

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-鞣花酸奈米顆粒
之製備及特性研究

Preparation and Characterization of Chitosan-
Sodium Tripolyphosphate-Ellagic Acid Nanoparticles

洪紹華

Shao-Hua Hung

指導教授：徐詮亮 博士

指導教授：阮進惠 博士

Advisor: Chuan-Liang Hsu, Ph.D.

Advisor: Jin-Hwei Rwan, Ph.D.

中華民國一百零八年一月

Januar, 2019

謝誌

在研讀研究所學位這段期間，得到太多人的幫助請容許我沒有逐一詳列，首先感恩恩師 阮進惠 博士細心的指導，給予耐心、關心以及愛心在實驗以及論文完成的這段時間裡，總是分享自身親身的經驗和經歷，給予建議的不只是論文和實驗，還有生命中重要的建議等等，在此致上最真誠且深深的謝意。

感恩另一位恩師 徐詮亮 博士，除了耐心地幫我修正我論文之外，在我數次心志低迷時，給予我肯定，非常感謝老師的用心以及關懷。

感謝國立屏東科技大學食品科學系 吳明昌 博士，給予非常仔細的論文建議，在百忙之中特別抽空審閱內容，使內容充實。

這段時間感謝系上專業教授的指導：蔡正宗 博士、蘇正德 博士、謝陸盛 博士、江文德 博士、梁志弘 博士、邱志穎 博士，總是使我受益良多並且協助我解決許多實驗上的困惑，還有本校化材系張有義 博士、韓怡娟 助教相當慷慨的借出儀器，使實驗能夠順利完成。

特別感謝在系辦的女神們：王姊、淑瑜、怡君、敏純、柏逸助教，幫忙我解決行政作業上繁複的作業流程，感謝實驗室的前輩們文華學長、怡臻學姊、柏漢學長在關鍵的時刻給予我建議；感謝萬宇學長、閔鴻學長有耐心的陪伴並且提點我，真的非常感謝你們、能夠這間實驗室學習真的很棒。

感恩衛生保健組的仙女們：淑玲 老師、碧珍 老師、亭盈 老師、思瑩 老師、又萱 老師、家綺 老師、雅足 老師、佩琪 老師，在我實驗進度上卡關的時候，給予我新的心情，學習關於健康的知識、活動舉辦、還擁有一顆溫暖的心、付出並且給予他人關愛，能當衛保組的夥伴，真的是令我非常的感動。

謝謝我的同班好同學：琤綾總是給予我幫忙協助解決我的困難、仁宜總是等待且陪伴我做實驗、佳茵協助我解決電腦技術上的困難、惟智和欣瑜陪我組隊完成作業。另外我還要感謝一位重要的夥伴俊哲，他總是很有耐心的關懷我，給予我協助和幫忙，這段時間能認識你們真的非常的幸福。

最重要的還要感謝我的家人們：父親、母親、妹妹，在這段時間內無條件的支持並且鼓勵，以及親戚們的關心，這份情感是我無法用言語形容的感恩。真的非常的謝謝你們。

洪紹華 謹致於

東海大學食品科學研究所

中華民國一百零七年一月

目錄

目錄.....	I
圖目錄.....	IV
表目錄.....	VI
中文摘要.....	VII
英文摘要.....	IX
壹、前言.....	1
貳、文獻整理.....	2
一、幾丁質與幾丁聚醣.....	2
(一)幾丁質與幾丁聚醣介紹及結構.....	2
(二)幾丁聚醣溶液之特性.....	4
(三)幾丁聚醣分子量之降解.....	6
(四)幾丁聚醣應用於控制藥物釋放.....	8
二、奈米科技.....	11
(一)奈米科技簡介.....	11
(二)奈米技術應用於食品.....	12
(三)奈米顆粒藥物.....	15
(四)奈米藥物之安全性及評估.....	16
三、幾丁聚醣奈米顆粒.....	17
(一)幾丁聚醣奈米顆粒之製備方法.....	17
(二)離子交聯法製備幾丁聚醣奈米顆粒.....	23
四、鞣花酸.....	26
(一)鞣花酸簡介.....	26
(二)鞣花酸之生理機能.....	29
(三)鞣花酸之生物利用率.....	30
參、材料與方法.....	31

一、實驗材料與樣品	31
二、實驗儀器	32
三、樣品製備	33
(一)幾丁聚醣製備	33
(二)不同分子量幾丁聚醣之製備	34
(三)鞣花酸溶解性測試	34
四、實驗方法	35
(一)幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒之製備	35
(二)幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒於胃腸安定性模擬實驗	37
五、分析方法	38
(一)幾丁聚醣去乙醯度之測定	38
(二)降解幾丁聚醣樣品分子量之測定	39
(三)鞣花酸包覆率、裝載率及奈米顆粒產率之測定	40
(四)鞣花酸定量方式	42
(五)奈米顆粒粒徑及表面電位之測定	43
(六)統計分析	44
肆、結果與討論	45
一、樣品製備	45
(一)幾丁聚醣製備	45
(二)幾丁聚醣分子量之製備	45
(三)鞣花酸溶解性測試	47
二、製備條件對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒特性之影響	48
(一)鞣花酸濃度之影響	48
(二)幾丁聚醣分子量之影響	60
(三)CS/TPP 重量比之影響	72
三、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒於胃腸安定性模擬實驗	83

伍、結論.....	86
陸、參考文獻.....	90

圖目錄

圖一、幾丁質、幾丁聚醣及纖維素之基本結構	3
圖二、幾丁聚醣在酸性溶液中之結構.....	5
圖三、臭氧降解法實驗流程.....	7
圖四、幾丁聚醣之特性對於多種藥物傳遞系統的發展	9
圖五、奈米技術提升食品安全和品質.....	14
圖六、合成幾丁聚醣奈米顆粒各種方法示意圖	21
圖七、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉之離子交聯示意圖	24
圖八、鞣花酸之化學結構.....	27
圖九、鞣花酸其衍生物之化學結構.....	28
圖十、臭氧處理時間對幾丁聚醣降解程度之影響	46
圖十一、鞣花酸濃度對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒包覆率之影響	50
圖十二、鞣花酸濃度對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒粒 徑大小之影響.....	52
圖十三、鞣花酸濃度對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒裝載率之影響	56
圖十四、鞣花酸濃度對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒產率之影響	58
圖十五、幾丁聚醣分子量對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒包覆率之影響	62
圖十六、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-鞣花酸奈米顆粒粒徑大小之影響	64
圖十七、幾丁聚醣分子量對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒裝載率之影響	68
圖十八、幾丁聚醣分子量對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒產率之影響 ..	70
圖十九、CS/TPP 重量比對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒包覆率之影響..	73
圖二十、CS/TPP 重量比對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉及幾丁聚醣-三聚磷 酸鈉-鞣花酸奈米顆粒粒徑大小之影響	75
圖二一、CS/TPP 重量比對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒裝載率之影響..	79
圖二二、CS/TPP 重量比對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒產率之影響....	81

圖二三、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒於模擬胃液及模擬腸液
之鞣花酸累積釋放率..... 85

表目錄

表一、鞣花酸對若干溶劑之溶解性.....	46
表二、鞣花酸濃度對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒表面電位 之影響.....	53
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-鞣花酸奈米顆粒表面電位之影響.....	65
表四、CS/TPP 重量比對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉及幾丁聚醣-三聚磷酸鈉- 鞣花酸奈米顆粒表面電位之影響.....	76

中文摘要

本研究以帶正電之幾丁聚醣(Chitosan,CS,去乙酰度 $\geq 85\%$)及帶負電之三聚磷酸鈉(Sodium tripolyphosphate,TPP),利用離子交聯作用之方式包覆鞣花酸(Ellagic acid,EA)製成奈米顆粒。先以臭氧降解幾丁聚醣(Original Mw,735 kDa)成高分子量(High Mw,約 511 kDa)、中分子量(Medium Mw,約 296 kDa)以及低分子量(Low Mw,約 46 kDa)等不同分子量之CS,並分別溶於1%醋酸溶液使濃度約為0.2%(w/v)且將pH值調至4.7;將不同濃度(100~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之鞣花酸溶液,與上述之CS溶液充分混勻,接著滴入TPP(pH 9.0)溶液使CS/TPP重量比3/1、4/1、5/1、6/1,製備成幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸(CS-TPP-ellagic acid)奈米顆粒,並探討鞣花酸濃度、幾丁聚醣分子量及CS/TPP重量比對於CS-TPP-ellagic acid奈米顆粒之包覆率、裝載率、產率、粒徑、表面電位等性質,以選定出較為適當的幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒。結果顯示,鞣花酸濃度600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、幾丁聚醣分子量以原分子量(Original Mw,735 kDa)及CS/TPP重量比3/1為最適選定的條件,其包覆率約45-50%、裝載率3%、產率約65%、粒徑大小約300 nm、表面電位約35-40mV。另外使用上述條件製出奈米顆粒放置於模擬腸胃道並探討其安定性,發現置於模擬胃液pH 1.2之胃蛋白酶(Pepsin)作用2個小時之後發現約有20%鞣花酸釋放

出奈米顆粒，表示此包覆有良好抗胃酸及胃酵素作用。繼續加入模擬腸液 pH 7.4 之胰酶(Pancreatin)繼續作用 6 小時，則鞣花酸累積釋放率約從 50 %到 70 %，表示幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒在模擬腸液環境中，幾丁聚醣奈米顆粒結構變為蓬鬆，釋放出鞣花酸。

關鍵字:幾丁聚醣、鞣花酸、三聚磷酸鈉、奈米顆粒、

模擬胃腸道之安定性

Abstract

Chitosan (CS, original Mw 735 kDa, deacetylation \geq 85%) were degraded by O₃ oxidation into various molecular weights (High Mw 511 kDa, Medium Mw 296 kDa, and Low Mw 46 kDa), then dissolved into a 2 mg/mL concentration and adjusted to pH 4.7, then mixed individually with various concentrations of ellagic acid solution (100-1000 μ g/mL). The mixed solutions were added dropwise with the sodium tripolyphosphate solution (TPP, pH 9.0) at different CS/TPP mass ratio of 3:1, 4:1, 5:1 and 6:1 to prepare CS-TPP- Ellagic acid nanoparticles. Such effective factors as ellagic acid concentration, chitosan molecular weight, and CS/TPP mass ratio on the encapsulation efficiency (EE) ,loading capacity, process yield, particle size and zeta potential of the nanoparticles were investigated.As a result, a suitable ellagic acid concentration 600 μ g/mL, original Mw of 735 kDa and CS/TPP ratio of 3/1 that gave an encapsulation efficiency of 45-50 % , a loading capacity of 3 % , a process yield of about 65%, a nanoparticle size of about 300 nm and a zeta potential of +35~+40mV. Simulated gastrointestinal stability was carried out by mixing the CS-TPP-Ellagic acid nanoparticles in the simulated gastric fluid (pH1.2,with pepsin)for 2 hours and then in the simulated intestinal fluid (pH7.4,with pancreatin)for 6 hours,that showed about 20 % and 70 % ellagic acid released respectively .

Key words: Chitosan, Ellagic acid, Sodium tripolyphosphate,
Nanoparticles, Simulated gastrointestinal stability,

壹、前言

鞣花酸(Ellagic acid)普遍存在水果和蔬菜中，包括黑莓、覆盆子、草莓、蔓越莓、山核桃、石榴等植物，為天然的酚類抗氧化劑且具有廣泛的功效，例如：抗癌、降血壓、美白等，尤其是在抗癌方面是相當受到矚目的(Okla *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018)。然而做為口服藥物鞣花酸，因其有限的溶解性低和腸道微生物快速分解導致生物利用率在人體吸收上是受到限制的，因此如何提高生物利用率為其重點。

文獻指出，幾丁聚醣(CS)和三聚磷酸鈉(TPP)可以經由離子交聯的方式形成奈米顆粒，可保護被包覆者的抗氧化、抗胃酸、胃酵素作用等，及奈米顆粒可直接被小腸吸收，如此可增加其生物利用率。另外，其奈米顆粒具有潛力應用於藥物傳遞系統上(Berger *et al.*, 2004)，例如：可控制藥物緩慢釋放、增加藥物吸收、提高藥物生物利用率和減少藥物副作用等。

本研究嘗試利用幾丁聚醣及三聚磷酸鈉作為基材，經由離子交聯作用，使鞣花酸包覆於其中製備成奈米顆粒，探討其奈米顆粒之特性以及其在模擬胃腸液之安定性。

貳、文獻整理

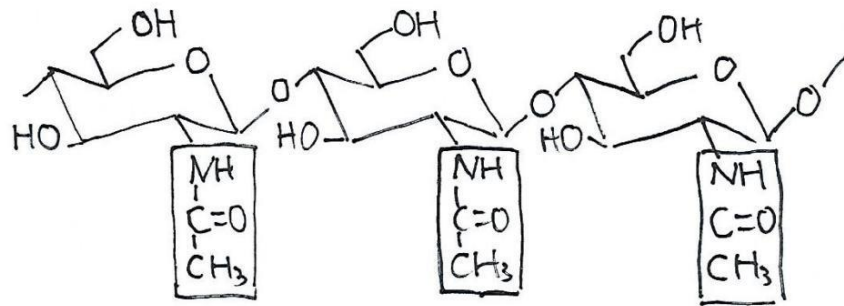
一、幾丁質與幾丁聚醣

(一)幾丁質與幾丁聚醣介紹及結構

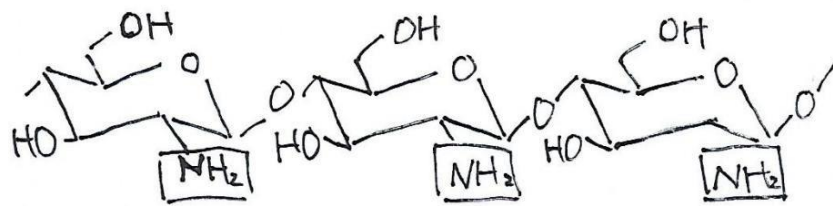
幾丁質(Chitin)由 1000 至 3000 個 N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)作為單元體,以 β -1,4 鍵結而成的高分子直鏈多糖聚合物。幾丁質廣泛的存在於自然界生物當中如:節肢動物的外殼、無脊椎動物體中、微生物如:真菌、藻類及酵母菌細胞壁等之細胞壁等也有其存在。自然界中的蘊藏量相當高。

結構上,幾丁質與纖維素(Cellulose)相似的(陳,2018)(圖一),差別在 C-2 所接的官能基不同,幾丁質和幾丁聚的不同在於官能基 C-2 位置上經過去乙醯作用(de-acetylation)由乙醯胺基(-NHCOCH₃)轉變為胺基(-NH₂),而纖維素在 C-2 位置上所接的則是氫氧基(-OH)。

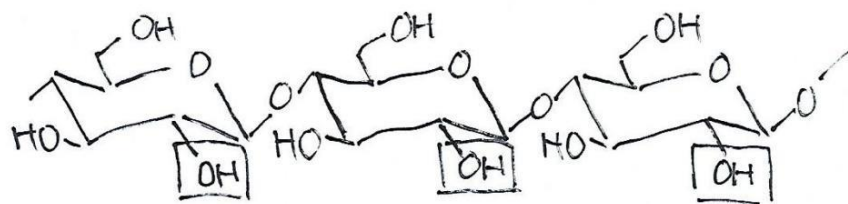
幾丁質在高溫及強鹼的環境作用下,乙醯基被部分去除,露出胺基,因此可以得到不同去乙醯程度之幾丁聚醣。然而先前學者認為要區分界定聚合物去乙醯程度小於 50 %稱為幾丁質,程度大於 50 %可稱幾丁聚醣(Kubota *et al.*, 2000)。



Chitin



Chitosan



Cellulose

圖一、幾丁質、幾丁聚醣及纖維素之結構。

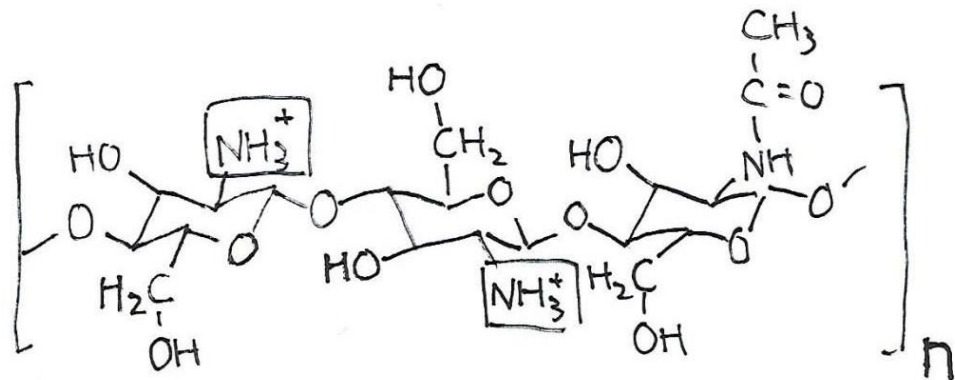
Fig. 1. Structure of chitin, chitosan and cellulose.

(Krajewska, 2004)

(二) 幾丁聚醣溶液之特性

幾丁質去乙醯化(Deacetylation)反應後得到幾丁聚醣，其應用廣泛，包括：環境、環保、生物醫學、農業、化工及食品等領域皆有相關的研究，其應用的效果與去乙醯程度、分子量及濃度有關(Zhou *et al.*, 2008)。CS 相較於幾丁質擁有較多的胺基，溶解性較佳，雖不溶於水但可溶於大多數酸性溶液中，幾丁聚醣的溶解性會決定於去乙醯程度越高則溶解性增加，而醋酸則經常被作為溶解幾丁聚醣溶液的選擇(Geng *et al.*, 2005)。

當幾丁聚醣溶在酸性溶液中且 $pK_a(pH)$ 小於 6.3 時，其 C-2 位置上的胺基(NH_2)將會形成 $-NH_3^+$ 的形式(圖二)，使幾丁聚醣結構上將成為帶有正電荷之聚合物。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)

(三)幾丁聚醣分子量之降解

幾丁聚醣的使用是相當廣泛，但是其分子量高，在酸溶液溶解時黏度相當高，不利於應用。因此增加幾丁聚醣之應用性需降解出較低之分子量。以下介紹幾個常見降解幾丁聚醣方法如：

1. 酸水解法：

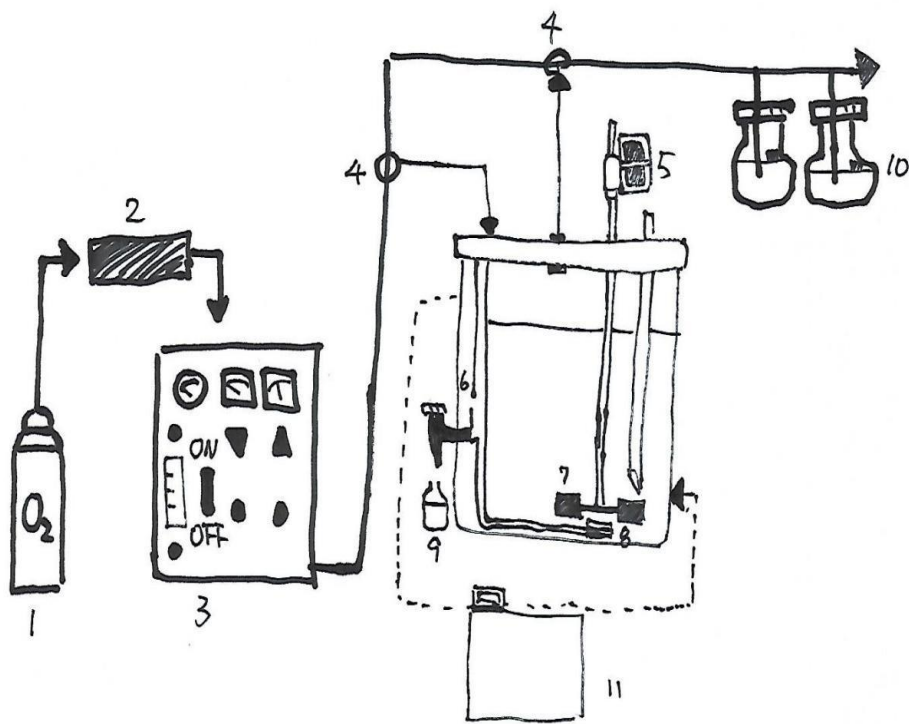
以亞硝酸、鹽酸及磷酸等將幾丁聚醣結構上之醣苷鍵打斷，使其分子變小。特色為處理量大且成本低，但此法將會對環境污染，且專一性低且較難以控制降解的程度。

2. 酵素水解法：

酵素(Chitosanase)將幾丁聚醣水解，特色為反應條件溫和且專一性高，但所需時間也相對較長且酵素價格昂貴，經濟效益不大，因此限制其應用性(Jeon and Kim, 2000)。

3. 臭氧氧化還原降解法：

臭氧(Ozone)本身為強氧化劑，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之分子量。其氧化降解設備如(圖三)缺點為會脫去部分幾丁聚醣脂胺基(林，2001)。



- | | | |
|--------------------|------------------|-------------------|
| 1.oxygen cylinder | 2.drying tube | 3.ozone generator |
| 4.three-way valve | 5.agitator motor | 6.baffles |
| 7.6-blade impeller | 8.diffuser | 9.sample port |
| 10.KI solution | 11.thermostat | |

圖三、臭氣降解法實驗流程。

Fig. 3. Schematic diagram of the experimental apparatus.

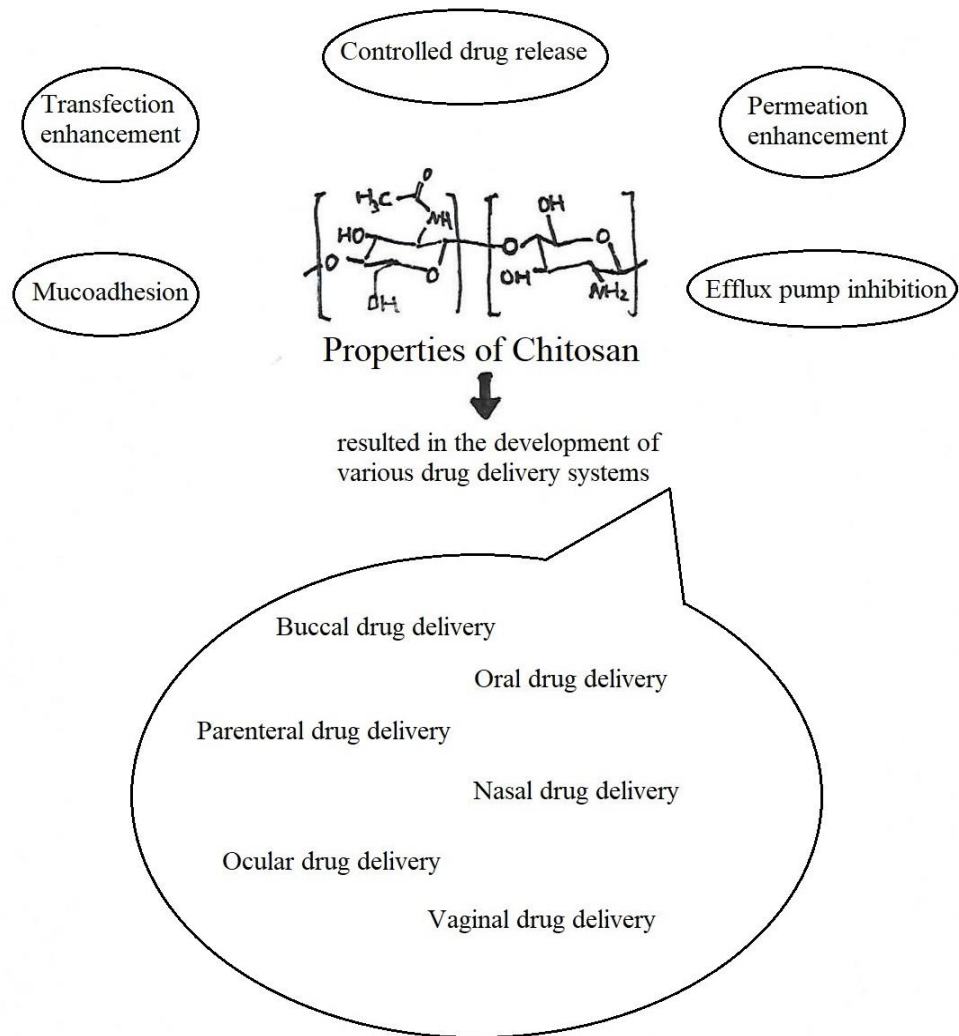
(林，2001)

(四)幾丁聚醣應用於控制藥物釋放

利用幾丁聚醣製備成口服藥物之外還有多種的藥物傳遞方式(圖四),幾丁聚醣能夠將藥物包埋於其中,主要是因為CS良好之特性如:良好的生物相容(Lopes *et al.*, 2010)、生物降解(Zhao *et al.*, 2010)和此表面帶有正電之天然聚合物使用上已有許多的應用,如藥物、生物科技及食品科技等領域有著廣泛且相關的研究。以下介紹常見關於幾丁聚醣於控制藥物釋放的優勢:

1. 控制藥物釋放(Drug delivery):

在化療藥物上能夠讓藥物傳送到特定部位並釋放,能減少藥物的使用及副作用。在達到持續的控制藥物釋放上也是考量的重點,像是(Zhang *et al.*, 2018)學者使用了幾丁聚醣、透明質酸和甘油磷酸鈉之水凝膠系統,將此化療藥物裝載在水凝膠系統上,相較於以往的傳統藥物治療,此方法有效減緩了藥物的釋放之外,也對不同的溫度和 pH 值等條件下得到的改善。



圖四、幾丁聚醣之特性對於多種藥物傳遞系統的發展。

Fig. 4. Properties of chitosan resulted in the development of various drug delivery systems.

(Bernkop-Schnürch and Dünnhaupt, 2012)

2. 幫助藥物送達目標器官 (Targeted drug delivery)

觀察幾丁聚醣結構會發現其同時擁有疏水基和親水基，而奈米化之後的幾丁聚醣能夠協助藥物更容易在腫瘤組織中穿越(Enhanced permeability and retention effect)，例如先前有學者(Zhang *et al.*, 2016)研究，利用幾丁聚醣裝載抗癌藥物 Doxorubicin hydrochloride 應用於小鼠腫瘤組織，發現給藥 45 天後腫瘤體積消退(從 514 下降到 170 毫米)，相比沒奈米化之對照組(453 下降至 284 毫米)，結果顯示奈米顆粒藥物比游離藥物之抗腫瘤效果高約兩倍。

3. 增強小腸上皮細胞滲透性(Intestine epithelium)

作為口服藥物需考慮藥物是否能被腸上皮細胞調節後吸收進入生物體，原因為幾丁聚醣結構帶有之正電，能夠緊密的與帶有負電的上皮細胞結合，一方面使藥物有足夠時間滲透小腸上皮細胞，進入血液內一方面可短暫的打開小腸緊密連結(Tight-junction)讓帶藥物之奈米顆粒直接進入血液。先前 Feng(2014)等學者以羧甲基修飾幾丁聚醣裝載紫杉醇類藥物，在 Caco-2 細胞上得到了優異的吸收結果。Canali(2012)等學者指出幾丁聚醣裝載花生四烯酸，觀察其腸道滲透性，發現到幾丁聚醣表面所帶有正電荷有助於腸道黏膜上吸收。

二、 奈米科技

(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。一奈米長度為十億分之一公尺($1\text{ nm} = 1 \times 10^{-9}\text{m}$)。這尺寸介於巨觀(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，用於說明奈米的新理論稱為介觀(meso-scope)。

奈米科技為在尺寸為奈米下所進行的科學技術，一般傳統的科學理論和技術皆不適用。因為在奈米尺寸的物質性質已是截然不同。而且當物質尺寸小到奈米一定的範圍內，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。

(二) 奈米技術應用於食品

現今奈米技術應用於食品已經相當廣泛，像是利用奈米技術加強食品安全及提高品質等方面的應用。以下介紹常見的經過奈米技術處理後關於食品之特性(圖五)：

1. 防止食物腐敗：

微生物對於食品的影響尤其重要，如果食品有微生物生長繁殖皆會影響食品的品質，透過奈米技術改良食品包裝材料能有效降低微生物的生長，進一步的減少對於食品的影響。先前有學者將銀(Silver)奈米化後製成抗菌劑，並且還與氧化石墨烯結合，產生的表面抑制了幾乎高達 100% 的細菌附著(Eleftheriadou *et al.*, 2017)。

2. 改善食品色澤

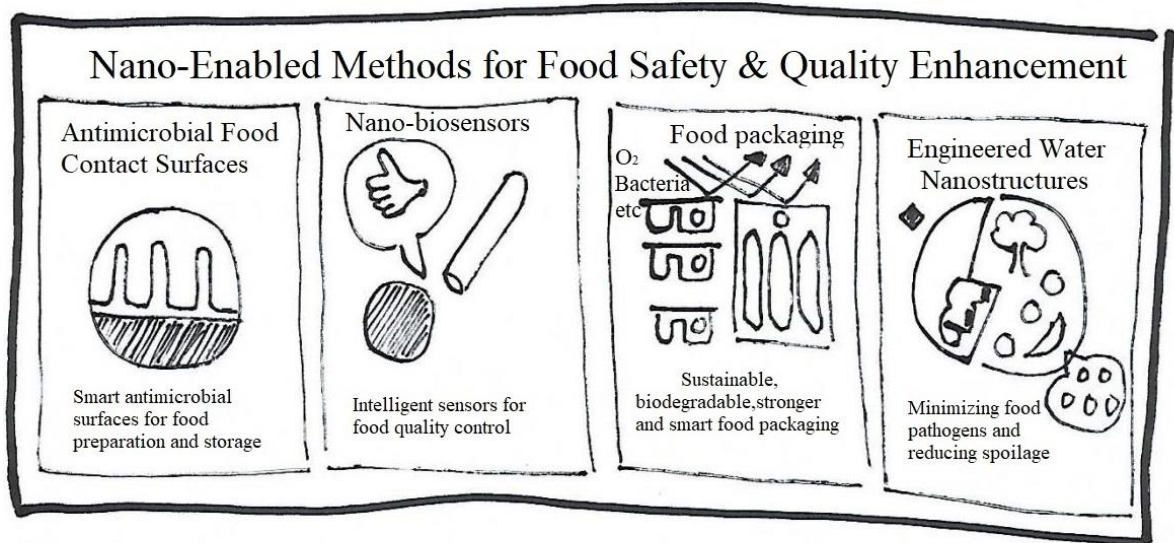
食品的外觀顏色對於消費者的影響是重要的第一印象，透過奈米技術的協助下，使得食品色澤保持良好狀態。例如抑制多酚氧化酶的活性達到減少蔬果變色之目的，此酵素普遍存在各種蔬菜水果當中，先前有學者們(Kim *et al.*, 2013)使用幾丁聚醣包覆抗壞血酸棕櫚酸脂能夠有效的抑制香蕉中的多酚氧化酶。

3. 延長食品保存期限

帶有脂質之食品，常於保存時，其脂質被氧化而影響至食品風味、顏色等，至今可利用奈米技術應用進一步的改善此缺點。例如有學者(Liu *et al.*, 2017)使用幾丁聚醣包覆茶多酚，擁有抗氧化能力的茶多酚經過幾丁聚醣包覆後，可增加茶多酚抗氧化時間，尤其是在脂肪類食物。

4. 提高生物利用率

生物利用率是當化合物通過口腔、胃和小腸最後進入血液，需要通過人體內一些主要障礙容易程度。而奈米技術應用可改善生物利用率，應用在於傳輸系統，通過改變物質粒徑的大小、增加表面積以提高溶解度、可控制的釋放機制，達到增加吸收，提高生物利用率，以達到目的。(Esfanjani *et al.*, 2018)。奈米技術還可加強食品包裝材料、保護特定營養物質等。表示出奈米技術應用於食品領域是相當有潛力的(Bajpai *et al.*, 2018)。



圖五、奈米技術提升食品安全和品質。

Fig. 5. Nano-enabled methods for food safety and Quality enhancement.

(Eleftheriadou *et al.*, 2017)

(三) 奈米顆粒藥物(Nanoparticles drugs)

做為奈米藥物擁有相對較大的表面積能將藥物均勻的分散，藥學領域中定義：粒子大小小於 $1\ \mu\text{m}$ ($1000\ \text{nm}$)即可稱之(高，2015)。

由天然或合成的聚合物製成的奈米顆粒是受到關注的，至今通過調整聚合物的特性、修飾的表面化學結構，進一步的達到控制藥物釋放。現在能確定擁有奈米載體的藥物能改善生物利用率、增強滲透性、維持藥物釋放及溶解性等，這些特性為癌症藥物提供了作為標靶藥物在細胞及組織間傳遞的優勢。

受到控制的藥物能夠在數天甚至是數周持續釋放，在選用製備奈米顆粒的聚合物上若是生物可降解性、生物相容性、且無毒等特性，能夠更為有效的傳遞藥物。像是先前有學者(Kenney *et al.*,2018)使用修飾的 PLGA 奈米顆粒表示能夠在不犧牲安全的情況下，PLGA 依然能作為標靶藥物。

(四) 奈米藥物之安全性及評估

相比於傳統的藥物雖然奈米藥物在醫學上能更有效的治療癌症，正因為如此操作載體系統須謹慎的安全性評估，對於奈米顆粒藥物的組成、形狀、尺寸大小、影響範圍、劑量等皆須進行評估(Jong *et al.*, 2008)。由於奈米藥物之尺寸(1~100 nm)開啟了穿過體內生物屏障的可能性，材料的選擇對於人體無害極為重要，目前所使用的載體經過實驗證實必須是對人體安全無疑的，如白蛋白(Albumin)、膠原蛋白(Collagen) 和幾丁聚醣(Chitosan)等也都是常使用的藥物載體。

近年來對於奈米顆粒對於人體的危害性也頗具話題，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，然而多數的學者及實驗指出作為可控制的藥物能夠減少疑慮，甚至不用擔心這樣的危害，其原因為做為奈米藥物載體上，皆會經過謹慎地對於人體和環境做整體的評估，如學者(Singh *et al.*, 2018)使用疏水蛋白作為奈米藥物，表示出藥物表面的的親水疏水能力可做為標靶藥物參考；學者(Li *et al.*, 2015)表示若能了解黑色素瘤致病機制及藥物的滲透性，都有可能作為治療黑色素瘤奈米藥物的考量。

三、 幾丁聚醣奈米顆粒

(一) 幾丁聚醣奈米顆粒製備方法

藥物傳遞系統中幾丁聚醣是廣泛使用的，其擁有良好之生物相容性和生物降解性之外，表面氨基(NH_3^+)所帶有的陽離子進行修飾後，其所包覆之物質能改善吸收、改善生物利用率。除了應用藥物傳遞系統上，也應用在農業領域(Kashyap *et al.*, 2015)以下介紹幾種製備幾丁聚醣奈米顆粒之方法(圖六):

1. 乳化交聯法(Emulsion cross-linking)

此法適用於疏水性物質。方法為將幾丁聚醣溶液加在至油相溶液中，藉由介面活性劑之乳化作用，使幾丁聚醣溶液於油相形成 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。此方法優點通常用在延長藥物的釋放時間能到數周甚至到月，並且對於非標靶藥物具有高度安全性。原理為利用幾丁聚醣帶有正電荷之胺基和交聯劑中的醛基反應而結合，所以缺點也為加入之交聯劑可能無法完全地去除且此方法步驟繁瑣。

2. 離子凝膠法(Ionotropic gelation)

離子凝膠法為較簡單且容易的製備方法且產生的幾丁聚醣奈米顆粒穩定、無毒。原理為將幾丁聚醣溶解在酸性溶液中，使幾丁聚醣上之胺基將形成帶有正電荷(NH_3^+)的形式，接著與溶於水中帶有負電的三聚磷酸鈉(Sodium tri-polyphosphate, TPP)是最為常見的離子交聯劑，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。此方法為本實驗使用之方法，詳細過程於下個章節進行探討。

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

將乳化交聯法與沉澱法兩者做結合，可使用交聯劑穩定顆粒結構，亦可幾丁聚醣與氫氧化鈉液滴產生沉澱反應達到加強結構。製備步驟：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)，將此兩乳化液高速攪拌，使乳滴隨機碰撞並產生交聯反應，進而沉澱出較小的幾丁聚醣顆粒。此方法所產生的乳化液滴為隨機碰撞並凝絮、相比較於其他方法所製成的液滴的大小尺寸上是差不多的，但是此方法形成之粒徑容易受到幾丁聚醣結構上去乙醯程度所影響。

4. 沉澱法(Precipitation)

其原理為利用幾丁聚醣於鹼性溶液中難以溶解之特性(pKa 6.3)，所產生之凝結及沉澱反應。方法是先把幾丁聚醣噴在鹼性溶液中 (sodium hydroxide 、 sodium hydroxide-methanol 或 ethanedi-amine)之環境，用壓縮空氣噴嘴完成，並通過分離、過濾純化等方式完成。儘管此方法步驟簡單，但是通常需要交聯劑用來提高顆粒的穩定性，且顆粒呈現不規則的型態。

5. 逆微胞法(Reverse micelles)

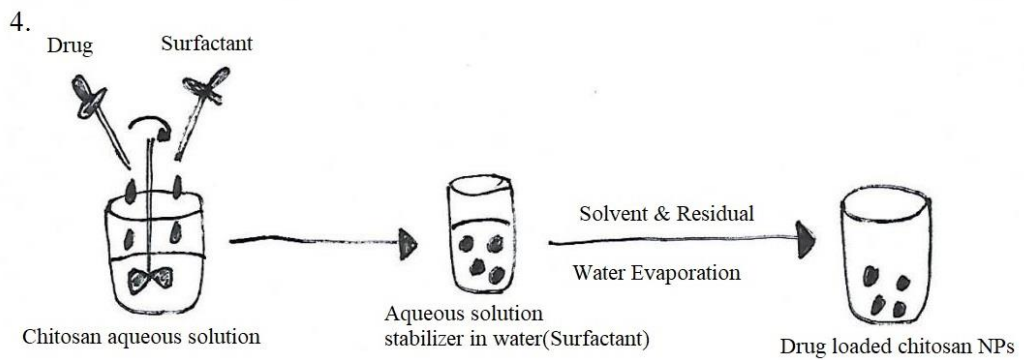
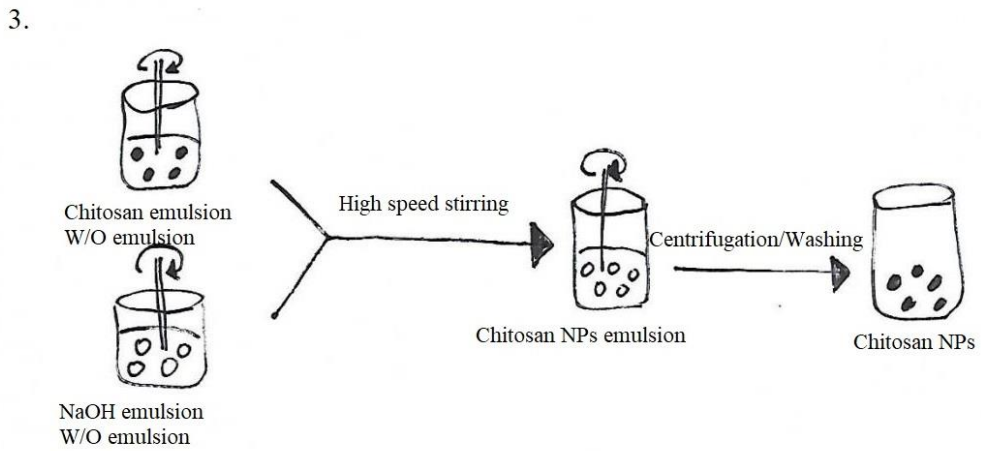
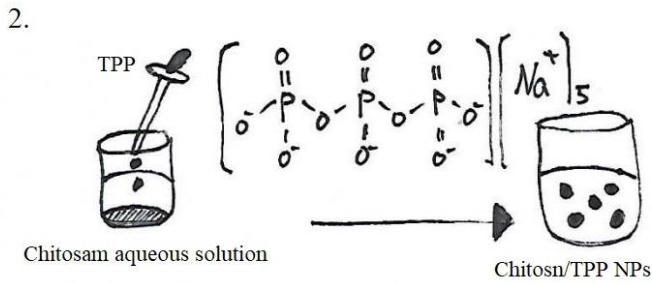
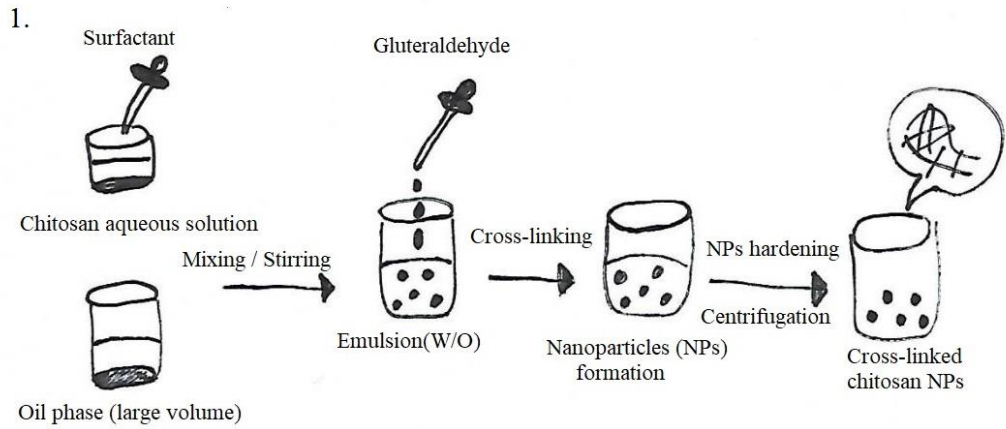
此法為使用介面活性劑和有機溶劑先將兩者混和之後加入幾丁聚醣及欲包覆之物質後，調整水相使其與油相及介面活性劑組成混合物，接著加交聯劑攪拌過夜後，去除有機溶劑得到沉澱物，將此分散於水溶液中，以合適的鹽類沉澱介面活性劑，離心後取其上清液並以透析膜作用，最後將液體凍乾即可得到幾丁聚醣奈米顆粒乾燥粉末。適合於低分子量之幾丁聚醣，但是需要大量的有機溶劑導致難以分離奈米顆粒，且生產出來的奈米顆粒有限。

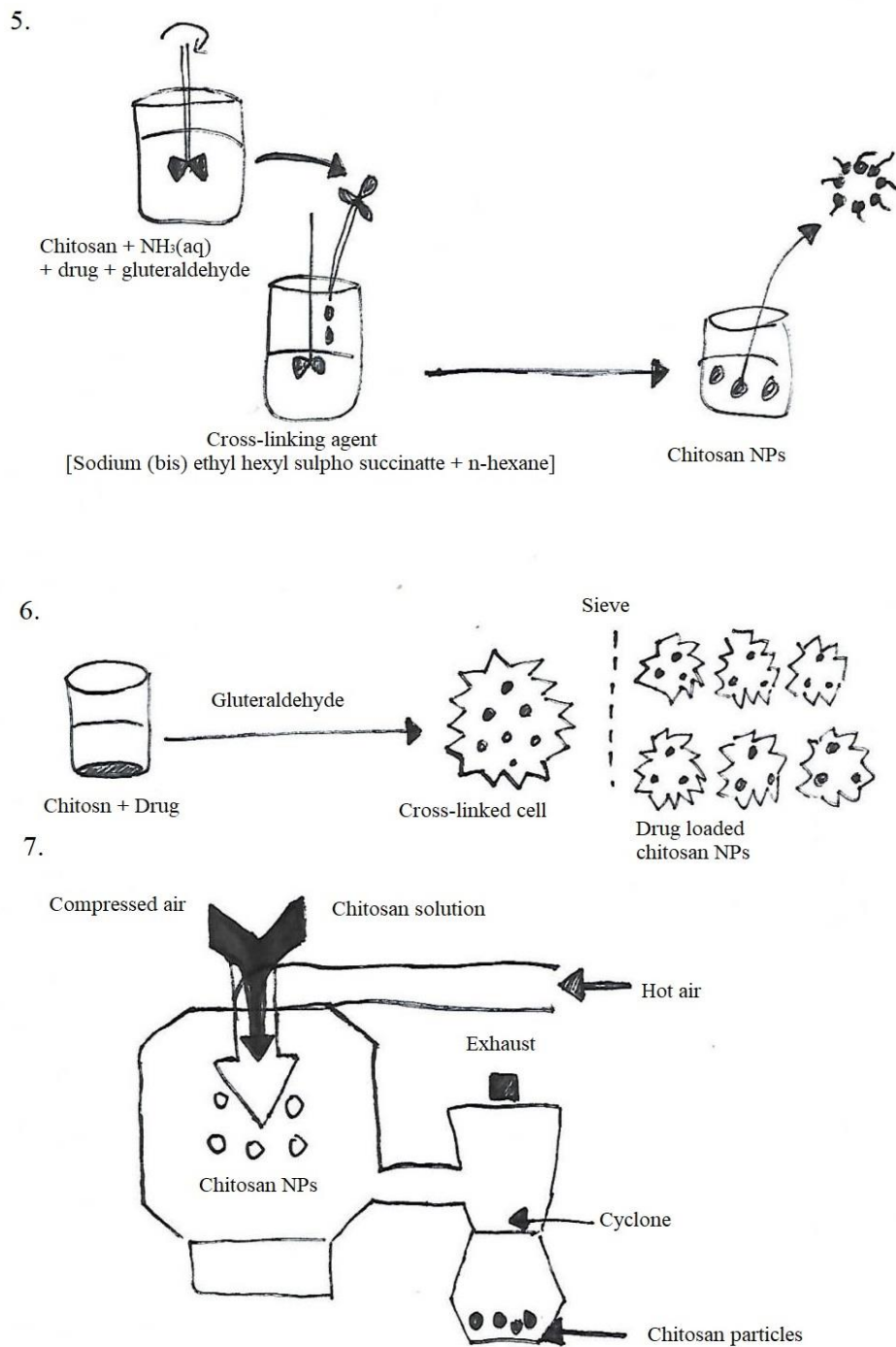
6. 篩分法(Sieving)

該方法涉及利用戊二醛交聯於幾丁聚醣的酸性水溶液。然後使交聯的殼聚醣通過具有合適篩目尺寸的篩子以獲得微粒。然後使用到氫氧化鈉(0.1N)溶液洗滌微粒以除去未反應的戊二醛並在40°C下乾燥。

7.噴霧乾燥法(Spray drying)

此方法成本價格上較為低廉且用途廣泛，原理是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，方法是先將CS溶於酸性溶液，再將欲包覆之物質分散於此中，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。此法之顆粒粒徑大小由噴嘴尺寸、空氣噴發速度、霧化壓力及進氣時之溫度速度等因素的不同，而有不同的結果，適合用在高熱性、高水溶性的藥物。





圖六、合成幾丁聚醣奈米顆粒各種方法示意圖。

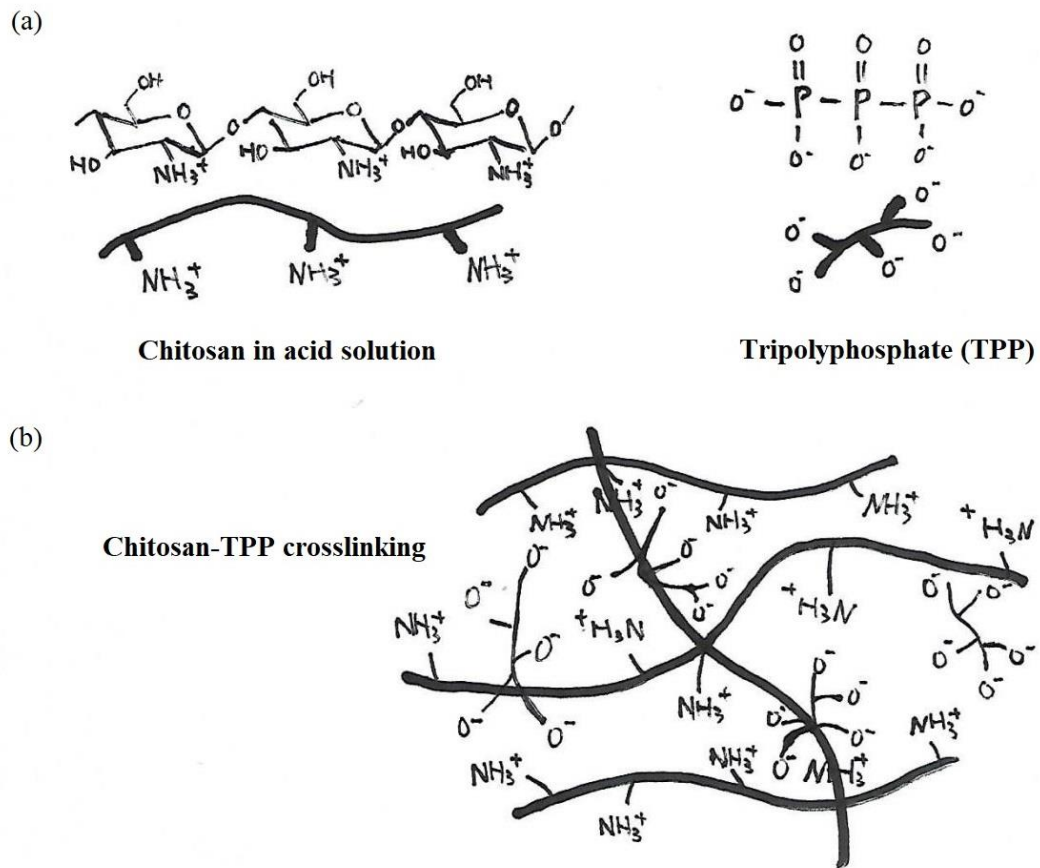
Fig. 6. Schematic representation of various methods for the synthesis of chitosan nanoparticles. (1) Emulsion cross-linking; (2) ionotropic gelation; (3) emulsion-droplet coalescence; (4) precipitation; (5) reverse micelles; (6) sieving; and (7) spray drying.

(Kashyap *et al.*, 2015)

(二) 離子交聯法製備幾丁聚醣奈米顆粒

幾丁聚醣溶解於酸性溶液中，當幾丁聚醣溶液 pH 值小於 pKa (pH 6.3) 時結構上 C-2 位置上之胺基(NH₂)將會轉變為 NH₃⁺即帶有正電的形式[圖七(a)];另外一方面三聚磷酸鈉結構組成為三個磷酸組合而成的化合物，溶於水特性為帶有多種負電基團(P₃O₁₀⁵⁻、HP₃O₁₀⁴⁻及 OH⁻)。將三聚磷酸鈉溶於水中，使其磷酸根變成有五個負電之離子基團，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⁺產生正負電相互吸引也就是離子交聯，並伴隨氫鍵與親疏水交互作用，形成奈米顆粒之網狀結構並且將欲包覆物質包覆在其中[圖七(b)]。

這樣的方法是受到控制的尤其是對顆粒粒徑大小方面，例如改變參數：溫度、不同的轉速、欲包覆物質是否避光等，皆可用於調整參數使得顆粒以達到想要的結果。



圖七、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉之離子交聯示意圖。

Fig. 7. (a) Molecular structure of chitosan in acid solution and that of triphosphate (TPP). (b) Ionic crosslinking between chitosan and TPP.

(Hsieh *et al.*, 2008)

鄭(2015)研究利用幾丁聚醣包覆茄紅素製備奈米顆粒，探討其條件：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。結果以中分子量之幾丁聚醣及 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，經由熱處理及儲存實驗後，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，探討其條件：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之幾丁聚醣及 CS/TPP 重量比在 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，此結果推測幾丁聚醣奈米顆粒能助於在腸道上的吸收之情況，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。

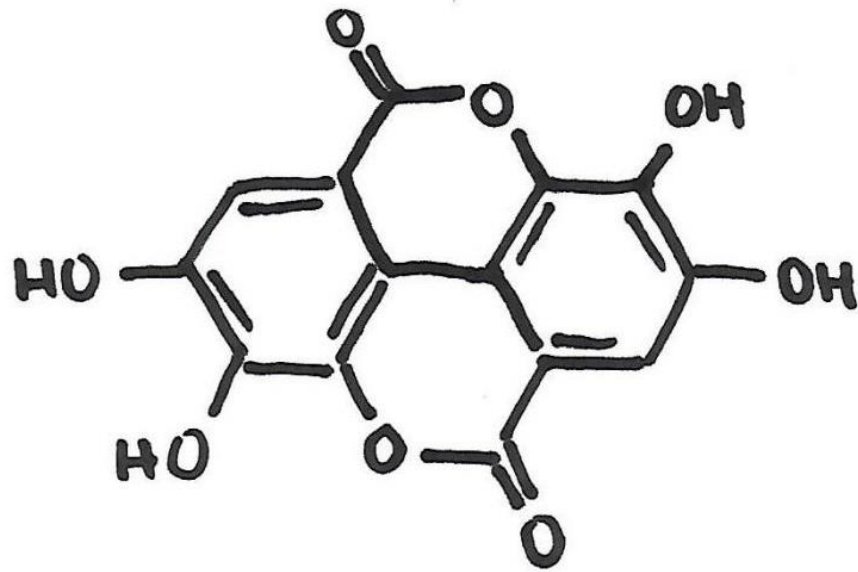
鄭(2017)研究利用幾丁聚醣包覆柚皮素，探討柚皮素濃度、幾丁聚醣之分子量及 CS/TPP 重量比對於奈米顆粒之影響。結果顯示以高分子量幾丁聚醣及 CS/TPP 重量比為 4/1 時，有 27 % 包覆率、表面電位+36.9 *mV*，且累積釋放率約為 20 %，表示奈米顆粒較為安定。

四、鞣花酸

(一) 鞣花酸(Ellagic acid)簡介

人類的飲食習慣關係到人類的健康，而其中植物所擁有的非營養性的二級代謝物(Secondary metabolites)植物化學素，已被證實能發揮廣泛的生物活性。

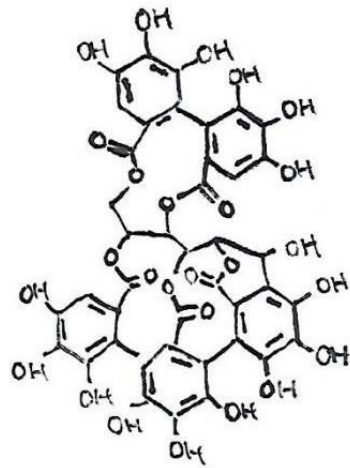
鞣花酸(圖八)是一種強大的抗氧化劑(Ippoushi *et al.*, 2009)，其擁有多酚結構的植物化學素，與其衍生物鞣花單寧(Ellagitannins)(圖九)普遍地存在於蔬菜水果當中，像是覆盆子、草莓、蔓越莓、核桃、山核桃等，其分子式為 $C_{14}H_{16}O_8$ ，分子量為 302.197 g/mol 。鞣花酸已經進行了多項的藥理研究，像是抗氧化、美白、癌症治療及預防等，但其差的溶解性、滲透性、穩定性限制了藥物應用的潛力(Carballo *et al.*, 2010)，其中以低的生物利用率為主要缺點是在給藥之後會快速的從身體排出，為了克服上述之缺點，給予適當的修飾以及藥物傳遞系統提供了另一種給藥方式。



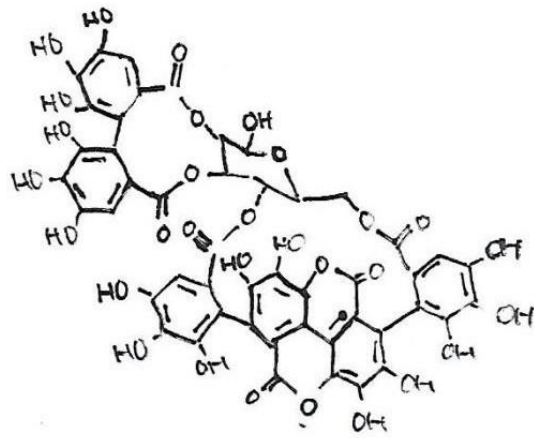
圖八、鞣花酸之化學結構。

Fig. 8. Structure of ellagic acid.

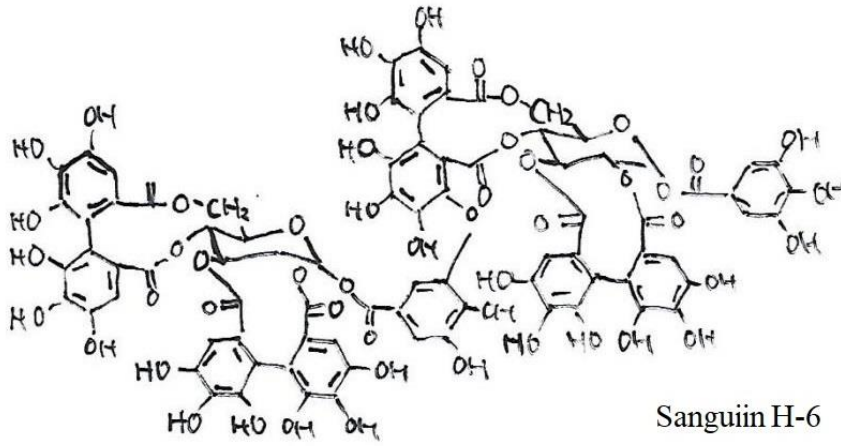
(Ippoushi *et al.*, 2009)



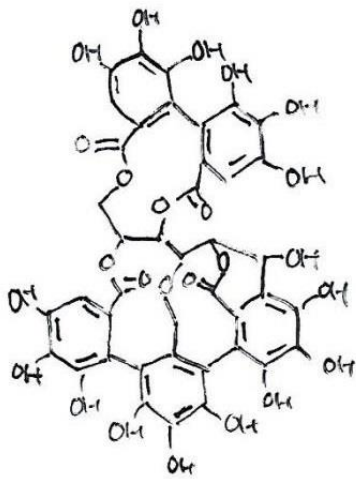
Vescalagin



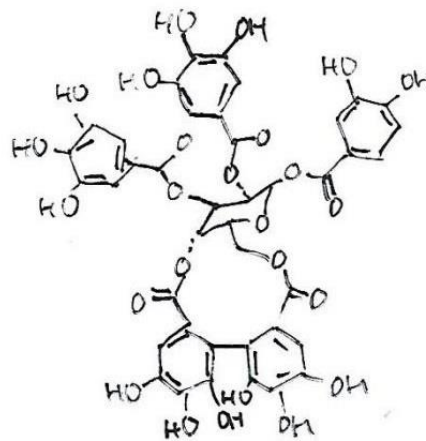
Punicalagin



Sanguin H-6



Castalagin



Tellimagradin II

圖九、鞣花酸其衍生物之化學結構。

Fig. 9. Structure of Ellagitannins.

(Landete *et al.*, 2011)

(二) 鞣花酸之生理機能

鞣花酸與其衍生物鞣花單寧，多酚是植物來源中常見的成份，是飲食中常見之天然抗氧化劑，其官能基在生物及細胞上代謝上有著特性，還有包括抗氧化劑、導致癌細胞凋亡等特性，以下介紹幾項特性引起近期科學家們的極大興趣：

1. 抗氧化

化合物作為抗氧化劑的能力主要決定於它們的化學結構的羥基官能團數量，成提供氫原子和未配對電子能力，另外有學者研究 (Hayer *et al.*, 2011) 比較清除 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazul 能力，發現抗氧化效率依次為：鞣花酸 > 芝麻酚 > BHA > 橄欖葉提取物，鞣花酸有效自由基清除能力，因為該化合物具有四個具有苯、呋喃結構的羥基基團。但即使有良好抗氧化的能力，但是鞣花酸低的水溶性、低的生物利用率仍然需要克服。

2. 抗發炎反應

一些研究證明了多酚化合物的抗發炎和調節免疫能力等，研究表示如：多酚抑制 IL-1、IL-6 和 TNF- α 炎症因子，減少發炎反應。具體而言，已顯示鞣花酸在體外抑制 IL-1 β 和 TNF- α 誘導活化蛋白酶能進一步的達到調節免疫 (Landete, 2011)。

3. 預防治療癌症

癌症對於人類健康威脅影響日漸嚴重，而植物化學素含有多酚結構，多酚化合物能抑制癌症生長及繁殖，而鞣花酸這種含有多酚結構的化合物已被研究做為抗癌的藥物之一，像是前列腺癌(Malik *et al.*, 2011)、結腸癌(Larrosa *et al.*, 2006)、口腔癌(Arulmozhi *et al.*, 2013)等，即使如此鞣花酸有良好的功用，但也同時指出其低溶解度、生物利用率限制其應有預防癌症的效果，而多數的學者研究指出也許奈米技術也許提供了新的給藥途徑，能夠給予預防和治療癌症的效果上得到提升，經過調整修飾載體以及條件，能夠給予更精準的標靶給藥。

(三) 鞣花酸之生物利用率

了解鞣花酸之吸收與代謝對於給藥的方式非常重要，然而鞣花酸低的生物利用率是不易被人體腸道吸收造成限制鞣花酸的治療潛力。(Larrosa *et al.*, 2006)飲食中大多數的鞣花酸最終進到腸道而被微生物菌群轉換。因此以適當方式將其包覆提高鞣花酸之生物利用率是必要的。(Kim *et al.*, 2009)使用幾丁聚醣裝載鞣花酸用來抑制體外之腦腫瘤神經細胞、(Talcott and Percival, 2005)使用鞣花酸、槲皮素與白藜蘆醇共同作用白血病細胞，誘導細胞走向自然的細胞凋亡。

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

17. Sodium tripolyphosphate:和光純藥株式會社，日本。

18. Toluidine blue:ALDRICH，美國。

二、 實驗儀器

1. 磨粉機:1hp 型，群策電機工業股份有限公司，台中市，台灣。
2. 分析篩網: Tyler 標準規格篩網，Endecotts，Wimbledon，United Kingdom。
3. 電磁式過篩器: OCTAGON DIGITAL 2000 型，Endecotts，Wimbledon,United Kingdom。
4. pH meter: SP701 型，Suntex，新北市，台灣。
5. 真空冷凍乾燥機: FD-5N 型，EYELA，Tokyo，Japan。
6. 高效率套組式臭氧機: OW-K1/O 型，易暘儀器，彰化縣，台灣。
7. 高速低溫離心機: CR22GII 型，Hitachi，Tokyo，Japan。
8. 微量超高速離心機: CS120GX 型，Hitachi，Tokyo，Japan。
9. 超音波細胞打碎機: Sonifier 250 型，Branson，Tokyo，Japan。
10. 往復式恆溫震盪器: BT-350 型，裕德科技有限公司，新北市，台灣。
11. 烘箱(多用途): 500 型，MEMMERT，Schwabach，Germany。
12. 超音波震盪器: S100 型，ELMA，Shideler Pkwy，USA。

13. 高效率液相層析儀：

- (a) L-6200A pump , Hitachi , Tokyo , Japan 。
- (b) RI-Detector8110 , Bischoff , Kanvsta , Germany 。
- (c) D-2500 chromato-integrator 積分儀 , Hitachi , Tokyo , Japan 。
- (d) Column: PolySep GFC-P 4000 , 台北市 , 台灣 。

14. 高效率液相層析儀：

- (a) L-6200A pump , Hitachi , Tokyo , Japan 。
- (b) L-4200 UV/VIS Detector , Hitachi , Tokyo , Japan 。
- (c) D-2500 chromato-integrator 積分儀 , Hitachi , Tokyo , Japan 。
- (d) Column: Inertsil ODS-2 , GL Sciences Inc , Tokyo , Japan 。

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

三、 樣品製備

(一) 幾丁聚醣製備

幾丁質磨成粉片狀，反覆過篩取得 40 至 60mesh 之幾丁質粉末備用。參考沈(2004)使用之方法及條件先把幾丁質粉末倒入約 57%(w/v)NaOH 溶液於 105±5°C 加熱攪拌處理 2 小時，而後將幾丁聚醣用蒸餾水沖洗至 pH 值達到中性，之後置入烘箱乾燥(80°C，

8 小時)。參考 Toei 及 Kohara(1976)所使用的方法測定幾丁聚醣去乙醯的程度，選擇去乙醯程度者大於 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(2008)等人及林(2001)利用臭氧降解幾丁聚醣作法。先以 1%的醋酸水溶液(v/v)配置 1%幾丁聚醣溶液(w/v)，經過濾膜，目的為去除顆粒、雜質及鹽類等，接著取 100 mL 之幾丁聚醣溶液放在 $55^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 水浴槽中，使用高效率套組式臭氧機通入臭氧，其濃度為 6.3 g/m^3 ，氧化降解作用至不同的時間(0 至 70 mins)。處理完後的幾丁聚醣溶液以 NaOH 溶液調整 pH 值至 7，目的為讓幾丁聚醣析出(幾丁聚醣之 pKa 值為 6.3)，經由離心($22,200\text{ x g}$ ， 20°C ， 30 min)並以去離子水反覆清洗數次，除掉鹽類或者多餘的鹼，最後以冷凍乾燥儲存備用。之後使用膠體層析管柱(Gel Permeation Chromatography, GPC)測定不同時間降解作用下的幾丁聚醣得到不同分子量，篩選出未經臭氧降解處理者 735kDa (Original Mw)、 511kDa (High Mw)、 296kDa (Medium Mw)以及 46kDa (Low Mw)作為後續實驗。

(三) 鞣花酸溶解性測試

取 1 mg 之鞣花酸粉末，分別加入 2 mL 不同溶劑(去離子水、冰醋酸、甲醇及絕對酒精、二甲基亞砷、氫氧化鈉、四氫呋喃)。

攪拌過夜選擇適當溶劑後，並測試溶劑與幾丁聚醣溶液適合比例並觀察其溶解性，以利後續實驗。

四、 實驗方法

(一) 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒之製備

參考吳(2008)之方法，分別將不同分子量之幾丁聚醣(CS)溶於 1%醋酸溶液(v/v)，濃度為 0.2 %(w/v)，過夜攪拌均勻之後調整 pH 值至 4.7；另外準備不同濃度的三聚磷酸鈉(TPP)溶於去離子水中，之後調整 pH 值至 9.0，之後將鞣花酸(Ellagic acid)溶於 0.1N 氫氧化鈉溶液中攪拌過夜。樣品添加次序為先將 Ellagic acid 溶液加到 CS 溶液中並攪拌均勻，之後將 TPP 溶液緩緩滴入混合液中攪拌。此實驗目的為探討藥物 Ellagic acid 的濃度、洽當之 CS 之分子量以及適當之 CS/TPP 重量比對 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒之參數：包覆率(Encapsulation efficiency)、裝載率(Load capacity)、產率(Process yield)、粒徑大小(Particle size)及表面電位(Zeta potential)影響。

(註:製備過程中全程避光，為防止鞣花酸因光照受到影響)

1. 鞣花酸濃度之影響

將 2 mL 不同濃度(100、200、400、600、800 及 1000 $\mu\text{g/mL}$)之 Ellagic acid 溶於 0.1N 氫氧化鈉中，接著與 5 mL CS 溶液(Original Mw, 0.2 % (w/v), pH 4.7)兩者混合攪拌，再將 2 mL TPP 溶液(CS:TPP 為 3:1, pH 9.0)緩慢逐滴加入到 CS 與 Ellagic acid 之混合並攪拌 30 min，(32,000 xg, 20 °C, 30 min)將上清液測定 Ellagic acid 含量並計算包覆率及裝載率，而沉澱物的部分 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒量測其粒徑大小、表面電位及計算產率。

2. CS 分子量之影響

將 2 mL Ellagic acid 溶液(conc. 600 $\mu\text{g/mL}$)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，再將 2 mL TPP 溶液(CS:TPP 為 3:1, pH 9.0)緩慢且逐滴加入到 CS 與 Ellagic acid 之混合溶液中攪拌 30 min 後，離心的方式(32,000 xg, 20 °C, 30 min)將上清液測定 Ellagic acid 含量並計算包覆率及裝載率，而沉澱物的部分 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒測量其粒徑大小、表面電位及計算產率。

3. CS/TPP 重量比之影響

使用 2 mL Ellagic acid 溶液 (conc. 600 $\mu\text{g/mL}$) 與 5 mL CS 溶液 (Original Mw, 0.2 % (w/v), pH 4.7) 兩者混合攪拌，再將 2 mL 不同濃度之 TPP 溶液 (CS:TPP 為 3:1、4:1、5:1 及 6:1, pH 9.0) 緩慢且逐滴加入到 CS 與 Ellagic acid 之混合溶液中攪拌 30 min，離心 (32,000 $\times g$, 20 °C, 30 min) 後將上清液測定 Ellagic acid 含量並計算包覆率及裝載率，而沉澱物的部分 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒則測定其粒徑大小、表面電位及計算產率。

(二) 幾丁聚糖-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒於胃腸安定性模擬實驗

參考 (Ge et al., 2018) 方法配置模擬胃液 (simulated gastric fluid) 即將 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 及模擬腸液 (simulated intestinal fluid) 即將 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 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒，將 5 mL Ellagic acid 溶液 (conc. 600 $\mu\text{g/mL}$) 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(CS:TPP 比為 3/1，pH 9.0)緩慢逐滴加入至 CS 與 Ellagic acid 之混合溶液中攪拌 30 min，離心機(32,000 x g，20 °C，30 min)，得到沉澱物即為 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒。將此奈米顆粒置於 6 mL 模擬胃液中，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 Ellagic acid 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 模擬腸液 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 Ellagic acid 濃度。最後利用公式及測量之濃度結果計算 Ellagic acid 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)

acid 總含量

acid 總含量

n,a：取樣次數

C：測定 Ellagic acid 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)之測定方法，先將幾丁聚醣與標準品重量精秤於 0.02 記錄。之後先將標準品及樣品分別溶於 10 mL 之 0.1 M 醋酸溶液當中，於室溫下攪拌超過 1 小時等待幾丁聚醣溶解，再以蒸餾水定量至 50 mL，攪拌 30 min 後。取 5 mL 標準品及樣品溶液分別放置於三角錐形瓶中，並以 0.05 mL toluidine blue 作為指示劑，N / 400 potassium polyvinyl sulfate solution (P.V.S.K) 滴定，滴定終點時三角錐形瓶中溶液會由深藍色轉變成紅紫色，透過標準品滴定和樣品之重量的滴定後做計算，即可計算出幾丁聚醣去乙醯之程度。

(二) 降解幾丁聚醣樣品分子量之測定

吳(2008)之方法，精秤 5 mg pullulan 標準品溶於 5 mL 的去離子水中，再精秤 5 mg 幾丁聚醣樣品溶於 5 mL 濃度為 1 % 之醋酸水溶液中，分別使用 0.45 μ m filter 進行過濾。之後使用 Gel Permeation Chromatography(GPC)方法分析幾丁聚醣樣品分子量。先以 pullulan 標準品建立檢量線，其數值分別為 6000、10000、21700、48800、113000、210000、366000 及 805000 Dalton。觀察樣品之遲滯時間(retention time)與標品之檢量線互相對照，即可推算出幾丁聚醣的平均分子量。

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) 鞣花酸包覆率、裝載率及奈米顆粒產率之測定

製備 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒，將 CS-TPP-Ellagic acid 反應液離心，取上清液，經過高效能液相層析法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)測定得知 Ellagic acid 含有量的多寡之後，並對照 Ellagic acid 標準品建立之檢量線，計算包覆率(Encapsulation efficiency)。

$$\begin{aligned} & \text{Encapsulation efficiency (\%)} \\ & = \frac{\text{total EA amount} - \text{supernatant EA amount}}{\text{total EA amount}} \times 100 \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} & \text{Loading capacity (\%)} \\ & = \frac{\text{total EA amount} - \text{supernatant EA amount}}{\text{nanoparticles weight (dry weight)}} \times 100 \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} & \text{Process yield (\%)} \\ & = \frac{\text{nanoparticles weight (dry weight)}}{\text{total solid weight (dry weight)}} \times 100 \end{aligned}$$

(四) 鞣花酸定量方式

參考 (Ranade *et al.*, 2015) 利用高效能液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 測定鞣花酸之含量。

其原理為移動相流通過固定相，所造成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之長短進而達到分離，再以積分面積與濃度再進行定量分析。

- 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 Potassium Dihydrogenphosphate(3:2 v/v)

偵測波長：254 nm

流速：1.0 mL/min

注射量：20 μ L

偵測時間：15mins

• HPLC 測定方法:

首先配製鞣花酸標準溶液(Sigma-Aldrich, 美國), 濃度分別為 31.25、62.5、125、250、500 及 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 建立鞣花酸之檢量線, 樣品與標準品使用 0.45 μm filter 進行過濾去除雜質, 之後藉由 HPLC 分析鞣花酸之含量。觀察樣品之遲滯時間(retention time)與檢量線互相比照, 計算出樣品含有的鞣花酸之濃度, 進一步推算其鞣花酸之含量。另外在進行 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒之安定性實驗時, 胃腸道模擬實驗的部分, 奈米顆粒經由離心後, 取 1 mL 上清液並加入 1 mL 氫氧化鈉回溶, 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

測奈米顆粒之粒徑大小及表面電位, 使用雷射光散射法粒徑及界面電位分析儀(Zetasizer 3000HS, Malvern, UK)。製作幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒。隨後使用超音波細胞震碎機震碎聚集之奈米顆粒(40 % duty cycle, 20 secs), 將 CS-TPP 及 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒懸浮於去離子水中, 測量前靜置 30 mins 以上, 抽取上層溶液做動態光散射法(dynamic light scattering method)測量顆粒之粒徑大小。另外的奈米顆粒使用去離子水稀釋至適當濃度, 測 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒表面電荷。所有樣品皆測定三次, 求平均值(mean \pm SD)。

(六) 統計分析

實驗結果之數據以平均±標準誤差(means ± SD)顯示。利用 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 分析所有組別之實驗數據，機率值小於 0.05 ($p < 0.05$)時各組間統計上有顯著性差異。之後使用 SigmaPlot 10.0 軟體進行資料整理及作圖。



肆、 結果與討論

一、 樣品製備

(一) 幾丁聚醣製備

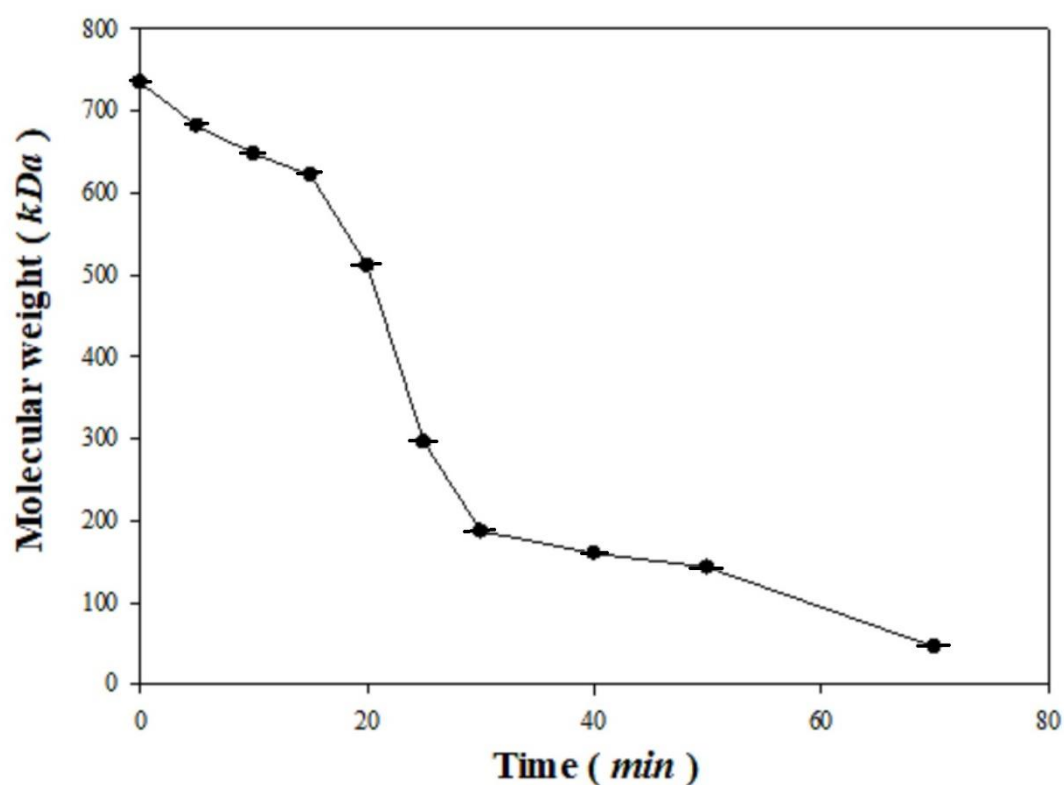
參考沈(2004)之方法及條件，放置幾丁質粉末於高溫($105\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)及強鹼(57 % (w/v) NaOH)的環境下作用約 2 小時，此為幾丁質之去乙醯目的是其結構上乙醯基(acetyl group)部分的去除造成胺基(amino group)裸露形成幾丁聚醣。

許多研究指出幾丁聚醣的去乙醯程度是決定其應用性之重要因素，包括溶解度、電荷及黏度等性質。當幾丁聚醣之去乙醯程度愈高愈容易溶解酸性溶液當中，並且具有高度陽離子之特性(NH_3^+)，此特性能增加與帶有負電之腸道黏膜細胞的吸附力，而且以短時間暫時打開腸黏膜上之連結(tight junctions)，有助於其中包覆之藥物易吸收進入人體或動物血液中。

(二) 幾丁聚醣分子量之製備

參考林(2012)製備之條件，以臭氧濃度 6.3 g/m^3 於 50 至 55 $^{\circ}\text{C}$ 之溫度分別處理幾丁聚醣於不同時間，由(圖十)得知，當臭氧氧化降解時間越長，幾丁聚醣鏈長變短、分子量越小，經 70 分鐘臭氧作用後可得到 46 kDa 之幾丁聚醣。

許多學者和研究表示，幾丁聚醣的分子量與其應用有重要的關係，包括幾丁聚醣的溶解度、黏度及鏈長等影響。當幾丁聚醣分子量變低時：溶解性變高、擁有的鏈長變短、黏度則變為較低(Tikhonov *et al.*, 2006)。本研究擬選出四種分子量：Original Mw (735 *kDa*)、High Mw (511 *kDa*)、Medium Mw (296 *kDa*)及 Low Mw (46 *kDa*) 之幾丁聚醣進行包覆鞣花酸，製備 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒奈米顆粒並探討其特性。



圖十、臭氧處理時間對幾丁聚醣降解程度之影響。

Fig. 10. Effect of ozone treatment time on the degree of chitosan degradation.

(三) 鞣花酸溶解性測試

表一為鞣花酸置於水、冰醋酸、甲醇、絕對酒精、二甲基亞砜、四氫呋喃、氫氧化鈉溶劑之溶解情形。結果得知，鞣花酸完全不溶於水，部分溶解於冰醋酸、甲醇、絕對酒精、二甲基亞砜、四氫呋喃，能完全溶解於 0.1 M 的氫氧化鈉溶液中。

鞣花酸其中一個特性從結構上看來是苯和呋喃官能基位置為羥基，其不溶於水同時不溶於有機溶液。關於鞣花酸的溶解特性跟萃取與來源有關，最後參考原料之建議溶劑選用 0.1 M 的氫氧化鈉且須攪拌過夜。

表一、鞣花酸對若干溶劑之溶解性。

Table. 1. Solubility of ellagic acid in a number of solvents.

去離子水	冰醋酸	甲醇	絕對酒精	二甲基亞砜	四氫呋喃	氫氧化鈉
▲	◆	◆	◆	◆	◆	●

▲: precipitate (完全不溶解)

◆: precipitate and creamy suspension (部分溶解)

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

二、 製備條件對幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸

(CS-TPP-Ellagic acid) 奈米顆粒特性之影響

將鞣花酸(ellagic acid)溶於氫氧化鈉後，分別加入不同分子量之幾丁聚醣溶液(CS)，攪拌均勻後再加入不同量之三聚磷酸鈉溶液(TPP)，進行包覆鞣花酸製備 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒，並探討其 ellagic acid 之濃度、CS 分子量及 CS/TPP 重量比，探討奈米顆粒之包覆率、裝載率、產率、粒徑及電位的影響。

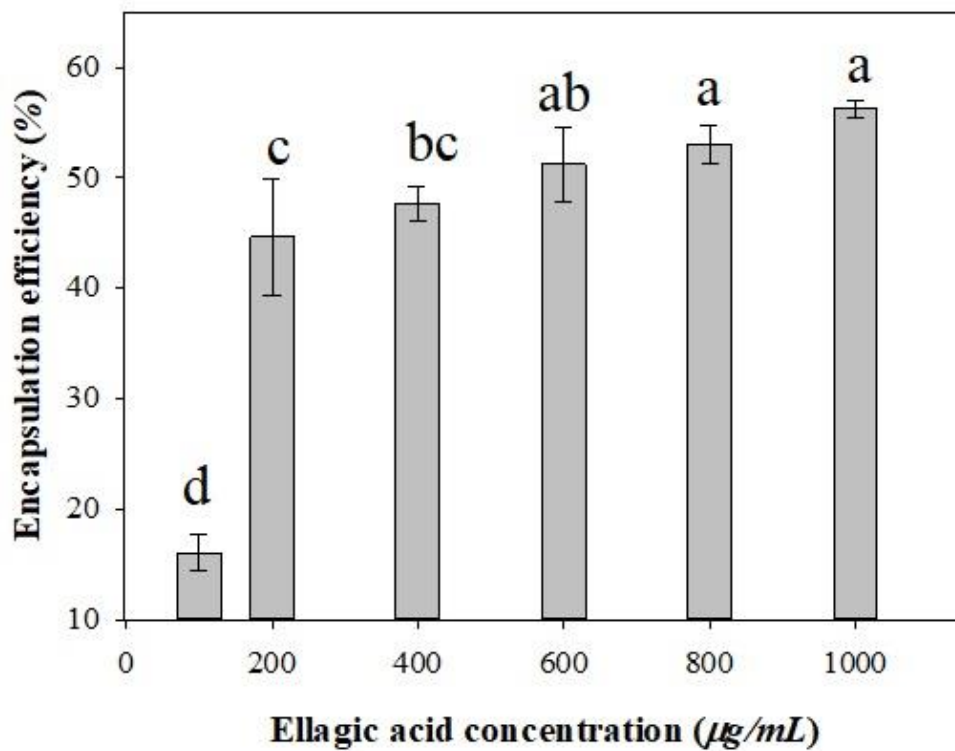
(一) 鞣花酸濃度之影響

先前孫(2010)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)，發現幾丁聚醣分子量越高、CS/TPP 重量比越低時，所製備出的奈米顆粒在胃腸道模擬釋放之實驗安定性越高。林(2012)利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆槲皮素(Quercetin)，使用原分子量幾丁聚醣且 CS/TPP 重量比例為 3/1 時，製備之奈米顆粒於胃腸道安定性的效果較佳。參考先前學者實驗後，本實驗先以未降解處理之幾丁聚醣(Original Mw CS, 735 kDa)，CS/TPP 重量比為 3/1，探討鞣花酸濃度(100 至 1000 $\mu\text{g/mL}$)對於 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒特性之影響，其中包括鞣花酸之包覆率、裝載率、產率、粒徑大小及表面電位等。

1. 鞣花酸包覆率之影響

(圖十一)為不同鞣花酸濃度對於 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒包。在鞣花酸奈米顆粒包覆率的部分，起初在鞣花酸低濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ 時是比較低的大約是 16 %，而之後隨著濃度的上升包覆率為上升趨勢，200 $\mu\text{g/mL}$ ~ 1000 $\mu\text{g/mL}$ 有從 44 % 上升到 56 % 的包覆率。推測的原因為低濃度的鞣花酸分散在溶液中的溶質密度較低，當和 CS、TPP 形成網狀結構時鞣花酸鑲入的量較低，當鞣花酸濃度上升時，相對的 CS 與 TPP 則捕捉較多的鞣花酸。本實驗未使用超過 1000 $\mu\text{g/mL}$ 因為鞣花酸溶解性和幾丁聚醣會析出的問題，固最高只可實驗至 1000 $\mu\text{g/mL}$ 。

鄭(2015)以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆茄紅素製備奈米顆粒，其結果發現當茄紅素濃度 20 $\mu\text{g/mL}$ 上升至 80 $\mu\text{g/mL}$ 時，包覆率逐漸上升，一般實驗情況理應進行更高濃度之測試，但由於高濃度之茄紅素對此系統中會產生析出的問題，故最高只可使用 80 $\mu\text{g/mL}$ 與本實驗有相同之結果。



圖十一、鞣花酸濃度對於幾丁聚糖鞣花酸奈米顆粒包覆率之影響。

Fig. 11. Effect of ellagic acid concentration on the ellagic acid encapsulation efficiency.

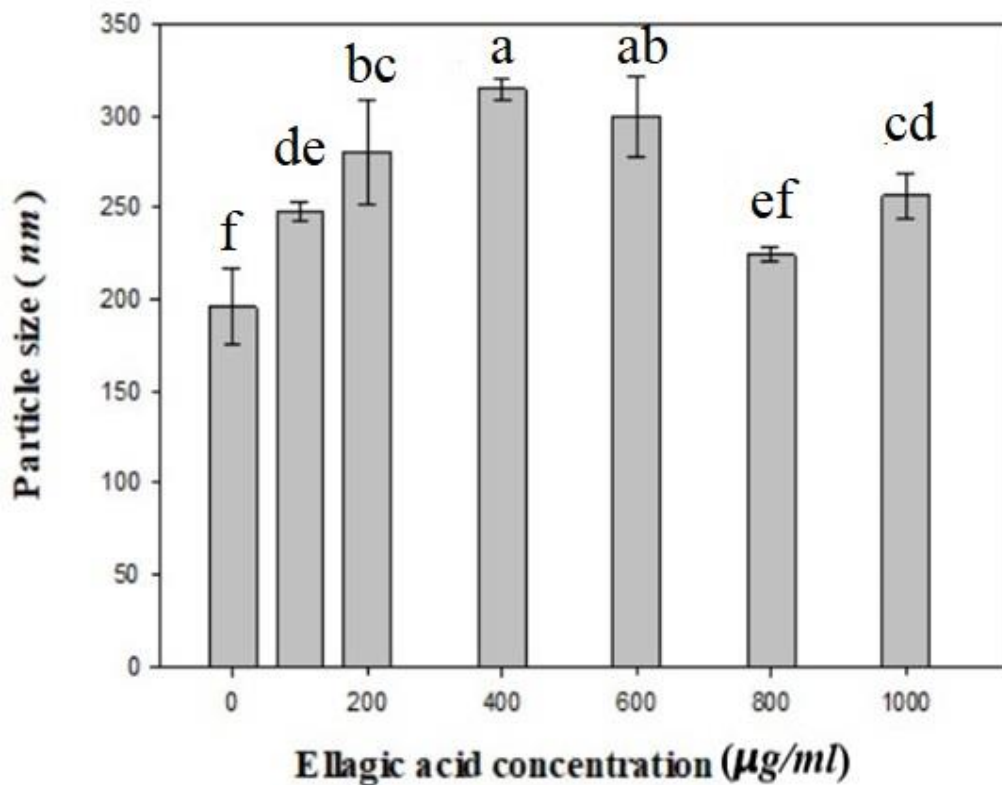
(Original Mw CS ; CS / TPP mass ratio : 3/1).

* a-d mean with different letters are significantly different (p<0.05) . Each value is expressed as mean ± SD, n=3.

2. 奈米顆粒平均粒徑之影響

(圖十二)所示鞣花酸濃度對 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒大小之影響。其中，未包覆者 CS-TPP 奈米顆粒，其大小約為 200 nm，其使用濃度 100、200 及 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，其奈米顆粒大小分別約為 250、280 及 310 nm，推測原因是鞣花酸濃度增加將會使 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒包覆率增加所致。但若其濃度增加至 600 及 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 則顆粒大小有下降的趨勢，約為 300 及 240 nm，此可能原因，鞣花酸本身帶有負電，當其濃度增加時會與幾丁聚醣之正電相互吸引力增加，使顆粒網狀縮小之故。當其濃度增加至 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，可能其負電太多會與 TPP 上負電產生排斥，使顆粒網狀蓬鬆，而稍微增加至約為 250 nm。

陳(2016)以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆薑黃素製備奈米顆粒，發現包覆不同濃度薑黃素之奈米顆粒，其粒徑皆大於未包覆者，而隨著薑黃素濃度的增加，其粒徑有變大的情況，作者推測是因為更多的薑黃素被包覆於奈米顆粒之中，導致粒徑變大，上述結果和本實驗相似。



圖十二、鞣花酸濃度對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒粒徑大小之影響。

Fig. 12. Effect of ellagic acid concentration on the particle size of CS-TPP- Ellagic acid nanoparticles. (Original Mw CS ; CS/TPP mass ratio : 3/1).

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

3. 奈米顆粒表面電位之影響

表二所示使用鞣花酸濃度對 CS-TPP-Ellagic acid，奈米顆粒表面電位之影響。未包覆者的+ 41.7 *mV*。使用鞣花酸之濃度自 100 ~ 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，其奈米顆粒之表面電位似乎無變化，但其濃度增加至 800 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，則表面電位有明顯下降，分別為+ 29.1 *mV*+ 26.4 *mV*。此應該由於鞣花酸之負電中和幾丁聚醣之正電之關係。

鄭(2015)以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆茄紅素奈米顆粒，探討不同濃度之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+ 49 *mV* 至+ 53 *mV*之間，可能是茄紅素表面不帶有電位，而和本實驗產生些許的差異。

表二、鞣花酸濃度對於幾丁聚醣－三聚磷酸鈉－鞣花酸奈米顆粒表面電位之影響。

Table 2. Effect of ellagic acid concentration on the zeta potential of CS-TPP Ellagic acid nanoparticles.

Ellagic acid concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	ζ potential(mV)
0	+41.7a
100	+38.8a
200	+39.5a
400	+38.7a
600	+39.4a
800	+29.1b
1000	+26.4b

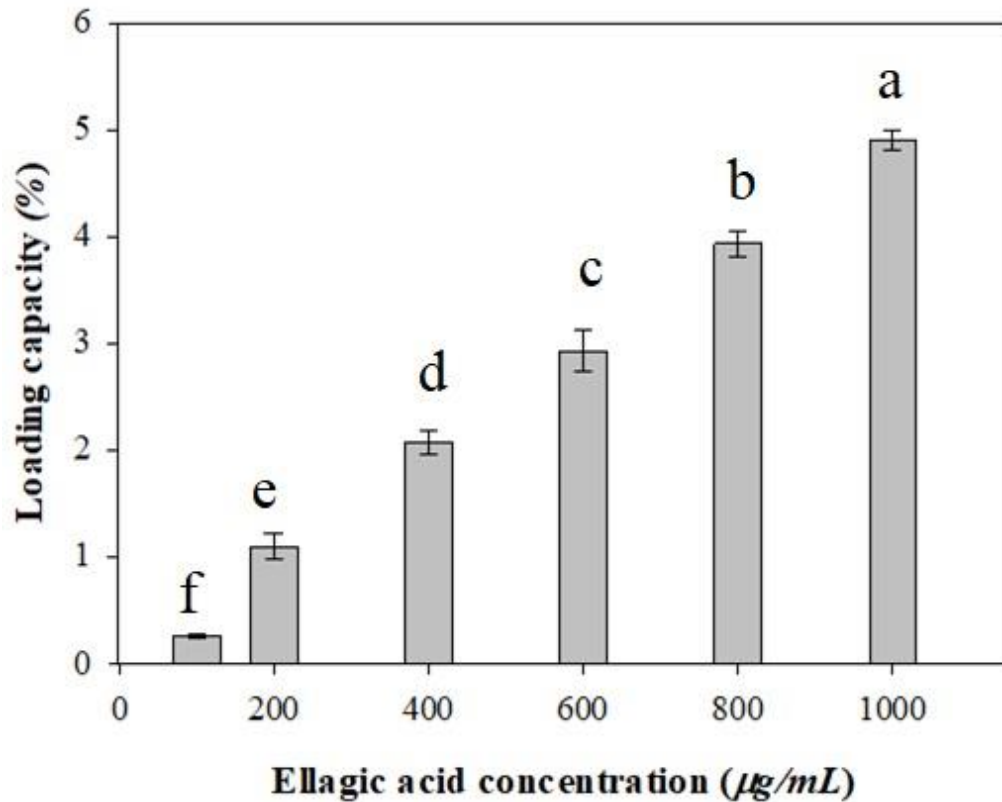
(Original Mw CS ; CS/TPP mass ratio: 3/1)

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

4. 鞣花酸裝載率之影響

鞣花酸裝載率的概念為單位奈米顆粒內攜帶多少量之鞣花酸。(圖十三)所示，發現其濃度自 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 上升 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 時，裝載率有上升之趨勢，由 0.26 上升到 0.49 %，可能的原因是與包覆率有關，即於低濃度時 CS 及 TPP 產生包覆率比較低，相對的於高濃度時，其與 CS、TPP 產生包覆率比較多所致。

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。發現隨著薑黃素濃度增加，其裝載率也有逐漸上升之趨勢，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，本實驗與上述結果相似。



圖十三、鞣花酸濃度對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒裝載率之影響。

Fig. 13. Effect of ellagic acid concentration on the ellagic acid loading capacity.(Original Mw CS ; CS/TPP mass ratio : 3/1).

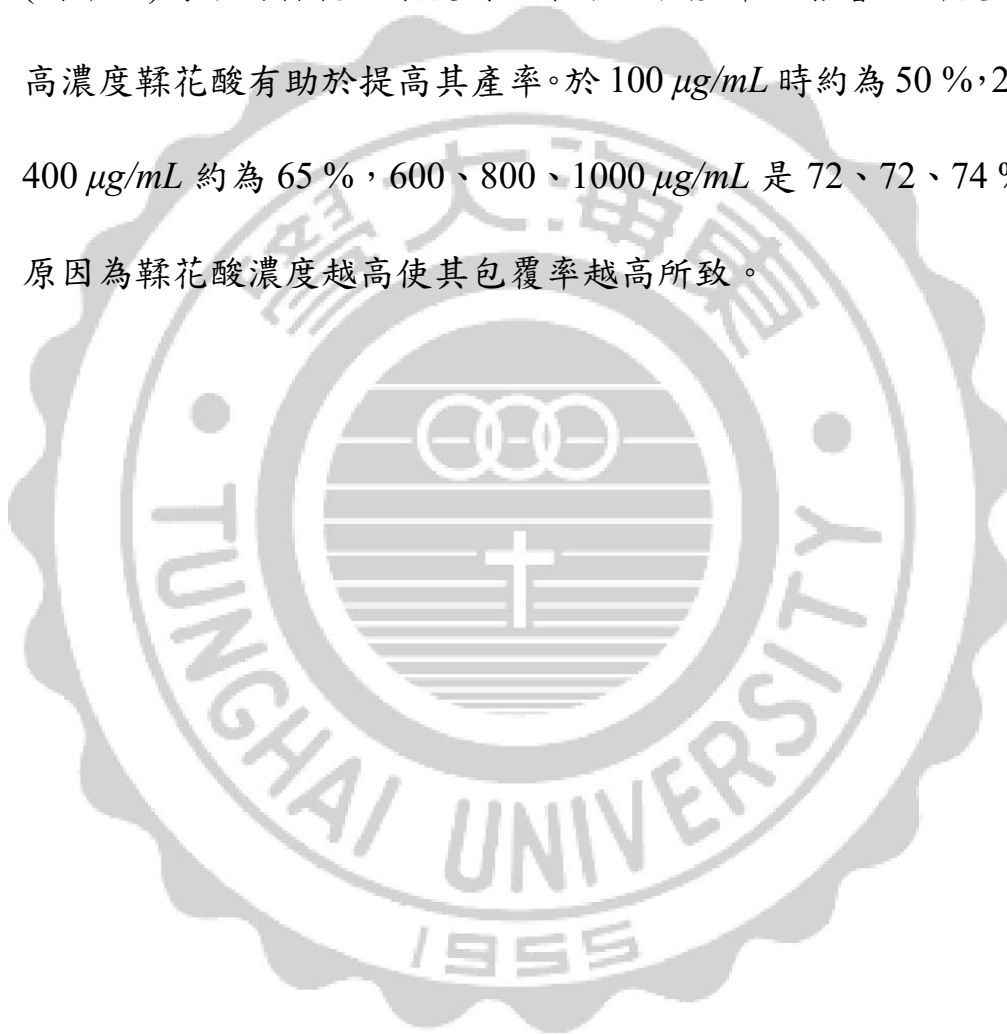
* a-f mean with different letters are significantly different (p<0.05). Each value is expressed as mean ± SD, n=3.

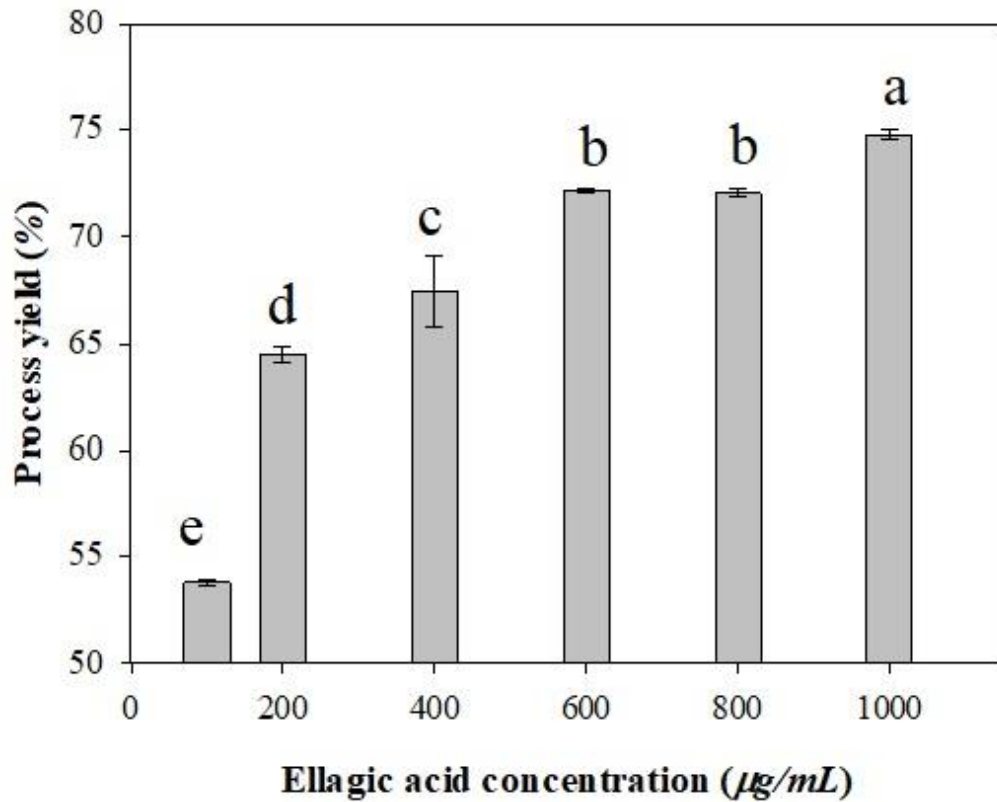
5. 奈米顆粒產率之影響

奈米顆粒產率由以下公式計算：

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

(圖十四)為不同鞣花酸濃度對於奈米顆粒產率之影響。所使用較高濃度鞣花酸有助於提高其產率。於 $100 \mu\text{g/mL}$ 時約為 50%，200、400 $\mu\text{g/mL}$ 約為 65%，600、800、1000 $\mu\text{g/mL}$ 是 72、72、74%。原因為鞣花酸濃度越高使其包覆率越高所致。





圖十四、鞣花酸濃度對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒產率之影響。

Fig. 14. Effect of ellagic acid 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.

總和以上實驗結果整理後，當鞣花酸濃度上升(100 至 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒之鞣花酸包覆率持續上升約在 50 %、裝載率則隨著鞣花酸濃度的增加而上升(0.2 至 5 %)、奈米顆粒之產率數據約在 (55 至 70 %)；不同鞣花酸濃度對於奈米顆粒之粒徑影響不大，皆在奈米等級的範圍(250 至 350 nm)，而表面電位奈米顆粒皆帶有正表面電位(+26 至+41 mV)。作為初步口服藥物考量盡可能選擇高劑量的條件下，總和結果，包覆率方面除了 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以外，大約在 50 %上下、裝載率因包覆率持續上升、產率方面 600、800 及 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 數據上差異不大、奈米顆粒之粒徑大小都有在奈米範圍中，以及表面電位方面增加鞣花酸濃度 600 到 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時數據上出現下降的情況，最終鞣花酸濃度選擇了 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作為後續實驗探討的條件。

(二) 幾丁聚醣分子量之影響

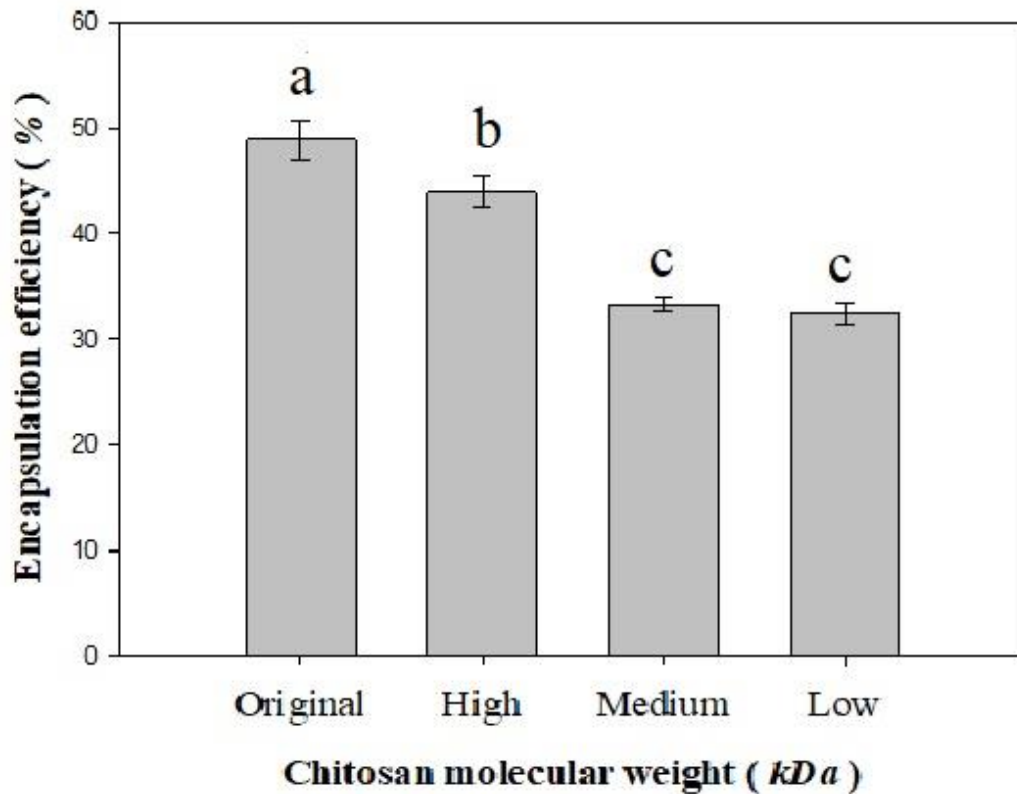
前一段實驗得知，鞣花酸濃度在 600 $\mu\text{g/mL}$ 時所製備出的 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒為最終的條件，並固定 CS/TPP 重量比在 3/1，使用不同分子量之幾丁聚醣(Original Mw : 735 kDa、High Mw : 511 kDa、Medium Mw : 296 kDa 及 Low Mw : 46 kDa) 對於鞣花酸之包覆率、裝載率、產率、粒徑大小還有表面電位之影響。

1. 鞣花酸包覆率之影響

(圖十五)為不同分子量幾丁聚醣對於鞣花酸包覆率影響，可觀察到原幾丁聚醣有較好的包覆率約 50%，之後使用幾丁聚醣分子量的下降，鞣花酸包覆率也跟著下降約 30%。推測以下三個原因將有助於原分子量之 CS 包覆較高的鞣花酸：其一較大的分子量其擁有較長的結構鏈長，進行離子交聯包覆時能與三聚磷酸鈉形成更多的網狀結構；其二，較高原分子量溶於溶液時黏度也較高，適當的黏度有助於包覆鞣花酸，屬於物理包覆的方式；其三，原分子量 CS 有較多帶正電 NH_3^+ 基，可捕抓較多帶負電的鞣花酸。

鄭(2015)等人以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉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茄紅素包覆率之影響。其結果分別為 Original Mw:70.8 %; High Mw:60 %; Medium Mw:49.9 %; Low Mw:上 41%，作者也說明了幾丁聚醣的鏈長、黏度和帶有正電量多寡皆會影響包覆率的數據，本實驗之結果與其結果相似。





圖十五、幾丁聚醣分子量對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒包覆率之影響。

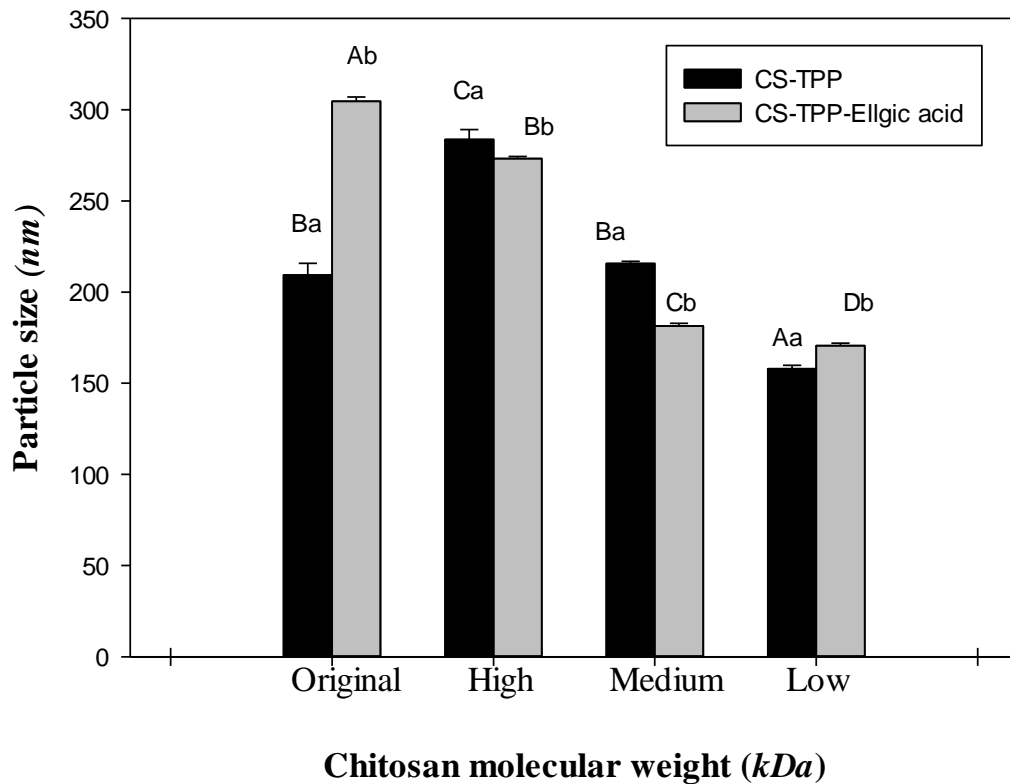
Fig. 15. Effect of chitosan molecular weight on the ellagic acid encapsulation efficiency of CS-TPP- Ellagic acid nanoparticles. (Ellagic acid concentration : $600 \mu\text{g}/\text{mL}$; CS/TPP mass ratio : 3/1).

* 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.

2. 奈米顆粒平均粒徑之影響

(圖十六)為不同分子量之幾丁聚醣對鞣花酸奈米顆粒之大小之影響。對未包覆鞣花酸而言，幾丁聚醣原分子量因其黏度較高且有最多的正電 NH_3^+ 基，CS 能與 TPP 形成結構較緊密而較小的奈米顆粒，約 200 nm 。當 CS 部分受到臭氧降解為高分子量者，其黏度及正電 NH_3^+ 基減少，此時與 TPP 鍵結後形成的結構較為寬鬆，其奈米顆粒變大約為 280 nm 。若 CS 繼續降解為更小的中分子量及低分子量者，其鏈長較短，與 TPP 鍵結變為更小的奈米顆粒，分別為約 220 nm 及 150 nm 。對有包覆鞣花酸奈米顆粒而言，CS 分子量越小則其奈米顆粒越小，此與包覆率有關，即 CS 分子量越小所包覆之鞣花酸越少，使其顆粒越小之故。

鄭(2017)等人以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆柚皮素製備奈米顆粒，探討不同分子量之幾丁聚醣對於柚皮素奈米顆粒粒徑大小之影響。結果發現未包覆柚皮素之奈米顆粒大約為 $300\text{ nm}\sim 400\text{ nm}$ 之間，包覆柚皮素後奈米顆粒大約為 $500\text{ nm}\sim 650\text{ nm}$ 之間，作者推論原和高分子量之幾丁聚醣擁有較長的鏈長、較高黏度以及較多的 NH_3^+ 基；中和低分子量之幾丁聚醣因為鏈長較短、黏度較低、 NH_3^+ 基也較少，而這些都會是影響最終奈米顆粒粒徑大小的因素。



圖十六、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-鞣花酸奈米顆粒粒徑大小之影響。

Fig.16. Effect of chitosan molecular weight on the particle size of CS-TPP and CS-TPP-Ellagic acid nanoparticles. (Ellagic acid concentration : $600 \mu\text{g/mL}$; CS/TPP mass ratio : 3/1).

* a-d 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.

3. 對奈米顆粒表面電位之影響

表三為不同的幾丁聚醣分子量對 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒表面電位影響結果。由此表可看出，未包覆者(CS-TPP nanoparticles)，原分子量之幾丁聚醣 CS-TPP 奈米顆粒表面電位約 $+47.6\text{ mV}$ ，經臭氧降解至高分子量、中分子量及低分子量，其奈米顆粒表面電位分別為 $+40.1\text{ mV}$ 、 $+33.8\text{ mV}$ 及 $+37.1\text{ mV}$ 。此電位下降之原因為幾丁聚醣被臭氧降解時，CS 鏈上之正電 NH^{3+} 基部分被去除之故。而包覆鞣花酸之 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒，CS 之不同分子量對其表面上對其表面電位影響之差異並不大，此可能為帶負電之鞣花酸本身會與帶負電之 TPP 有相互排斥作用，使奈米顆粒彼此之間產生斥力推開彼此而露出正電 NH^{3+} 基之故。

鄭(2015)等人以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉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茄紅素表面電位之影響。其結果包覆前後分別為 Original Mw： $+55.2\text{ mV}$ 、 $+51.8\text{ mV}$ ；High Mw： $+54.4\text{ mV}$ 、 $+48.7\text{ mV}$ ；Medium Mw： $+51.4\text{ mV}$ 、 $+45.8\text{ mV}$ ；Low Mw： $+39.6\text{ mV}$ 、 $+33.4\text{ mV}$ ，作者也說明了結構分子會部分遮蔽住幾丁聚醣結構上 NH^{3+} 基，進而影響表面電位。

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－鞣花酸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-Ellagic acid nanoparticles.

Type of nanoparticles		
Chitosan molecular weight (kDA)	Unloaded	Ellagic acid-loaded
	ζ potential(mV)	
Original Mw	+47.6Aa	+48.3Aa
High Mw	+40.1Bb	+45.5ABa
Medium Mw	+33.8Cb	+43.2Ba
Low Mw	+37.1BCb	+46.7ABa

*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.

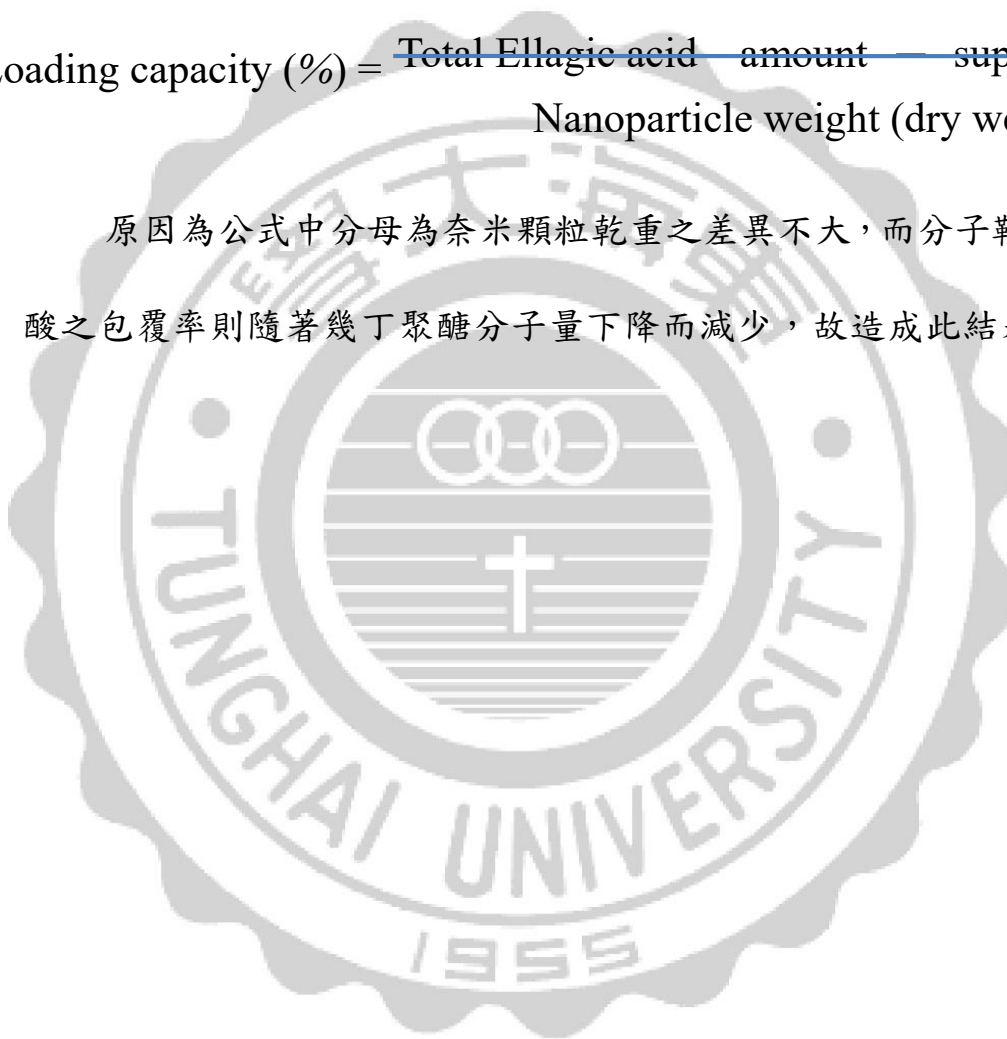
4. 鞣花酸裝載率之影響

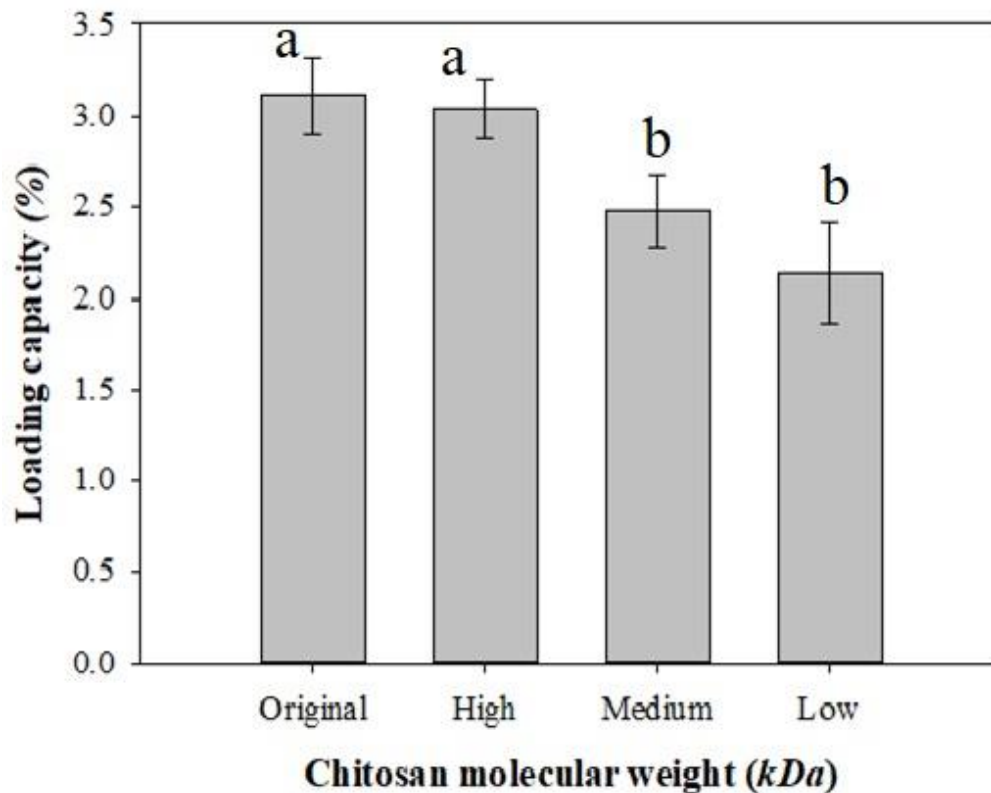
(圖十七)為不同分子量之幾丁聚醣對於鞣花酸裝載率之影響。

由此圖得知，隨著幾丁聚醣分子量的減少，鞣花酸之裝載率有些許下降的趨勢，大約從3%下降至2%。裝載率的公式如下：

$$\text{Loading capacity (\%)} = \frac{\text{Total Ellagic acid amount} - \text{supernatant Ellagic acid amount}}{\text{Nanoparticle weight (dry weight)}}$$

原因為公式中分母為奈米顆粒乾重之差異不大，而分子鞣花酸之包覆率則隨著幾丁聚醣分子量下降而減少，故造成此結果。





圖十七、幾丁聚醣分子量對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒裝載率之影響。

Fig. 17. Effect of chitosan molecular weight on the ellagic acid loading capacity of CS-TPP-ellagic acid nanoparticles. (Ellagic acid concentration : $600\mu\text{g}/\text{mL}$; CS/TPP mass ratio : 3/1).

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

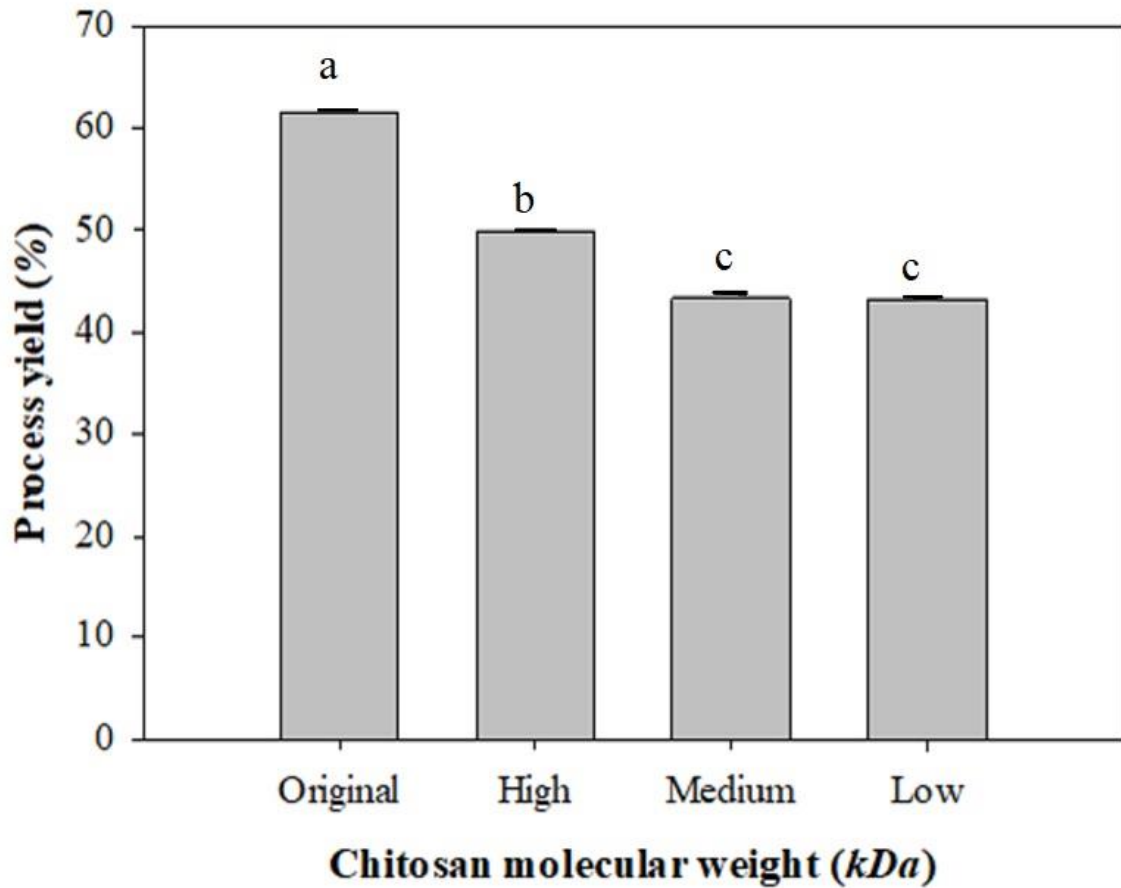
5. 奈米顆粒產率之影響

產率公式計算為：

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

(圖十八)所示不同幾丁聚醣分子量對鞣花酸奈米顆粒產率之影響。由此圖可看出，幾丁聚醣分子量減少會使其產率有下降的趨勢。其中原分子量、高分子量及中分子量，其產率約為 60 %、50 % 及 40 % 而低分子量者則不下降了。原因為其分母是固定地。而公式中分子當幾丁聚醣分子量減少使鞣花酸之包覆率下降，故產生此結果。





圖十八、幾丁聚醣分子量對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒產率之影響。

Fig. 18. Effect of chitosan molecular weight on the nanoparticle process yield of CS-TPP-Ellagic acid nanoparticles. (Ellagic acid concentration : $600 \mu\text{g/mL}$; 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.

從以上不同分子量實驗結果得之，當幾丁聚醣分子量越小(735 至 46 *kDa*)，所製備出之 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒，其包覆率逐漸下降(50 至 20 %)，裝載率也呈現下降的趨勢(3 至 2 %)，產率也呈現下降的趨勢(60%下降至 40 %)，同時奈米顆粒平均粒徑在(300nm 至 170 nm)，而表面電位在(+ 48.3 *mV* 至+43.2 *mV*)之間。其中 CS 原分子量之 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒在包覆率、裝載率、產率、粒徑大小及表面電位，數值上表示優勢。(約 50 %、約 3 %、約 60 %、約 300 nm、約+45 *mV*)。故本實驗以原分子量之 CS 作為原料於後續實驗。

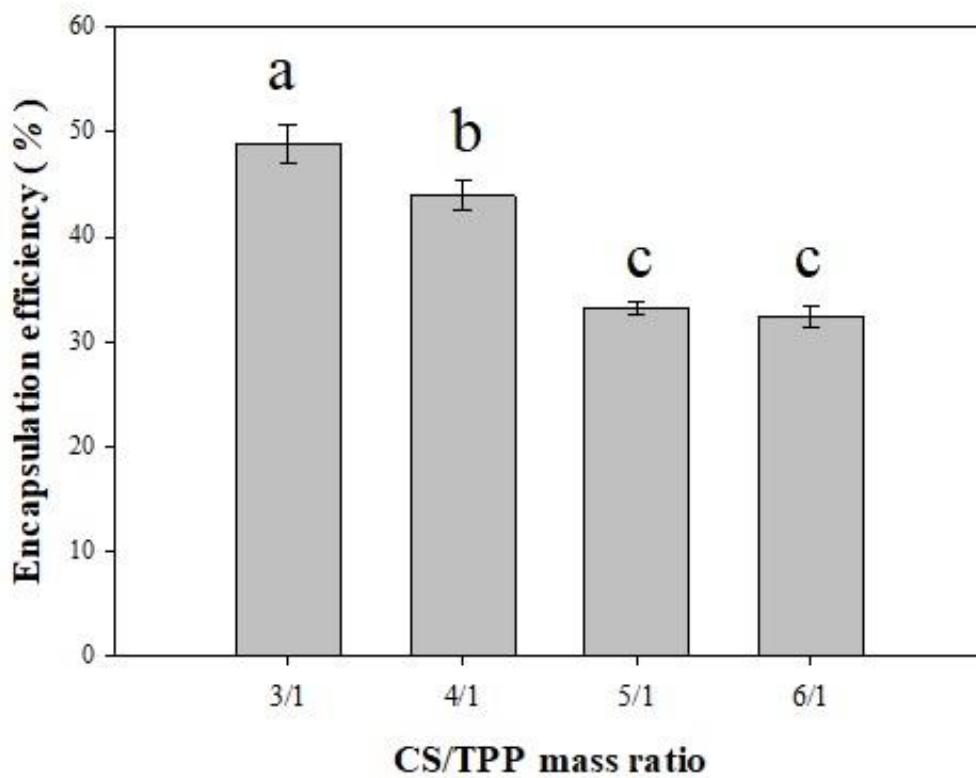
(三) CS/TPP 重量比之影響

由上述兩實驗結果得知 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒，在鞣花酸濃度為 $600 \mu\text{g/mL}$ 及原分子量有較佳之特性。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)對於鞣花酸包覆率、裝載率、產率、粒徑大小及表面電位之影響。

1. 鞣花酸包覆率之影響

(圖十九)為 CS/TPP 重量比對鞣花酸包覆率之影響。圖中所示，CS/TPP 越高(3/1、4/1、5/1 及 6/1)其包覆率很明顯地越低(約 50 %、40 %、33 %及 30 %)，此可能由於 CS/TPP 重量比為 3/1 時，CS 上之正電數量與 TPP 負電量數量差異不大，CS 與 TPP 產生良好之離子鍵，形成較完整的網狀結構，較多的鞣花酸包在其中。當 CS/TPP 上升時，CS 鏈上之正電 NH^{3+} 基則多於 TPP 之負電，此時過多之 NH^{3+} 基彼此間產生斥力，形成之網狀結構較為鬆散，使其包覆率下降之故。

陳(2016)研究不同分子量幾丁聚醣包覆薑黃素製備奈米顆粒，當 CS/TPP 重量比 3/1 到 6/1 時，包覆率有些許下降的趨勢，推測原因為當 CS/TPP 在 3/1 與 4/1 時，幾丁聚醣和三聚磷酸鈉的含量較接近，當幾丁聚醣比例升高，過多的 CS 與 TPP 形成的奈米顆粒結構是較為寬鬆的，而無法有效包覆薑黃素，本實驗與此結果相似。



圖十九、CS/TPP 重量比對於幾丁聚糖鞣花酸奈米顆粒包覆率之影響。

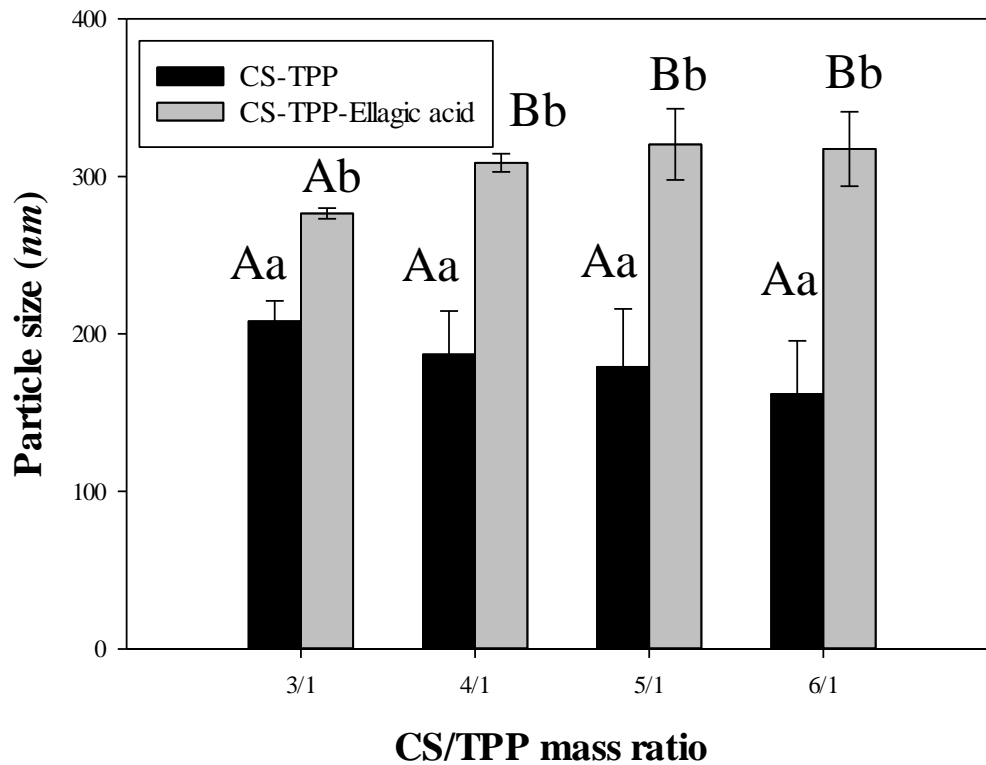
Fig. 19. Effect of CS/TPP mass ratio on the ellagic acid encapsulation Efficiency. (Original molecular weight chitosan ; Ellagic acid concentration : 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

* 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, $n=3$.

2. 奈米顆粒平均粒徑之影響

(圖二十)為不同 CS/TPP 重量比對 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒大小之影響。首先有包覆鞣花酸者比未包覆者大。此由於有包覆鞣花酸在內之關係。對未包覆者而言，雖系統統計上其顆粒大小無差異，但 CS/TPP 較大(3/1 ~ 6/1)時其顆粒變小些(約 200 ~ 150 nm)。此可能於製備奈米顆粒時固定 CS 量，減少 TPP 量，讓 CS/TPP 增加，致使 CS 與 TPP 鍵結不夠而使其顆粒大小變小之故。另外有包覆者而言，CS/TPP 為 3/1 時其奈米顆粒較小，此可能原因為 CS 與 TPP 使用量較適當，使兩者正負電鍵結良好，助於其網狀結構較緊密，進而顆粒變小。當 CS/TPP 大於 3/1，TPP 負電漸少與 CS 形成鍵結漸少，其網狀結構較為寬鬆所致。其顆粒大小約在 250 ~ 310 nm。

鄭(2015)利用不同比例幾丁聚醣與三聚磷酸鈉 3/1 ~ 6/1 製備奈米顆粒包覆茄紅素，發現包覆前奈米顆粒大小差不多，但隨著比例上升 3/1 ~ 6/1 時包覆後奈米顆粒會逐漸變大，最後顆粒大小超過奈米的範圍。而本實驗整體趨勢與此幾丁聚醣與三聚磷酸鈉 3/1 ~ 5/1 時相呼應，而本實驗包覆後奈米顆粒大小皆約在 300 nm 可能的原因是結構上鞣花酸是球形，茄紅素結構是長鏈型，使得 CS/TPP 重量比在 3/1 ~ 6/1 時 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒大小皆在奈米範圍內。



圖二十、CS/TPP 重量比對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉及幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒粒徑大小之影響。

Fig. 20. Effect of CS/TPP mass ratio on the particle size of CS-TPP and CS-TPP-Ellagic acid nanoparticles. (Original molecular weight chitosan ; Ellagic acid concentration : 600 $\mu\text{g/mL}$).

* 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.

*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.

3. 奈米顆粒表面電位之影響

表四為 CS/TPP 重量比對 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒表面電位之影響。未包覆者隨著 CS/TPP 重量比增加 CS-TPP 奈米顆粒表面電位幾乎無差異，但 CS/TPP 重量比上升至 6/1 時的確有增加 $+44\text{ mV} \sim +45.6\text{ mV}$ 。當 CS/TPP 比例之增加理論上其表面電位也會增加，但可能由於 TPP 負電將 CS 正電中和外，部分正電被 CS-TPP 網狀遮蔽所致。有包覆之 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒表面上之正電亦有類似之現象，CS/TPP 增加其正電稍有增加 $+39.5\text{ mV} \sim +41.3\text{ mV}$ 。另外有包覆者，其表面正電位較未包覆者少，此由於帶負電之鞣花酸中和作用所致。

鄭(2017)利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉製備奈米顆粒包覆柚皮素，發現包覆後奈米顆粒包覆前後表面電位下降差異不大，作者解釋可能原因為柚皮素包覆成奈米顆粒時，可能會部分遮蔽幾丁聚醣上之 NH_3 ，因此包覆前後表面電位差異不大。

表四、CS/TPP 重量比對於幾丁聚醣－三聚磷酸鈉及幾丁聚醣－三聚磷酸鈉－鞣花酸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-Ellagic acid nanoparticles.

CS/TPP mass ratio	Type of nanoparticles	
	Unloaded	Ellagic acid-loaded
	ζ potential(mV)	
3/1	+44.0Aa	+39.5Ab
4/1	+42.9Aa	+38.8Aa
5/1	+42.5Aa	+41.0Aa
6/1	+45.6Aa	+41.3Aa

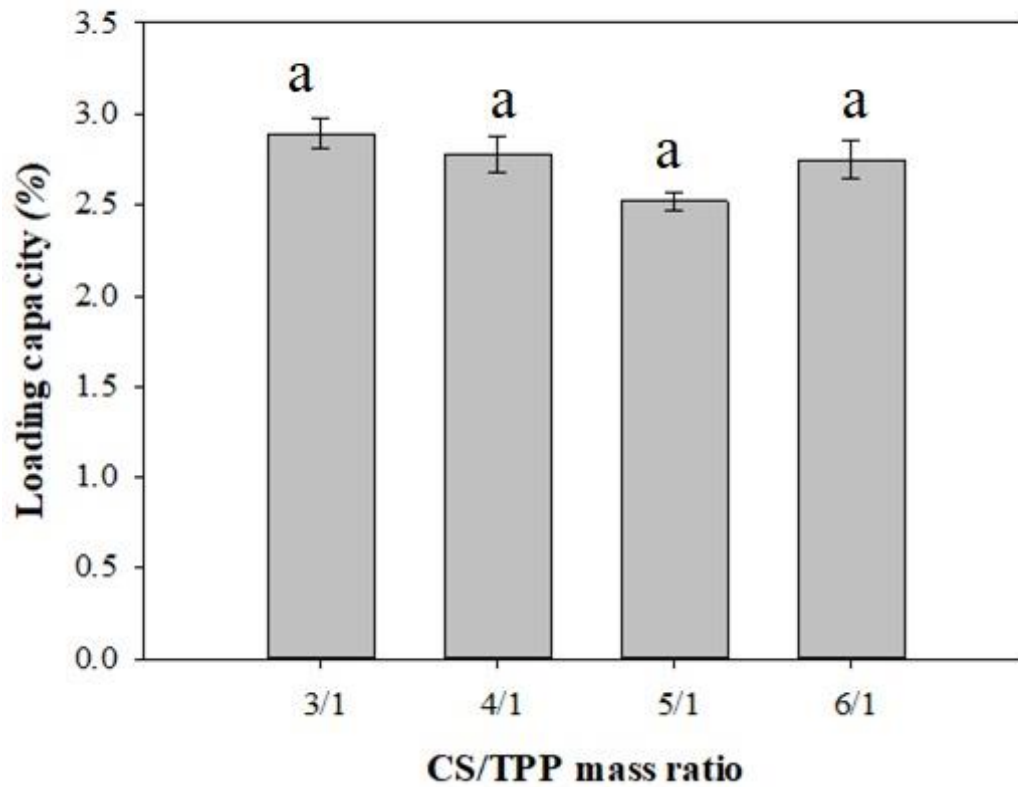
*A mean in the same column (CS/TPP mass ratio) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.

*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.

4. 鞣花酸裝載率之影響

(圖二十一)為 CS/TPP 重量比對於裝載率的影響，是一個先持平後下降，之後又上升的結果，但在統計上則無差異。其原因以公式推導，當 CS/TPP 重量比上升，分母 Nanoprticle weight(dry weight)下降，而分子的部分鞣花酸之包覆率亦下降，此產生其裝載率為持平之結果，裝載率的公式如下：

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



圖二一、CS/TPP 重量比對於幾丁聚糖鞣花酸奈米顆粒裝載率之影響。

Fig. 21. Effect of CS/TPP mass ratio on the ellagic acid loading capacity. (Original molecular weight chitosan ; ellagic acid concentration : 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

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

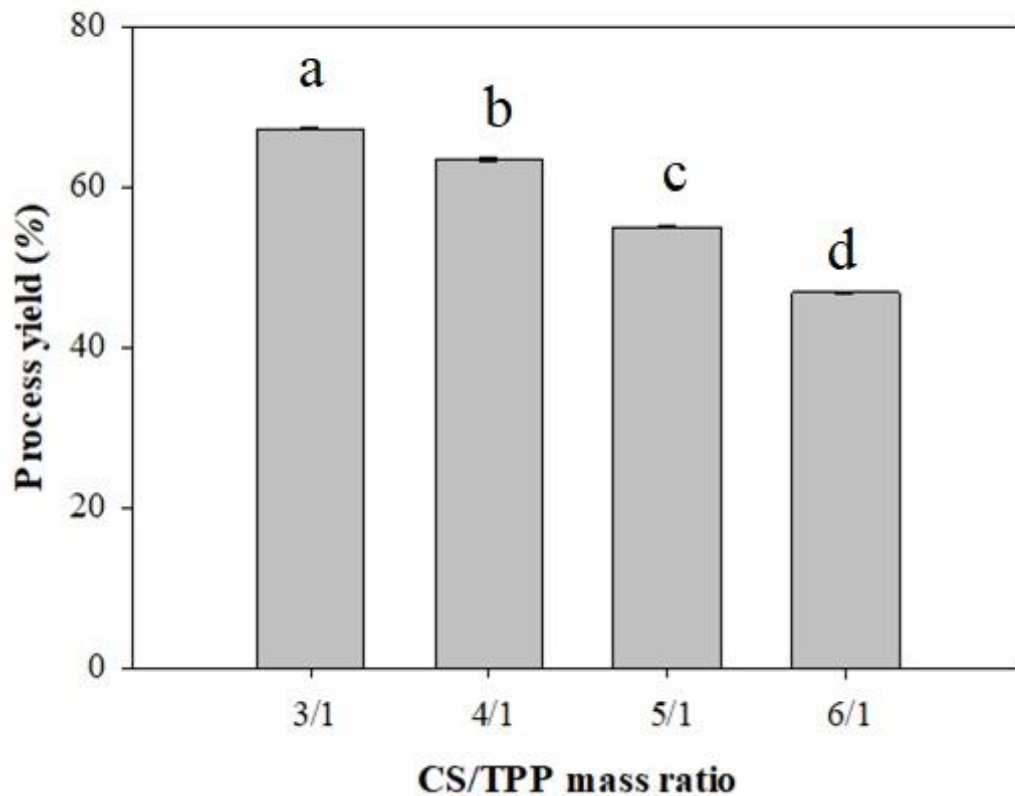
5. 奈米顆粒產率之影響

(圖二十二)為 CS/TPP 重量比對 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒產率之影響。隨著 CS/TPP 之增加其產率減少，即當 CS/TPP 為 3/1、4/1、5/1 及 6/1 時，其產率分別約為 67 %、63 %、55 % 及 46 %。產率公式計算為：

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

公式中，當 CS/TPP 比例上升，分母分子皆為下降趨勢，分母減少 TPP，而分子減少的 CS 與 EA，原因為過少的 TPP 無法有效的與 CS 結合，使得 EA 無法有效包覆在其中，故隨著 CS/TPP 重量比增加，奈米顆粒產率減少。

陳(2016)以不同分子量幾丁聚醣包覆薑黃素製備奈米顆粒，探討 CS/TPP 重量比對於奈米顆粒產率之影響。其結果為 3/1、4/1、5/1 及 6/1 時，其產率分別約為 56 %、20 %、15 % 及 8% 作者推測原因過多的幾丁聚醣無法充分的和三聚磷酸鈉結合，奈米顆粒的量減少，故隨著重量比增加，奈米顆粒的產率越少，本實驗結果與上述結果相同。



圖二二、CS/TPP 重量比對於幾丁聚醣鞣花酸奈米顆粒產率之影響。

Fig. 22. Effect of CS/TPP mass ratio on the nanoparticle process yield. (Original molecular weight chitosan ; Ellagic acid concentration:600 $\mu\text{g/mL}$).

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

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-Ellagic acid 奈米顆粒其包覆率有下降的趨勢(約 50%降到 30%)，產率也是呈現下降的趨勢(約 67%下降到 46%)，裝載率則是持平的結果，粒徑大小變化不大(約 270 到 325 nm)，而表面電位變化不大在(+ 38.8 mV 至+ 41.3 mV)。因此考慮擁有較佳之包覆率，並帶有較佳之裝載率的情況下，挑選 CS/TPP 重量比為 3/1 作為後續實驗之條件。



三、 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒於胃腸 安定性模擬實驗

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-Ellagic acid 奈米顆粒在模擬人體胃腸道之安定性。

選用最佳條件:鞣花酸濃度為 $600 \mu\text{g/mL}$ 、原分子量之幾丁聚醣 (735 kDa)及 CS/TPP 重量比為 3/1 時製備之 CS-TPP-Ellagic acid 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，之後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鞣花酸之釋放情況。

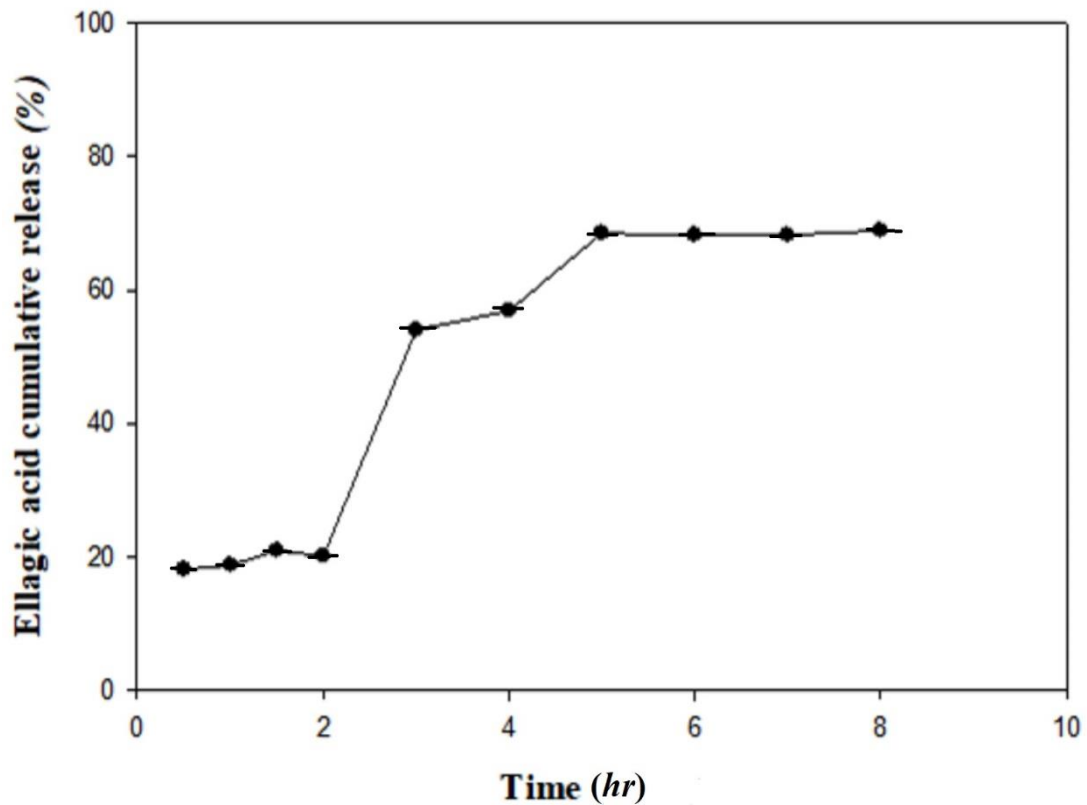
如(圖二三)所示，前 2 小時內鞣花酸在模擬胃酸的環境下，累積釋放率約為 20%，即約有 80%之鞣花酸依舊受到奈米顆粒的保護，這表示幾丁聚醣能夠有效保護鞣花酸，免於受到模擬人體胃酸及酵素的破壞。

接著 3 到 4 小時於模擬人體小腸內之環境時，其釋放率約為 55%，而之後 5 到最後的 8 小時，釋放率則持平約 70%，表示 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒在模擬腸液弱鹼的環境，幾丁聚醣結構變為蓬鬆進一步使的鞣花酸釋放出之原因，然而在將近八個小時的模擬腸道消化中仍

有約 30 %鞣花酸仍在 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒中。

Feng 等學者(2014)實驗利用羧甲基幾丁聚醣裝載紫杉類化療藥物，發現在 Caco-2 細胞膜型上有良好的腸道滲透性效果，並且利用鈣離子其表面帶有正電的特性，短暫的打開細胞間隙(Tight junction)之緊密連結，將紫杉類帶入體內達到提高吸收，本實驗結果與此相呼應。





圖二三、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒於模擬胃液 2 小時後置入模擬腸液 6 小時的鞣花酸累積釋放率。

Fig. 23. Ellagic acid cumulative release of CS-TPP-Ellagic acid nanoparticles in the simulated gastric fluid (pH 1.2 with pepsin) for 2 hours and then in the simulated intestinal fluid (pH 7.4 with pancreatin) for 6 hours.

伍、 結論

一、 製備不同分子量之幾丁聚醣

利用臭氧降解法處理幾丁聚醣(Original Mw : 735 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 70 分鐘的處理後可得到分子量為 46 kDa 之幾丁聚醣，此法為簡單、方便且效率高之降解方法。本實驗依此法控制不同處理時間製出 Original Mw(735 kDa)、High Mw(511 kDa)、Medium Mw(296 kDa)及 Low Mw(46 kDa)作為後續實驗材料。

二、 不同製備條件對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸 (CS-TPP-Ellagic acid) 奈米顆粒特性之影響

此實驗探討三種不同條件，包括鞣花酸濃度、幾丁聚醣分子量及 CS/TPP 重量比，對於 CS-TPP-Ellagic acid 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) 鞣花酸濃度之影響

發現當鞣花酸濃度上升(100 至 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒之鞣花酸包覆率持續上升約(15 至 56 %)，裝載率則隨著鞣花酸濃度的增加而上升(0.2 至 5 %)，然而奈米顆粒之產率數據約在(55 至 70 %)；鞣花酸濃度對於奈米顆粒之粒徑影響不大，皆在奈米

等級的範圍(250 至 350 nm)，而表面電位奈米顆粒皆帶有正表面電位(+26 至+41 mV)。總和以上結果，考量了其有表現良好上述之特性選擇了 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作為後續實驗探討的條件。

(二) 幾丁聚醣分子量之影響

當幾丁聚醣分子量越小(735 至 46 kDa)，製備之 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒其包覆率會逐漸下降(50 至 20 %)，裝載率也呈現下降的趨勢(3 至 2 %)，產率也呈現下降的趨勢(60%下降至 40 %)，同時奈米顆粒平均粒徑在 (150 nm 至 300 nm)，而表面電位在(+ 40 mV 至 +30 mV)。本實驗考量可得上述之良好特性，選擇原分子量(Original Mw)幾丁聚醣作為後續探討不同 CS/TPP 重量比所使用之條件。

(三) CS/TPP 重量比之影響

當 CS/TPP 重量比上升時(3/1 至 6/1)，CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒包覆率有下降的趨勢(50%降到 30%)，產率呈現下降的趨勢(67%下降到 46%)，裝載率是持平的結果，粒徑大小變化不大 (250 到 350 nm)，而表面電位變化不大約(+ 39.5 mV 至+ 41.3 mV)。考慮擁有較佳上述特性，挑選 CS/TPP 重量比為 3/1 作為後續實驗之條件。

三、 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒

於胃腸安定性模擬實驗

將 Ellagic acid 濃度 $600 \mu\text{g/mL}$ 、原分子量幾丁聚醣 Original Mw(735kDa)及 CS/TPP 重量比 3/1 製備 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒，並置於胃及腸溶液，並觀察其釋放出 Ellagic acid 以了解其奈米顆粒在胃溶液安定性。結果，其置留模擬胃液中，釋放出約 20 % Ellagic acid。表示其在胃液中對胃酸及胃酵素有良好的抵抗力。而後續在模擬腸液中 3 至 8 小時，其釋放率約 70 %。表示在腸液弱鹼環境下奈米顆粒不安定。但無論 Ellagic acid 被釋放或在奈米顆粒之中，均可被小腸吸收。

四、 總結

以原分子量幾丁聚醣(735 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 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度之鞣花酸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 3/1，製備 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒。結果發現鞣花酸包覆率約為 50 %，裝載率為 2.5 %，產率約為 60 %，粒徑大小為 300 nm，表面電位約為 +40 mV。經由模擬胃腸道實驗發現，在胃液中有良好的保護作用及在腸液中大部分可被釋放，由此可見此方法製備奈米顆粒，其在胃中可被保護，在腸內可有效的控制鞣花酸的藥物傳遞系統，建議未來需進一步的使用奈米技術修飾後的鞣花酸，謹慎地確定療效，在細胞及動物實驗觀察 CS-TPP-Ellagic acid 奈米顆粒於動物體內之鞣花酸吸收的情況。

陸、 參考文獻

- 林淑珍。(2001)。以臭氧降解幾丁聚醣製備幾丁寡醣之研究。國立臺灣大學食品科學研究所碩士論文。台北，台灣。
- 沈家弘。(2004)。不同去乙酰度幾丁聚醣乳化性質之比較及應用於沙拉醬汁研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。台中，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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 高廣宇。(2015)。奈米技術轉化醫學發展現況及前景展望。藥學學報，50，8，919-924。
- 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。
- 鄭閔鴻。(2017)。幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-柚皮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。
- 陳柏翔。(2017)。以幾丁質和幾丁聚醣製備碳點並探討其特性和應用於檢測微生物及金屬離子。國立臺灣海洋大學食品科學研究所碩士論文。基隆，台灣。

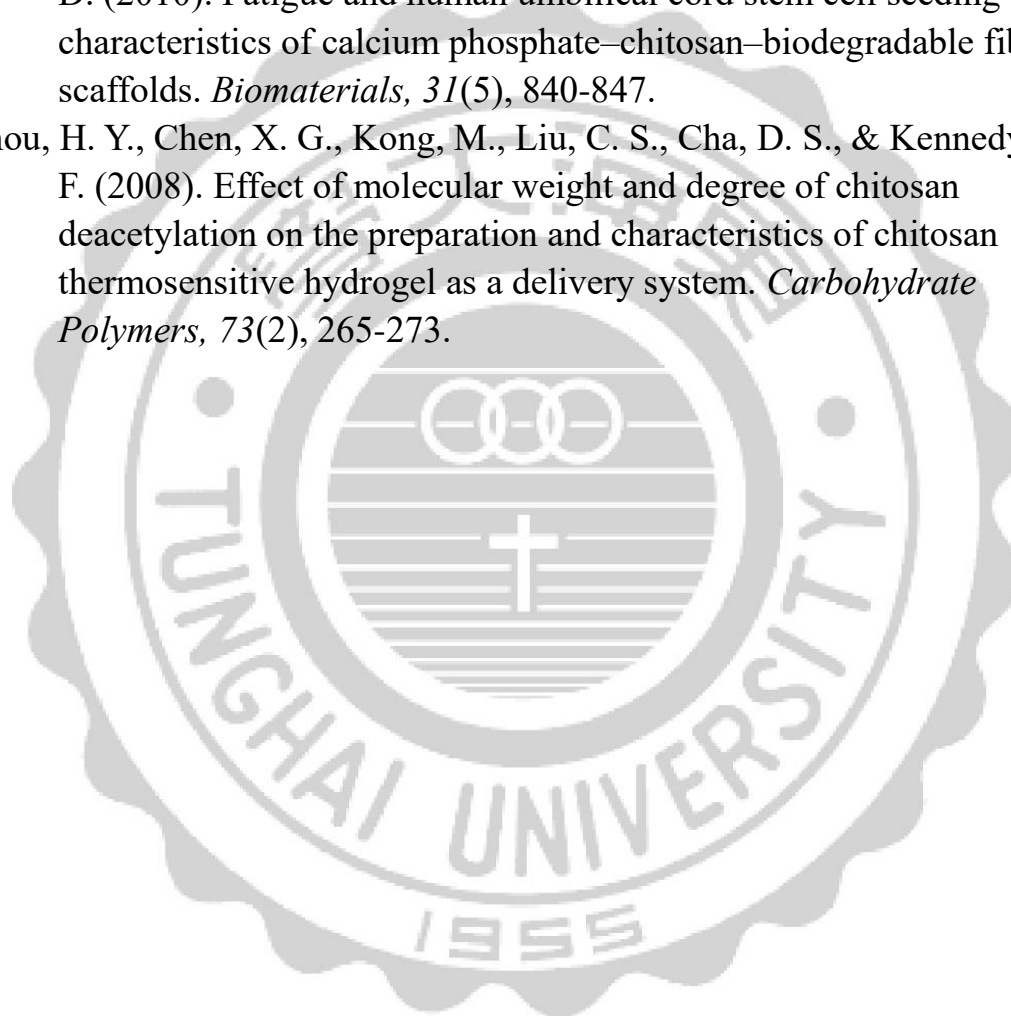
- Arulmozhi, V., Pandian, K., & Mirunalini, S. (2013). Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles for drug delivery system in human oral cancer cell line (KB). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110, 313-320.
- Bajpai, V. K., Kamle, M., Shukla, S., Mahato, D. K., Chandra, P., Hwang, S. K., Kumar, P., Huh, Y. S., & Han, Y.-K. (2018). Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4), 1201-1214.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 19-34.
- Bernkop-Schnürch, A., & Dünnhaupt, S. (2012). Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(3), 463-469.
- Canali, M. M., Pedrotti, L. P., Balsinde, J., Ibarra, C., & Correa, S. G. (2012). Chitosan enhances transcellular permeability in human and rat intestine epithelium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(2), 418-425.
- Eleftheriadou, M., Pyrgiotakis, G., & Demokritou, P. (2017). Nanotechnology to the rescue: using nano-enabled approaches in microbiological food safety and quality. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 87-93.
- Faridi Esfanjani, A., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2018). Improving the bioavailability of phenolic compounds by loading them within lipid-based nanocarriers. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 56-66.
- Feng, C., Sun, G., Wang, Z., Cheng, X., Park, H., Cha, D., Kong, M., & Chen, X. (2014). Transport mechanism of doxorubicin loaded chitosan based nanogels across intestinal epithelium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(1), 197-207.
- Ge, J., Yue, X., Wang, S., Chi, J., Liang, J., Sun, Y., Gao, X., & Yue, P. (2018). Nanocomplexes composed of chitosan derivatives and β -Lactoglobulin as a carrier for anthocyanins: Preparation, stability and bioavailability in vitro. *Food Research International*.

- Geng, X., Kwon, O.-H., & Jang, J. (2005). Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*, 26(27), 5427-5432.
- Hayes, J. E., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M. N., & Kerry, J. P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126(3), 948-955.
- Hsieh, F.-M., Huang, C., Lin, T.-F., Chen, Y.-M., & Lin, J.-C. (2008). Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. *Process Biochemistry*, 43(1), 83-92.
- Ippoushi, K., Takeuchi, A., & Azuma, K. (2009). Prevention of peroxy-nitrite-induced oxidation and nitration reactions by ellagic acid. *Food Chemistry*, 112(1), 185-188.
- Ito, T., Takami, T., Uchida, Y., & Murakami, Y. (2018). Chitosan gel sheet containing drug carriers with controllable drug-release properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 163, 257-265.
- Jeon, Y.-J., & Kim, S.-K. (2000). Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochemistry*, 35(6), 623-632.
- Jong, Wim. H., & Borm, Paul.JA(2008). Drugs delivery and nanoparticles : applications and hazards. *Int J Nanomedicine*.3(2):133-149
- Kashyap, P. L., Xiang, X., & Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 36-51.
- Kennedy, P. J., Perreira, I., Ferreira, D., Nestor, M., Oliveira, C., Granja, P. L., & Sarmiento, B. (2018). Impact of surfactants on the target recognition of Fab-conjugated PLGA nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 366-370.
- Kim, M. K., Lee, J.-S., Kim, K. Y., & Lee, H. G. (2013). Ascorbyl palmitate-loaded chitosan nanoparticles: Characteristic and polyphenol oxidase inhibitory activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 391-394.
- Kim, S., Gaber, M. W., Zawaski, J. A., Zhang, F., Richardson, M., Zhang, X. A., & Yang, Y. (2009). The inhibition of glioma growth in vitro and in vivo by a chitosan/ellagic acid composite biomaterial. *Biomaterials*, 30(27), 4743-4751.

- Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2), 126-139.
- Kubota, N., Tatsumoto, N., Sano, T., & Toya, K. (2000). A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydrate Research*, 324(4), 268-274.
- Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44(5), 1150-1160.
- Larrosa, M., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2006). The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(9), 611-625.
- Li, J., Wang, Y., Liang, R., An, X., Wang, K., Shen, G., Tu, Y., Zhu, J., & Tao, J. (2015). Recent advances in targeted nanoparticles drug delivery to melanoma. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(3), 769-794.
- Liu, F., Avena-Bustillos, R. J., Chiou, B.-S., Li, Y., Ma, Y., Williams, T. G., Wood, D. F., McHugh, T. H., & Zhong, F. (2017). Controlled-release of tea polyphenol from gelatin films incorporated with different ratios of free/nanoencapsulated tea polyphenols into fatty food simulants. *Food Hydrocolloids*, 62, 212-221.
- Liu, Y., Tang, J., Chen, X., & Xin, J. H. (2005). A templating route to nanoporous chitosan materials. *Carbohydrate Research*, 340(18), 2816-2820.
- Lopes, A., Lopes-Lima, M., Bobos, I., Ferreira, J., Gomes, S., Reis, R., Mano, J., & Machado, J. (2010). The effects of Anodonta cygnea biological fluids on biomineralization of chitosan membranes. *Journal of Membrane Science*, 364(1), 82-89.
- Madrigal-Carballo, S., Lim, S., Rodriguez, G., Vila, A. O., Krueger, C. G., Gunasekaran, S., & Reed, J. D. (2010). Biopolymer coating of soybean lecithin liposomes via layer-by-layer self-assembly as novel delivery system for ellagic acid. *Journal of Functional Foods*, 2(2), 99-106.

- Malik, A., Afaq, S., Shahid, M., Akhtar, K., & Assiri, A. (2011). Influence of ellagic acid on prostate cancer cell proliferation: A caspase-dependent pathway. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(7), 550-555.
- Mertens-Talcott, S. U., & Percival, S. S. (2005). Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Letters*, 218(2), 141-151.
- Okla, M., Kang, I., Kim, D. M., Gourineni, V., Shay, N., Gu, L., & Chung, S. (2015). Ellagic acid modulates lipid accumulation in primary human adipocytes and human hepatoma Huh7 cells via discrete mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(1), 82-90.
- Ranade, A. N., Ranpise, N. S., & Ramesh, C. (2015). To investigate the pharmacokinetic profile of ellagic acid in presence of Aloe vera gel powder in rabbits using validated HPLC method. *Synergy*, 2(4), 25-30.
- Singh, B. N., Singh, B. R., Gupta, V. K., Kharwar, R. N., & Pecoraro, L. (2018). Coating with Microbial Hydrophobins: A Novel Approach to Develop Smart Drug Nanoparticles. *Trends in Biotechnology*.36(11),1103-1106.
- 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.
- Wang, Y., Zeng, Y., Fu, W., Zhang, P., Li, L., Ye, C., Yu, L., Zhu, X., & Zhao, S. (2018). Seed-mediated growth of Au@Ag core-shell nanorods for the detection of ellagic acid in whitening cosmetics. *Analytica Chimica Acta*, 1002, 97-104.
- Yue, W., Yao, P., Wei, Y., Li, S., Lai, F., & Liu, X. (2008). An innovative method for preparation of acid-free-water-soluble low-molecular-weight chitosan (AFWSLMWC). *Food Chemistry*, 108(3), 1082-1087.

- Zhang, X., Yang, X., Ji, J & Liu, A.(2016). Tumor targeting strategies for chitosan-based nanoparticles. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*, 148,460-473.
- Zhang, W., Jin, X., Li, H., Zhang, R.-r., & Wu, C.-w. (2018). Injectable and body temperature sensitive hydrogels based on chitosan and hyaluronic acid for pH sensitive drug release. *Carbohydrate Polymers*, 186, 82-90.
- Zhao, L., Burguera, E. F., Xu, H. H. K., Amin, N., Ryou, H., & Arola, D. D. (2010). Fatigue and human umbilical cord stem cell seeding characteristics of calcium phosphate–chitosan–biodegradable fiber scaffolds. *Biomaterials*, 31(5), 840-847.
- Zhou, H. Y., Chen, X. G., Kong, M., Liu, C. S., Cha, D. S., & Kennedy, J. F. (2008). Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 73(2), 265-273.



東海大學

食品科學系碩士班
食品科技組

幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-鞣花酸奈米顆粒之製備及特性研究

(107)

洪紹華
撰