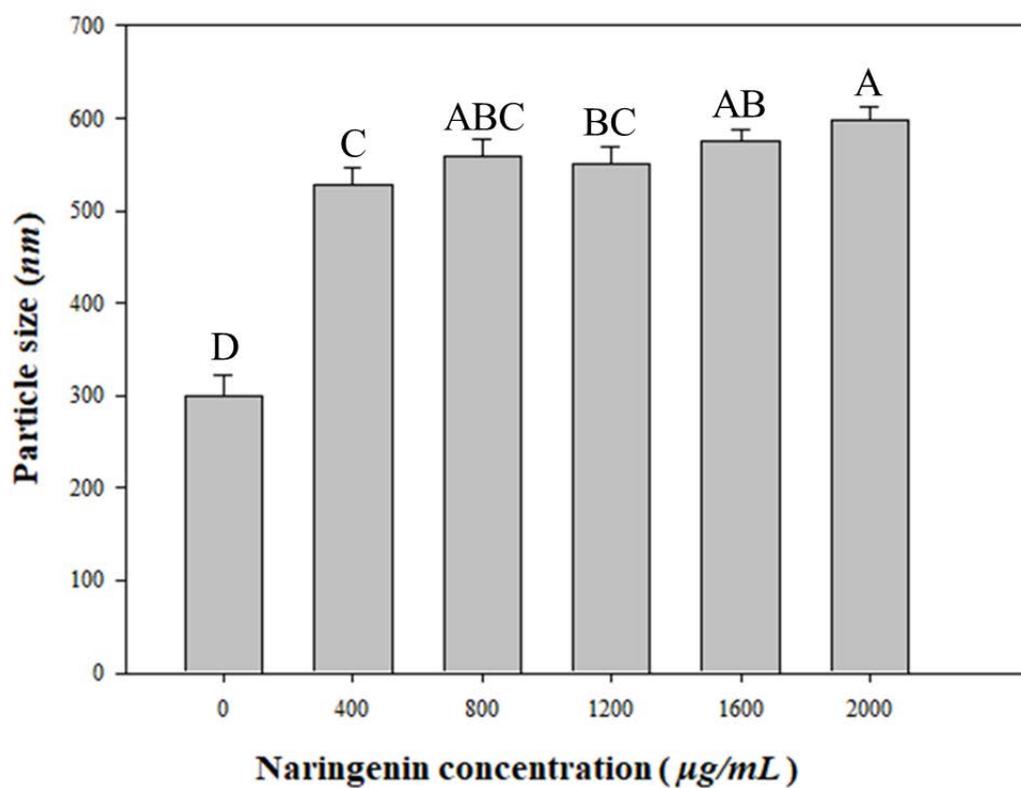
4. 奈米顆粒平均粒徑之影響

圖三十二為不同柚皮素濃度對於奈米顆粒粒徑大小之結果。

由圖可知，未包覆柚皮素之奈米顆粒其平均粒徑為 300 nm ，在包覆低濃度 $400\text{ }\mu\text{g/mL}$ 之柚皮素後，其平均粒徑上升至 530 nm ，推測原因為奈米顆粒將柚皮素包覆於其中而使得平均粒徑上升。而隨著柚皮素濃度的上升，其平均粒徑則緩慢地上升，從 530 nm 上升至 600 nm ，此結果也可與包覆率及裝載率結果互相呼應，包覆率及裝載率隨著柚皮素濃度的增加而上升，代表奈米顆粒包覆的柚皮素的量增加，使得奈米顆粒平均粒徑逐漸變大。

Wu(2005)等人以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆甘草酸銨製備奈米顆粒，發現隨著甘草酸銨濃度的增加，由 0.1 mg/mL 上升至 0.5 mg/mL ，其粒徑有逐漸上升的趨勢。

鄭(2015)以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆茄紅素製備奈米顆粒，發現包覆不同濃度茄紅素之奈米顆粒，其粒徑皆大於未包覆者，而隨著茄紅素濃度的增加，其粒徑有變大的情況，作者推測是因為更多的茄紅素被包覆於奈米顆粒之中，導致粒徑變大。



圖三十二、柚皮素濃度對於幾丁聚糖-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒
粒徑大小之影響。

Fig. 32. Effect of naringenin concentration on the particle size of CS-TPP-Naringenin nanoparticles. (Original Mw CS ; CS/TPP mass ratio : 3/1).

* A-D mean bars (naringenin concentration) with different letters are significantly different ($p < 0.05$). Each value is expressed as mean \pm SD, $n=3$.

Ilk(2017)等人研究以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆山柰酚形成奈米顆粒，結果發現隨著山柰酚之濃度增加，奈米顆粒粒徑大小也隨之增大，從 137 nm 增加至 272 nm，作者推測高濃度的山柰酚會減少奈米顆粒之間的空間，阻斷了奈米顆粒的排斥力，造成奈米顆粒產生聚集(aggregation)的現象，使得其粒徑增加。

5. 奈米顆粒表面電位之影響

表二為不同柚皮素濃度對於 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒表面電位之影響。由結果得之，未包覆之奈米顆粒其電位約為+ 49 mV，原因為當幾丁聚醣溶於酸性溶液時，其結構上之 NH_2 會形成 NH_3^+ 的形式之故。而在包覆柚皮素後，其奈米顆粒之表面電位皆小於未包覆者，推測被包覆之柚皮素可能會部分遮蔽幾丁聚醣上的 NH_3^+ ，使得表面電位下降。另外，柚皮素濃度的不同對於奈米顆粒表面電位似乎影響不大，大約落在+ 38 mV 至+ 40 mV 之間。

孫(2010)以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆 ISPH 製備奈米顆粒，探討不同濃度之 ISPH 對於奈米顆粒表面電位之影響，結果發現濃度對於奈米顆粒之表面電位影響程度不大，且皆帶正電荷，大約為+ 42 mV 至+ 43 mV 之間。

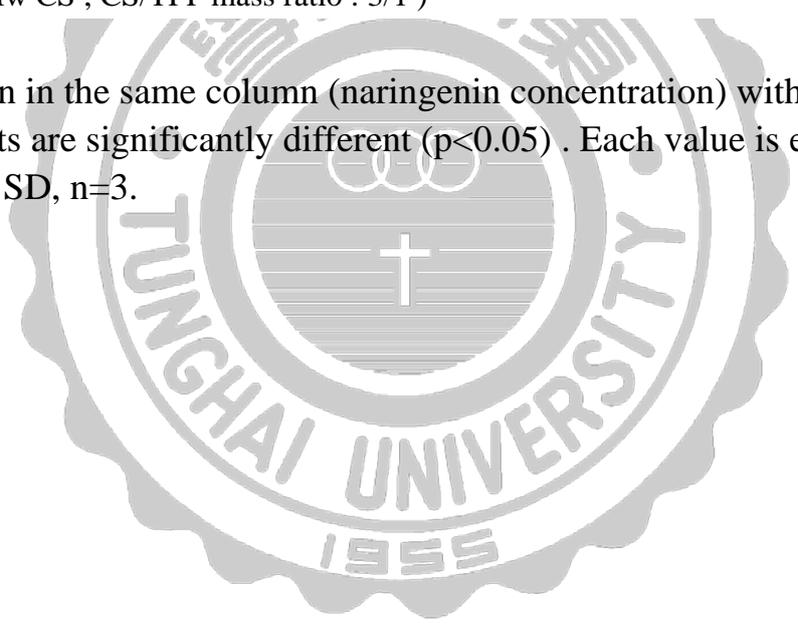
表二、柚皮素濃度對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒表面電位之影響。

Table 2. Effect of naringenin concentration on the zeta potential of CS-TPP Naringenin nanoparticles.

Naringenin concentration ($\mu\text{g/mL}$)	ξ potential (mV)
0	+ 49.0 \pm 1.93 ^A
400	+ 38.8 \pm 0.94 ^B
800	+ 39.7 \pm 0.59 ^B
1200	+ 39.9 \pm 0.29 ^B
1600	+ 40.6 \pm 0.68 ^B
2000	+ 40.5 \pm 0.82 ^B

(Original Mw CS ; CS/TPP mass ratio : 3/1)

*A-B mean in the same column (naringenin concentration) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.



陳(2016)探討薑黃素濃度對於幾丁聚醣-薑黃素奈米顆粒表面電位之影響，結果顯示在包覆薑黃素後，其奈米顆粒之表面電位有下降的趨勢，作者推測薑黃素可能部分遮蔽著幾丁聚醣上 NH_3^+ 所造成。

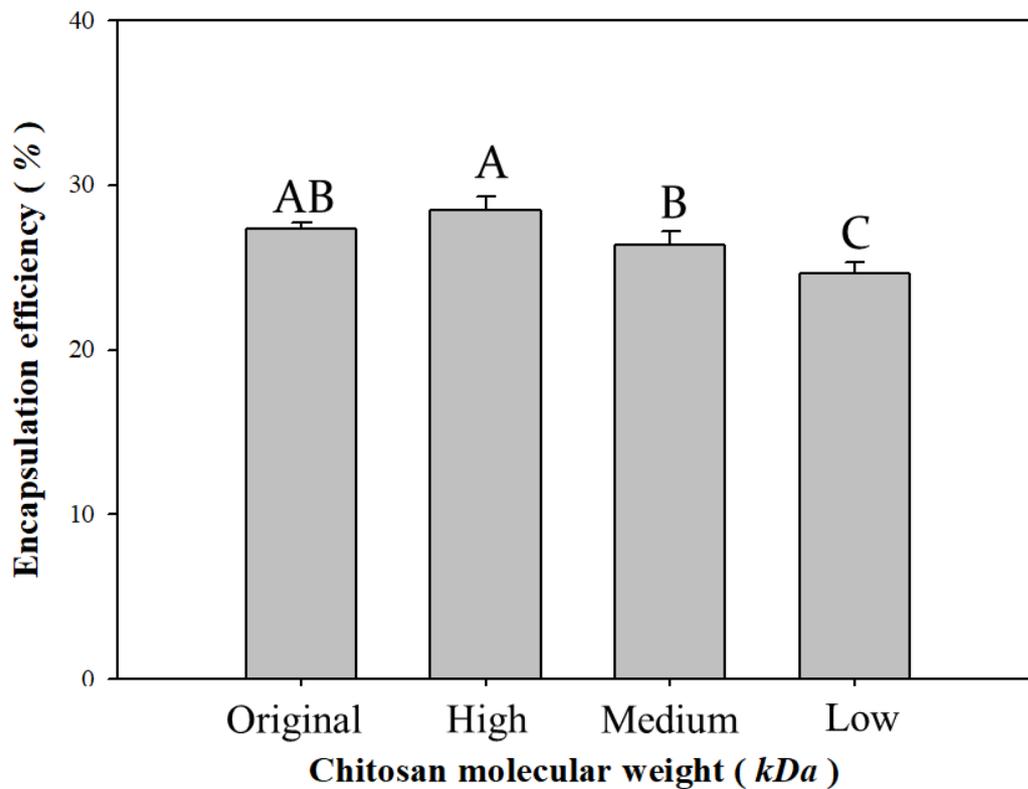
綜合以上實驗結果，發現當柚皮素濃度上升(400至2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒之柚皮素包覆率為先升後降，柚皮素濃度在 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時包覆率達到最高(29.2 %)，至更高濃度(2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)時柚皮素之包覆率反而下降；裝載率則隨著柚皮素濃度的增加而上升(1.5至11%)，然而奈米顆粒之產率反而隨之下降(60至40%)；柚皮素濃度對於奈米顆粒之粒徑及表面電位影響不大，粒徑皆在奈米等級的範圍(530至600 nm)，且皆帶正表面電位(+38至+40 mV)。因此為了得到帶有較多柚皮素之奈米顆粒，選擇包覆率最高即柚皮素濃度為 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作為後續探討幾丁聚醣分子量之固定條件。

(二) 幾丁聚醣分子量之影響

由前一段實驗結果得知，柚皮素濃度在 $1600 \mu\text{g}/\text{mL}$ 時所製備出的 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒有較佳之包覆率，粒徑則落在奈米等級範圍且皆帶有相當高之正表面電位，故接下來實驗以柚皮素濃度為 $1600 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，並固定 CS/TPP 重量比為 3/1，探討不同分子量之幾丁聚醣(Original Mw : 767 kDa 、High Mw : 596 kDa 、Medium Mw : 265 kDa 及 Low Mw : 50 kDa)對於柚皮素之包覆率及裝載率，奈米顆粒產率、粒徑大小及表面電位之影響。

1. 柚皮素包覆率之影響

圖三十三為不同分子量之幾丁聚醣對於柚皮素包覆率之影響。由此圖得知，以原分子量及高分子量幾丁聚醣對於柚皮素之包覆率結果較佳，分別為 27.3 及 28.5 %，而以中分子量及低分子量幾丁聚醣對於柚皮素之包覆率則有下降的趨勢，分別為 26.3 及 24.6 %。幾丁聚醣之降解為臭氧方式處理，其優點為速率快，但專一性低，因此在切斷幾丁聚醣鏈長的同時，也將部分幾丁聚醣上之 NH_3^+ 切除，讓幾丁聚醣與三聚磷酸鈉離子交聯作用不完整，形成的網狀結構較少，造成包覆率下降；另一原因推測為經降解處理之幾丁聚醣，其黏性也隨著下降，因此幾丁聚醣無法有效地將柚皮素抓進幾丁聚醣的矩陣(matrix)內，而造成包覆率開始下降。



圖三十三、幾丁聚醣分子量對於柚皮素包覆率之影響。

Fig. 33. Effect of chitosan molecular weight on the naringenin encapsulation efficiency of CS-TPP-Naringenin nanoparticles. (Naringenin concentration : $1600 \mu\text{g}/\text{mL}$; CS/TPP mass ratio : 3/1).

* A-C mean bars (chitosan Mw) with different letters are significantly different($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.

Wu(2005)等人以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆甘草酸銨製備奈米顆粒，探討不同分子量之幾丁聚醣對於甘草酸銨包覆率之影響。結果顯示以高分子量幾丁聚醣(200 *kDa*)之甘草酸銨包覆率為高於低分子量幾丁聚醣(24 *kDa*)，作者推測是因為高分子量幾丁聚醣其鏈長較長，能夠在與三聚磷酸鈉形成離子交聯時，捕獲更多的甘草酸銨，使得其包覆率較低分子量幾丁聚醣來得高。

吳(2008)研究以不同分子量之幾丁聚醣包覆牛血清蛋白製備奈米顆粒，結果發現未降解之幾丁聚醣(350 *kDa*)包覆率較降解後之幾丁聚醣(129.7 *kDa*)來得低，作者推測原分子量幾丁聚醣其黏度太高，使得牛血清蛋白不易進入網狀結構；而經過更長時間降解處理之幾丁聚醣(61.6 *kDa*)，其包覆率也隨之下降，推測因NH₃⁺較少及黏度降低，使得幾丁聚醣無法有效捕捉牛血清蛋白，造成包覆率下降。洪(2014)以臭氧降解得到不同分子量之幾丁聚醣，包覆Ca²⁺製備奈米顆粒，結果發現隨著幾丁聚醣分子量的下降，其包覆率有下降的趨勢，作者推測幾丁聚醣分子量較大時，其分子鏈較長可與三聚磷酸鈉形成較多網狀結構而包覆Ca²⁺，另外也可利用幾丁聚醣結構上之OH與Ca²⁺產生螯合作用包覆Ca²⁺，而高分子量幾丁聚醣其黏度高，可包覆較多Ca²⁺，本實驗結果皆與以上研究相互呼應。

2. 柚皮素裝載率之影響

圖三十四為不同分子量之幾丁聚醣對於柚皮素裝載率之影響。

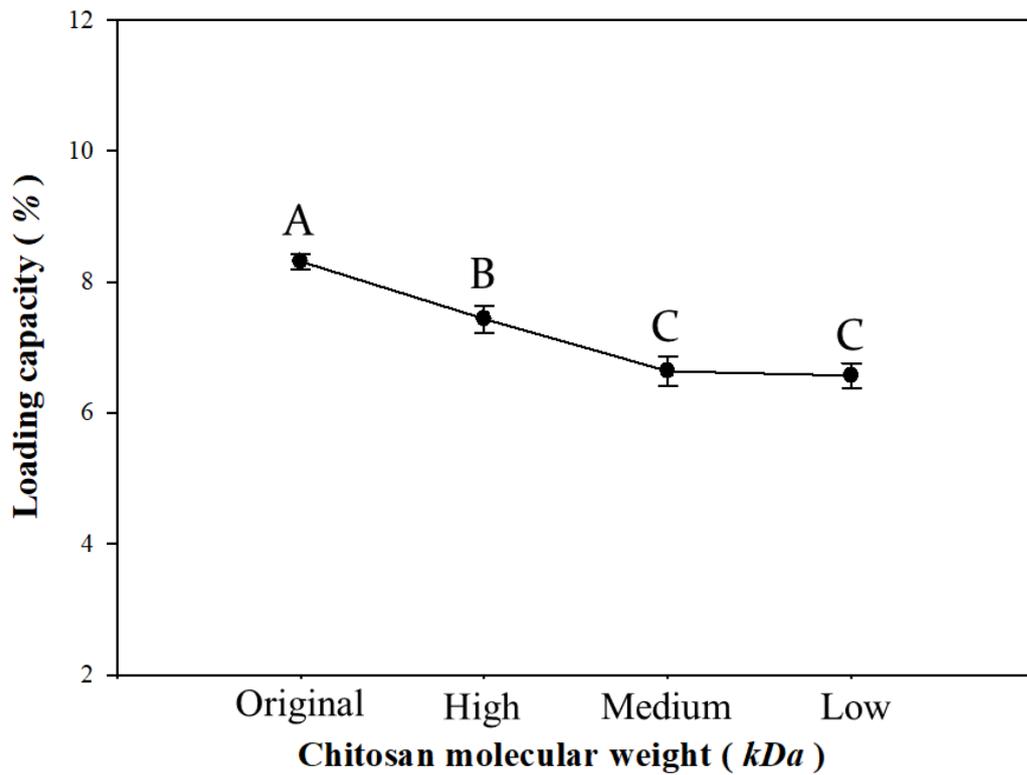
由此圖得知，隨著幾丁聚醣分子量的減少，柚皮素之裝載率也有下降的趨勢，大約從 8.3 % 下降至 6.5 %。裝載率的公式如下：

$$\text{Loading capacity (\%)} = \frac{\text{Total Naringenin amount} - \text{supernatant Naringenin amount}}{\text{Nanoparticle weight (dry weight)}} \times 100$$

藉由包覆率的結果得知，隨著幾丁聚醣分子量的下降，包覆率呈現下降的趨勢，而奈米顆粒經乾燥後其乾重增加有限，故得上述之結果。陳(2016)以三種不同分子量之幾丁聚醣包覆薑黃素製備奈米顆粒，探討其對於薑黃素裝載率之影響。結果發現隨著幾丁聚醣分子量的降低，薑黃素之裝載率有下降的趨勢，作者推測在包覆率無顯著性差異的前提下，依照產率的結果表示隨著幾丁聚醣分子量的下降，其奈米顆粒的乾重是逐漸增加的，因此藉由公式計算得到隨著幾丁聚醣分子量的降低，薑黃素之裝載率呈現下降的趨勢。

3. 奈米顆粒產率之影響

圖三十五為不同分子量之幾丁聚醣包覆柚皮素製備奈米顆粒，對於奈米顆粒產率之影響。由圖可觀察到奈米顆粒之產率隨著原始幾丁聚醣分子量降解至中分子量時，有增加的趨勢，由 40 % 上升至 50 %，而其分子量再降至低分子量時則下降至 46 %。



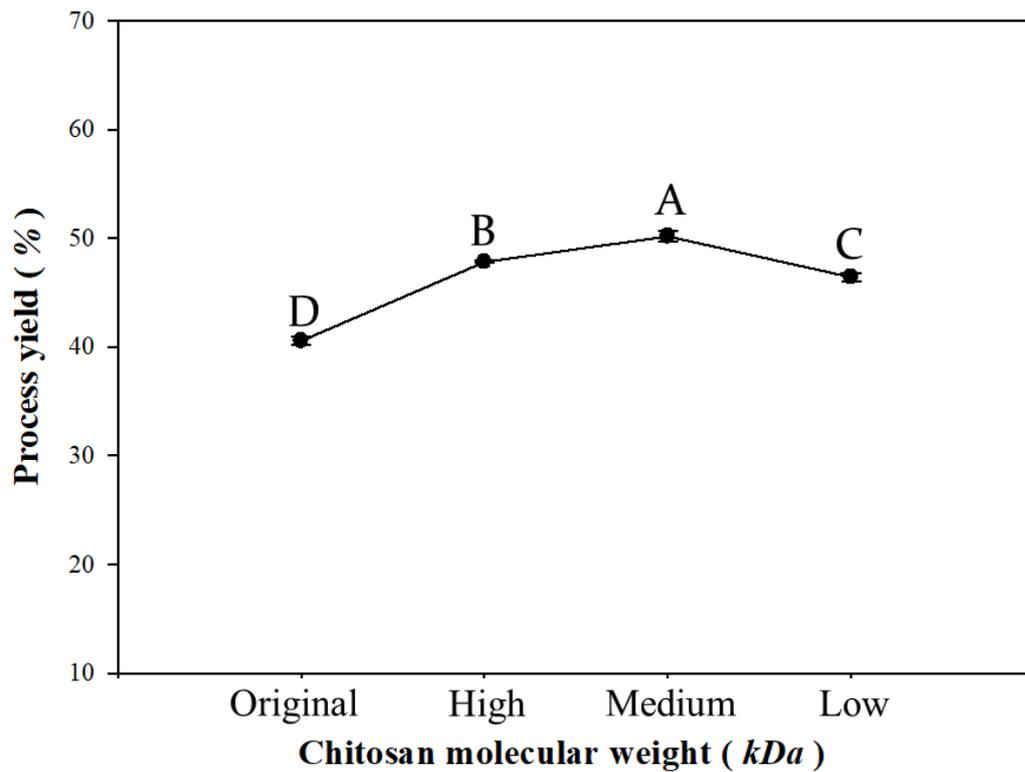
圖三十四、幾丁聚醣分子量對於柚皮素裝載率之影響。

Fig. 34. Effect of chitosan molecular weight on the naringenin loading capacity of CS-TPP-Naringenin nanoparticles. (Naringenin concentration : $1600 \mu\text{g}/\text{mL}$; CS/TPP mass ratio : 3/1).

* A-C mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.

推測原因為高分子量與中分子量之幾丁聚醣，其分子鏈較短，立體結構障礙較小，使得三聚磷酸鈉較容易與幾丁聚醣產生離子交聯，造成奈米顆粒之乾重增加，造成產率上升。而低分子量之幾丁聚醣推測因臭氧降解處理，其結構上較多 NH_3^+ 被切除，使得三聚磷酸鈉無法有效地與幾丁聚醣進行離子交聯作用，形成的網狀結構較少，造成奈米顆粒乾重減少。

陳(2016)以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆薑黃素製備奈米顆粒，探討不同分子量之幾丁聚醣(740、200 至 250 及 50 *kDa*)對於奈米顆粒產率之影響。結果顯示隨著幾丁聚醣分子量越小，奈米顆粒之產率有上升的趨勢。作者推測高分子量之幾丁聚醣因分子鏈較長，使得鏈與鏈之間立體結構障礙較大，三聚磷酸鈉較不易與幾丁聚醣發生離子交聯作用造成產率較低；而低分子量幾丁聚醣因黏度較低，三聚磷酸鈉較容易與幾丁聚醣產生離子交聯作用，故形成的奈米顆粒乾重較多，產率隨之提升。



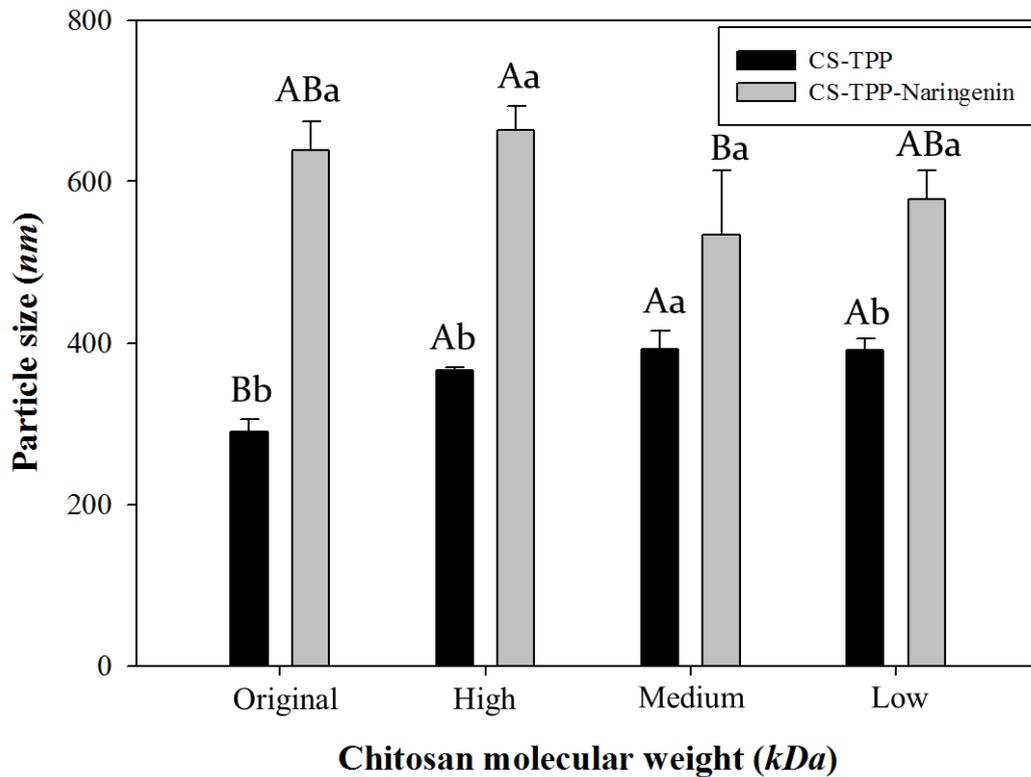
圖三十五、幾丁聚醣分子量對於奈米顆粒產率之影響。

Fig. 35. Effect of chitosan molecular weight on the nanoparticle process yield of CS-TPP-Naringenin nanoparticles. (Naringenin concentration : $1600 \mu\text{g/mL}$; CS/TPP mass ratio : 3/1).

* A-D mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, $n=3$.

4. 奈米顆粒平均粒徑之影響

圖三十六為不同分子量之幾丁聚醣對於 CS-TPP 奈米顆粒(未包覆者)及 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒(有包覆者)平均粒徑之影響。首先在未包覆者方面，原分子量(未降解)幾丁聚醣製備之奈米顆粒其粒徑約為 291 nm，隨著幾丁聚醣分子量的下降，粒徑有逐漸上升的趨勢，中及低分子量幾丁聚醣所製備之奈米顆粒粒徑增加至約 392 nm。推測因降解處理之幾丁聚醣，其結構上之 NH_3^+ 被臭氧給任意切除，三聚磷酸鈉無法充分地與幾丁聚醣產生離子交聯作用，使奈米顆粒結構較寬鬆而造成奈米顆粒粒徑較大。在包覆柚皮素者，無論幾丁聚醣分子量大小，其奈米顆粒粒徑皆大於未包覆者方面，原因為柚皮素被包覆於奈米顆粒當中之故。其中，原分子量、高分子量、中分子量及低分子量奈米顆粒粒徑大小分別為 639、664、535 及 578 nm，此結果與包覆率之趨勢結果相似，原及高分子量幾丁聚醣製備之奈米顆粒，在統計上其粒徑差異不大，不過高分子量幾丁聚醣仍大於原分子量幾丁聚醣。而原及高分子量因幾丁聚醣鏈長較長，鏈與鏈之間立體結構障礙較大，且黏度較高，使得形成之奈米顆粒粒徑較大；中及低分子量因幾丁聚醣之分子鏈長較短，黏度也較低，立體結構障礙較小，因此所形成之奈米顆粒粒徑較小，兩者皆不到 600 nm。



圖三十六、幾丁聚醣分子量對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉及幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒粒徑大小之影響。

Fig. 36. Effect of chitosan molecular weight on the particle size of CS-TPP and CS-TPP-Naringenin nanoparticles. (Naringenin concentration : $1600 \mu\text{g}/\text{mL}$; CS/TPP mass ratio : 3/1).

* A-B mean bars (chitosan Mw) with different letters are significantly different ($p < 0.05$) .

Each value is expressed as mean \pm SD, $n=3$.

*a-b mean bars (type of nanoparticles) with different letters are significantly different ($p < 0.05$) .

Each value is expressed as mean \pm SD, $n=3$.

Gan 與 Wang(2007)以幾丁聚醣包覆牛血清蛋白，與三聚磷酸鈉製備奈米顆粒，探討不同分子量之幾丁聚醣對於奈米顆粒粒徑大小的影響。結果顯示隨著幾丁聚醣分子量越小，其粒徑大小有變小的趨勢，從 582.5 nm 下降至 388.4 nm。楊(2008)研究以不同分子量之幾丁聚醣與不同 pH 值之三聚磷酸鈉製備奈米顆粒，結果發現在三聚磷酸鈉 pH 值為 9.0 時，隨著幾丁聚醣分子量越小，其粒徑有逐漸變大的趨勢，作者推測低分子量幾丁聚醣因其分子鏈較短，立體結構障礙較小，使得三聚磷酸鈉有較大的空間發生作用，可充分地與幾丁聚醣產生離子交聯，使得顆粒越大。本實驗結果皆與以上實驗結果相似。

5. 對奈米顆粒表面電位之影響

表三為不同分子量之幾丁聚醣對於 CS-TPP 及 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒表面電位之影響。未包覆者方面，隨著幾丁聚醣分子量越小，奈米顆粒表面電位有逐漸變小的趨勢，從原分子量的 + 47.6 mV 下降至低分子量的 + 30.3 mV，原因為幾丁聚醣隨著臭氧降解處理時間越長(即幾丁聚醣分子量越小)， NH_3^+ 被切除的也較多，使奈米顆粒表面電位越小。而在包覆柚皮素過後，其奈米顆粒之表面電位降低之趨勢與上述類似，且更低。其原分子量、高分子量、中分子量及低分子量奈米顆粒之電位分別為

表三、幾丁聚醣分子量對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉及幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒表面電位之影響。

Table 3. Effect of chitosan molecular weight on the zeta potential of CS-TPP and CS-TPP-Naringenin nanoparticles.

Chitosan molecular weight (<i>kDa</i>)	Type of nanoparticle	
	Unloaded	Naringenin-loaded
	ξ potential (<i>mV</i>)	
Original Mw	+47.6 \pm 0.45 ^{Aa}	+40.1 \pm 0.31 ^{Ab}
High Mw	+37.2 \pm 0.17 ^{Ba}	+28.1 \pm 1.49 ^{Bb}
Medium Mw	+37.7 \pm 0.98 ^{Ba}	+25.8 \pm 1.11 ^{Bb}
Low Mw	+30.3 \pm 1.26 ^{Ca}	+21.8 \pm 0.70 ^{Cb}

(Naringenin concentration: 1600 $\mu\text{g/mL}$; CS/TPP mass ratio : 3/1)

*A-C mean in the same column (chitosan Mw) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.

*a-b mean in the same row (type of nanoparticles) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.

+ 40.1、+ 28.1、+ 25.8 及 + 21.8 *mV*。此由於柚皮素在包覆時會部分遮蔽住幾丁聚醣結構上之 NH_3^+ 所致。

Gan 與 Wang(2007)利用幾丁聚醣包覆牛血清蛋白，與三聚磷酸鈉製備奈米顆粒，探討不同分子量之幾丁聚醣對於奈米顆粒表面電位的影響。結果顯示隨著幾丁聚醣分子量越小，其表面電位有變小的趨勢，從 + 50.2 *mV* 下降至 + 46.3 *mV*。鄭(2015)以幾丁聚醣包覆茄紅素製備奈米顆粒，探討不同分子量之幾丁聚醣對於奈米顆粒表面電位之影響。結果發現隨著幾丁聚醣分子量越小，無論在未包覆者或有包覆者，其表面電位皆下降。陳(2016)利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆薑黃素，同樣探討不同分子量幾丁聚醣對於奈米顆粒表面電位之影響，其結果同樣隨著幾丁聚醣分子量越小，表面電位呈現下降的趨勢，而在包覆薑黃素後，其奈米顆粒表面電位皆較未包覆者來得低，作者推測在包覆薑黃素後，幾丁聚醣結構上之 NH_3^+ 被部分遮蔽住，另一原因推測為帶負電之薑黃素與帶正電之幾丁聚醣做結合，因此減少幾丁聚醣所帶之正電，使得表面電位下降，而本實驗結果皆與上述結果相同。

綜合以上實驗結果得之，當幾丁聚醣分子量越小(767 至 50 *kDa*)，製備之 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒其包覆率會逐漸下降(28 至 24 %)，裝載率也呈現下降的趨勢(8.3 至 6.5 %)，然而產率則是先上升後下降(40 上升至 50 下降至 46 %)，同時奈米顆粒平均粒徑也逐漸變小(663.5 *nm* 至 534.6 *nm*)，而表面電位也隨之下降(+ 40.1 *mV* 至 + 21.8 *mV*)。因此為了得到較多柚皮素，以及較高的奈米顆粒表面電位，同時不損失柚皮素之裝載率及奈米顆粒之產率，選擇高分子量(High Mw)幾丁聚醣作為後續探討不同 CS/TPP 重量比時使用之條件。



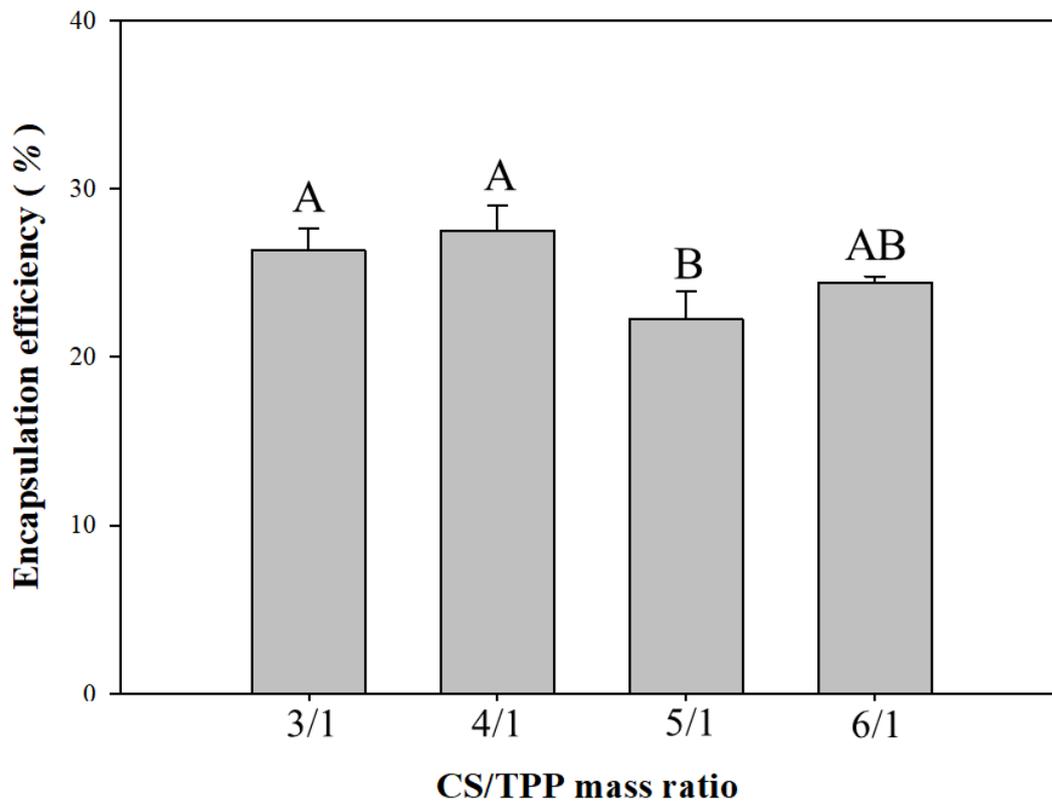
(三) 幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比之影響

由上述兩實驗結果得知，以柚皮素濃度為 $1600 \mu\text{g/mL}$ 及高分子量幾丁聚醣製備 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒有較佳之特性。故接下來實驗固定此兩條件，探討不同 CS/TPP 重量比(3/1、4/1、5/1 及 6/1)對於柚皮素包覆率及裝載率，奈米顆粒產率、粒徑大小及表面電位之影響。

1. 柚皮素包覆率之影響

圖三十七為 CS/TPP 重量比對於柚皮素包覆率之影響。由圖可知當 CS/TPP 重量比為 3/1 及 4/1 時，柚皮素之包覆率較高，推測在此條件下，幾丁聚醣與三聚磷酸鈉的比例較為接近，其結構上之 NH_3^+ 與三聚磷酸鈉的負電基團能夠充分地產生離子交聯作用，形成的網狀結構較完整，使得包覆率較好；而 CS/TPP 重量比由 4/1 上升至 6/1 時，包覆率呈現下降的情況，推測幾丁聚醣加入的比例越多，將會造成其奈米顆粒的結構較為鬆散，因此無法有效地包覆住柚皮素，造成包覆率下降。

Gan 與 Wang(2007)利用低分子量幾丁聚醣包覆牛血清蛋白製備奈米顆粒，實驗結果發現 CS/TPP 重量比越高，牛血清蛋白之包覆率越低，由 61.1 % 下降至 49.2 %，作者推測在 CS/TPP 重量比較低(即三聚磷酸鈉比例較多)時，可能會將整體溶液的 pH 值



圖三十七、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比對於柚皮素包覆率之影響。

Fig. 37. Effect of CS/TPP mass ratio on the naringenin encapsulation Efficiency. (High molecular weight chitosan ; Naringenin concentration : 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

* A-B mean bars (CS/TPP mass ratio) with different letters are significantly different ($p < 0.05$) .

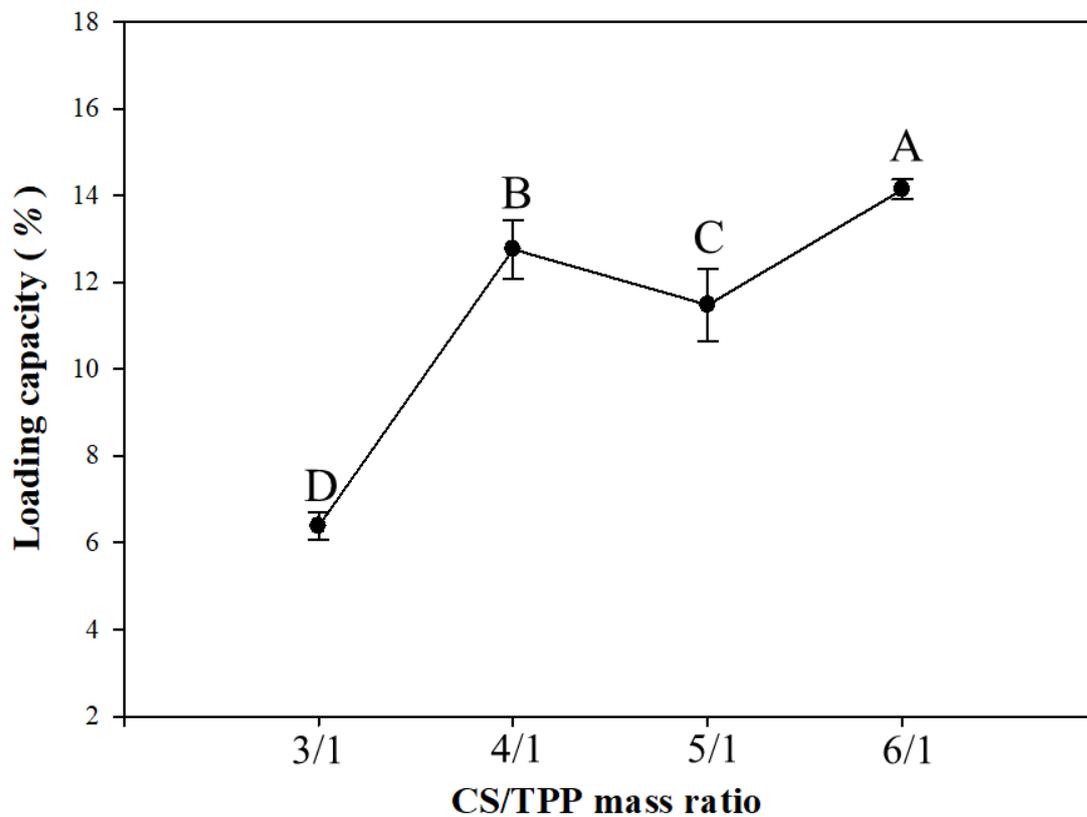
Each value is expressed as mean \pm SD, $n=3$.

升高，使牛血清蛋白攜帶的負電荷增加，藉此加強與幾丁聚醣之間的靜電交互作用。孫(2010)研究以低分子量幾丁聚醣包覆 ISPH 製備奈米顆粒，發現 CS/TPP 重量比為 3/1 及 4/1 時，包覆率較 CS/TPP 重量比為 5/1 及 6/1 時較高，作者推測在較低 CS/TPP 重量比(即 TPP 較多)的條件下，能夠讓幾丁聚醣之 NH_3^+ 與三聚磷酸鈉產生離子交聯的機會增加，形成較多的網狀結構來包覆 ISPH，使得包覆率較高；而當 CS/TPP 重量比增加至 5/1 及 6/1 時，幾丁聚醣與三聚磷酸鈉的反應較不緊密，對 ISPH 捕捉的能力有限，造成包覆率下降。

2. 柚皮素裝載率之影響

圖三十八為不同 CS/TPP 重量比對於柚皮素裝載率之影響。由此圖可見，柚皮素之裝載率是隨著 CS/TPP 重量比自 3/1 提高至 6/1 時，其裝載率自 6.4% 上升至 14.1%。此現象與柚皮素之包覆率有類似之趨勢，即 CS/TPP 重量比增加，柚皮素之包覆率增加，使其裝載率而增加，唯獨在 CS/TPP 重量比為 4/1 至 5/1 時有下降的情況(12.7 至 11.4%)。

孫(2010)以低分子量幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆 ISPH 製備奈米顆粒，結果發現當 CS/TPP 重量比越低時(6/1 至 2/1)，ISPH 之裝載率越低(9.6 至 3.22%)，作者解釋因 CS/TPP 重量比越低時



圖三十八、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比對於柚皮素裝載率之影響。

Fig. 38. Effect of CS/TPP mass ratio on the naringenin loading capacity. (High molecular weight chitosan ; Naringenin concentration : 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

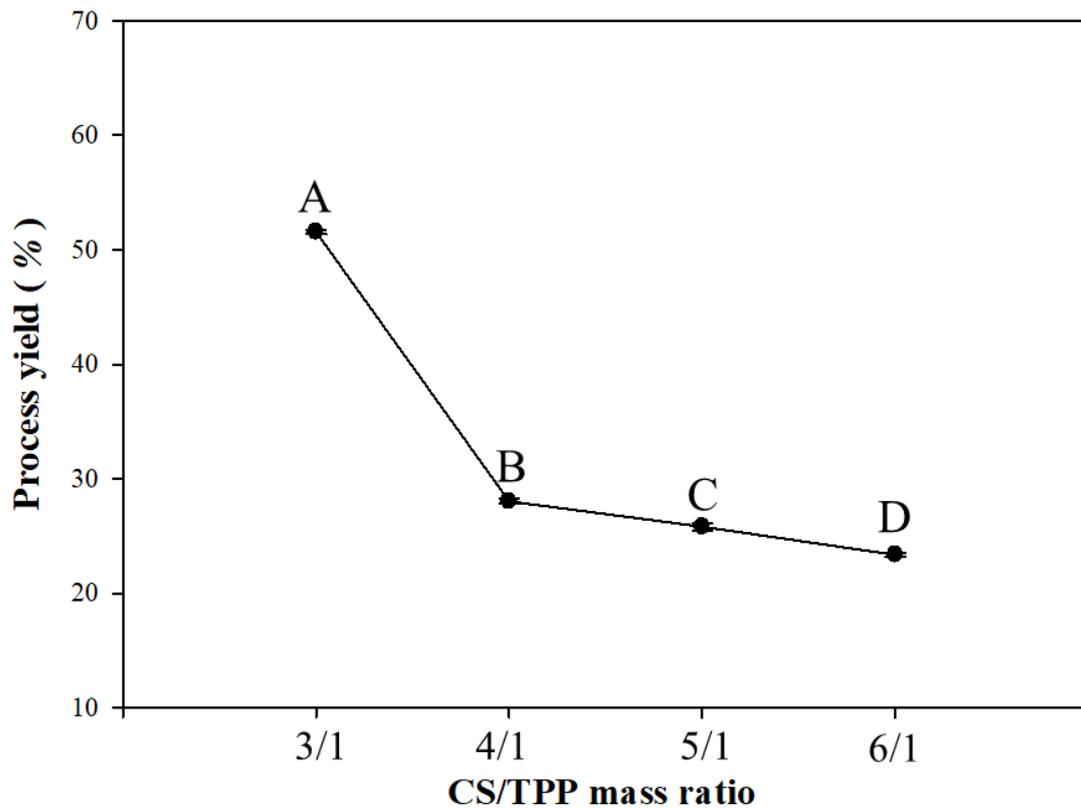
* A-D mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, $n=3$.

(即 TPP 含量越多)，幾丁聚醣與三聚磷酸鈉形成較為緊密的網狀結構，造成 ISPH 沒有較多空間進入奈米顆粒當中，ISPH 裝載率因此下降。陳(2016)利用中分子量幾丁聚醣包覆薑黃素製備奈米顆粒，其結果同樣隨著 CS/TPP 重量比的增加，薑黃素之裝載率自 2 % 上升至 12 %，本實驗結果皆與上述結果相似。

3. 奈米顆粒產率之影響

圖三十九為 CS/TPP 重量比對於奈米顆粒產率之影響，由圖得知，當 CS/TPP 重量比越高，奈米顆粒產率越低，從 51.5 % 下降至 23.6 %。其原因推測為 CS/TPP 重量比越高時，代表所加入的 CS 量越多，但三聚磷酸鈉的量為固定，因此隨著 CS/TPP 重量比的增加，將會有越多的幾丁聚醣無法參與反應，而離開奈米顆粒，使得奈米顆粒之乾重越少，而所加入所有原料所得之乾重為固定的，因此造成奈米顆粒的產率隨著重量比的增加而下降。

孫(2010)以低分子量幾丁聚醣包覆 ISPH 製備奈米顆粒，探討 CS/TPP 重量比對於奈米顆粒產率之影響。結果發現當 CS/TPP 重量比越高，其產率越低，本實驗結果與上述結果相同。



圖三十九、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比對於奈米顆粒產率之影響。

Fig. 39. Effect of CS/TPP mass ratio on the nanoparticle process yield. (High molecular weight chitosan ; Naringenin concentration : 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

* A-D mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, $n=3$.

4. 奈米顆粒平均粒徑之影響

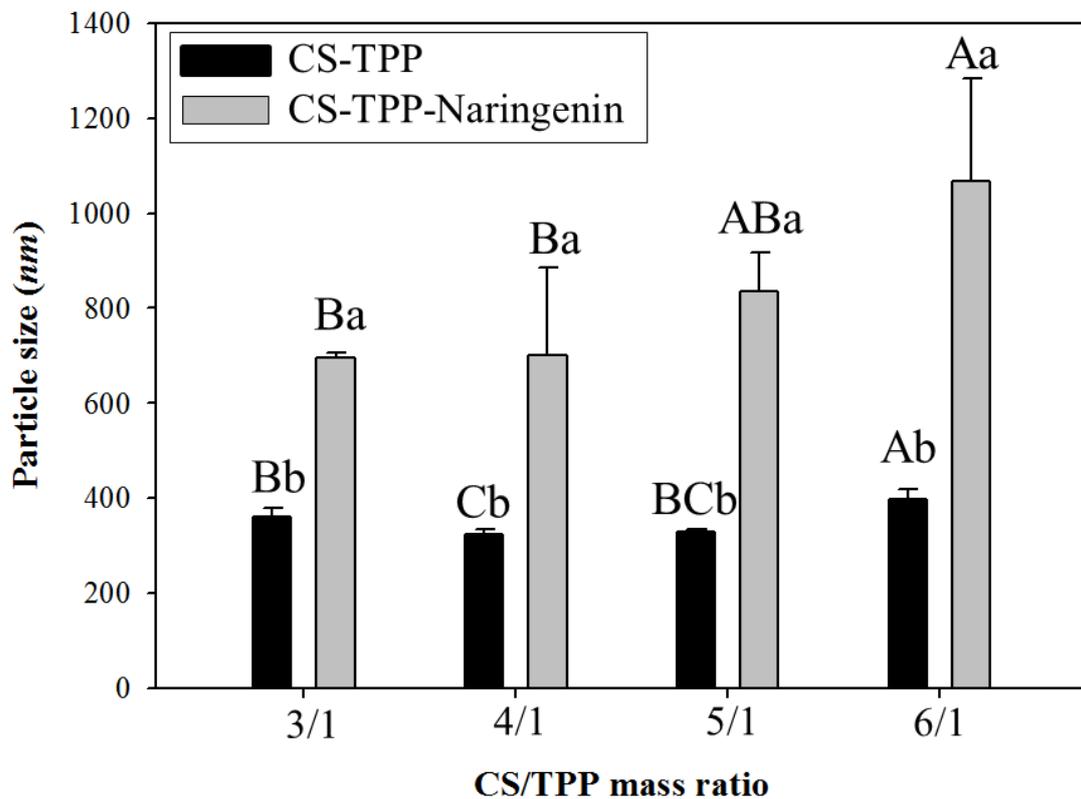
圖四十為 CS/TPP 重量比對於 CS-TPP 及 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒平均粒徑之影響。此圖所示，在未包覆者，即 CS-TPP 奈米顆粒方面，當 CS/TPP 重量比由 3/1 增加至 5/1 時，其奈米顆粒粒徑呈現不明顯的變化，但當 CS/TPP 重量比為 6/1 時，其粒徑增加，此可能由於 CS 濃度過多而 TPP 濃度為固定，造成 CS-TPP 結合網狀不完整，結構寬鬆所致。在包覆者，即 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒方面，其粒徑皆大於 CS-TPP 奈米顆粒，此原因為柚皮素被包覆於其中之故。當 CS/TPP 重量比為 3/1 至 4/1 時，其粒徑變化不明顯約 700 nm，但 CS/TPP 重量比大於 4/1 時，其粒徑開始增加，尤其是 CS/TPP 重量比為 6/1 時，其粒徑為微米程度約 1067 nm，此原因與未包覆者相同。

孫(2010)研究利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆 ISPH 製備奈米顆粒，並探討不同 CS/TPP 重量比對於奈米顆粒粒徑大小的變化，結果發現包覆 ISPH 者其粒徑皆大於未包覆者。而在包覆 ISPH 奈米顆粒方面，當 CS/TPP 重量比為 2/1 上升至 4/1 時，其粒徑大小有逐漸上升的趨勢，作者解釋隨著 TPP 逐漸減少，有部分幾丁聚醣上之 NH_3^+ 無法與 TPP 產生鍵結，造成幾丁聚醣上鏈與鏈之間的斥力增加，立體結構障礙變大，使得粒徑上升。而 CS/TPP

重量比為 4/1 上升至 6/1 時，稀少的 TPP 使得幾丁聚醣無法有效地產生鍵結，形成的網狀結構較少，使得粒徑大小變小。

Xu 等人(2012)研究幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆 interleukin-12 製備奈米顆粒，探討七種不同 CS/TPP 重量比(2/1 至 14/1)對於粒徑大小的影響，結果顯示隨著 CS/TPP 重量比的增加，其粒徑有逐漸上升的趨勢(178 至 372 nm)。

Antoniou 等人(2015)以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉製備奈米顆粒，探討不同 CS/TPP 重量比對於其粒徑大小之影響，結果發現當 CS/TPP 重量比為 6/1 下降至 3/1 時，其粒徑大小逐漸增大，作者解釋隨著 TPP 濃度的增加(即 CS/TPP 重量比越小)，形成的網狀結構越多，使得溶液變得更為混濁，造成奈米顆粒之間互相產生聚集，因此粒徑大小變大。本文之結果與上述結果相反，可能是因為此篇論文探討為單純幾丁聚醣與三聚磷酸鈉製備奈米顆粒，並沒有包覆任何樣品，因此奈米顆粒之粒徑大小不會受到樣品的作用而影響。



圖四十、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉及幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒粒徑大小之影響。

Fig. 40. Effect of CS/TPP mass ratio on the particle size of CS-TPP and CS-TPP-Naringenin nanoparticles.

(High molecular weight chitosan ; Naringenin concentration : $1600 \mu\text{g/mL}$).

* A-C mean bars (CS/TPP mass ratio) with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Each value is expressed as mean \pm SD, $n=3$.

*a-b mean bars (type of nanoparticles) with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Each value is expressed as mean \pm SD, $n=3$.

5. 奈米顆粒表面電位之影響

表四為不同 CS/TPP 重量比對於 CS-TPP 與 CS-TPP-

Naringenin 奈米顆粒表面電位之影響。在未包覆的 CS-TPP 奈米顆粒方面，隨著 CS/TPP 重量比由 3/1 上升至 6/1，其表面電位有微升的趨勢，自 +37.3 mV 上升至 +38.9 mV，推測因 CS/TPP 重量比的增加，帶 NH_3^+ 之 CS 增加所致。在包覆的 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒方面，其表面電位皆低於未包覆者(CS-TPP 奈米顆粒)，原因為柚皮素被包覆於奈米顆粒時，可能會部分遮蔽住幾丁聚醣上之 NH_3^+ 之故，且當 CS/TPP 重量比的增加(3/1 至 6/1)，其奈米顆粒表面之電位隨之增加(+31.3 至 +37.7 mV)，此原因與未包覆之 CS-TPP 奈米顆粒相同。

Xu 等人(2012)利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉製備奈米顆粒包覆 interleukin-12，結果顯示隨著 CS/TPP 重量比的增加其表面電位有逐漸上升的趨勢，作者解釋為過量的幾丁聚醣會使得其表面電位逐漸的上升。另外，當 CS/TPP 越高時(即 10/1 至 14/1)其表面電位並無太大差異。

表四、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉及

幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒表面電位之影響。

Table 4. Effect of CS/TPP mass ratio on the zeta potential of CS-TPP and CS-TPP-Naringenin nanoparticles.

CS/TPP mass ratio	Type of nanoparticle	
	Unloaded	Naringenin-loaded
	ξ potential (mV)	
3/1	+37.3 ± 0.60 ^{Ba}	+31.3 ± 1.30 ^{Bb}
4/1	+37.8 ± 0.49 ^{ABa}	+36.9 ± 0.59 ^{Aa}
5/1	+38.6 ± 0.94 ^{ABa}	+37.1 ± 0.58 ^{Aa}
6/1	+38.9 ± 0.45 ^{Aa}	+37.7 ± 0.05 ^{Ab}

(High molecular weight chitosan ; Naringenin concentration: 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

*A-B mean in the same column (CS/TPP mass ratio) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.

*a-b mean in the same row (type of nanoparticles) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.

Antoniou 等人(2015)研究幾丁聚醣與三聚磷酸鈉製備奈米顆粒，探討不同 CS/TPP 重量比對於其表面電位的影響，結果發現隨著 CS/TPP 重量比的增加，其表面電位有逐漸上升的趨勢，而當 CS/TPP 重量比為 5/1 至 15/1 時，其表面電位幾乎沒有太大的差異，本實驗結果皆與以上結果相似。

綜合上述實驗結果得到，當 CS/TPP 重量比上升時(3/1 至 6/1)，CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒其包覆率在 4/1 至 5/1 時有下降的趨勢(27 至 22 %)，產率也是呈現下降的趨勢(51 至 23 %)，裝載率則是逐漸上升的情況(6 至 14 %)，粒徑大小也是逐漸上升(695 至 1066 nm)，而表面電位也些微上升(+31 mV 至 +37 mV)。因此考慮擁有較佳之包覆率且較高表面電位，並帶有較佳之裝載率的情況下，挑選 CS/TPP 重量比為 4/1 作為後續實驗之條件。

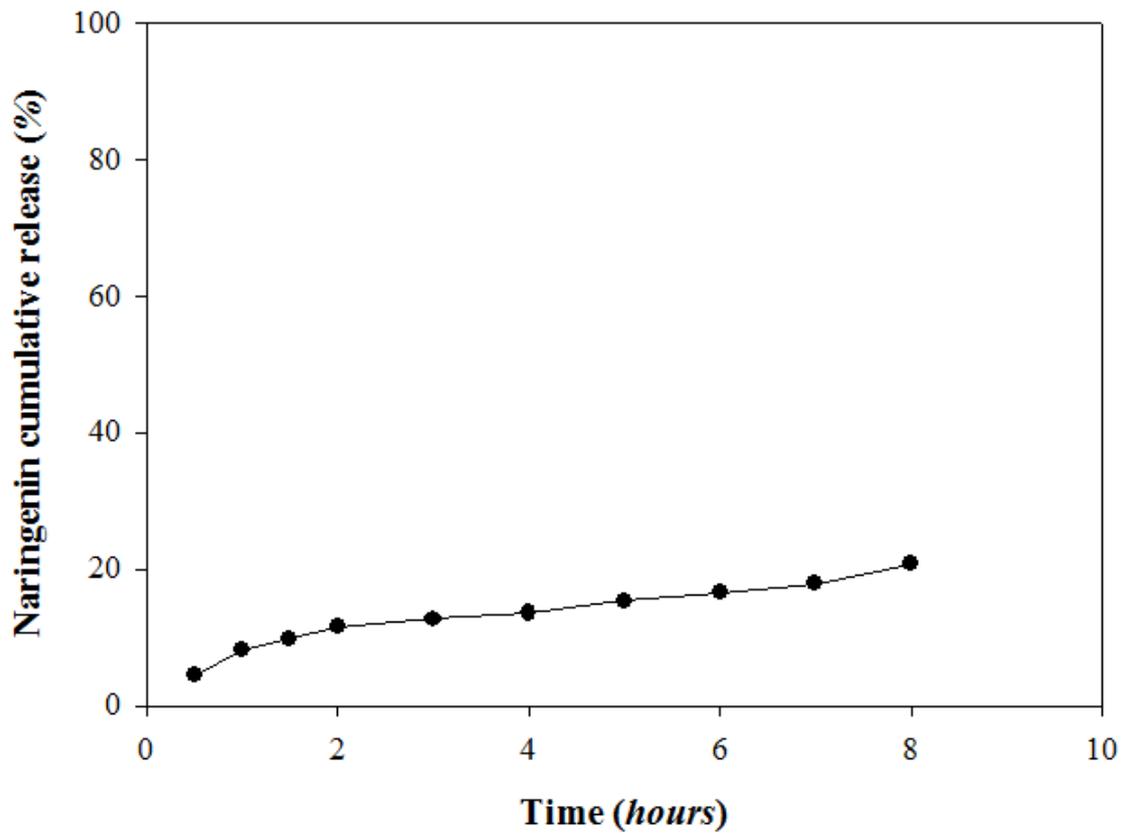
三、 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒於模擬

胃腸道安定性試驗

幾丁聚醣與三聚磷酸鈉形成之奈米顆粒於胃中所含胃蛋白酶 (pepsin) 或於腸中所含胰酶 (pancreatin) 之環境，可能造成奈米顆粒的結構不完整甚至瓦解，因此接下來將透過此實驗來探討 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒在模擬人體胃腸道之安定性。

利用最佳條件：柚皮素濃度為 $1600 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、高分子量之幾丁聚醣 (596 kDa) 及 CS/TPP 重量比為 4/1 時製備之 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒，首先置於含有胃蛋白酶之模擬胃液中 (pH 1.2) 震盪培養 2 小時，接著將此奈米顆粒置於含有胰酶之模擬腸液中 (pH 7.4) 持續震盪培養 6 小時，並分別在不同時間點取樣以觀察柚皮素之釋放情況。

如圖四十一，可觀察到在 2 小時內柚皮素之累積釋放率約為 10%，這表示幾丁聚醣能夠有效保護柚皮素，免於受到模擬人體胃酸及酵素的破壞，約有 90% 之柚皮素依舊受到奈米顆粒的保護。而後續第 2 到 8 小時於模擬人體小腸內之環境時，其釋放率約為 10%。如此，於模擬胃腸液內 8 小時作用，其奈米顆粒中柚皮素只有 20% 被釋放出去，其剩餘 80% 柚皮素仍保留在奈米顆粒中。



圖四十一、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒於模擬胃液及模擬腸液之柚皮素累積釋放率。

Fig. 41. Naringenin cumulative release of CS-TPP-Naringenin nanoparticles in the simulated gastric fluid (pH 1.2 with pepsin) and simulated intestinal fluid (pH 7.4 with pancreatin) system.

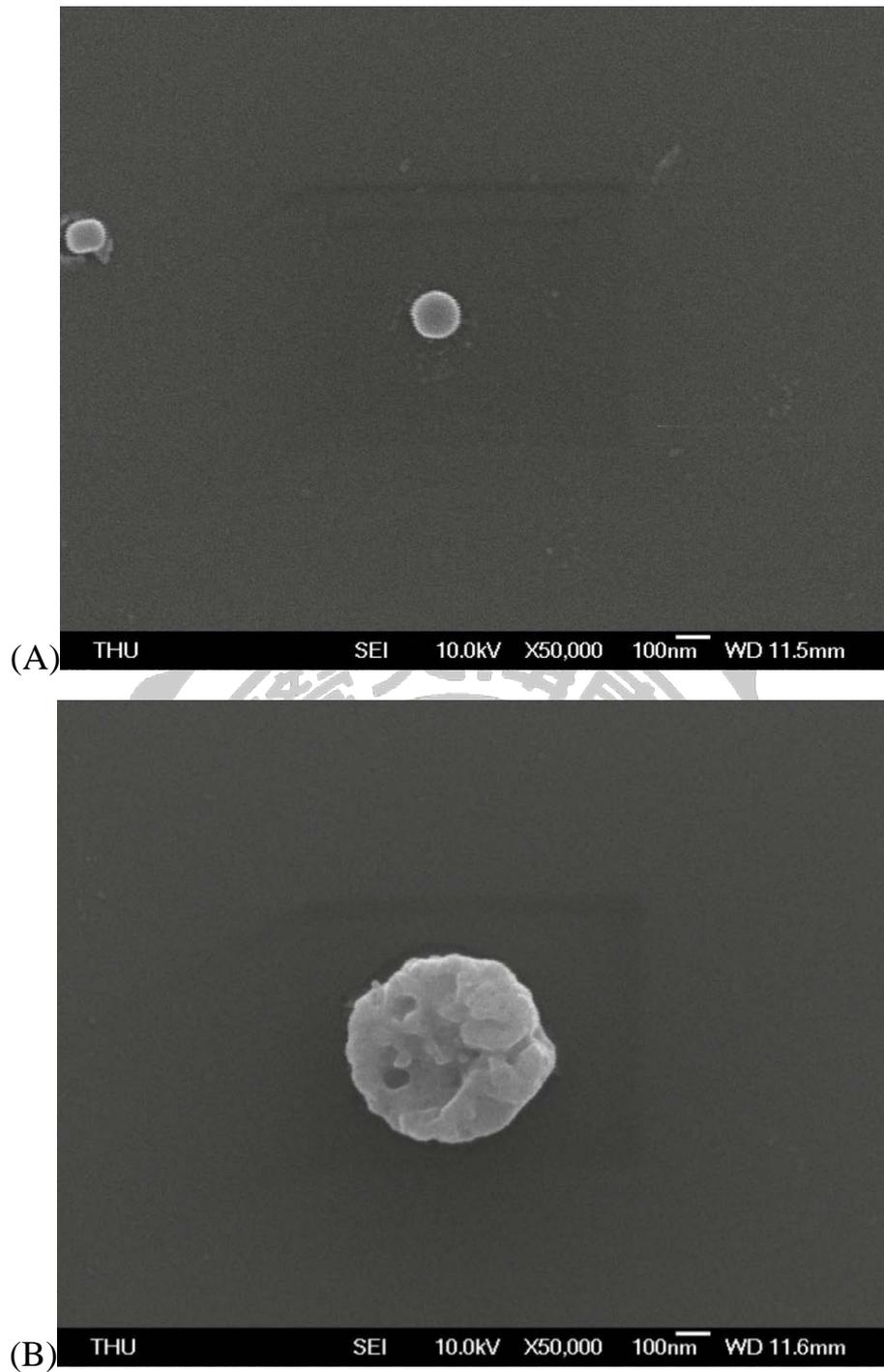
鄭(2015)以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉製備奈米顆粒包覆茄紅素，經由模擬胃腸道試驗中發現茄紅素之累積釋放率不到 1%，表示幾丁聚醣可有效保護茄紅素不受到胃酸及酵素的破壞。Kumar 等人(2015)利用幾丁聚醣製備奈米顆粒包覆柚皮素研究其相關特性，發現以 CS/TPP 重量比為 5/1 時在模擬胃液試驗中，其累積釋放率為 15%，本研究與此實驗結果相似。



四、 掃描式電子顯微鏡觀察幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒外觀型態

圖四十二(A)為掃描式電子顯微鏡拍攝未包覆柚皮素之 CS-TPP 奈米顆粒，在外觀上呈現球狀，粒徑大小約為 200 nm，與經由粒徑分析儀(Zetasizer)測得之結果(325 nm)較為略小，可能因樣品在拍攝前須風乾的影響所致，使得原本在水溶液中較為澎潤之奈米顆粒，因為失去水分而稍微萎縮。圖四十二(B)為包覆柚皮素之 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒，在外觀上也接近球狀，但與 CS-TPP 奈米顆粒外觀相比則較不圓潤，可能是包覆柚皮素的關係使得顆粒的形成無法完整地作用，其粒徑大小約為 600 nm，粒徑大於未包覆之 CS-TPP 奈米顆粒。

Luo 等人(2010)以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉製備奈米顆粒，並透過掃描式電子顯微鏡觀察其外觀型態，結果發現其外觀呈現圓形球狀，而粒徑大小約為 200 至 300 nm。Alishahi 等人(2011)同樣利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉經由離子交聯作用製備奈米顆粒包覆 vitamin C，並觀察其外觀型態，研究發現其外觀呈現球型或是橢圓型等形狀，粒徑大小也較為一致，本文結果皆與以上結果相同。



圖四十二、掃描式電子顯微鏡之觀察。

Fig. 42. Scanning electron micrograph (SEM) of (A) CS-TPP and (B) CS-TPP-Naringenin nanoparticles.

伍、 結論

一、 不同分子量幾丁聚醣之製備

利用臭氧降解法處理幾丁聚醣(Original Mw : 767 kDa)，濃度使用 $6.3\text{g}/\text{m}^3$ 並處理不同時間，結果發現幾丁聚醣之分子量隨著作用時間的增加而減少，經過 60 分鐘的處理後可得到分子量為 50 kDa 之幾丁聚醣，此法為簡單、方便且效率高之降解方法。

二、 不同製備條件對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素 奈米顆粒特性之影響

此實驗探討三種不同條件，包括柚皮素濃度、幾丁聚醣分子量及 CS/TPP 重量比，對於 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒特性影響，如柚皮素之包覆率、裝載率，奈米顆粒之產率、粒徑大小及表面電位。

(一) 柚皮素濃度之影響

當柚皮素濃度由 400 上升至 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒之柚皮素包覆率呈現上升後下降的趨勢，並且在 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時有最高的包覆率(29.2 %)，柚皮素之裝載率由 1.5 % 上升至 11 %，然而奈米顆粒產率反而隨之下降(60 % 至 40 %)，粒徑大小及表面電位的影響似乎不大，皆在奈米的範圍(530 nm 至 600 nm)且帶有正電位(+ 38 mV 至 + 40 mV)，故考量攜帶較多柚皮素之情況，選擇 1600

$\mu\text{g/mL}$ 作為 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒之較佳製備條件。

(二) 幾丁聚醣分子量之影響

幾丁聚醣分子量由 767 kDa(Original Mw)減少至 50 kDa(Low Mw)時，製備之 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒其柚皮素包覆率由 28 % 下降至 24 %，柚皮素之裝載率則略為下降(8.3 %至 6.5 %)，奈米顆粒產率則由 40 %先上升至 50 %後再下降至 46 %，奈米顆粒之平均粒徑及表面電位也隨之下降，粒徑由 663.5 nm 下降至 534.6 nm，電位則是由+ 40.1 mV 下降至+ 21.8 mV。故為了得到較高柚皮素之包覆率及表面電位，同時不損失柚皮素之裝載率及奈米顆粒之產率，挑選 High Mw CS 作為 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒之較佳製備條件。

(三) 幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比之影響

當 CS/TPP 重量比由 3/1 上升至 6/1 時，製備之 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒其柚皮素之包覆率由 27 %下降至 22 %，裝載率由 6 %上升至 14 %，奈米顆粒產率則呈現下降的趨勢，由 51 %下降至 23 %，而粒徑大小與表面電位是逐漸上升的，粒徑由 695 nm 上升至 1066 nm，表面電位由+ 31 mV 增加至+ 37 mV。考慮擁有較佳包覆率的情況下，且帶有較好之柚皮素裝載率及較高表面電位，選擇 CS/TPP 重量比為 4/1 作為製備 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒，於後續探討其模擬胃腸道之安定性試驗。

三、 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒於模擬胃腸道安定性試驗

經由上述實驗結果得到製備 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒之最佳條件為:柚皮素濃度為 1600 $\mu\text{g/mL}$ 、高分子量幾丁聚醣(596 kDa)及 CS/TPP 重量比為 4/1，以此條件製備 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒並進行模擬胃腸道之安定性試驗。將此奈米顆粒置於含有胃蛋白酶之模擬胃液(pH 1.2)培養 2 小時，而後置於含有胰酶之模擬腸液中(pH 7.4)持續培養 6 小時，結果發現在頭 2 小時內柚皮素之釋放率為 10 %，表示此奈米顆粒較為安定，能有效保護柚皮素不受到胃酸及酵素的破壞，而在後續的 6 小時內柚皮素釋放約 10 %，代表此奈米顆粒在腸內仍有 90 %之安定性。

四、 掃描式電子顯微鏡觀察幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮素奈米顆粒外觀型態

利用柚皮素濃度為 1600 $\mu\text{g/mL}$ 、高分子量幾丁聚醣及 CS/TPP 重量比 4/1 製備奈米顆粒，經由 SEM 觀察 CS-TPP 與 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒，其外觀皆為球狀，唯獨 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒外觀較不圓潤，因包覆柚皮素之關係。平均粒徑方面因風乾的影響造成其粒徑皆略小於粒徑分析儀所測得之結果，CS-TPP 奈米顆粒為 200 nm ，CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒為 600 nm 。

五、 總結

以高分子量幾丁聚醣(596 kDa)溶於 1 %醋酸當中，配置 0.2 %濃度之幾丁聚醣水溶液，接著將 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度之柚皮素溶液加入至幾丁聚醣水溶液中混合，最後將三聚磷酸鈉溶液逐滴加入至上述溶液中，使其 CS/TPP 重量比為 4/1，製備 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒。結果發現柚皮素之包覆率為 27 %，裝載率為 12 %，而奈米顆粒外觀呈現球狀，產率為 28 %，粒徑大小為 700 nm，表面電位為 + 36.9 mV。經由模擬胃腸道試驗發現奈米顆粒能有效保護柚皮素不受到胃酸及酵素的破壞，且達到緩慢釋放的效果，未來可進一步利用 Caco-2 細胞探討奈米顆粒於細胞之通透性，並利用動物實驗觀察 CS-TPP-Naringenin 奈米顆粒於動物體內之柚皮素吸收情況。

陸、參考文獻

- 刁秀華 (1993)。高級氧化預處理對自來水中含氯有機物生成之影響。國立台灣大學環境工程學研究所碩士論文。台北，台灣。
- 吳靜玫 (2008)。以不同分子量之幾丁聚醣包覆牛血清蛋白及舞菇多醣及其奈米顆粒製備之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。台中，台灣。
- 沈家弘 (2004)。不同去乙醯度幾丁聚醣乳化性質之比較及應用於沙拉醬之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。台中，台灣。
- 林希奇 (2012)。槲皮素奈米顆粒之製備及特性之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。台中，台灣。
- 洪偉珊 (2014)。幾丁聚醣水解物-三聚磷酸鈉-鈣-維生素 D₃ 奈米顆粒之製備及特性之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。台中，台灣。
- 范國烜 (2003)。幾丁聚醣奈米粒之製備及其應用於紅黴素控制釋放之探討。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文。基隆，台灣。
- 柯建邦 (2006)。不同去乙醯度膠態幾丁聚醣乳化性質之比較及其應用於冰淇淋之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。台中，台灣。
- 馬遠榮 (2002)。奈米科技。應用物理學。1: 30-33。
- 孫百秀 (2010)。分離大豆蛋白質水解物奈米顆粒之製備及特性之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。台中，台灣。
- 陳美惠、莊淑惠及吳志津 (1999)。幾丁聚醣的物化特性。食品工業。31: 1-6。

- 陳怡臻 (2016)。幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-薑黃素奈米顆粒之製備及特性研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。台中，台灣。
- 楊欣樺 (2008)。幾丁聚醣水解物-三聚磷酸鈉-表沒食子兒茶素沒食子酸酯奈米顆粒之製備及其特性之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。台中，台灣。
- 葉文彬 (2010)。幾丁聚醣之製備及其於農業之應用。臺中區農業改良場特刊，105: 127-131。
- 鄭文華 (2015)。幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-茄紅素奈米顆粒之製備及特性研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。台中，台灣。
- Aiba S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules.*, 14: 225-228.
- Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N. and Aminabhavi T.M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release.*, 100: 5-28.
- Alishahi A., Mirvaghefi A., Tehrani M.R., Farahmand H., Shojaosadati S.A., Dorkoosh F.A. and Elsabee M.Z. (2011). Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. *Food Chemistry.*, 126: 935-940.
- Antoniou J., Liu F., Majeed H., Qi J., Yokoyama W. and Zhong F. (2015). Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.*, 465: 137-146.
- Bernkop-Schnürch A. and Dünnhaupt S. (2012). Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.*, 81: 463-469.

- Bhise K., Dhumal R., Paradkar A. and Kadam S. (2008). Effect of drying methods on swelling, erosion and drug release from chitosan-naproxen sodium complexes. *AAPS PharmSciTech.*, 9: 1-12.
- Biesaga M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A.*, 1218: 2505-2512.
- Bodet C., La V.D., Epifano F. and Grenier D. (2008). Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. *Journal of Periodontal Research.*, 43: 400-407.
- Borradaile N.M., Carroll K.K. and Kurowska E.M. (1999). Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids.*, 34: 591-598.
- Butkovi V., Klasinc L. and Bors W. (2004). Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 52: 2816-2820.
- Dekkers S., Krystek P., Peters R.J., Lankveld D.X., Bokkers B.G., Hoeven-Arentzen P.H. van, Bouwmeester H. and Oomen A.G. (2011). Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology.*, 5: 393-405.
- Denker S.P., Ji S., Dingman A., Lee S.Y., Derugin N., Wendland M.F. and Vexler Z.S. (2007). Macrophages are comprised of resident brain microglia not infiltrating peripheral monocytes acutely after neonatal stroke. *J Neurochem.*, 100: 893-904.
- Dingler A. and Gohla S. (2002). Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. *Journal of Microencapsulation.*, 19: 11-16.
- Erlund I., Meririnne E., Alfthan G. and Aro A. (2001). Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in

- humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *Journal of Nutrition.*, 131: 235-241.
- Erlund I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research.*, 24: 851-874.
- Farajtabar A. and Gharib F. (2013). Spectral analysis of naringenin deprotonation in aqueous ethanol solutions. *Chemical Papers.*, 67: 538-545.
- Felgines C., Texier O., Morand C., Manach C., Scalbert A., Regerat F. and Remesy C. (2000). Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology.*, 279: G1148-G1154.
- Gan Q. and Wang T. (2007). Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, 59: 24-34.
- He P., Davis S.S. and Illum L. (1999). Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics.*, 187: 53-65.
- He X. and Hwang H.M. (2016). Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *Journal of Food and Drug Analysis.*, 24: 671-681.
- Hoigne J. and Bader H. (1983). Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water—II: Dissociating organic compounds. *Water Research.*, 17: 185-194.
- Hollman P.C., Bijlsman M.N., Van Gameren Y. , Cnossen E.P., de Vries J.H. and Katan M.B. (1999). The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man.

Free Radical Research., 31: 569-573.

Hsieh F.M., Huang C., Lin T.F., Chen Y.M. and Lin J.C. (2008). Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. *Process Biochemistry.*, 43: 83-92.

Ilk S., Sağlam N., Özgen M. and Korkusuz F. (2017). Chitosan nanoparticles enhances the anti-quorum sensing activity of kaempferol. *International Journal of Biological Macromolecules.*, 94: 653-662.

Illum L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Res.*, 15: 1326-1331.

Ishii K., Furuta T. and Kasuya Y. (1996). Determination of naringin and naringenin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 683: 225-229.

Jabbari M., Mir H., Kannani A. and Ajloo D. (2014). Kinetic solvent effects on the reaction between flavonoid naringenin and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in different aqueous solutions of ethanol: An experimental and theoretical study. *Journal of Molecular Liquids.*, 196: 381-391.

Jeon Y.J., Shahidi F. and Kim S.K. (2000). Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Rev.Int.*, 16: 159-176.

Jintapattanakit A., Junyaprasert V.B. and Kissel T.(2009). The role of mucoadhesion of trimethyl chitosan and PEGylated trimethyl chitosan nanocomplexes in insulin uptake. *J. Pharm. Sci.*, 98: 4818–4830.

- Jung H.A., Paudel P., Seong S.H., Min B.S. and Choi J.S. (2017). Structure-related protein tyrosine phosphatase 1B inhibition by naringenin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, 27: 2274-2280.
- Kabal' nova N. N., Murinov K. Y., Mullagaliev I. R., Krasnogorskaya N. N., Shereshovet V. V., Monakov Y. B. and Zaikov G. E. (2001). Oxidative destruction of chitosan under the effect of ozone and hydrogen peroxide. *Applied Polymer Science.* 81: 875-881.
- Kanaze F.I., Bounartzi M.I., Georgarakis M. and Niopas I. (2007). Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition.*, 61: 472-477.
- Kawashima Y., Handa T., Kasai A., Takenaka H., Lin S.Y. and Ando Y. (1985). Novel Method for the Preparation of Controlled-Release Theophylline Granules Coated with a Polyelectrolyte Complex of Sodium Polyphosphate-Chitosan. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 74: 264-268.
- Khan M.K., Huma Z.E. and Dangles O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis.*, 33: 85-104.
- Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.-H., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C.Y., Kim Y.K., Lee Y.S., Jeong D.H. and Cho M.H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.*, 3: 95-101.
- Kipp J.E. (2004). The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics.*, 284: 109-122.
- Knorr D. (1984). Use of chitinous polymers in food: A challenge for food

research and development. *Food Technology.*, 38: 85-97.

- Krajewska B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilization: a review. *Enzyme and Microbial Technology.*, 35: 126-139.
- Krause K. and Galensa R. (1992). Determination of naringenin and naringenin-chalcone in tomato skins by reversed phase HPLC after solid phase extraction. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung.*, 194: 29-32.
- Kumar S.P., Birundha K., Kaveri K. and Ramya Devi K.T. (2015). Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing naringenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules.*, 78: 87-95.
- Kurowska E.M., Borradaile N.M., Spence J.D., and Carrol C.C. (2000). Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. *Nutrition Research.*, 20: 121-129.
- Lan E.H., Dunn B. and Zink J.I. (2005). Nanostructured Systems for Biological Materials. In Vo-Dinh T. (Ed.), *Protein nanotechnology* New Jersey: Humana Press Inc., 53-80.
- Langlais B., Reckhow D. A. and Brink D. R. (1991). Ozone in water treatment : application and engineering : cooperative research report. *American Water Works Association Research Foundation, Compagnie Generale des Eaux, Lewis Publishers, Michigan.*
- Lee M.K., Lim S.J. and Kim C.K. (2007). Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles. *Biomaterials.*, 28: 2137-2146.
- Lemmer H.J.R. and Hamman J.H. (2013). Paracellular drug absorption enhancement through tight junction modulation. *Expert Opinion on*

Drug Delivery., 10: 103-114.

Leong Y.S. and Candau F. (1982). Inverse microemulsion polymerization. *Journal of Physical Chemistry.*, 86: 2269-2271.

Li N., Ma L.L., Wang J., Zheng L., Liu J., Duan Y.M., Liu H.T., Zhao X.Y., Wang S.S., Wang H., Hong F.H. and Xie Y.N. (2010). Interaction Between Nano-Anatase TiO₂ and Liver DNA from Mice In Vivo. *Nanoscale Res Lett.*, 5: 108-115.

Li X., Li W., Jiang Y., Ding Y., Yun J., Tang Y. and Zhang P. (2011). Effect of nano-ZnO-coated active packaging on quality of fresh-cut 'Fuji' apple. *International Journal of Food Science and Technology.*, 46: 1947-1955.

Liu Y., Tang J., Chen X. and Xin J. H. (2005). Decoration of carbon nanotubes with chitosan. *Carbohydrate. Res.*, 43: 3178-3180.

Lueßen H.L., Leeuw B.J. de , Langemeijer M.W.E., Boer A.G. de, Verhoef J.C. and Junginger H.E. (1996). Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin in vivo. *Pharm. Res.*, 13: 1668-1672.

Luo Y.C., Zhang B., Cheng W.H. and Wang Q. (2010). Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. *Carbohydrate Polymers.*, 82: 942-951.

Manach C., Morand C., Gil-Izquierdo A., Bouteloup-Demange C. and Rémésy C. (2003). Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *European Journal of Clinical Nutrition.*, 57: 235-242.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L. (2004).

Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition.*, 79: 727-747.

McClements D.J., Xiao H. and Demokritou P. (2017). Physicochemical and colloidal aspects of food matrix effects on gastrointestinal fate of ingested inorganic nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science.*

Mi F.L., Shyu S.S., Lee S.T. and Wong T.B. (1999). Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *Journal of Polymer Science.*, 37: 1551-1564.

Mukhopadhyay P., Mishra R., Rana D. and Kundu P.P. (2012). Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progress in Polymer Science.*, 37: 1457-1475.

Muzzarelli R. A. A. (1977). Chitin. *Oxford:Pergamon.* 220-228.

Nahmias Y., Goldwasser J., Casali M., van Poll D., Wakita T., Chung R.T. and Yarmush M.L. (2008). Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology.*, 47: 1437-1435.

Nishimura K., Nishimura S., Seo H., Nishi N., Tokura S. and Azuma I. (1986). Macrophage activation with multiporous beads prepared from partially deacetylated chitin. *Journal of Biomedical Materials Research.*, 20: 1359-1372.

Pan Y., Li Y.J., Zhao H.Y., Zheng J.M., Xu H., Wei G., Hao J.S. and Cui F.D. (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International Journal of Pharmaceutics.*, 249: 139-147.

- Pescina S., Sonvico F., Santi P. and Nicoli S. (2015). Therapeutics and carriers: the dual role of proteins in nanoparticles for ocular delivery. *Current Topics in Medicinal Chemistry.*, 15: 369-385.
- Pooja D., Tunki L., Kulhari H., Reddy B.B. and Sistla R. (2015). Characterization, biorecognitive activity and stability of WGA grafted lipid nanostructures for the controlled delivery of rifampicin. *Chemistry and Physics of Lipids.*, 193: 11-17.
- Pooja D., Tunki L., Kulhari H., Reddy B.B. and Sistla R. (2016). Optimization of solid lipid nanoparticles prepared by a single emulsification-solvent evaporation method. *Data in Brief.*, 6: 15-19.
- Puri M., Marwaha S.S., Kothari R.M. and Kennedy J.F. (1996). Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the debittering of kinnow juice. *Enzyme and Microbiol Technology.*, 18: 281-285.
- Reis C.P., Ribeiro A.J., Houng S., Veiga F. and Neufeld R.J. (2007). Nanoparticulate delivery system for insulin: design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 30: 392-397.
- Ribeiro I.A., Rocha J., Sepodes B., Mota-Filipe H. and Ribeiro M.H. (2008). Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 52-53: 13-18.
- Ribeiro D. A., Buttros J. B., Oshima C. T., Bergamaschi C. T. and Campos R. R. (2009). Ascorbic acid prevents acute myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: role of inducible nitric oxide synthase production. *Journal of Molecular Histology.*, 40: 99-105.
- Rouget C. (1859). Des substances amylase dans le tissue des animaux,

specialement les *Atricules (Chitine)*. *Comp. Rend.*, 48: 792-795.

Salvia-Trujillo L., Martín-Belloso O. and McClements D.J. (2016). Excipient nanoemulsions for improving oral bioavailability of bioactives. *Nanomaterials.*, 6: 17.

Sáiz-Abajo M.J., González-Ferrero C., Moreno-Ruiz A., Romo-Hualde A. and González-Navarro C.J. (2013). Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. *Food Chemistry.*, 138: 1581-1587.

Schipper N.G.M., Vårum K.M. and Artursson P. (1996). Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (caco-2) cells. *Pharm. Res.*, 13: 1686-1692.

Schipper N.G.M., Olsson S., Hoogstraate J.A., deBoer A.G., Vårum K.M. and Artursson P. (1997). Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res.*, 14: 923-929.

Shah S., Pal A., Kaushik V.K. and Devi S. (2009). Preparation and characterization of venlaxine hydrochloride-loaded chitosan nanoparticles and in vitro release of drug. *Journal of Applied Polymer Science.*, 112: 2876-2887.

Slimestad R., Fossen T. and Verheul M.J. (2008). The flavonoids of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 56: 2436-2441.

Sun W., Mao S., Wang Y., Junyaprasert V.B., Zhang T., Na L. and Wang J. (2010). Bioadhesion and oral absorption of enoxaparin nanocomplexes. *Int. J. Pharm.* 386: 275-281.

- Tikhonov V.E., Stepnova E.A., Babak V.G., Yamskov I.A., Palma-Guerrero J. and Jansson H.B. (2006). Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-(2-(3-(dodec-2-enyl) succinoyl)-derivatives. *Carbohydrate Polymers.*, 64: 66-72.
- Toei K. and Kohara T. (1976). A conductometric method for colloid titrations. *Analytica Chimica Acta.*, 83: 59-65.
- Tokumitsu H., Ichikawa H. and Fukumori Y. (1999). Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron capture therapy of cancer: preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization. *Pharmaceutical Research.*, 16: 1830-1835.
- Tokura S., Ueno K., Miyazaki S. and Nishi N. (1997). Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. *Macromolecular Symposiums.*, 120: 1-9.
- Torres L., Carreras A., Jimenez A., Brillas E., Torrelles X., Rius J. and Julia L. (2007). Reducing Power of Simple Polyphenols by Electron-Transfer Reactions Using a New Stable Radical of the PTM Series, Tris(2,3,5,6-tetrachloro-4-nitrophenyl)methyl Radical. *The Journal of Organic Chemistry.*, 72: 3750-3756.
- Trapani A., Lopodota A., Franco M., Cioffi N., Ieva E., Garcia-Fuentes M. and Alonso M.J. (2010). A comparative study of chitosan and chitosan/cyclodextrin nanoparticles as potential carriers for the oral delivery of small peptides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 75: 26-32.
- U.S. FDA. (2015). Color additive status list. accessed 18.07.16.
- Vafeiadou K., Vauzour D., Lee H.Y., Rodriguez-Mateos A., Williams R.J. and Spencer J.P.E. (2009). The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against

neuroinflammatory injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 484: 100-109.

Van Acker F.A.A., Schouten O., Haenen G.R., Van Dervijgh W.J.F. and Bast A. (2000). Flavonoids can replace α -tocopherol as an antioxidant. *FEBS Letters.*, 473: 145-148.

Vinogradov S.V., Bronich T.K. and Kabanov A.V. (2002). Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, 54: 135-147.

Vo-Dinh T. (2005). Protein nanotechnology: The new frontier in biosciences. In Vo-Dinh T. (Ed.), Protein nanotechnology. New Jersey: Humana Press Inc., 1-14.

Wang Q., Tang X.N. and Yenari M.A. (2007). The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.*, 184: 53-68.

Watari F., Abe S., Koyama C., Yokoyama A., Akasaka T., Uo M., Matsuoka M., Totsuka Y., Esaki M., Morita M. and Yonezawa T. (2008). Behavior of in vitro, in vivo and internal motion of micro/nano particles of titanium, titanium oxides and others. *Journal of the Ceramic Society of Japan.*, 116: 1-5.

Weiss J. (1935). Investigations on the radical HO_2 in solution. *Trans. Far Soc.*, 31: 668-687.

Wright J.S., Johnson E.R. and DiLabio G.A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society.*, 123: 1173-83.

Wu Y., Yang W., Wang C., Hu J. and Fu S. (2005). Chitosan nanoparticles

as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics.*, 295: 235-245.

Xu Q., Guo L.C., Gu X.H., Zhang B., Hu X., Zhang J.J., Chen J.H., Wang Y., Chen C., Gao B., Kuang Y.T. and Wang S.L. (2012). Prevention of colorectal cancer liver metastasis by exploiting liver immunity via chitosan-TPP/nanoparticles formulated with IL-12. *Biomaterials.*, 33: 3909-3918.

Yamamoto H., Kuno Y., Sugimoto S., Takeuchi H. and Kawashima Y. (2005). Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *Journal of Controlled Release.*, 102: 373-381.

Yigit D., Yigit N. and Mavi A. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*, 42: 346-352.

Youssef A.M. (2013). Polymer nanocomposites as a new trend for packaging applications. *Polymer-Plastics Technology and Engineering.*, 52: 635-660.

Yue W., Yao P., Wei Y., Li S., Lai F. and Liu X. (2008). An innovative method for preparation of acid-free-water-soluble low-molecular-weight chitosan (AFWSLMWC). *Food Chemistry.*, 108: 1082-1087.