

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-茄紅素奈米顆粒

之製備及特性研究

**Preparation and Characterization of Chitosan-
Sodium Tripolyphosphate-Lycopene Nanoparticles**

鄭文華

Wen-Hua Cheng

指導教授：阮進惠 博士

Advisor: Jin-Hwei Rwan, Ph.D.

中華民國一百零四年六月

June, 2015

謝誌

研修碩士學位期間，承蒙恩師 阮進惠 博士於研究上給予悉心指導及建議，使實驗與論文得以順利進行及完成；於生活中的照顧，如同家人般，使我倍感親切。在論文撰寫期間，亦感謝恩師不厭其煩地反覆詳閱批改及給予建議，使我能順利通過碩士學位口試，師恩浩蕩，在此獻上最真摯的謝意，能與您相遇使我感受無比幸運與感恩。

論文口試期間，承蒙國立屏東科技大學食品科學系 吳明昌 博士以及本研究所 徐詮亮 博士，撥空審閱及詳加修正，提供寶貴意見使本論文內容更加周詳，在此深表由衷感謝。

在研究所期間，感謝系所所有教授及助教在專業領域上的教導及協助，感謝蘇正德 博士、李根永 博士、閻立平 博士、梁志弘 博士及本校化材系 張有義 博士慷慨出借儀器及知識上的協助，使實驗得以順利進行。特別感謝 蔡正宗 博士在我實驗及論文撰寫期間給予的各種幫助，協助我度過瓶頸。

在此，感謝貞誼助教在生活上及研究上給予的陪伴及協助，沒有你，我的求學生涯會失色許多；感謝食科系最強大的王姐這麼長時間對我的照顧及關愛，我會銘記於心；感謝怡君及淑瑜助教在各種大小事情上的協助；感謝偉珊及凱琳學姊在實驗上的關懷與指導，讓我頭好壯壯的順利完成各種實驗；感謝明興、瀚文從大學到研究所陪伴我

吃吃喝喝，讓我總是有好心情面對實驗；感謝皓儀每次都陪我度過低潮；感謝昱翔總是帶給我歡樂；感謝琮為每次都幫我解決疑難雜症，感謝孟蓉、健峰、儒碩的陪伴，讓我在撰寫論文的日子裡充滿歡笑；感謝盈吟、暉婷、容蓉、毓琪、昱華給我實驗及生活上幫助；感謝實驗室夥伴貫中，謝謝你總是在我受到挫折時安撫我的情緒；感謝實驗室學弟妹怡臻、柏漢、萬宇、閔鴻對我的包容，並忍受我這個瘋瘋的學長，有你們的陪伴真好；特別感謝予捷在論文撰寫及各種大小事上給予的協助。研究所期間得到太多人的幫助，無法一一詳列，在此一併感謝，謝謝所有人的陪伴、協助及鼓勵，讓我的研究所充滿了色彩，充實又快樂。

最後，感謝我最親愛的媽媽、爸爸、姊姊及阿姨，讓我在沒有壓力的環境下好好學習，沒有後顧之憂地做自己有興趣的事物，你們給我最大的包容、支持及鼓勵，讓我感受到滿滿的愛，言語無法表達我對你們的愛及謝意，但我仍要說一句，我愛你們。將此論文獻給我最親愛的家人，一起分享我的成長與喜悅。

鄭文華 謹致於

東海大學食品科學系碩士班

中華民國一〇四年六月

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	7
(四)幾丁聚醣的製備	9
(五)幾丁聚醣分子量之降解	11
(六)臭氧氧化還原降解法應用於幾丁聚醣	13
(七)幾丁聚醣應用於藥物控制釋放	17
二、奈米科技	27
(一)奈米科技簡介	27
(二)奈米技術應用於食品領域	28
(三)奈米顆粒 (nanoparticles)	31
(四)奈米之安全性探討	32
三、幾丁聚醣奈米顆粒	35
(一)常見之幾丁聚醣奈米顆粒製備方法	35
(二)以離子交聯法製備幾丁聚醣奈米顆粒之機制	46
(三)幾丁聚醣奈米顆粒作為營養物質載體之優勢與應用	51
四、茄紅素	55
(一)茄紅素簡介	55
(二)茄紅素的生理機能	57
(三)茄紅素的安定性	59
(四)茄紅素的生物利用率	61
參、材料與方法	64

一、 實驗材料與藥品	64
二、 實驗儀器	65
三、 樣品製備	67
(一) 幾丁聚醣製備	67
(二) 不同分子量幾丁聚醣之製備	67
(三) 茄紅素之製備	68
(四) 茄紅素溶解性測試	69
四、 實驗方法	70
(一) 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-茄紅素 (CS-TPP-Lycopene) 奈米顆粒 之製備	70
(二) CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之安定性試驗	72
五、 分析方法	76
(一) 幾丁聚醣去乙酰度之測定	76
(二) 降解之幾丁聚醣樣品分子量測定	76
(三) 茄紅素包覆率、裝載率及奈米顆粒產率之測定	77
(四) 茄紅素定量方式	78
(五) 奈米顆粒粒徑及表面電位之測定	80
(六) 掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察	80
(七) 統計分析	81
肆、 結果與討論	82
一、 樣品製備	82
(一) 幾丁聚醣製備	82
(二) 不同分子量幾丁聚醣之製備	82
(三) 茄紅素之製備	84
(四) 茄紅素溶解性測試	85
二、 不同製備條件對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-茄紅素 (CS-TPP-Lycopene) 奈米顆粒特性之影響	89
(一) 茄紅素濃度之影響	89
(二) 幾丁聚醣分子量之影響	101

(三) CS/TPP 重量比之影響·····	109
三、 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之安定性試驗·····	119
(一) 熱處理 (heat treatment) 試驗·····	119
(二) 儲存 (storage) 試驗·····	124
(三) 胃腸道模擬試驗·····	129
四、 掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒外觀 型態·····	132
伍、 結論·····	134
陸、 參考文獻·····	139



圖目錄

圖一、幾丁質、幾丁聚醣及纖維素之基本結構	6
圖二、幾丁聚醣在酸性溶液中之結構	8
圖三、幾丁質進行去乙酰作用後型態變化示意圖	10
圖四、臭氧降解法實驗流程	12
圖五、臭氧在水中之反應型態	14
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、人體的外在環境和循環系統的內在環境之間，經由消化、 呼吸和泌尿系統做營養素交換	20
圖九、營養物質經由腸上皮細胞之三種穿透模式：被動擴散通過細胞 膜、被動擴散通過相鄰細胞間隙及載體調控運輸	21
圖十、幾丁聚醣鼻腔給藥示意圖	24
圖十一、利用穿透式電子顯微鏡觀察硒化鎘-幾丁聚醣奈米顆粒於小 鼠腸上皮細胞之分佈	25
圖十二、幾丁聚醣誘導緊密連結開啟之機制示意圖	26
圖十三、奈米顆粒於腸道吸收之優勢	33
圖十四、以離子交聯法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖	36
圖十五、以共凝結及沉澱法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖	38
圖十六、以乳化交聯法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖	39
圖十七、以乳化液滴接合法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖	41
圖十八、以逆微胞法製備幾丁聚醣顆粒之流程圖	42
圖十九、以噴霧乾燥法製備幾丁聚醣顆粒之流程圖	44
圖二十、以化學修飾自組裝法製備幾丁聚醣顆粒之流程圖	45
圖二十一、幾丁聚醣與 TPP 之離子交聯反應	47
圖二十二、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉在不同 pH 值下之鍵結情形	48
圖二十三、全反式茄紅素的化學結構	56

圖二十四、臭氧處理時間對幾丁聚醣降解程度之影響	83
圖二十五、茄紅素樣品利用HPLC分析結果圖	86
圖二十六、奈米顆粒形成之巨觀現象	90
圖二十七、茄紅素濃度對於茄紅素包覆率的影響	92
圖二十八、茄紅素濃度對於茄紅素裝載率的影響	94
圖二十九、茄紅素濃度對於奈米顆粒產率的影響	96
圖三十、茄紅素濃度對於CS-TPP-Lycopene奈米顆粒粒徑大小之影響	98
圖三十一、幾丁聚醣分子量對於茄紅素包覆率之影響	103
圖三十二、幾丁聚醣分子量對於 CS-TPP 及 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒粒徑大小之影響	106
圖三十三、CS/TPP 重量比對於茄紅素包覆率之影響	111
圖三十四、CS/TPP重量比對於CS-TPP及CS-TPP-Lycopene奈米顆粒 粒徑大小之影響	113
圖三十五、不同CS/TPP重量比之三聚磷酸鈉與幾丁聚醣離子交聯 示意圖	115
圖三十六、茄紅素於不同溫度加熱處理一小時後顏色變化	120
圖三十七、CS-TPP-Lycopene奈米顆粒於加熱 (120 °C, 1 hr) 前 (A) 後 (B) 之顏色變化	122
圖三十八、包覆與否之茄紅素於不同溫度加熱一小時後降解情形	123
圖三十九、儲存時間對茄紅素粉末之影響 (25 °C)	125
圖四十、儲存時間對 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒顏色變化之影響 (25 °C)	127
圖四十一、包覆與否之茄紅素於不同儲存時間之降解情形	128
圖四十二、CS-TPP-Lycopene奈米顆粒於模擬胃液2小時後置入 模擬腸液6小時的茄紅素累積釋放率	130
圖四十三、掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察	133

表目錄

表一、幾丁聚醣奈米顆粒之若干製備方法·····	36
表二、常見的蔬果之茄紅素含量·····	56
表三、茄紅素對若干溶劑之溶解性·····	87
表四、茄紅素濃度對於 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒表面電位之影響	100
表五、幾丁聚醣分子量對於 CS-TPP 及 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒 表面電位之影響·····	108
表六、CS/TPP 重量比對於 CS-TPP 及 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒 表面電位之影響·····	117



中文摘要

本研究將幾丁聚醣 (Chitosan, CS, 去乙酰度 $\geq 85\%$, 607 kDa, Original Mw) 以臭氧 (O_3) 氧化降解至 200-250 kDa (High Mw)、100-150 kDa (Medium Mw) 及 50 kDa (Low Mw) 之分子量, 配置 2 mg/mL 濃度之各種 CS 溶液並調整 pH 值至 4.7, 接著將不同濃度 (20-80 $\mu\text{g/mL}$) 之茄紅素溶液, 與上述 CS 溶液混合均勻後, 加入三聚磷酸鈉溶液 (Sodium tripolyphosphate, TPP) 使 CS/TPP 重量比為 3/1、4/1、5/1 及 6/1, 製備成幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-茄紅素 (CS-TPP-Lycopene) 奈米顆粒, 並探討茄紅素濃度、CS 分子量及 CS/TPP 重量比對於 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之包覆率、粒徑大小、表面電位及安定性 (熱處理、儲存及胃腸道模擬) 之影響, 並利用掃描式電子顯微鏡 (SEM) 拍攝觀察此奈米顆粒外觀。

結果顯示, 在包覆率方面, 茄紅素濃度越高及 CS 分子量越大時, 包覆率越好 (41-71.4%), 而 CS/TPP 重量比對包覆率無顯著影響 (50-54.8%); 粒徑方面則隨茄紅素濃度、幾丁聚醣分子量及 CS/TPP 重量比之增加而粒徑會變大 (634.4-1707 nm); 表面電位方面, 隨幾丁聚醣分子量越小、CS/TPP 重量比減少, 表面電位會下降, 但顆粒仍然皆帶正電荷 (+33 至 +51 mV), 而茄紅素濃度之影響不大。安定性方面, 利用 Medium Mw CS, 茄紅素濃度 80 $\mu\text{g/mL}$ 及 CS/TPP 重量

比 3/1 所製備出來的奈米顆粒，於 120 °C 加熱處理 1 小時只損失 8% 之茄紅素；於 25 °C 儲存 28 天後仍有 47.4% 之茄紅素保留率；於胃腸道模擬安定性試驗，將奈米顆粒置入模擬胃液 (pH 1.2, with pepsin) 2 小時後，於模擬腸液 (pH 7.4, with pancreatin) 持續作用 6 小時，結果顯示茄紅素之累積釋放率低於 1%。綜合以上實驗證實此奈米顆粒十分安定，並經由 SEM 觀察其顆粒型態為圓形球狀之奈米顆粒。

關鍵字：幾丁聚醣、茄紅素、三聚磷酸鈉、奈米顆粒、安定性



ABSTRACT

Chitosan (CS, original Mw 607 *kDa*, deacetylation $\geq 85\%$) use degraded by O₃ oxidation into different molecular weights (High Mw 200-250 *kDa*, Medium Mw 100-150 *kDa* and Low Mw ≤ 50 *kDa*), then dissolved at a 2 *mg/mL* concentration adjusted to pH 4.7, and mixed individually with lycopene solution of different concentrations (20-80 $\mu\text{g/mL}$). The mixed solutions were added dropwise with the sodium tripolyphosphate solution (TPP, pH 9.0) by different CS/TPP mass ratio of 3:1, 4:1, 5:1 and 6:1 to prepare CS-TPP-Lycopene nanoparticles. Such effective factors as lycopene concentration, chitosan molecular weight and CS/TPP mass ratio on the encapsulation efficiency (EE), particle size, zeta potential of the nanoparticles were investigate. SEM and stability (heat treatment, storage and gastrointestinal simulation) of the nanoparticles were also determined.

As a result, a higher lycopene EE was obtained as the high lycopene concentration and CS Mw were applied (41-71.4%) EE was insignificantly affected by CS/TPP mass ratio (50-54.8%). CS-TPP-Lycopene nanoparticles size increased as CS Mw, lycopene concentration and CS/TPP mass ratio increased (634.4-1707 *nm*). Zeta potential of CS-TPP-Lycopene nanoparticles increased as CS Mw and CS/TPP mass ratio increased (+33-+51 *mV*), lycopene concentration showed a little effect . Heat stability of CS-TPP-Lycopene nanoparticles (prepared with medium Mw CS (128 *kDa*), lycopene concentration of 80 $\mu\text{g/mL}$ and CS/TPP mass ratio of 3/1) at 120 °C for 1 hour showed a reducing about 8% loss of the lycopene. Storage stability of CS-TPP-Lycopene nanoparticles at 25 °C for 28 days was still 47.4% of

the lycopene retention. Simulated gastrointestinal stability was carried out by mixing the CS-TPP-Lycopene 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, that showed a less than 1% of lycopene release. SEM observation showed that both CS-TPP and CS-TPP-Lycopene nanoparticles were spherical shape.

Key words: Chitosan, Lycopene, Sodium tripolyphosphate, Nanoparticles, Stability.



壹、前言

茄紅素 (Lycopene) 是一種天然的脂溶性紅色色素，屬於類胡蘿蔔素的一種，擁有極強的抗氧化活性，其消滅單線態氧 (singlet oxygen) 的能力是 β -胡蘿蔔素的 2 倍，更高於維生素 E 達 10 倍之多，是一種抗氧化能力極強的物質 (Di Mascio *et al.*, 1989, 1991; Conn *et al.*, 1991; Devasagayam *et al.*, 1992; Ribaya-Mercado *et al.*, 1995)，其可以預防許多疾病的發生，例如可降低 DNA 損傷及惡性轉化，並減少蛋白質及脂質的氧化損傷等功能 (Zhang *et al.*, 1992)，且因具有避免血液中脂蛋白氧化的功能，進而可以降低粥狀動脈硬化及冠狀動脈心臟疾病的風險 (Kristenson *et al.*, 1997)。另外有學者研究發現茄紅素具有預防癌症的功能，包括前列腺癌、肺癌、消化道癌、乳癌、皮膚癌、子宮頸癌、胰臟癌及膀胱癌等許多癌症 (Micozzi *et al.*, 1986; Olson, 1986; Levy *et al.*, 1995; Gerster, 1997)。

然而因為茄紅素之結構關係，在環境中容易受到光、熱、氧及酸的作用，使其結構發生異構化或產生氧化裂解，進而導致茄紅素生理活性降低 (Liaaen-Jensen, 1971; Sharma and Mague, 1996; Nguyen and Schwartz, 1999)。而茄紅素在人體消化吸收上受到其疏水性 (Tyssandier *et al.*, 1998)、與其他物質之交互作用 (Van den Berg, 1999) 及飲食攝取成分的影響 (Castenmiller and West, 1998)，導致

茄紅素人體生物利用率不到 2% (Tang *et al.*, 2005)，因此如何保護茄紅素在環境中的安定性及提高其生物利用率是很重要的。

文獻指出，以幾丁聚醣包覆藥物或活性物質 (bioactive agents) 製備成奈米顆粒，可提升疏水性物質在消化道之溶解性 (Guan *et al.*, 2006)，此外幾丁聚醣可隔離被包覆物質與胃及腸內之其他物質產生結合，且可降低包覆物質在胃中避免受強酸及酵素破壞，進而保護其生理活性。還可藉由幾丁聚醣帶正電之特性，貼附在帶負電之腸膜上，延長其在腸道之作用時間；同時幾丁聚醣可短暫打開腸膜細胞之緊密連結 (tight junctions, TJ) 通道，增加物質通透性 (Ward *et al.*, 2000)，進而增加物質在腸道的吸收 (Tengamnuay and Mitra, 1997)，達到提高被包覆物質之生體利用率 (Luessen *et al.*, 1996)。

因此，本研究嘗試利用幾丁聚醣作為基材，與三聚磷酸鈉 (sodium tripolyphosphate, TPP) 經由離子交聯作用，將茄紅素包覆於其中製備成奈米顆粒，期望透過此方式改善茄紅素於環境中之安定性，使其在加工過程、儲存期間及食用進入消化道時，不受光、熱、氧、胃酸及酵素等因子之破壞，同時利用幾丁聚醣奈米顆粒之特性，減緩其在胃部之釋放，改善其在腸道之溶解性及滯留時間，同時避免其他物質之交互作用造成的生理活性下降，進而達到提高茄紅素在人體之生物利用率之目的。

貳、文獻整理

一、幾丁質與幾丁聚醣

(一) 幾丁質 (chitin) 與幾丁聚醣 (chitosan) 簡介

英國學者 Hachett 於 1799 年以酸處理蝦、蟹外殼後，發現產生泡沫並且形成黃色軟膠狀物質，當時並不知其為何物質 (賴，1979)。

在 1811 年時法國植物學家 Braconnot 以低濃度的氫氧化鈉溶液加熱處理菇類，發現一種不溶於水的物質，將其命名為 fungine。而接著 1821 年學者 Odier 在昆蟲外殼部分發現一些特殊物質，並將其命名為幾丁質 (chitin)，希臘語意為“包覆的物質”之意 (陳，1999)。

幾丁質又名為甲殼質及甲殼素，為一種淡黃色至褐色的棉絮狀或絲狀固體，具有高度彈性及延展性，廣泛存在於甲殼類 (如蝦、蟹)、軟體動物 (如烏賊) 及昆蟲之骨骼中，某些微生物如藻類、酵母菌及真菌之細胞壁中也有其存在。幾丁質在自然界中的含量僅次於纖維素，是第二豐富的天然聚合物 (Knorr, 1984)，也是地球上蘊藏量最豐富的胺基醣 (amino sugar) 形式之多醣，同時也是除了蛋白質外數量最多的含氮天然纖維素，具有保護及支持生物體的作用，在自然界中常與蛋白質結合成黏多醣體 (mucopolysaccharide)，並以此形式存在 (陳，1999)。

1859 年 Rouget 將幾丁質與濃氫氧化鈉溶液進行加熱處理後，發現原本不溶於酸的幾丁質可溶於有機酸中。Hoppe-Seyler 於 1894 年將此物質正式命名為幾丁聚醣 (chitosan) (Muzzarelli, 1977)，而於 1925 年 Children 證明其為含氮化合物 (賴, 1979)。幾丁質經由高溫及強鹼進行去乙醯化作用 (deacetylation) 後，所得到的產物即為幾丁聚醣 (Knorr, 1984)。

對於全球漁業加工業來說，蝦及蟹殼等廢棄物量每年約有數百萬噸，取得容易且價格便宜，因此是目前幾丁質原料的主要來源。而相較於幾丁質，在自然界中幾丁聚醣的含量極少。

(二) 幾丁質與幾丁聚醣結構

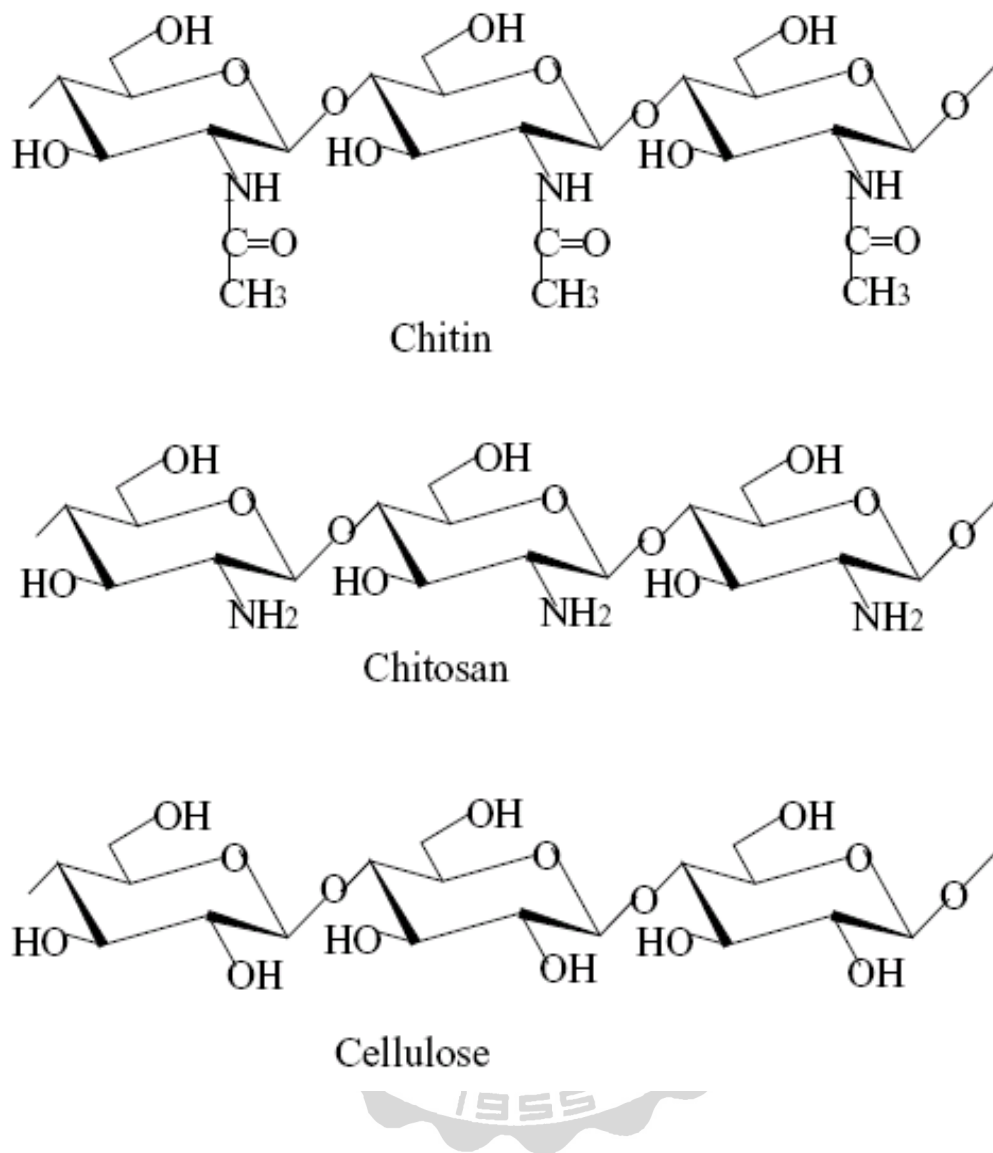
幾丁質 (chitin) 是由 1000 - 3000 個 N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucose 或稱 N-acetyl-D-glucosamine) 單元體，以 β -1,4 所鍵結而成之高分子直鏈狀多醣聚合物。在不同的生物體中依分子鏈的排列形成不同的構形，X-ray 光譜分析結果顯示其分成三種不同結晶構形： α -、 β - 及 γ -chitin。

其中 α -chitin 為斜方晶系 (rhombic system)，結構緻密，質地較硬，昆蟲及甲殼類 (如蝦、蟹) 外骨骼屬於此類，是自然界中最普遍且最穩定的構形 (Muzzarelli, 1977)。 β -chitin 為單斜晶系 (monoclinic

system) ，結構較為鬆散，易被幾丁質酶 (chitinase) 分解，如烏賊軟骨即屬此類。 γ -chitin 為 α -及 β -之混合體，結構緊密性亦介於兩者，藻類與真菌類屬於此類 (Muzzarelli, 1977; 賴，1979; Blackwell, 1988) 。

纖維素 (cellulose) 、幾丁質 (chitin) 及幾丁聚醣 (chitosan) 三者具有相似之結構 (如圖一) 。主要差別在於幾丁質與幾丁聚醣在 C-2 位置所接上的為乙醯胺基 ($-\text{NHCOCH}_3$) 或胺基 ($-\text{NH}_2$) ，而纖維素 C-2 位置所接上的則是氫氧基 ($-\text{OH}$) 。

將幾丁質利用高溫及強鹼處理，會使其發生去乙醯化作用 (deacetylation) ，造成其結構上乙醯基被部分去除，而使胺基露出，得到的產物即為不同去乙醯程度的幾丁聚醣。目前，幾丁質與幾丁聚醣在去乙醯程度上的差異並沒有明確的界定，而學者 Muzzarelli 及 Rocchett 於 1985 年提出總氮量佔聚合物的百分之七 (w/w) 以上者即可稱為幾丁聚醣；另外一種說法是去乙醯度大於 60 % 且微溶於酸性溶液者稱為幾丁聚醣 (Aiba, 1992) 。幾丁聚醣的去乙醯程度最高可達 99 % ，但一般來說大多介於 70 - 80% (陳，1999) 。去乙醯度越高的幾丁聚醣，在某些生理活性上越明顯，如抗菌特性等。因此，去乙醯度的檢測是重要的，其常見方法有：紅外/紫外光光譜分析法、氣/液相層析法、熱分析法、核磁共振光譜分析法、滴定法及酵素法等。



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.

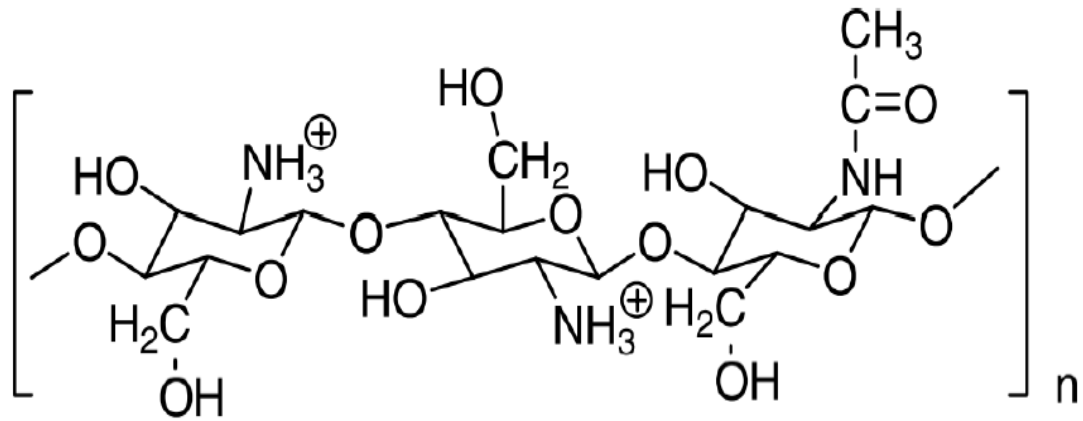
(Krajewska, 2004)

(三) 幾丁聚醣溶液之特性

幾丁質不溶於水及一般之無機或有機溶劑，也不溶於鹼液中，只溶於強無機酸，屬於難溶性物質。而幾丁聚醣因具有較多的胺基，其溶解性較幾丁質佳，可溶於酸性或弱酸性的有機酸或無機酸中，例如醋酸、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。其不溶於硫酸及中性或鹼性溶劑，但可溶於酸化多醇 (acidified polyols)，而經常被作為測定幾丁聚醣溶液系統的溶劑為醋酸 (Knorr, 1984)。

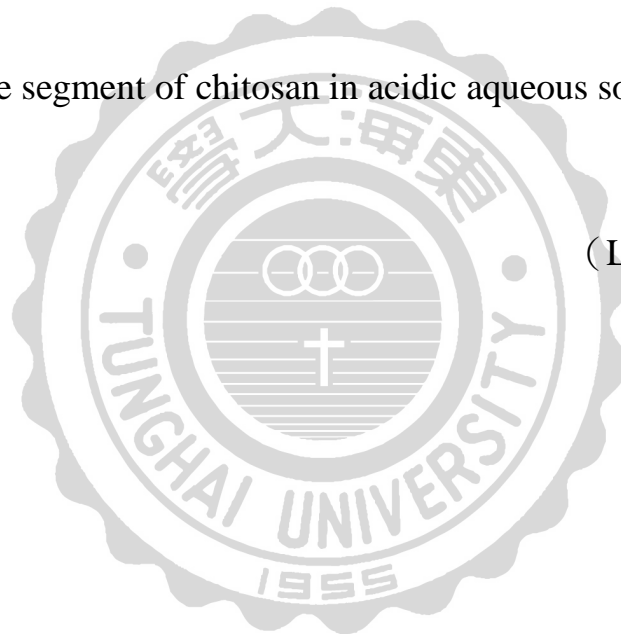
幾丁聚醣溶解於酸性溶液中且小於其 pKa (pH~6.3) 時，其胺基 (-NH₂) 會形成 -NH₃⁺ 的形式 (如圖二)，使幾丁聚醣成為帶正電的聚合物 (Illum, 1998)，而其親水性亦會隨著 pH 值不同而改變，當 pH 較低時因 -NH₃⁺ 較多，親水性較佳；反之 pH 較高時，-NH₃⁺ 變為 -NH₂，使其親水性較差。

幾丁聚醣溶液的黏度會受到本身分子之離子化程度 (正電荷數) 的增加或是溶液離子強度降低而使黏度上升。當溶液中的離子強度及 pH 值升高時，會使幾丁聚醣分子間的靜電排斥情形減少，造成分子鏈容易結合在一起，形成分子捲縮的現象進而使黏度下降 (Aiba *et al.*, 1986)。因此在配置幾丁聚醣溶液時，pH 值高低尤其重要，其會影響幾丁聚醣之帶電量、溶解性及黏度。



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.

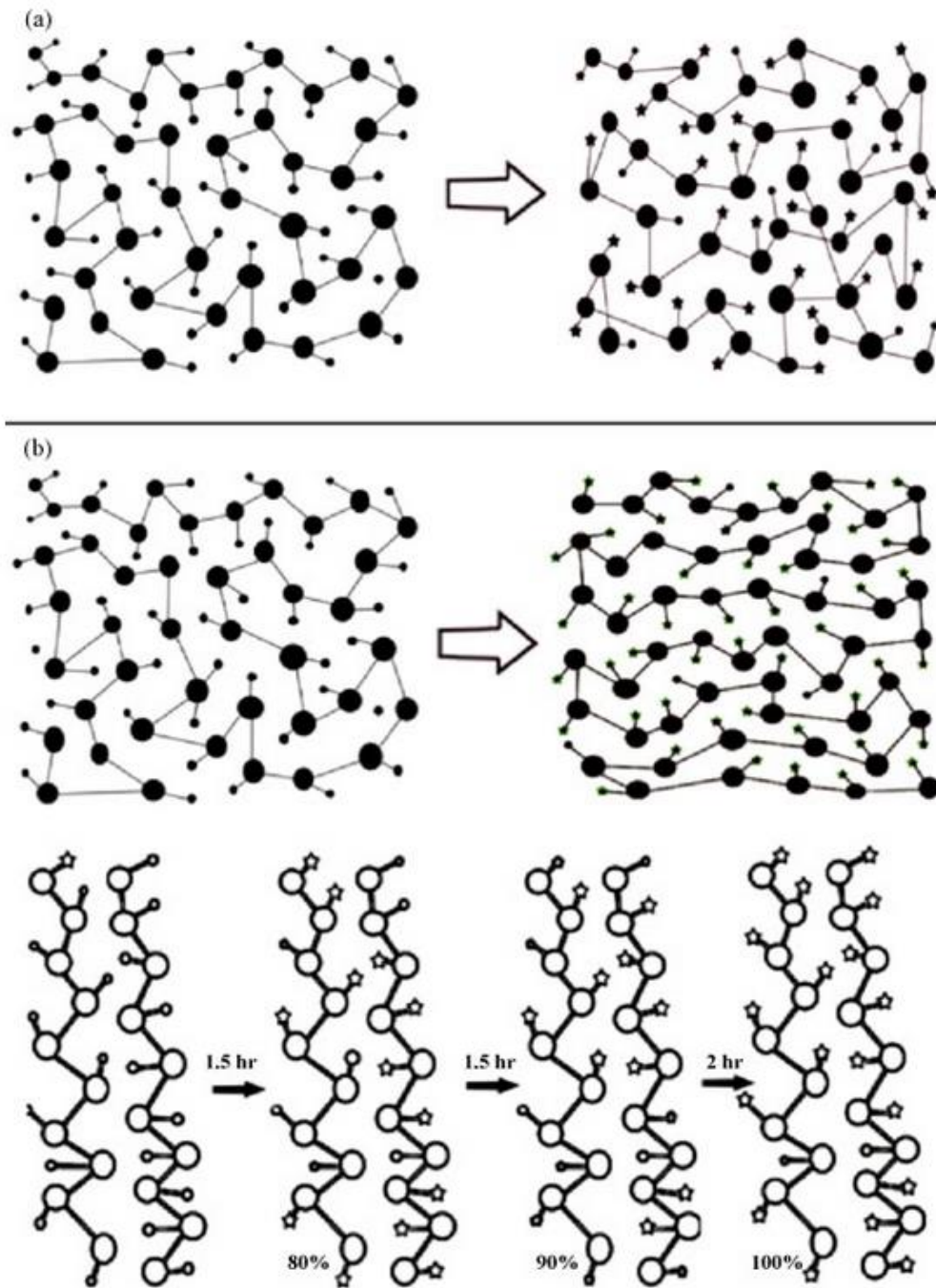


(Liu *et al.*, 2005)

(四) 幾丁聚醣的製備

利用幾丁質進行去乙醯作用可得到幾丁聚醣，常見的操作方法有熱鹼法、酵素法及微生物法等。熱鹼法為目前最常使用的方法，將幾丁質置入鹼液中加熱除去乙醯基，此法優點為反應時間短、去乙醯程度高及製備成本低等，而幾丁聚醣的去乙醯程度會受鹼液濃度、溫度及作用時間影響（徐，2001）。酵素法是利用幾丁質去乙醯酶（chitin deacetylase）去除乙醯基來製備幾丁聚醣，此法優點為不會降解幾丁聚醣分子量，也無鹼液廢液處理的問題，但此法所需作用時間長且產率太低，酵素成本亦高，因此在實用性上較低（陳等，1999）。微生物法則是利用 *Aeromonas sp.* 中的幾丁質去乙醯生產菌，以發酵反應來製備幾丁聚醣，其優缺點相似於酵素法，故也較少被使用（陳等，1999）。

Yaghobi 等人（2010）利用熱鹼法對幾丁質進行去乙醯作用，結果顯示連續處理五小時後去乙醯度可達到 75-85%，其中在 1.5 小時的時候其去乙醯程度就達到 80%，而後趨緩的原因推測是受幾丁質鏈型結構影響，使氫氧化鈉無法接觸被遮蔽的乙醯基所造成。另一部分，學者進行多階段去乙醯（包含水洗及乾燥），發現此方式會使幾丁聚醣鏈型澎潤，得以較緩的速度持續進行去乙醯作用，得到更高去乙醯程度之幾丁聚醣（如圖三）。



圖三、幾丁質進行去乙醯作用後型態變化示意圖。

Fig. 3. Schematic representation of the morphological effect of chitin structure under (a) single stage and (b) multistage deacetylation treatment, (○) : acetamide group, (☆) : NH₂.

(Yaghobi and Hormozi, 2010)

(五) 幾丁聚醣分子量之降解

由於幾丁聚醣分子量大、黏度高及溶解度差，使其應用受到限制，因此如何製備出較低分子之幾丁聚醣，進而提高其溶解性，是被學者們所重視的。降解幾丁聚醣分子量的方法有許多種，常見幾種介紹如下：

1. 化學酸水解法：

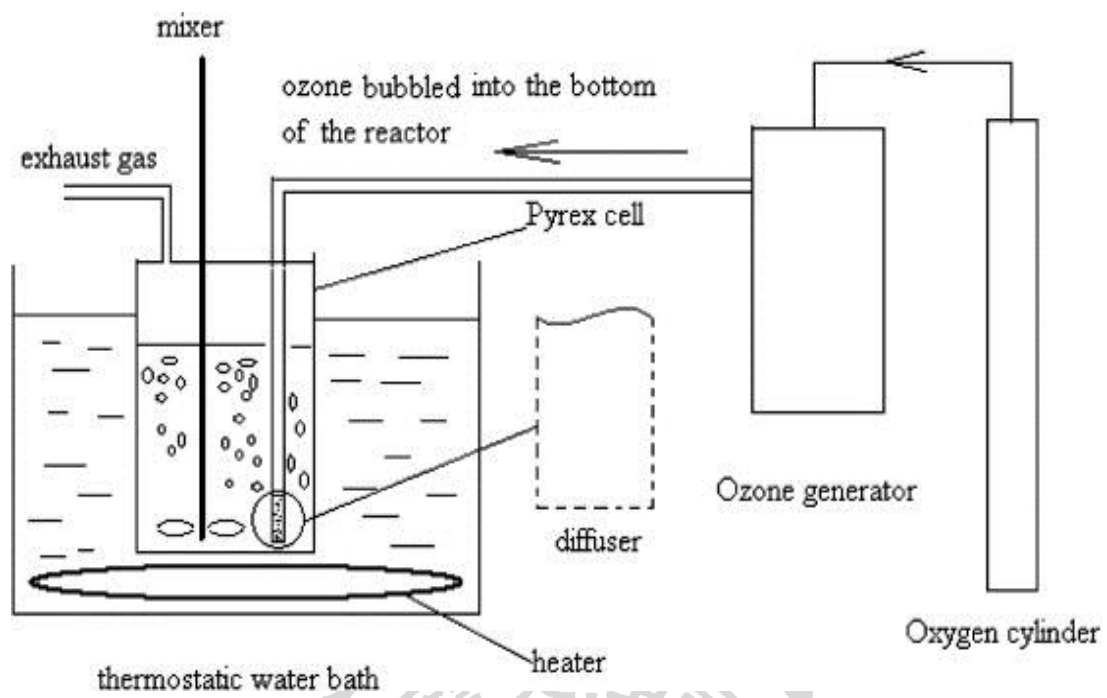
利用鹽酸、磷酸、氫氟酸及亞硝酸等，打斷幾丁聚醣結構上的醣苷鍵位置。此法優點是作用時間短、成本低及處理量大，但其缺點是需處理大量廢液、分子量再現性差以及可能會有藥品殘留疑慮等。

2. 酵素水解法：

常用酵素例如 cellulase 及 chitosanase 等，此法優點為專一性極高，但作用時間較長，且酵素價格昂貴，不符合經濟效益，因此限制了其應用性 (Jeon *et al.*, 2000)。

3. 臭氧氧化還原降解法：

利用臭氧為強氧化劑之特性，打斷幾丁聚醣上之醣苷鍵，達到降解分子量的效果，為一種效率佳、成本低且無殘留問題的降解方式 (陳, 2002)，故本實驗選擇利用此法來降解幾丁聚醣分子量 (如圖四)。



圖四、臭氧降解法實驗流程。

Fig. 4. Experimental procedure of degradation by ozone treatment.

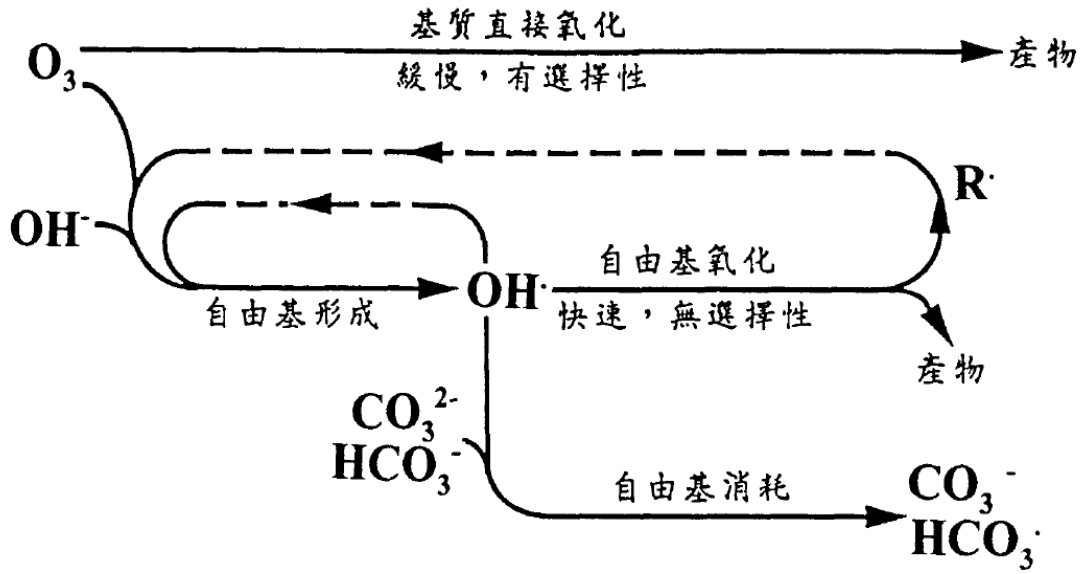
(Yue *et al.*, 2008)

(六) 臭氧氧化還原降解法應用於幾丁聚醣

臭氧 (O_3) 是氧氣 (O_2) 的同素異形體 (allotrope)，由三個氧原子構成，為一種強氧化劑，易與其他物質產生化學反應 (Langlais *et al.*, 1991)。自然界中產生臭氧 (ozone) 的途徑有兩種：一種是陽光中之紫外線照射氧氣而產生，另一種是由閃電激發氧氣而生成。而人為方式多是利用高壓電板放電激發乾燥氧氣生成，臭氧製造機亦是利用此原理設計，可應用於工業或實驗室 (Langlais *et al.*, 1991)。

臭氧在水中可能有兩種反應途徑 (如圖五)：1. 臭氧本身直接反應，即表示臭氧直接與其他化學物質進行氧化反應，此方式具選擇性 (selectivity)；2. 利用臭氧分解所產生之自由基進行反應，臭氧在水中易與 OH^- 反應生成較高氧化力之 $OH\cdot$ 自由基 (如圖六)，產生之自由基與其他化學物質反應，此方式速率快但不具選擇性。利用臭氧降解幾丁聚醣時，可能會以此模式型態進行 (Hoigne *et al.*, 1983; Staehelin *et al.*, 1985; Langlais *et al.*, 1991)。

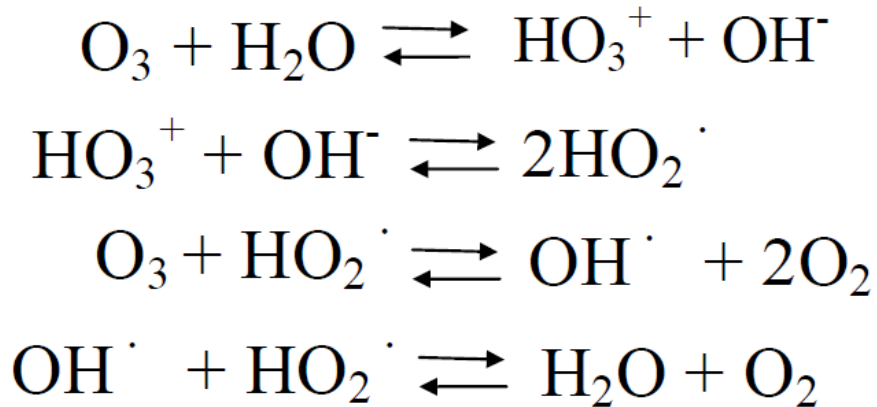
Kabal' nova 等人 (2001) 提出臭氧降解幾丁聚醣的反應機制可能分為兩種，第一種是臭氧可能在不開環的情況下降解幾丁聚醣 (如圖七之一) 達到降解分子量的目的，這是本實驗中所期望的反應機制。但由於臭氧作用並無專一性，所以也可能在不期望的位置氧化裂解幾丁聚醣 (如圖七之二)。



圖五、臭氧在水中之反應型態。

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

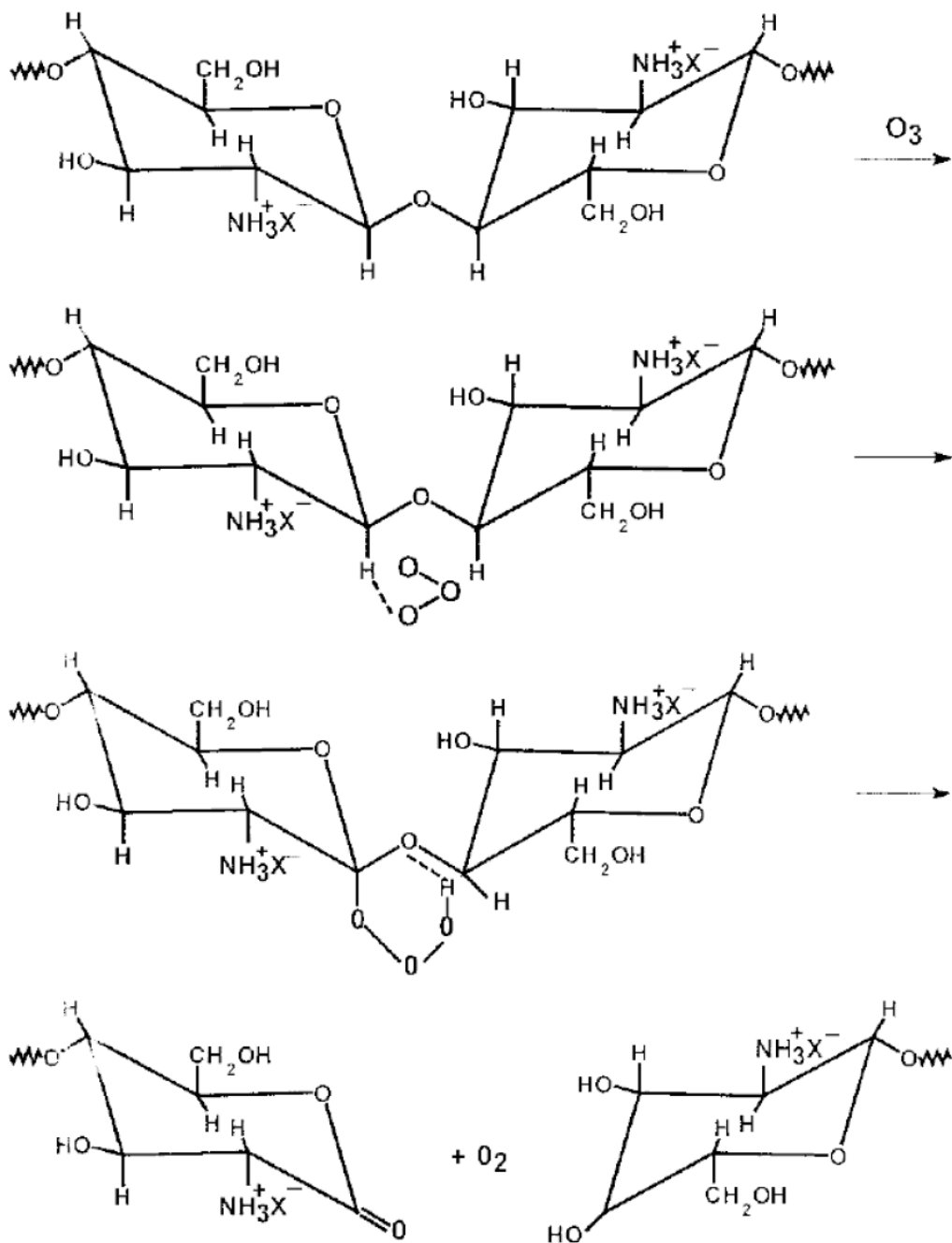
(刁, 1993)



圖六、臭氧自分解反應機制。

Fig. 6. The reaction mechanism of ozone degeneration.

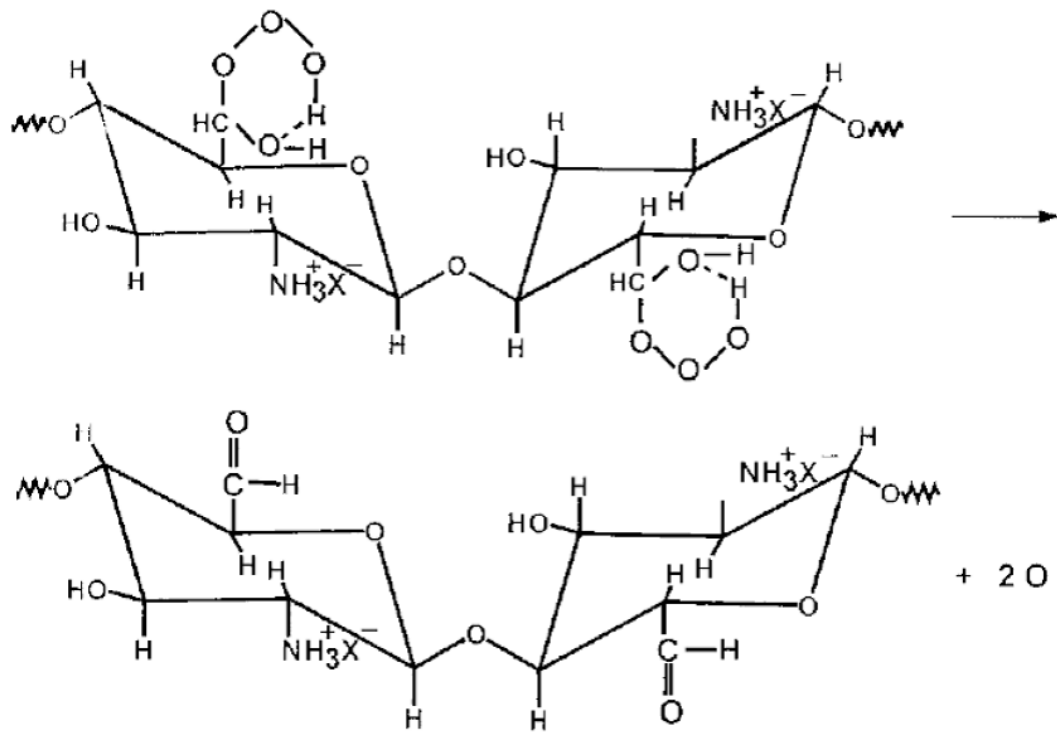
(Weiss, 1935)



圖七、臭氧氧化降解多醣類之可能機制（一）。

Fig. 7-1. The mechanism for ozonolytic depolymerization 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 depolymerization of polysaccharides.

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

(七) 幾丁聚醣應用於藥物控制釋放

幾丁聚醣及其衍生物近年來已經被廣泛應用於許多領域，在環保領域可以做為廢水處理的吸附劑，用於除去重金屬等物質；在農業領域可作為生物性農藥，抑制病蟲害並提高作物產量；在化工領域可利用其保濕性，添加於化妝品、洗髮精及清潔劑等，亦可添加於紡織產品使其具有抗菌、防臭及防水功能；在食品領域可強化食品香氣，改善食品色澤，防止沉澱與混濁，亦可吸附色素並做為防腐劑；而在醫藥領域可做為手術縫線、人工皮膚、人工透析膜、人工血管及隱形眼鏡等生醫材料，並可作為凝血劑及療傷藥品，亦是藥物控制釋放的優良材料。

世界各國每年花費上千億的經費於醫療領域，而數以千萬的病人對於醫療有迫切的需求，因此幾丁聚醣這種高分子聚合物於醫療領域之研究逐漸被重視，其中應用於藥物控制釋放更是一大重點。以下介紹幾丁聚醣於藥物控制釋放之應用：

1. 穩定藥物中的成分：

因幾丁聚醣具有正電荷，可與藥物中帶負電荷之游離脂肪交互作用形成乳劑狀，此狀態下兩者形成聚合物（co-polymer），能有效保護脂肪功能性，避免藥物中脂肪在高溫滅菌過程遭到破壞（Jumaa, 1999）。

2. 延緩或控制藥物的溶解速度：

有些藥物是水溶性或是遇到酸隨即溶解，使得此類藥物無法達到小腸被吸收而喪失生理活性，因此延緩或控制藥物的溶解速率是相當重要的，研究顯示幾丁聚醣與高水溶性藥物混合做成錠片後能有效延長其溶解時間（Brine, 1989; Felt *et al.*, 1999; Ganza-Gonzalez *et al.*, 1999）。

Nigalaye 等人（1990）將幾丁聚醣、檸檬酸及 carbomer-934p 三者混合，組成水膠質的基質體系統（hydrocolloidal matrix system），這種錠片系統可持續 theophylline 的釋放，當錠片中幾丁聚醣濃度大於 50 %（w/w）以上，便會形成一種不溶且非浸蝕型的基質體；而濃度低於 33 % 以下則形成一種快速釋放的基質系統。

3. 幫助藥物送達目的器官：

幾丁聚醣同時具有疏水基和親水基，可與紫杉醇（taxol）形成小於 100 nm 小顆粒膠粒，研究發現此形式的紫杉醇能更有效地被送達至腫瘤部位，且幾丁聚醣與紫杉醇之混合物對腫瘤細胞的抑制能力比游離的紫杉醇佳（Miwa *et al.*, 1998）。

4. 促進藥物吸收：

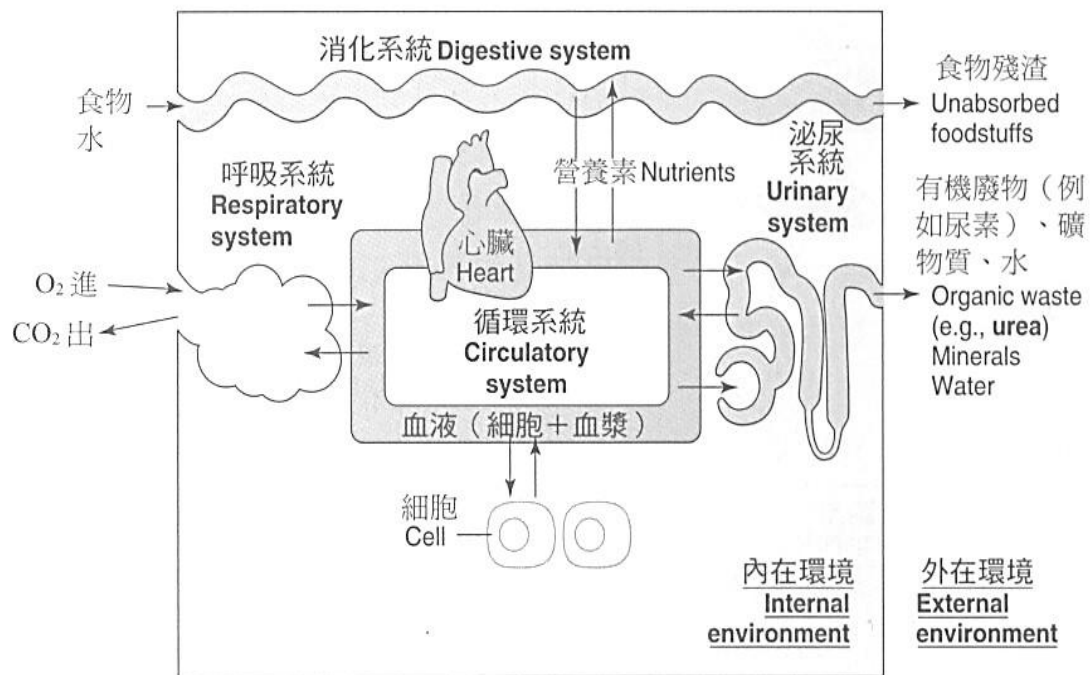
文獻指出幾丁聚醣可提高藥物之運輸（enhance the transport）

(Illum *et al.*, 1994) , 並增加藥物在腸道的吸收 (absorption enhancer) (Tengamnuay and Mitra, 1997) , 進而達到提高藥物生體利用率的功能 (improve the bioavailability) (Luessen *et al.*, 1996) 。研究顯示某些不易被吸收的藥物如 atenolol 與幾丁聚醣混合後, 可提升其於腸道細胞(Caco-2)10-15 倍之吸收率(Schipper *et al.*, 1999) 。

在正常情況下人體的消化吸收機制起始於口腔, 我們攝取的各種食物經由口服進入食道, 接著到達胃及腸道, 而經由消化道的消化作用後, 營養素等物質會被釋出, 其會在腸道中穿過上皮細胞進入血液循環系統, 經由血液循環系統的運送將營養素帶至全身各處利用, 接著代謝完的物質則由特定系統排出體外 (如圖八) ; 而藥物除了由胃腸道進入體內外, 較特別的是其可由呼吸系統經呼吸道上皮細胞進入血液循環。這些營養物質及藥物分子要穿過腸上皮細胞進入血液分為三個路徑 (如圖九) :

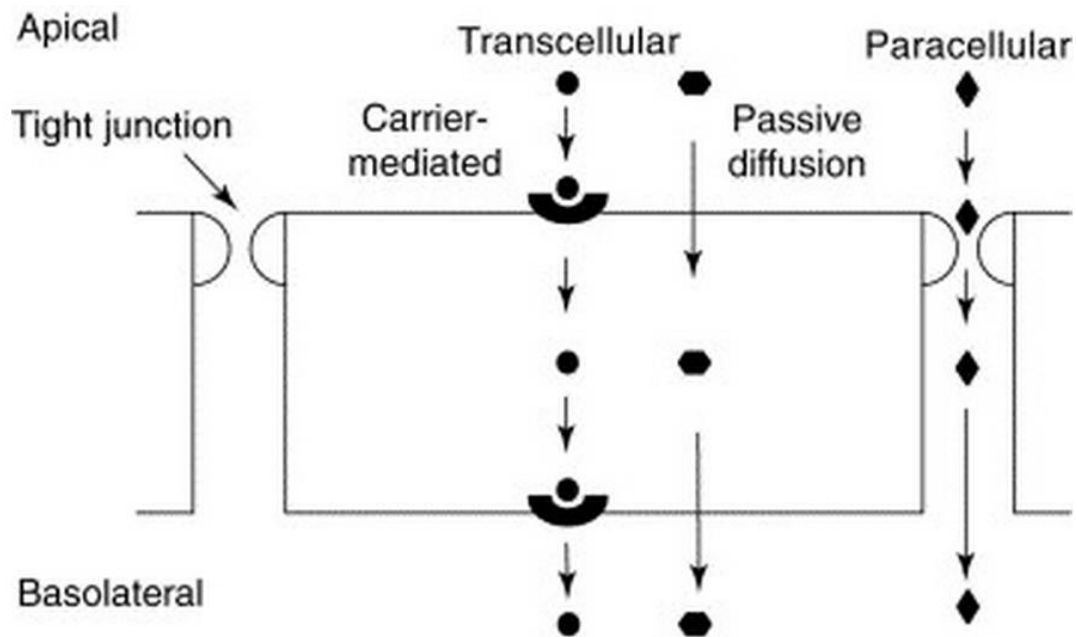
1. 被動擴散通過細胞膜 (transcellular pathway) :

此方式是利用物質的濃度梯度原則, 藉由其高濃度往低濃度移動之特性, 使物質穿過上皮細胞進入血液循環。利用此吸收方式的前提是物質需具有上皮細胞滲透性, 一般像水及脂肪等物質以此方式吸收。



圖八、人體的外在環境和循環系統的內在環境之間，經由消化、呼吸和泌尿系統做營養素交換。

(Gordon *et al.*, 2006)



Pharmaceutical Science & Technology Today

圖九、營養物質經由腸上皮細胞之三種穿透模式：被動擴散通過細胞膜、被動擴散通過相鄰細胞間隙及載體調控運輸。

Fig. 9. Transport across intestinal epithelium. Molecules cross the intestinal epithelium into the blood primarily by three pathways : passive diffusion across the cell membranes (transcellular pathway) ; passive diffusion between adjacent cells (paracellular pathway) ; and carrier-mediated transport (carrier-mediated pathway) .

(Ward *et al.*, 2000)

2. 載體調控運輸 (carrier-mediated transcellular pathway) :

利用細胞膜上的載體，協助特定物質由腸腔穿過細胞而進入體內，如離子、葡萄糖、胺基酸、二胜肽及三胜肽等物質以此方式吸收。

3. 被動擴散通過相鄰細胞間隙 (paracellular pathway) :

此方式主要是適用於部分胺基酸、單醣、親水性物質及大分子的被動擴散，由於這些物質無法穿透上皮細胞及無法被載體辨識，因此需透過相鄰細胞間隙吸收，然而透過此法吸收之分子會受到上皮細胞之緊密連結 (tight junction) 嚴格限制 (Sadowski *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 2000; Déprez *et al.*, 2001)。

上述提到之緊密連結是一種封閉連結，主要存在上皮細胞和內皮細胞間，如消化道上皮、鼻黏膜上皮、膀胱上皮、腦毛細管內皮以及睪丸支持細胞之間等。腸道上皮細胞的緊密連結主要功能為：(1) 選擇性屏障；(2) 維持柵欄功能。其能阻止潛在有害物質或病原菌進入體內，同時控制營養物質進入體內。當藥物或營養物質經由口服方式進入人體時，此特性反而成為藥物或營養物質在腸胃道吸收的主要障礙之一。

文獻指出幾丁聚醣的衍生物具有促進胜肽類藥物在腸道內釋放及吸收的效果 (Kotze *et al.*, 1998)，原因是其具有可逆性調控腸道上

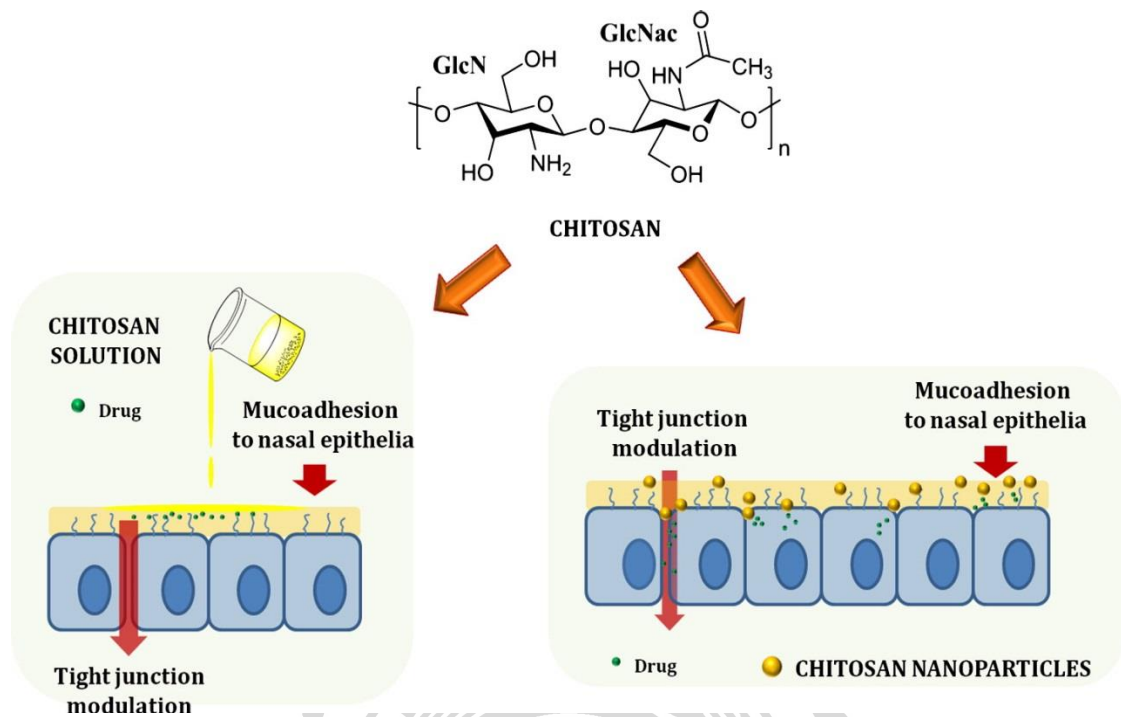
皮細胞間的緊密連接開合的功能，讓藥物或營養物質順利通過腸到進入血液中被吸收。

Illum 等人 (1994) 研究證明，利用幾丁聚醣溶液與藥物混合及利用奈米顆粒裝載藥物，都能夠顯著提高小分子藥物、較大分子的胜肽及蛋白質等物質，經由穿過鼻腔上皮細胞之緊密連結進入血液循環，進而達到提高吸收率的效果（如圖十）。

Dodane 等人 (1999) 指出幾丁聚醣調控腸道上皮細胞緊密連結開合是因其帶有正電荷，能夠黏附在腸道上皮細胞上，並與調控緊密連結開合之蛋白產生作用。經由穿透式電顯微鏡觀察腸道上皮細胞之結構，證實幾丁聚醣能夠可逆性調控上皮細胞之細胞間和細胞內路徑，來增加物質的滲透性。

Sonaje 等人 (2011) 將幾丁聚醣與硒化鎘 (QD) 製備成奈米顆粒，研究口服給藥對其在小鼠腸膜穿透機制，結果顯示未包覆之鎘無法穿越腸膜上皮細胞緊密連結，而經由幾丁聚醣奈米顆粒攜帶之鎘則可，證實幾丁聚醣具有短暫打開上皮細胞緊密連結之功能（如圖十一）。

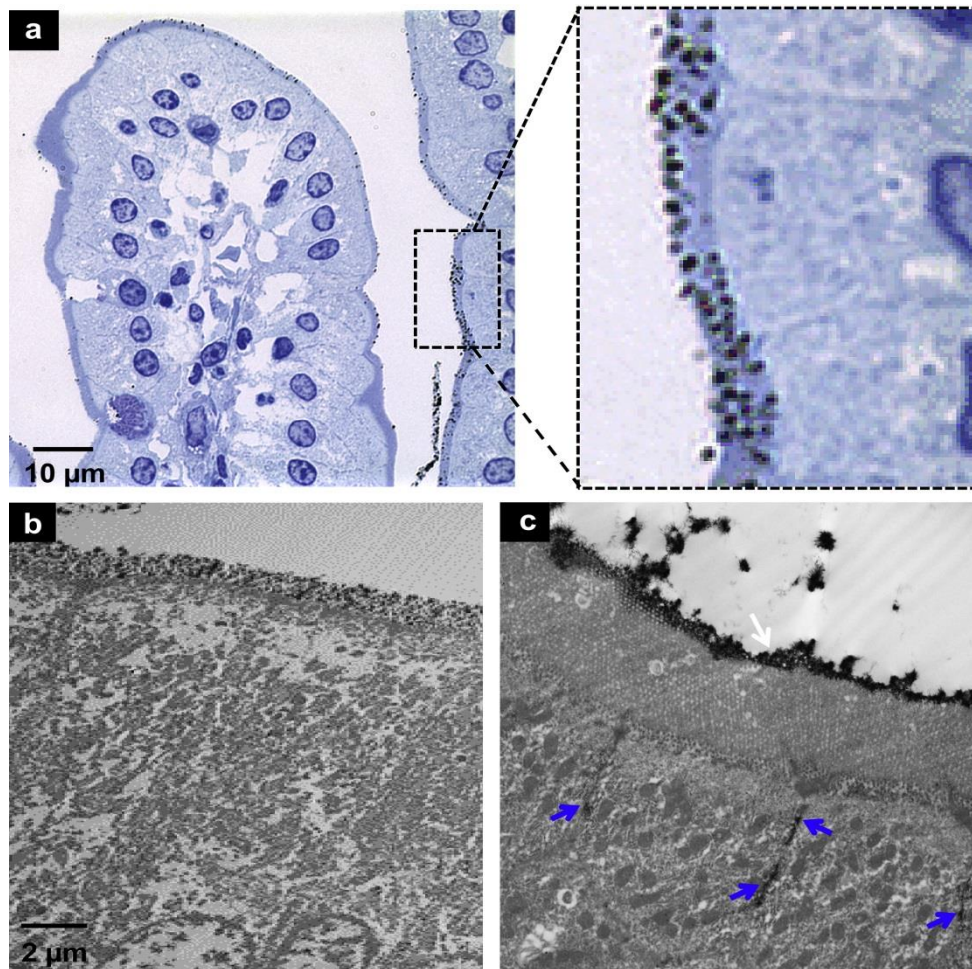
Hsu 等人 (2013) 研究利用 Caco-2 單層細胞，探討幾丁聚醣奈米顆粒對緊密連結的影響，結果發現幾丁聚醣短暫打開緊密連結的能力與 pH 值（影響其帶電）有一定程度的相關性，但由於其機制牽涉十分複雜，仍須進一步探討其他因子影響（如圖十二）。



圖十、幾丁聚醣鼻腔給藥示意圖。

Fig. 10. Schematic representation of chitosan and nasal delivery of drugs.

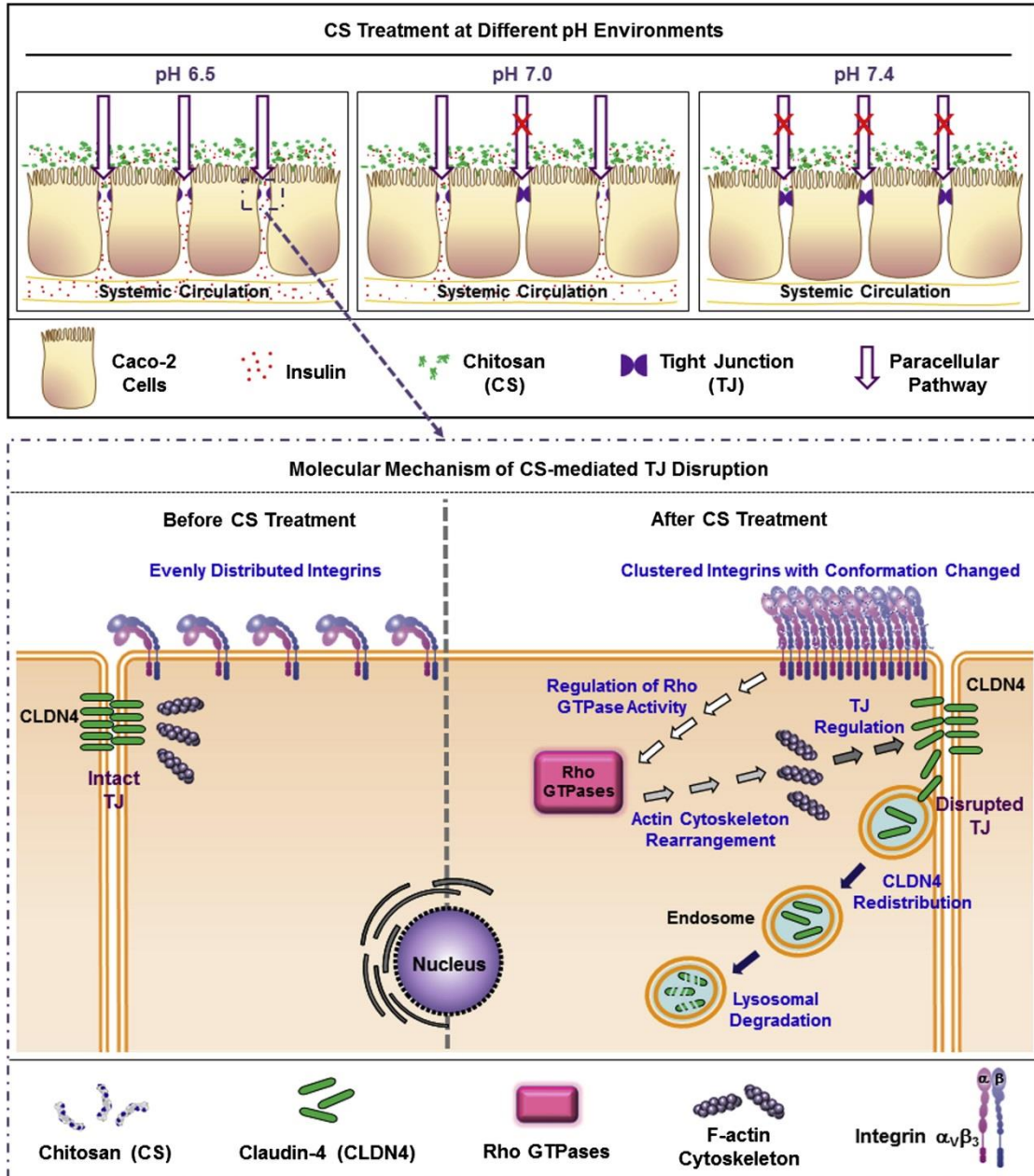
(Casettari *et al.*, 2014)



圖十一、利用穿透式電子顯微鏡觀察硒化鎘-幾丁聚醣奈米顆粒於小鼠腸上皮細胞之分佈。

Fig. 11. (a) Photomicrograph of a silver-enhanced intestinal section showing the mucoadhesion and infiltration of QD-CS NPs (black dots) after oral administration, area defined by a rectangle is shown at a higher magnification in the inset; (b) TEM micrographs of the control intestinal segment incubated with a lanthanum solution; and (c) permeation of lanthanum through the opened paracellular space (indicated by the blue arrows) in mice treated with QD-CS NPs.

(Sonaje *et al.*, 2011)



圖十二、幾丁聚醣誘導緊密連結開啟之機制示意圖。

Fig. 12. Schematic illustrations showing the molecular mechanism and consequence of CS-mediated tight junction (TJ) opening in a pH-dependent manner.

(Hsu *et al.*, 2013)

二、 奈米科技

(一) 奈米科技簡介

奈米為一個度量單位 nanometer (nm) 的譯名，指的是十億分之一公尺 ($1\ nm = 10^{-9}\ m$)，也就是百萬分之一公釐。奈米科技 (nanotechnology) 是指量測、模擬、操控及製作奈米等級物質的技術。根據美國國家奈米技術創新中心的定義，「奈米科技」包括以下三項：1. 物件或結構尺寸範圍在 1-100 奈米之間的研究；2. 工作或操作的對象是分子等級的物件；3. 因尺寸達到奈米等級，所衍生出物理、化學及生物等特性的改進技術。在歐洲的調查顯示，45% 的專家贊同上述第一項定義；17% 的專家認為小於微米即為奈米；而 23% 的專家則認為奈米應屬於原子與分子層次。但在某些場合中，小於一奈米（如原子的操控）與大於一百奈米（如奈米粒子強化聚合物在 200-300 奈米時展現特殊功能、或奈米粒子與聚合物間的鍵結）也屬於奈米科技（葉，2004）。

物質及材料在奈米尺寸下，會呈現跟一般狀態下完全不同的物理、化學及生物特性，例如物質之結構、表面積、熔點、磁性、電學性能、光學性能、力學性能及化學活性等，即使不改變材料本身的成份，這些奈米化的物質都與傳統材料大不相同，而這些新的特性，可應用於

許多領域中，更進一步衍生出許多有潛力且可開發的特定功能產品，像是奈米塑材、醫療用品、塗料、觸媒、食品、藥物、化妝品及保養品等。

(二) 奈米技術應用於食品領域

奈米食品，是指在生產、加工或包裝過程中應用了奈米技術（微結構修飾或奈米設備）的食品。以奈米技術製備微膠囊載體為例，其可裝填易被人體排出或不易溶解於水的營養物質，改變營養物之溶解性質，達到提高吸收率、控制營養成分的釋放與延長保存期限的目的（陳，2008）。食品經由各種奈米化技術處理之後，其基本性質會有所改變，進而具有以下特性：

1. 改善溶解度：

經由奈米化後物質顆粒粒徑變小，表面積增加，使藥物或營養物質溶解度增加，學者研究指出，利用奈米顆粒包覆非極性分子或疏水性營養物質，如油脂、類胡蘿蔔素及維生素等，皆可提高其溶解性。如植物固醇本難溶於水或脂肪中，經由奈米化，後其溶解性顯著增加（Guan *et al.*, 2006）；而維生素經由奈米化後，溶解性、分散性及吸收率皆獲得改善，進而提高維生素之穩定性及功效性（趙及田，2006）。

2. 改善感官品質：

創造食品良好的質感（如質地、香氣及風味等）是食品加工的重要目的，而奈米化技術應用於澱粉，會使澱粉產生類似脂肪的細膩口感，故可以利用奈米化之澱粉取代部分脂肪類成分製造低脂食品，提升口感同時達到降低熱量之功效(Zhu *et al.*, 2006)。

此外，纖維素是公認為具有多項保健功能（如促進腸胃蠕動、減少膽固醇、油酯的吸收及緩和血糖升高等）的成分，且廣泛存在於各項食品中，但由於其組織及結構較粗糙，口感不佳，而經由奈米技術將纖維素研磨成奈米或次微米的等級後，其性質改變，變得具有非常滑順的質感，可取代重奶油蛋糕中的奶油或其他烘焙食品中的用油（葉，2007）。

3. 延長保存期限：

有研究指出，將奈米黏土應用於食品包裝材料，可使包材質輕、堅韌及耐熱，同時具有阻隔氧氣、二氧化碳、水及揮發性物質之通透，進而達到延長食品的保存期限的功能（葉，2004）。

另外，有學者利用微脂體包覆 Vitamin E，發現可提升 Vitamin E 對於高溫及紫外線之抵抗力，達到延長 Vitamin E 之保存期限，進而證實可藉由將營養物質裝載於奈米顆粒之核心，有效隔離外界影響因素，達到提高保護之功能（Chen *et al.*, 2006b）。

4. 提高吸收率：

將奈米化技術應用於中草藥、礦物質及功能性胜肽等物質，皆具有提高人體吸收率之功效（李，2006）。文獻指出，降低物質粒徑及形成非離子之分子，具有增加物質在生物體組織上的滲透、傳輸及吸收的功能，進而達到提高營養物質在腸道之吸收率之功效（Chen *et al.*, 2006b）。由於奈米結構材料具有非常高的比表面積，分布於材料表面具較高表面能的原子比率，會隨著物質粒子粒徑的縮小而大幅增加，使奈米食品材料的吸收率提高（葉，2007）。

5. 提高生物利用率：

疏水性藥物在生理環境下容易析出沉澱，通常會使用賦型劑來增加其溶解性，但賦型劑通帶有微毒性。而利用奈米技術製備微膠囊載體，可裝載不溶於水之營養物質，如脂溶性維生素、輔酶 Q₁₀、類胡蘿蔔素、植物固醇及 ω -3 脂肪酸等，亦可用於包覆極性或非極性物質（如大分子蛋白質），並改變其物理性質，如溶解性、分子粒徑大小及表面電位等，改善其溶解性質，並提高其穿透細胞膜之能力，進而達到提高生物利用率之目的（Schafer *et al.*, 1992; Desai *et al.*, 1996; Desai *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2006a; Lamprecht *et al.*, 2004）。

6. 增進保健功效：

利用奈米包覆技術，將對人體有利之營養物質包覆於其中，可保護營養物質不受胃腸道溫度、pH 值變化及酵素作用所造成的破壞，保持其生物活性，同時因為奈米載體的特性，可延長營養物質在腸道之滯留時間，並保持高濃度，使物質更易被腸道吸收進入體內，使其能有效發揮生理功能 (Peppas, 1995; Kawashima, 2001; Arbo's *et al.*, 2002)。另外有學者利用介質研磨法，將靈芝研磨為奈米級的粒子進行萃取，結果發現相較於傳統萃取方法，經奈米化後萃取到的靈芝多醣與幾丁質含量明顯增加，且其萃取液可抑制肝癌細胞的生長，對人體細胞無害 (葉, 2007)。

(三) 奈米顆粒 (nanoparticles)

到目前為止國際間對於「奈米食品」尚沒有統一定義。一般針對非食品材料領域，定義粒子大小小於 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)。然而藥學領域，則認為粒子大小小於 1 μm (即 1000 nm) 即可定義為“奈米顆粒” (Kipp, 2004)，因此本文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。

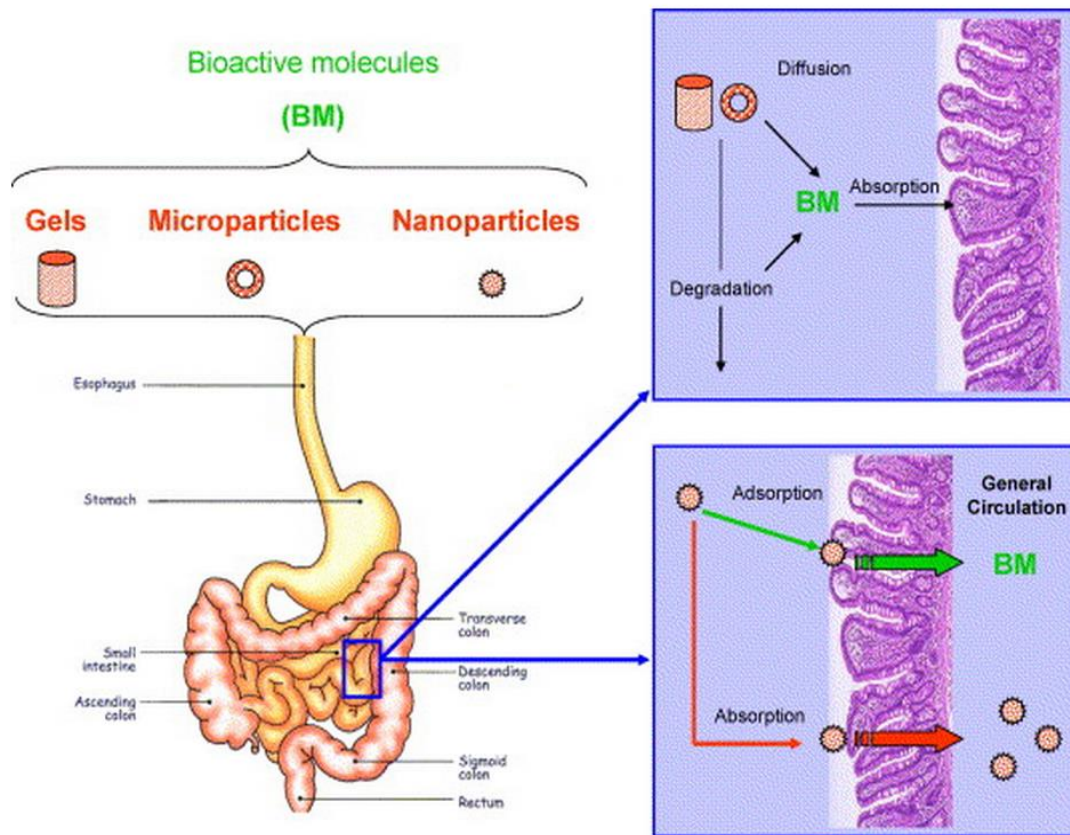
文獻指出，而當顆粒大小小於 1000 nm 時，可改善營養物質之生

體利用率 (Acosta, 2009)。有學者研究奈米顆粒在結腸上皮細胞通透實驗,結果顯示粒徑為 14 nm 之顆粒穿過結腸上皮細胞只需 2 分鐘;粒徑為 415 nm 之顆粒需要 30 分鐘;當顆粒粒徑大於 1000 nm ($1 \mu\text{m}$) 則無法通過生物屏障。因此,奈米顆粒相較於微米顆粒 ($>1 \mu\text{m}$),更容易通過腸道上皮細胞 (Desai *et al.*, 1996)。食品經由奈米技術處理後,會增加其與腸道上皮細胞接觸之面積與機會,甚至可直接穿透細胞進入體內被利用 (如圖十三),進而提高營養物質之生物利用率 (Peppas, 1995; Kawashima, 2001; Arbo's *et al.*, 2002)。

奈米顆粒可利用化學或機械 (物理) 方法製造,而利用機械方式所製備出之奈米顆粒大小通常介於 100-1000 nm 之間;若以化學法則可製備出大小約為 10-100 nm 之更小的顆粒 (Acosta, 2009)。

(四) 奈米之安全性探討

奈米材料因具有與過去截然不同的特性,這些特性是否會影響生物反應作用或是產生毒性,成為安全性試驗的探討議題。科學家主要針對奈米顆粒之尺寸大小、組成、表面積、形狀、型態、結晶、表面電荷、反應性的表面化學、塗層/包覆的表面化學及聚集與凝聚等特性,進行安全性評估,此外對於奈米顆粒進入體內後之吸收、分佈、代謝及排泄之研究也是一大重點。



圖十三、奈米顆粒於腸道吸收之優勢。

Fig. 13. Schematic representation of different absorption mechanisms of bioactive molecules.

(Chen *et al.*, 2006b)

至目前為止，多數安全性研究仍著重於非食品使用之奈米材料，因此食品領域之奈米材料等相關研究是較為缺乏的。世界衛生組織（WHO）及聯合國農糧組織（FAO）從營養學角度切入，針對奈米食品進行探討，規定應用於食品之奈米材料必須是含有營養之物質、已長期使用且證明對人體無毒性，因此奈米食品材料之選擇尤其重要。此外，除了研究營養物質本身成分外，裝載營養物之載體的研究亦為重要，目前應用於奈米食品之材料，大多為食用及天然高分子材料，如：白蛋白（albumin）、膠原蛋白（collagen）及幾丁聚醣（chitosan）等，這些物質經實驗證實在人體內可正常代謝，不會產生毒性問題。

奈米食品與傳統食品在檢測上之方式不同，因此確認劑量多寡是很重要的議題，不僅如此，原料組成與粒徑變化是否會造成理化性質及保健機能成分改變也是一大課題。此外，必須經由實驗得知劑量效應與生物體反應機制間的相關性，才可獲得明確安全極限值，這些都是需要持續研究探討的。

三、 幾丁聚醣奈米顆粒

(一) 常見之幾丁聚醣奈米顆粒製備方法

以幾丁聚醣作為基材製備微米及奈米顆粒已被廣泛應用在藥物傳遞上，其製備方法包括物理法及化學法兩種。物理法有研磨法、噴霧乾燥法及過篩法等，但以物理法製備出之顆粒粒徑分佈較廣，且不易達奈米等級，再加上只能透過顆粒表面吸附方式攜帶藥物，故較不適用於藥物傳遞方面。Gan 和 Wang 等人 (2007) 統整出幾項近年常被用來製備幾丁聚醣奈米顆粒之化學方法及其應用在藥物、蛋白質及基因上 (見表一)，幾種常見方法依序介紹如下：

1. 離子交聯法 (Ionic crosslinking)

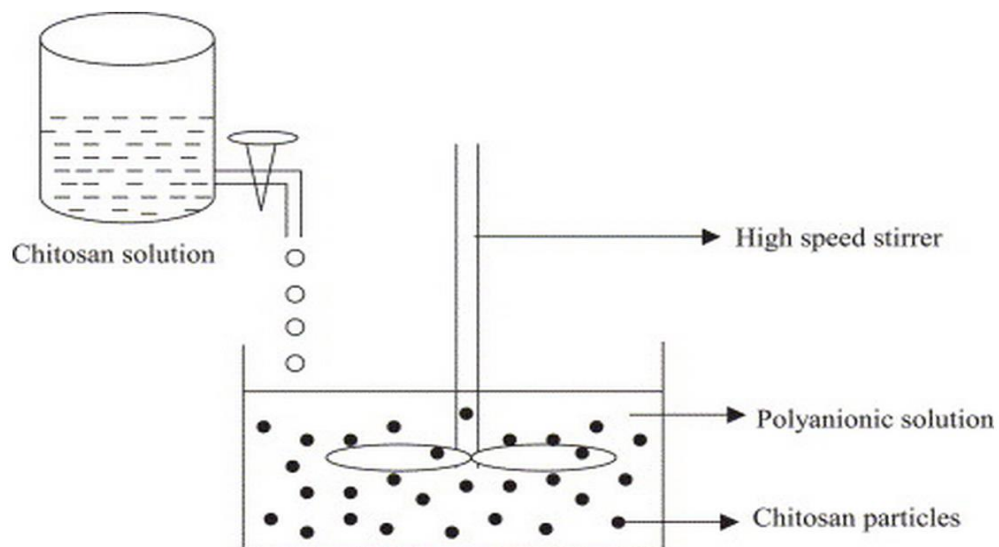
離子交聯法為最常使用的方法 (如圖十四)。其製備原理是利用幾丁聚醣的胺基於酸性環境下帶正電荷 (NH_3^+) 之特性，與帶負電之分子藉由離子交聯作用產生奈米顆粒。一般常使用的帶負電分子為三聚磷酸鈉 (sodium tripolyphosphate, TPP)，TPP 在水中會水解為三聚磷酸根，其具有五個負電，可與帶正電之幾丁聚醣產生足夠強度之作用力，包括離子鍵、氫鍵及親疏水之作用力等，進而形成奈米顆粒 (Kawashima *et al.*, 1985a/1985b)。此方法為本實驗用於製備奈米顆粒之方法，會於下個章節進行詳細探討。

表一、幾丁聚醣奈米顆粒之若干製備方法。

Table 1. Some preparation method for chitosan nanoparticles.

Method of preparation	Drugs/proteins/genes
Ionic gelation	Insulin, BSA, cyclosporin A
Coacervation or precipitation	DNA
Emulsion-droplet coalescence	Gadopentetic acid
Reverse micellar	Doxorubicin
Self-assembly chemical modification	Deoxycholic acid

(Gan and Wang, 2007)



圖十四、以離子交聯法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖。

Fig. 14. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by ionic gelation method.

(Agnihotri *et al.*, 2004)

2. 共凝結及沉澱法 (Coacervation or Precipitation)

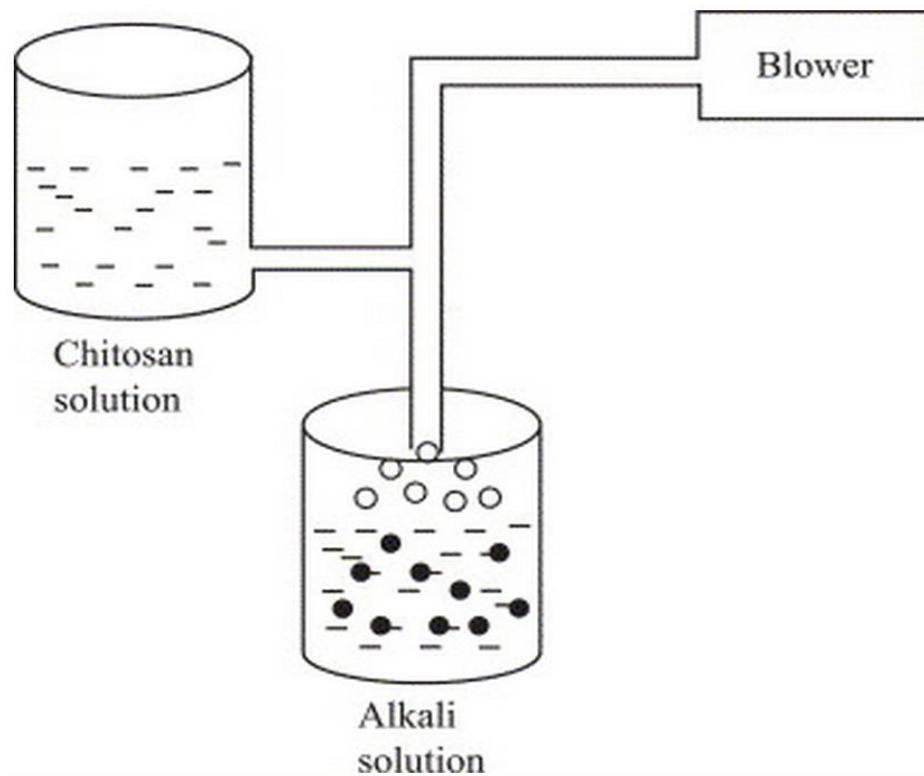
此法是將幾丁聚醣噴入含鹼性溶液（如：NaOH、NaOH-methanol、ethanediamine）之環境中（如圖十五），利用幾丁聚醣在鹼性條件下無法溶解的特性（ $pK_a \sim 6.3$ ），產生凝結及沉澱反應，接著將沉澱物經由多次水洗及離心去除殘留之鹼性溶液，即可得到幾丁聚醣奈米顆粒（Nishimura *et al.*, 1986）。

有學者將幾丁聚醣與DNA利用共凝結法製備奈米顆粒，形成不成規則球型顆粒，此顆粒粒徑範圍介於100–250 nm，當在pH值小於6時，顆粒表面帶正電荷，而經實驗結果得知，以此方法製備的Chitosan-DNA複合奈米顆粒具有保護DNA不受核酸分解酵素影響之優勢（Mao *et al.*, 2001）。

3. 乳化交聯法及乳化液滴接合法

(Emulsion cross-linking and Emulsion-droplet coalescence)

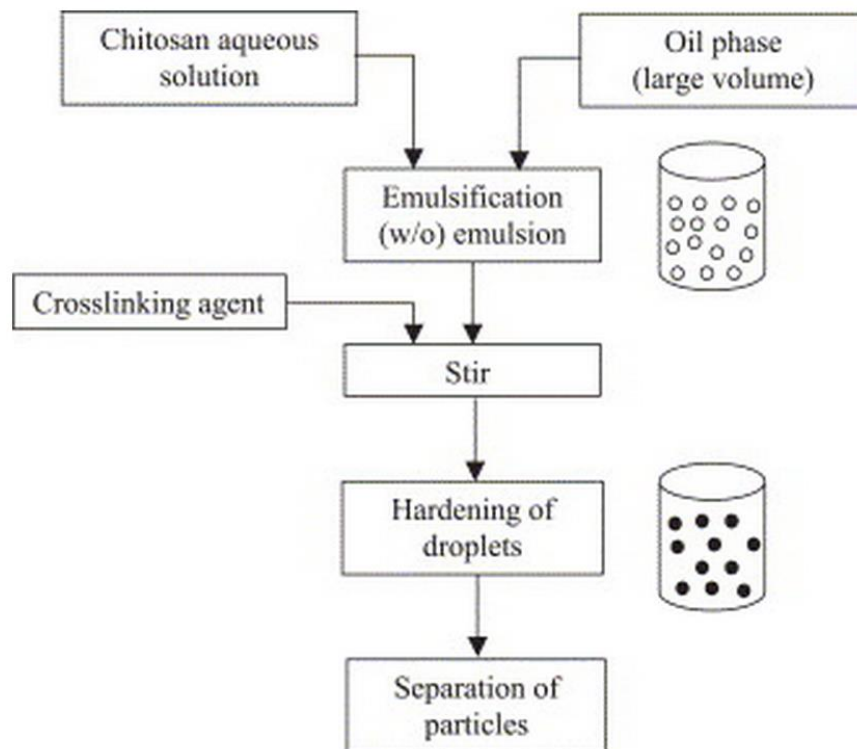
乳化交聯法是利用幾丁聚醣的胺基與交聯劑之醛基進行反應而結合。將幾丁聚醣溶液加入油相溶液中，藉由介面活性劑的乳化作用使幾丁聚醣溶液在油相中形成W/O (water-in-oil) 乳化液，接著加入交聯劑（如戊二醛）穩定及硬化乳滴，過濾顆粒後利用正己烷及乙醇清洗並乾燥，即可得到奈米顆粒（如圖十六）。但此方法可能無法完全去除未反應的交聯劑。



圖十五、以共凝結及沉澱法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖。

Fig. 15. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by coacervation/precipitation method.

(Agnihotri *et al.*, 2004)



圖十六、以乳化交聯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 cross-linking method.

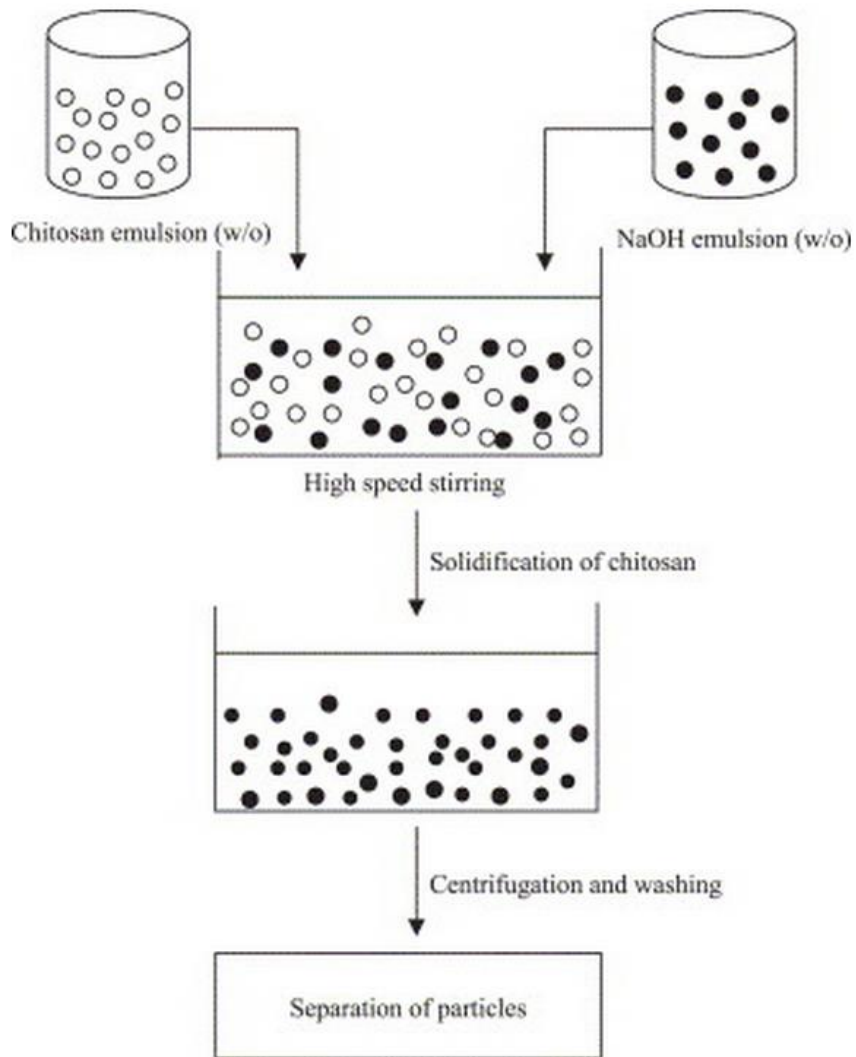
(Agnihotri *et al.*, 2004)

乳化液滴接合法由Tokumitsu等人（1999）提出，其將乳化交聯法及沉澱法兩種方法做結合，不僅可以利用交聯劑來穩定顆粒結構外，還藉由幾丁聚醣液與氫氧化鈉液滴所造成之沉澱反應來加強顆粒結構。其製備流程為先個別配置幾丁聚醣-藥物乳化液（w/o）及幾丁聚醣-氫氧化鈉乳化液（w/o），而後將兩者以高速攪拌，其乳滴會隨機碰撞並產生交聯，進一步沉澱產生幾丁聚醣奈米顆粒（如圖十七）。此方法已被成功應用在製備chitosan-gadopentetic acid奈米顆粒上，可形成藥物裝載率約為45%，平均粒徑約為452 nm之奈米顆粒。

4. 逆微胞法（Reverse micellar）

逆微胞法是將介面活性劑與有機溶劑混合，再加入幾丁聚醣及欲包覆的物質後，調節水相使其與油相及介面活性劑組成穩定混合物，接著加入交聯劑持續攪拌過夜後，去除有機溶劑得到沉澱物，將此沉澱物分散於水溶液中，利用合適的鹽類沉澱介面活性劑（圖十八），離心後上取清液即是幾丁聚醣微米/奈米顆粒（Leong and Candau, 1982）。

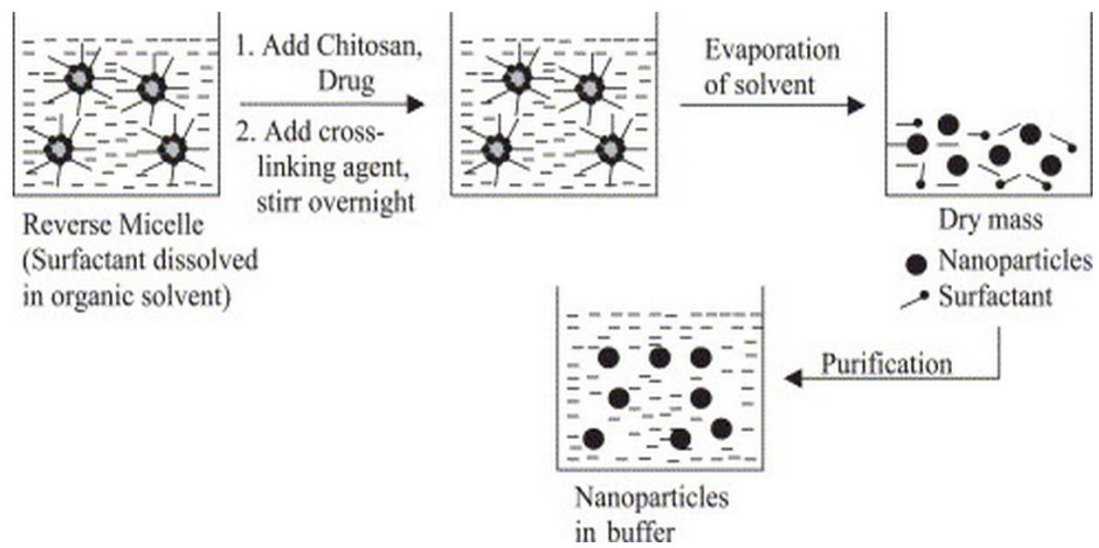
Mitra等人（2001）利用此方法來包覆Doxorubicin，製備出粒徑大小約為100 nm，且對腫瘤細胞具有良好滲透性和較長之滯留效果之藥物顆粒。



圖十七、以乳化液滴接合法製備幾丁聚醣顆粒之示意圖。

Fig. 17. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by emulsion-droplet coalescence method.

(Agnihotri *et al.*, 2004)



圖十八、以逆微胞法製備幾丁聚醣顆粒之流程圖。

Fig. 18. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by reverse micellar method.

(Agnihotri *et al.*, 2004)

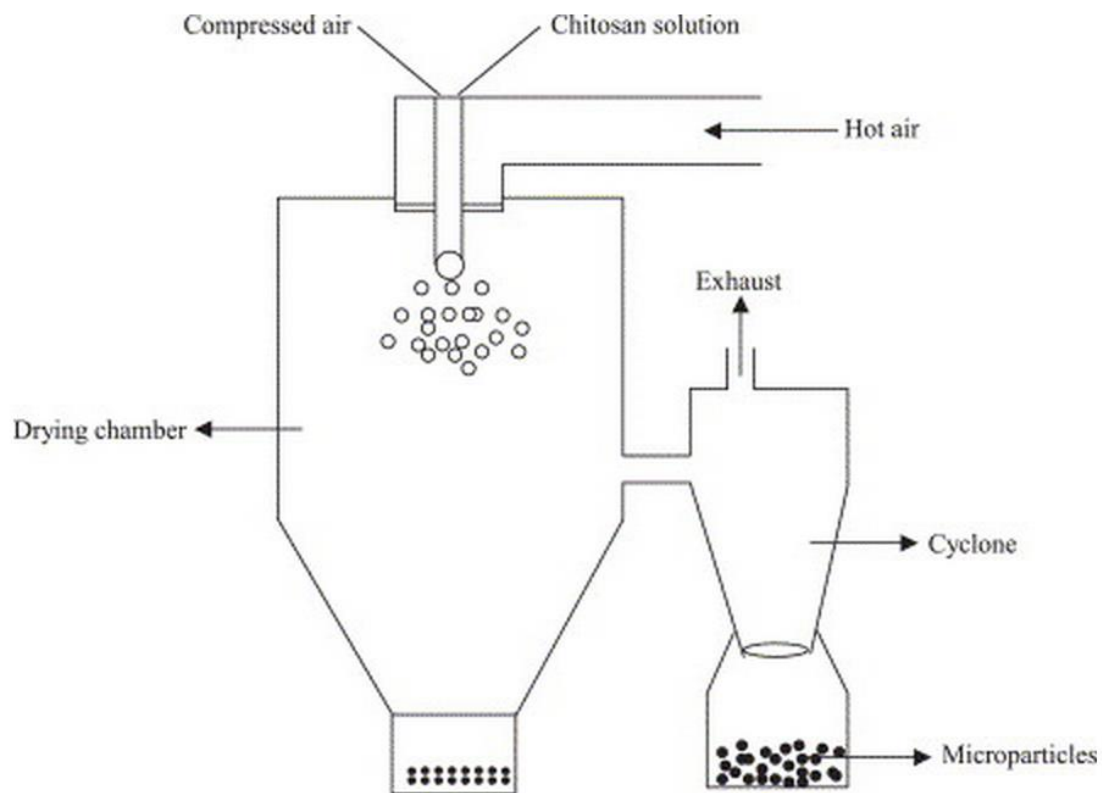
5. 噴霧乾燥法 (Spray-drying)

此方法是將欲包覆的物質分散在幾丁聚醣溶液中，並加入適當的交聯劑，以噴霧乾燥設備經由噴嘴將溶液在熱空氣中噴成霧狀，利用熱空氣使溶液水分瞬間蒸發，便可得到乾燥之奈米顆粒（如圖十九），此顆粒粒徑大小取決於噴嘴、噴射速度、壓力及溫度等。此方法雖需噴霧乾燥設備，但因為其操作簡單快速，故被工業界廣泛應用（He *et al.*, 1998）。

6. 化學修飾自組裝法 (Self-assembly chemical modification)

化學修飾自組裝法之原理是利用具有親水性及疏水性基團的兩性分子鏈，藉由親疏水性交互作用、靜電及氫鍵等作用力使物質自組裝成顆粒狀。其方法是利用修飾後之幾丁聚醣，其同時具有親水鏈與疏水鏈，在與樣品混合攪拌後，利用疏水性交互作用、靜電作用力、氫鍵及凡得瓦力等，使幾丁聚醣產生聚集，進而形成奈米顆粒（Yang *et al.*, 2014）。

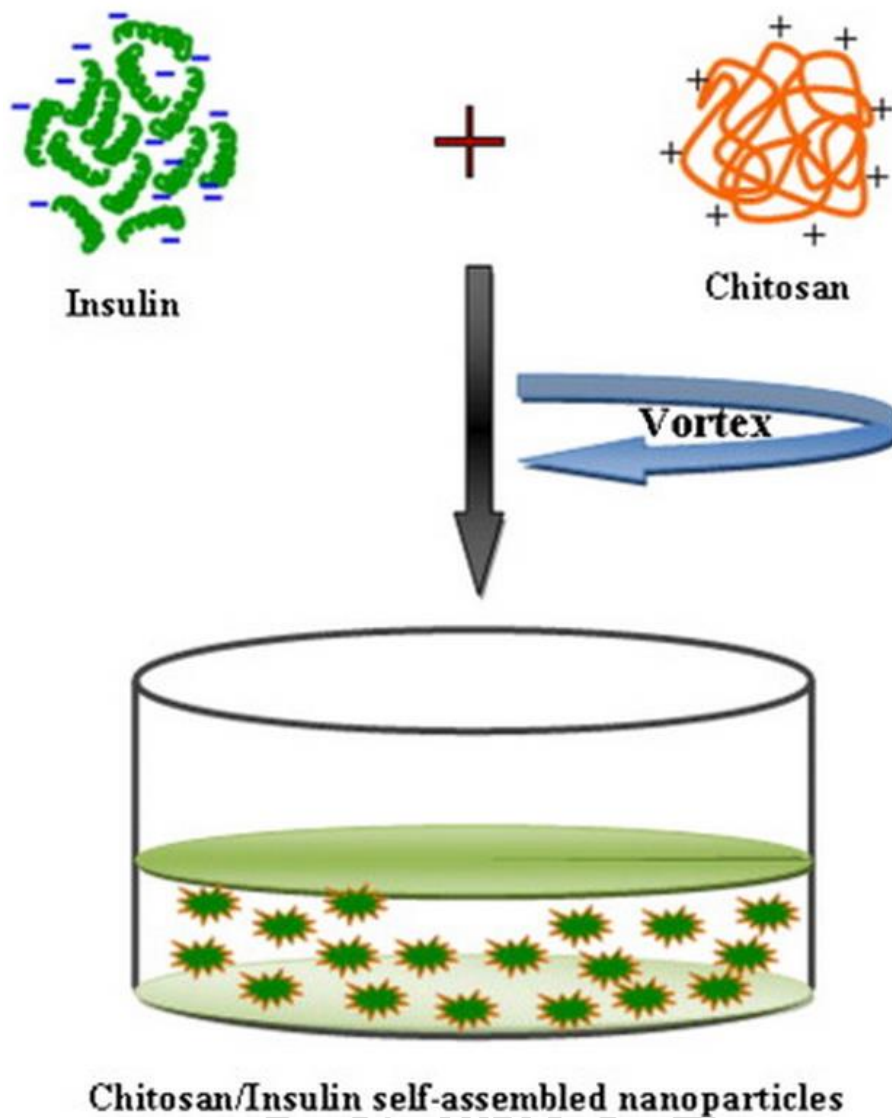
Kundu等人（2013）利用化學修飾自我組裝法製備幾丁聚醣-胰島素奈米顆粒（如圖二十），結果顯示其粒徑介於220-550 nm，胰島素包覆率為85%，且經由動物實驗後發現，此奈米顆粒可有效降低糖尿病小鼠之血糖。



圖十九、以噴霧乾燥法製備幾丁聚醣顆粒之流程圖。

Fig. 19. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by Spray-drying method.

(Agnihotri *et al.*, 2004)



圖二十、以化學修飾自組裝法製備幾丁聚醣顆粒之流程圖。

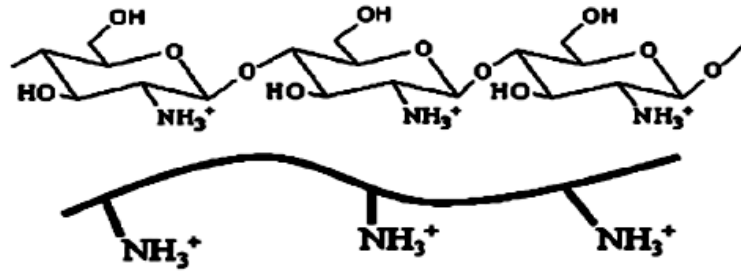
Fig. 20. Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by self-assembly chemical modification method.

(Kundu *et al.*, 2013)

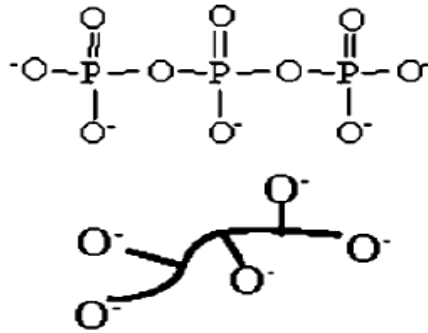
(二) 以離子交聯法製備幾丁聚醣奈米顆粒之機制

當幾丁聚醣溶解於酸性溶液且小於其 pKa (pH~6.3) 時，其結構上C-2位置上所帶的NH₂ group會轉變為NH₃⁺ group；三聚磷酸鈉 (sodium tripolyphosphate, TPP) 是由三個磷酸組合而成的物質，帶有多種負電基團 (-P₃O₁₀⁵⁻、-HP₃O₁₀⁴⁻及-OH⁻ group)。當三聚磷酸鈉溶於水中時會逐漸水解，使其磷酸根帶負電，形成帶五個負電的陰離子基團。當三聚磷酸鈉水溶液緩緩的加入幾丁聚醣酸性溶液時，-P₃O₁₀⁵⁻、-HP₃O₁₀⁴⁻及-OH⁻ group會與NH₃⁺ group互相吸引，產生離子交聯，並伴隨氫鍵與親疏水交互作用，形成穩固的奈米顆粒 (如圖二十一)。此作用力大小受到幾丁聚醣濃度、分子量、pH值及三聚磷酸鈉濃度影響，進而影響形成之奈米顆粒粒徑大小及相關特性 (如表面電位、包覆率及安定性等)，故在使用此方法製備奈米顆粒時應考慮以上因素造成之影響 (Kawashima, 1985)。

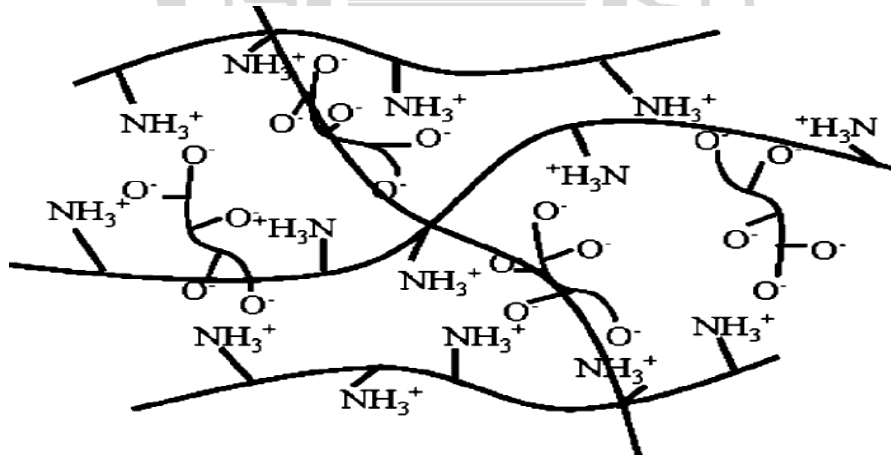
以pH值的影響來說，在不同pH下幾丁聚醣與三聚磷酸鈉的鍵結會有所差異。幾丁聚醣在pH<4.5時帶有的-NH₃⁺較多，其分子之間會有靜電排斥作用，使幾丁聚醣結構鏈會展開呈長條狀，並以此型態與TPP交聯，其結構骨架會呈現梯形狀態 (ladder) (如圖二十二a)；在 pH>4.5時，幾丁聚醣帶有-NH₃⁺會減少，分子間靜電排斥作用較小，此時幾丁聚醣分子鏈會捲曲 (如圖二十二b)，與TPP作用後形



(a) 幾丁聚醣溶於酸性溶液中



(b) 三聚磷酸鈉 (TPP)

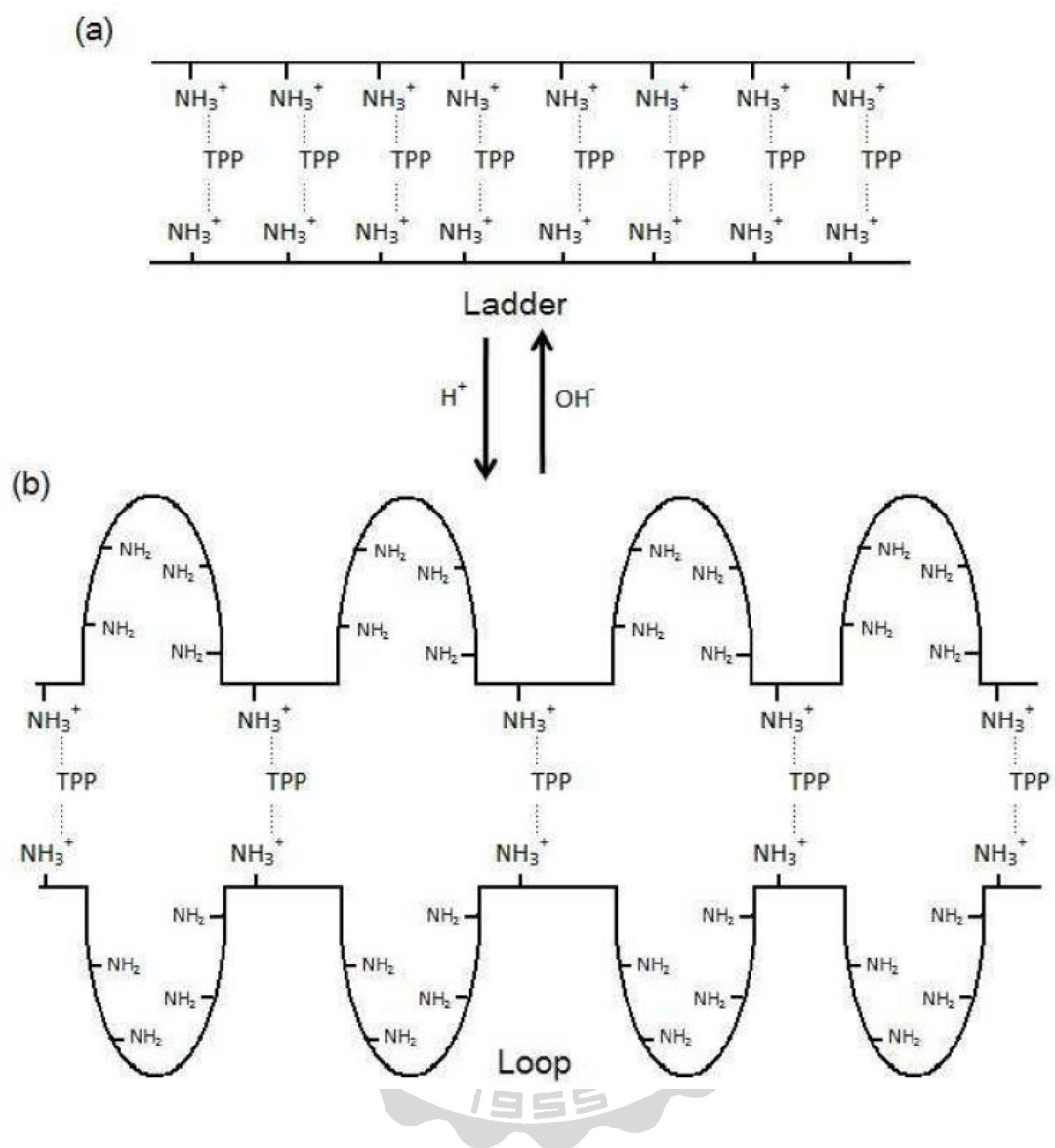


(c) Chitosan-TPP 交聯反應

圖二十一、幾丁聚醣與 TPP 之離子交聯反應。

Fig. 21. Molecular structure of chitosan in acid solution (a) , tripolyphosphate (TPP) (b) and ionic crosslinking between chitosan and TPP (c) .

(Hsieh *et al.*, 2008)



圖二十二、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉在不同 pH 值下之鍵結情形。

Fig. 22. Ladder-loop transition of chitosan-TPP complex structures: (a) ladder type; (b) loop type.

(Mi *et al.*, 1999)

成環狀結構 (loop)，而幾丁聚醣與 TPP 之鍵結是以環狀結構較為安定。另外，幾丁聚醣溶液之 pH 接近其 pKa (pH~6.3) 時，其結構上的 -NH_3^+ 會再度轉變為 -NH_2 ，故在製備奈米顆粒時將幾丁聚醣溶液 pH 調控在 4.5-6.3 之間最為理想。另一方面，TPP 溶液在 pH 為 3.0 時，負電荷來源為 $\text{-P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ ；當 TPP 溶液在 pH 為 5.0 時，則具有 $\text{-P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 及 $\text{-HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ 兩種；TPP 在 pH 為 9.0 時，其溶液的負電荷基團為 -OH^- 、 $\text{-P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 及 $\text{-HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ ，因此為了帶有較多可與幾丁聚醣交聯的陰離子，故 TPP 溶液 pH 應選擇在 9.0 最為理想。

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以製備成奈米顆粒，探討幾丁聚醣分子量、幾丁聚醣溶液 pH 值、CS/TPP 重量比及樣品添加順序對包覆率之影響。結果顯示降低幾丁聚醣分子量及提高 CS/TPP 重量比，會使奈米顆粒粒徑減小；而幾丁聚醣溶液 pH 值大於 4.8 時因牛血清蛋白帶負電，可提升包覆率；舞菇多醣因不帶電，當幾丁聚醣溶液 pH 值為 5 時，其可與三聚磷酸鈉作用形成較穩定之顆粒。

楊 (2008) 研究利用幾丁聚醣包覆兒茶素製備成奈米顆粒，探討幾丁聚醣分子量、幾丁聚醣溶液 pH 值 (pH 3.4、4.7 及 6.0)、TPP 溶液 pH 值 (pH 3.0、5.0 及 9.0)、CS/TPP 重量比及兒茶素濃度對於包覆率、粒徑、電位之影響，結果顯示以 pH 4.7 之幾丁聚醣溶液與 pH = 9.0

之TPP溶液製備的奈米顆粒較佳，其粒徑為奈米級；而CS/TPP重量比為6/1時，具有較佳之安定性。

孫（2010）研究利用幾丁聚醣包覆大豆蛋白水解物製備成奈米顆粒，探討幾丁聚醣分子量、CS/TPP重量比及大豆蛋白水解物濃度對於包覆率、粒徑、電位之影響。結果顯示，幾丁聚醣分子量降低其粒徑也隨之下降；利用高分子量幾丁聚醣與CS/TPP重量比3/1為條件時，奈米顆粒具有良好之安定性。

林（2012）研究利用幾丁聚醣包覆槲皮素製備成奈米顆粒，並經由臭氧方式降解幾丁聚醣分子量，探討幾丁聚醣分子量、CS/TPP重量比及槲皮素濃度對於包覆率、粒徑及表面電位之影響。結果顯示，利用原分子量之幾丁聚醣、CS/TPP重量比為3/1作為條件時，製備出的顆粒具有較佳之安定性，其網狀結構較多，使結構更為緊密，粒徑呈現較小之趨勢且顆粒分散性穩定。

洪（2014）研究利用幾丁聚醣包覆鈣及維生素D製備成奈米顆粒，並經由臭氧方式降解幾丁聚醣分子量，探討幾丁聚醣分子量、CS/TPP重量比及鈣與維生素D濃度對於包覆率、粒徑及電位之影響。結果顯示，隨幾丁聚醣分子量下降，奈米顆粒粒徑有變小的趨勢；而CS/TPP重量比增加，鈣的包覆率會上升。而利用低分子量幾丁聚醣在CS/TPP重量比為6/1的條件下製備奈米顆粒，其擁有最佳的安定性。

(三) 幾丁聚醣奈米顆粒作為營養物質載體之優勢與應用

綜合前面章節內容得知，幾丁聚醣是安全的高分子聚合物，與生物體間具有良好的生物相容性 (biocompatible)，在生物體內不會產生排斥現象，且具有生物分解性，在體內會被血液中之溶菌酶(lysosome)作用分解，因此對於人體不會產生毒性 (nontoxicity)。利用幾丁聚醣可製備出攜帶各種物質 (如藥物、營養素、礦物質、蛋白質、胜肽及許多機能性物質) 的奈米顆粒，這些顆粒因為同時具有幾丁聚醣及奈米顆粒之特性，故具有許多優勢統整如下：

1. 提升被包覆物質之安定性：

- (1) 由於幾丁聚醣在酸性條件下是安定的，故幾丁聚醣奈米顆粒經由口服到達胃時，可以保護其所包覆的物質不被胃酸及酵素破壞，保留包覆物的生理活性。
- (2) 利用幾丁聚醣包覆營養物質製備成奈米顆粒，可以減少營養物質免於受到外界環境中氧氣、光線、熱、酸或鹼的破壞 (Shahidi and Han, 1993)。

2. 提高被包覆物質之吸收率：

- (1) 利用幾丁聚醣奈米顆粒裝載脂溶性物質，可改變其溶解性，有利於吸收。
- (2) 幾丁聚醣奈米顆粒表面帶有正電荷且具有黏性，故當其

進入腸道後，會貼附於帶負電的腸道上皮，進而增加被
包覆物質在腸道的滯留時間，提高其吸收率。

- (3) 幾丁聚醣奈米顆粒由於有奈米等級大小且帶有正電荷，
故在腸道時可利用幾丁聚醣短暫打開腸道上皮細胞 tight
junction 的能力，將物質釋放進入其中，或直接帶著被包
覆物質穿過細胞間隙進入血液循環，達到提高被包覆物
質之吸收率。

3. 改善被包覆物質之釋放：

- (1) 利用幾丁聚醣奈米顆粒裝載藥物，可使藥物在腸道具有
緩慢釋放的功能，並維持一定的治療濃度，故可減少口
服或注射次數，同時可降低高劑量藥物造成的副作用。
- (2) 將幾丁聚醣奈米顆粒表面進行化學修飾後，可攜帶藥物
至目標位置，使其具有標的給藥的功能，應用於癌症治
療可減少藥物對於正常細胞之損傷。

由於經由幾丁聚醣包覆物質製備而成的奈米顆粒，無論是在消化、
吸收、加工過程、物質釋放等各方面皆有許多優勢，故已成為許多學
者研究之重點。

Calvo 等人(1997)利用 chitosan/polyethylene oxide – polypropylene
oxide (CS/PEO-PPO) 奈米顆粒包覆 BSA，製備出粒徑為奈米等級，

帶有+20 mV 至 +60 mV 之奈米顆粒，同時對 BSA 包覆率達 80%，而於釋放試驗中證實，其可持續釋放 BSA 達一周。

Fernandez-Urrusun 等人 (1999) 利用離子交聯法製備幾丁聚醣-胰島素奈米顆粒，經兔子鼻黏膜傳遞試驗，結果發現幾丁聚醣奈米顆粒可提高鼻黏膜吸收胰島素的能力。

Alonso 等人 (2001) 利用幾丁聚醣之特性，期望能夠延長抗癌藥物 Doxorubicin 在體內停留之時間以及使藥物分子變小，經由體外釋放實驗中發現加入三聚磷酸鈉製備成奈米顆粒，可使 Doxorubicin 較易釋放，在細胞毒性試驗中證實利用此方法製備之顆粒不會對細胞產生毒殺作用。

Pan 等人 (2002) 以幾丁聚醣奈米顆粒包埋胰島素，利用動物實驗觀察其血糖變化，結果發現幾丁聚醣奈米顆粒有增強胰島素在腸道的吸收力，可使患有糖尿病的大白鼠之血糖量減少並維持此作用約 10 小時。

Alonso 等人 (2005) 指出利用高分子量之幾丁聚醣製備奈米微粒，可有效地改善鮭魚口服降鈣素之吸收，證實幾丁聚醣可以促進藥物吸收。

Jiskoot 等人 (2006) 利用鼻黏膜作為輸入疫苗或藥物之途徑，選擇幾丁聚醣作為傳遞載體，與三聚磷酸鈉製備成奈米顆粒，以卵白蛋

白 (ovalbumin) 作為藥物，結果顯示此奈米顆粒可增加吸收表面積並且延長停留時間、改善藥物吸收率，且在鼻黏膜毒性測試結果中顯示，適當的幾丁聚醣濃度不會對細胞產生毒性作用。

Sung 等人 (2007) 研究指出幾丁聚醣與聚 γ -谷氨酸 (poly γ -glutamic acid, γ -PGA)，利用離子交聯的方式與胰島素製備出奈米顆粒，經由動物實驗結果指出，經由包埋胰島素之奈米顆粒可有效降低口服時胃酸及酵素之破壞到達腸道，因此可降低小鼠血液中葡萄糖之濃度。

Wan 等人 (2009) 以幾丁聚醣-三聚磷酸鈉包覆 Aspirin (ASA) 與 Probucol (PRO) 兩種模擬藥物製備成奈米顆粒。結果顯示兩者包覆率皆大於 50%，顆粒大小皆小於 300 nm。證實幾丁聚醣奈米顆粒可應用在同步包覆多種藥物，以有效地治療複雜的心血管疾病。

Al-Qadi 等人 (2011) 研究微膠囊化幾丁聚醣奈米顆粒肺蛋白之傳遞情形，將胰島素幾丁聚醣奈米顆粒、不含胰島素之幾丁聚醣奈米顆粒及經甘露醇微膠囊化之胰島素三者，分別吹入老鼠氣管中，結果顯示胰島素與幾丁聚醣藉由離子交聯的方式製備成奈米顆粒後，能延長降低葡萄糖濃度之時間。而又使用甘露醇微膠囊化胰島素與幾丁聚醣奈米顆粒共同進行噴霧乾燥後，在一定時間內，具有增加降低葡萄糖濃度之能力。

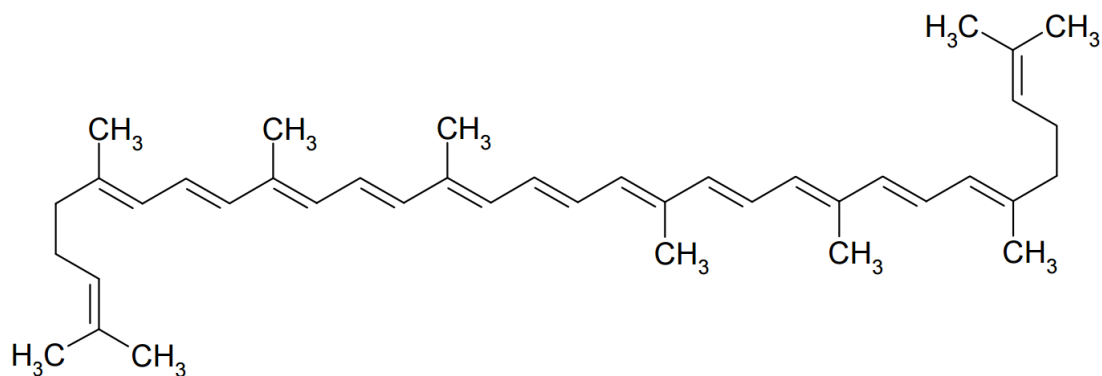
四、 茄紅素

(一) 茄紅素 (Lycopene) 簡介

1873 年學者 Hartsen 自 *Tamus communis* L. 這種漿果中，分離出深紅色的結晶物質；1875 年學者 Millardet 亦自番茄中抽取出含有番茄紅素的粗萃取物；1903 年 Schunck 則正式將這種紅色結晶物質命名為「Lycopene」，中文稱為番茄紅素 (Nguyen and Schwartz, 1999)。

番茄紅素 (Lycopene) 亦稱為茄紅素，是一種天然的脂溶性紅色色素，屬於類胡蘿蔔素的一種，其分子式為 $C_{40}H_{56}$ ，分子量為 536.89 Da，熔點介於 172-175 °C，易溶於氯仿、四氫呋喃、丙酮及苯等有機溶劑中，幾乎不溶於乙醇及甲醇，完全不溶於水中。其結構對稱，由 8 個異戊二烯單元 (isoprene) 組成，含有 13 個雙鍵，其中包含 11 個共軛雙鍵，是非環狀直鏈排列的碳氫化合物，在自然界中以最安定的全反式 (all-trans) 形式存在 (如圖二十三) (Clinton, 1998)。

茄紅素可由植物、藻類及微生物合成，而人類無法自行合成，因此茄紅素的攝取必須依靠飲食作為來源 (Magri *et al.*, 2008)。茄紅素廣泛存在於許多蔬果中，如番茄、西瓜、葡萄柚及木瓜等 (如表二) (Rao and Agarwal, 1999)，其中又以番茄及其製品為主要攝取來源，佔人們膳食中攝取茄紅素的 85% (Bramley, 2000)。



圖二十三、全反式茄紅素的化學結構。

Fig. 23. The structural formula of all-trans-lycopene.

(Zofia, 2006)

表二、常見的蔬果之茄紅素含量。

Table 2. Lycopene contents of common fruits and vegetables.

Fruits / Vegetables	Lycopene ($\mu\text{g/g}$ wet weight)
Tomatoes	8.8 - 42.0
Water melon	23.0 - 72.0
Pink Guava	54.0
Pink Grapefruit	33.6
Papaya	20.0 - 53.0
Apricot	< 0.1

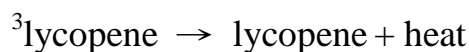
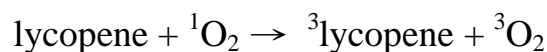
(Rao and Agarwal, 1999)

(二) 茄紅素的生理機能

茄紅素因為缺乏維生素 A 的活性，導致其相關研究在早期未受到重視，直到近年來有學者研究發現，茄紅素對人體健康與疾病預防有其特殊的功效，才引起學界的注意與研究(Stahl and Sies, 1996; Gerster, 1997)。

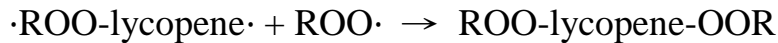
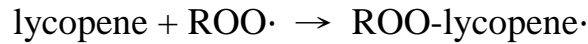
學者研究指出，茄紅素雖無維生素 A 活性，但其擁有極強的抗氧化活性，其消滅單線態氧 (singlet oxygen) 的能力是β-胡蘿蔔素的 2 倍，更高於維生素 E 達 10 倍之多，是一種抗氧化能力極強的物質 (Di Mascio *et al.*, 1989, 1991; Conn *et al.*, 1991; Devasagayam *et al.*, 1992; Ribaya-Mercado *et al.*, 1995)。類胡蘿蔔素的抗氧化能力強弱取決於其結構上的共軛雙鍵，而茄紅素擁有 11 個共軛雙鍵，這也茄紅素擁有極高的抗氧化能力的原因 (Ukai and Lu, 1994)。

茄紅素的抗氧化作用機制有很多種，其一是可以將單線態氧轉變成低能量的三線態氧 (基態氧)，其作用機制如下 (Krinsky, 1992)：



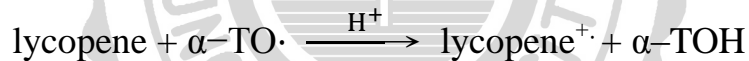
茄紅素接受單線態氧的能量而形成激發態 (${}^3\text{lycopene}$)，此型態茄紅素會利用振動及轉動相互作用，以熱能形式消散多餘的能量，而後繼續與單線態氧作用。利用此作用方式，僅需一個茄紅素分子就可消滅

無數個單線態氧，進而達到抗氧化的功能 (Krinsky, 1998)。而另一種抗氧化機制是茄紅素與自由基作用，其反應如下：



茄紅素接收自由基上多餘的電子，利用本身長鏈多烯鏈穩定共振，接著再與更多自由基結合，達到消滅自由的目的。利用此方式一個茄紅素分子亦可與多個自由基作用，達到良好的抗氧化能 (Krinsky, 1992)。

除以上兩種外作用機制外，還有學者研究指出，茄紅素在體內可以通過修復維生素 E 自由基及維生素 C 自由基，使其重新具有抗氧化能力，反應如下：



茄紅素因為可以消滅上述這些活性氧物種及自由基，因此進而可以預防許多疾病的發生，例如其可降低 DNA 損傷及惡性轉化，並減少蛋白質及脂質的氧化損傷等功能 (Zhang *et al.*, 1992)。茄紅素因具有避免血液中脂蛋白氧化的功能，進而可以降低粥狀動脈硬化及冠狀動脈心臟疾病的風險 (Kristenson *et al.*, 1997)。

茄紅素被許多學者研究後發現具有預防許多癌症的功能，包括前列腺癌、肺癌、消化道癌、乳癌、皮膚癌、子宮頸癌、胰臟癌及膀胱癌等許多癌症 (Micozzi *et al.*, 1986; Olson, 1986; Levy *et al.*, 1995;

Gerster, 1997)。因此有學者研究建議每天攝取一份番茄相關產品，有助於大幅減少消化道癌症的機率 (Franceschi *et al.*, 1994)。

(三) 茄紅素的安定性

在自然界中，茄紅素結構通常以全反式 (all-trans) 形式呈現，此形式具有較高的穩定性 (Clinton, 1998)。而因為茄紅素具有長鏈的碳-碳雙鍵存在，在環境中容易受到光、熱、氧及酸的作用，使其結構發生異構化或產生氧化裂解，進而導致茄紅素生理活性降低 (Liaaen-Jensen, 1971; Sharma and Mague, 1996; Nguyen and Schwartz, 1999)。

研究指出，茄紅素於加工及儲存過程會有兩個變化，其一是從全反式 (all-trans) 異構為順式形式 (mono-cis or poly-cis)；其二是茄紅素結構氧化裂解，而此現象同時會伴隨顏色上的損失 (Cole and Kapur, 1975a, 1975b)。

食品加工中，加熱處理是番茄加工常見的方式，但此加工方式可能會造成茄紅素的損失。有學者將新鮮番茄於 110 °C 下乾燥 230 分鐘後，偵測其茄紅素，發現減少了 12% 的含量 (Zanoni *et al.*, 1999)。另有學者研究指出，高於 70 °C 的加熱溫度會導致茄紅素裂解速率增加數倍 (Demiray *et al.*, 2013)。

Henry 等人 (1998) 探討將類胡蘿蔔素添加在紅花籽油中，以不同溫度加熱對類胡蘿蔔素熱安定性的影響。在四種類胡蘿蔔素（全反式 β -胡蘿蔔素、9-cis β -胡蘿蔔素、黃體素及茄紅素）中，茄紅素在三種溫度（75 °C、85 °C及 95 °C）下的熱裂解常數遠高於其他三種類胡蘿蔔素，表示番茄紅素是一種對熱與氧化極為敏感的類胡蘿蔔素。

Lee 和 Chen (2002) 利用茄紅素標準品做實驗，發現在 100 °C 加熱 120 分鐘後，其濃度會損失 78%；於 150 °C 加熱 10 分鐘後，所有茄紅素皆被熱破壞，顯示了溫度越高會使茄紅素裂解越快。

至於儲存方面，有學者將番茄糊分為空氣中照光、空氣中避光及真空中避光三組，並儲存不同溫度（-20 °C、5 °C及 25 °C），探討光、氧及溫度對於樣品中茄紅素含量之影響，結果指出在各溫度下儲藏茄紅素的損失程度為：空氣中光照 > 空氣中避光 > 真空中避光組。空氣中照光組在 25 °C 儲存 60 天後，有 77.6% 的茄紅素被破壞，顯示氧氣與光線對於茄紅素降解最為明顯 (Sharma and Mague, 1996)。

Lee 和 Chen (2002) 探討光線對茄紅素的影響。將茄紅素溶解在正己烷中，在 25 °C 密閉空間利用照明強度介於 2000-3000 lux 的光線照射照六天，結果顯示，經照光 144 小時後，茄紅素損失率達 94%。

由上述可知，茄紅素安定性問題是需要被重視的，因此改善茄紅素於環境中的安定性，保持其生理功能是一大重點。

(四) 茄紅素的生物利用率

茄紅素在人體內的吸收包括幾個步驟，首先必須食用含有茄紅素的食物（如番茄），接著在消化道中利用酵素及消化液作用，伴隨胃腸道的蠕動，將茄紅素由食物基質釋出，而此時共同攝取的油脂扮演很重要的角色（Unlu *et al.*, 2005；Huo *et al.*, 2007）。而當茄紅素溶解在油脂中便可以在腸道經由膽汁作用形成微膠粒（micelle），利用被動擴散或載體協助運輸等方式於腸道吸收（Yonekura and Nagao, 2007；Kong *et al.*, 2010）。

由上述消化吸收過程可知，從食物基質釋放茄紅素、將茄紅素溶入油脂及與膽汁混合形成微膠粒，這三步驟是茄紅素吸收的關鍵步驟（Yeum and Russell, 2002），然而，這三個步驟卻也造成茄紅素生物利用率不佳，其原因如下：

1. 從食物基質釋放茄紅素是受到阻礙的：

茄紅素通常存在於蔬果組織的有色體(Chromoplast)胞器中，因此在人體消化道內欲釋放茄紅素，有色體及細胞壁的存在便成為兩個天然的結構障礙(Jeffery *et al.*, 2012;Palmero *et al.*, 2013)，必須將有色體及細胞壁結構破壞才可釋放出更多的茄紅素，但胃腸道對此能力有限，因此造成飲食中之茄紅素難以被釋放到胃腸道中。

2. 茄紅素溶入油脂是受到阻礙的：

如前面所說，茄紅素要在腸道要吸收，必須先溶入油脂，然而此步驟會受到茄紅素的疏水性 (Tyssandier *et al.*, 1998)、與物質的交互作用 (Van den Berg, 1999) 及食物中脂肪的多寡而影響 (Castenmiller and West, 1998)。由於茄紅素疏水性極強，且因長鏈結構的關係，導致其溶解於油脂的過程較一般脂溶性物質更為不易，需要足夠量之油脂才有辦法將其溶解 (Deming *et al.*, 2000; Hoppe *et al.*, 2003)，若無油脂攝取或攝取不足，茄紅素將會因為溶解性不佳的原因導致吸收率降低，然而大量攝取油脂是對健康無益的。

3. 飲食成分影響：

當飲食中有水溶性膳食纖維之類的物質存在，且與含有茄紅素之食物共同攝取時，可能會造成茄紅素吸收率下降進而影響其生物利用率 (Castenmiller and West, 1998)，原因是水溶性膳食纖維容易結合膽汁排泄，使茄紅素在腸道乳化形成微膠粒的過程受阻，進而影響茄紅素之吸收率，但具體機制尚未明確。

Faisal 等人 (2010) 使用插管麻醉大鼠模型，評估茄紅素在其腸淋巴系統運輸狀況，研究茄紅素的絕對生物利用率，實驗結果發現，茄紅素的生物利用率極低，只有 $1.85 \pm 0.39\%$ 。

Tang 等人 (2005) 對人體血液進行測定，並推算茄紅素於人體之生物利用率，結過發現，在口服番茄醬後，茄紅素生物利用率只有 0.2%；而直接服用茄紅素與合成茄紅素，也僅僅只有 0.2 - 0.3% 及 1.2% 的生物利用率，證實茄紅素在人體吸收上是存在一些障礙的。

有學者指出番茄經由熱處理可以提升生物利用率，其理論是因為在加熱過程中，不僅可以破壞食物基質組織以釋出茄紅素，還可使番茄內全反式茄紅素會轉變為順式，此結構上的改變使其更容易與油脂及膽汁混合形成微膠粒，有利於吸收。(Britton, 1995; Boileau *et al.*, 2002)。但此論述是有爭議的，因為有學者發現，經由加熱處理的番茄，其茄紅素及 β -胡蘿蔔素對於混合油脂及膽汁形成微膠粒是不利的，其推測可能是因為加熱造成食物基質包覆住茄紅素，使其不易釋放造成 (Karakaya and Yilmaz, 2007; Tydeman *et al.*, 2010; Palmero *et al.*, 2014)。另外如前面章節所敘述，茄紅素對於光、熱、酸及氧作用是敏感的，其轉換成順式形式其實是不安定的，而且有可能直接造成茄紅素的降解，進而喪失其生理活性 (Liaaen-Jensen, 1971; Sharma and Mague, 1996; Nguyen and Schwartz, 1999)。

參、材料與方法

一、 實驗材料與藥品

1. Acetic acid：聯工化學廠股份有限公司，台灣。
2. Acetone：MACRON，美國。
3. Butylated hydroxytoluene (BHT)：Sigma-Aldrich，美國。
4. Chitin (幾丁質)：高雄應化公司，高雄 台灣。
5. Dichloromethane：MACRON，美國。
6. Ethanol absolute：Ferak Berlin GmbH，德國。
7. Ethyl acetate：MACRON，美國。
8. Glycerol：和光純藥，日本。
9. GPC standards (Pullulan)：Shodex，日本。
10. Hexane：MACRON，美國。
11. Hydrochloric acid：聯工化學廠股份有限公司，台灣。
12. Lycopene：Sigma-Aldrich，美國。
13. Methanol alcohol, anhydrous：MACRON，美國。
14. Pancreatin：Sigma-Aldrich，美國。
15. Pepsin (800-2500 *units/mg* protein)：Sigma-Aldrich，美國。
16. Potassium polyvinyl sulfate solution (P.V.S.K.)：和光純藥，日本。

17. Sodium acetate : Ferak Berlin GmbH , 德國。
18. Sodium hydroxide : 聯工化學廠股份有限公司 , 台灣。
19. Sodium tripolyphosphate : 和光純藥 , 日本。
20. Tetrahydrofuran (THF) : MACRON , 美國。
21. Toluidine blue : Sigma-Aldrich , 美國。
22. Tomato (*Solanum lycopersicum*) : 西屯市場 , 台中 台灣。

二、 實驗儀器

1. 磨粉機 : 1hp 型 , 群策電機工業股份有限公司 , 台灣。
2. 分析篩網 : Tyler 標準規格篩網 , Endecotts , 英國。
3. 電磁式過篩機 : OCTAGONDIGITAL 2000 型 , Endecotts , 英國。
4. pH meter : SP701 型 , Suntex , 台灣。
5. 真空冷凍乾燥機 : EYELAFD-5N 型 , Tokyo , 日本。
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. 微量超高速離心機 : CS 120GX 型 , Hitachi , 日本。
9. 細胞粉碎機 : XL-2020 型 , Misonix , 美國。
10. 往復式恆溫震盪器 : BT-350 型 , Yih Der , 台灣。
11. 烘箱 (多用途) : 500 型 , MEMMERT , 德國。

12. 超音波震盪器：S00 型，ELMA，德國。
13. 旋轉減壓濃縮機：MF-5T 型，EYELA，日本。
14. 熱風乾燥機：SMO-3 型，志聖工業股份有限公司，台灣。
15. 低溫恆溫培養箱：LTI-601 型，TKS，日本。
16. 高效率液相層析儀：
 - (a) L-6000 pump，Hitachi，日本。
 - (b) RI-Detector 8110，Bischoff，德國。
 - (c) D-2500 chromatointegrator 積分儀，Hitachi，日本。
 - (d) Column：PolySep GFC-P4000，日本。
17. 高效率液相層析儀：
 - (a) Agilent 1100 series，Agilent，美國。
 - (b) Chromatocorder 21，System Instruments，日本。
 - (c) UV-VIS Detector/S3702，Soma，日本。
 - (d) Column：Luna C18 (2)，Phenomenex，美國。
18. 雷射奈米粒徑及界面電位分析儀：Zetasizer Nano 3000HS 型，
Malvern Instrument，英國。
19. 掃描式電子顯微鏡：JSM 7000F 型，Jeol，日本。

三、 樣品製備

(一) 幾丁聚醣製備

取片狀幾丁質，將其磨成粉末後，經篩網反覆過篩，取得 40-60 mesh 之幾丁質粉末備用。隨後參考沈(2004)方法，配製 57% (w/v) NaOH 並加熱，加入 100 g 之幾丁質粉末，並於 $102\pm 2^\circ\text{C}$ 加熱攪拌處理 2 小時，而後將幾丁聚醣與鹼液分離，並以蒸餾水沖洗幾丁聚醣至 pH 值到達中性，置入烘箱進行乾燥 (80°C ，8 小時)。利用 Toei 及 Kohara (1976) 之方法測定幾丁聚醣之去乙酰程度，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之方法。利用 1% 醋酸水溶液配置濃度為 1% 之幾丁聚醣溶液 (w/v)，經由過濾以去除顆粒較大之雜質及鹽類，接著利用量筒定量 100 mL 的幾丁聚醣溶液置於三角錐形瓶，以高效率套組式臭氧機通入臭氧，臭氧濃度設定為 6.3 g/m^3 ，反應溫度為 $50\text{-}55^\circ\text{C}$ ，接著以不同時間進行氧化降解處理。處理完之幾丁聚醣溶液以 NaOH 溶液調整 pH 值至 7，使幾丁聚醣析出 (幾丁聚醣之 pKa 值為 6.3)，經由離心 ($22200\times\text{g}$ ，

15 °C，30 min) 並以去離子水反覆水洗三至四次，使幾丁聚醣沉澱並去除鹽類或者多餘的鹼，再將其以冷凍乾燥機進行凍乾得到不同分子量之幾丁聚醣樣品。接著利用膠體層析管柱 (Gel Permeation Chromatography, GPC) 測定以不同時間處理幾丁聚醣之分子量，篩選出未降解者 607 kDa (Original Mw)、200-250 kDa (High Mw)、100-150 kDa (Medium Mw) 以及 50 kDa 以下者 (Low Mw) 進行後續試驗之樣品。

(三) 茄紅素之製備

1. 番茄之乾燥：

參考 Zanoni 等人 (1999) 利用熱風乾燥機乾燥番茄。將新鮮番茄洗淨後切片，鋪放置於不鏽鋼盤，利用熱風乾燥機以 60 °C 乾燥 24 小時，將乾燥完之番茄收集裝袋密封，避光保存於 -18 °C。

2. 溶劑萃取乾燥番茄之茄紅素：

參考 Sadler 等人 (1990) 利用溶劑萃取乾燥番茄中的茄紅素。取 120 g 乾燥番茄片磨碎成小顆粒狀，將其加入將其加入 3.6 L 之混合的有機溶劑中 (Hexane : Acetone : Alcohol = 2 : 1 : 1)，使樣品與溶劑比為 30 : 1 (v/w)，並加入 0.05% (w/v) 的 BHT，避免其在萃取過程中氧化，接著將萃取瓶置於超音波震盪 30 分鐘後

避光靜置 8 小時，萃取完成後使用布氏漏斗抽氣過濾固形物（番茄殘渣），得到含有茄紅素之有機溶劑濾液。

3. 茄紅素之純化：

參考于等人（2003）利用 Recrystallization 方法分離純化茄紅素。首先將含有茄紅素之有機溶劑萃取液，於避光狀態利用減壓濃縮機濃縮至黏稠膏狀，接著將膏狀物以 75 mL 正己烷回溶，並使用分液漏斗將其與蒸餾水進行分液，分液完成後取上層正己烷溶液置於冷藏溫度（4-7℃）避光靜置 8 小時，此時會產生茄紅素結晶，接著將茄紅素結晶過濾收集，以水及乙醇清洗後加入少量正己烷進行二次再結晶（提升純度），步驟如上述，接著進行過濾、清洗及收集茄紅素結晶，利用冷凍乾燥機進行凍乾，並將乾燥完成的深紅色茄紅素結晶粉末以 -80℃ 低溫避光冷凍保存，此即為實驗用之茄紅素樣品。

（四） 茄紅素溶解性測試

取 5 mg lycopene 粉末，分別加入不同溶劑（水、冰醋酸、甲醇、絕對酒精、正己烷、丙酮、四氫呋喃及二氯甲烷）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-茄紅素 (CS-TPP-Lycopene) 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 %醋酸水溶液 (v/v) 中至 2 mg/mL 之濃度，調 pH 至 4.7；不同濃度之三聚磷酸鈉 (TPP) 溶於去離子水中，調 pH 至 9.0；將茄紅素 (lycopene) 溶於四氫呋喃 (THF) 中。樣品添加次序為先將 lycopene 溶液加入 CS 溶液中攪拌均勻，再將 TPP 溶液緩緩滴入混合液中攪拌。此試驗目的為探討 lycopene 濃度、CS 之分子量及 CS/TPP 重量比對 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之茄紅素包覆率、茄紅素裝載率、奈米顆粒產率、粒徑大小及表面電位之影響(註：在製備過程皆避光，目的是防止 lycopene 因光照受到影響)。其細節如下：

1. Lycopene 濃度之影響：

將 12 mL 不同濃度 (20、30、40、50、60、70 及 80 $\mu\text{g/mL}$) 之 lycopene 溶於 THF 中，與 5 mL CS 溶液 (Original Mw, 2 mg/mL, pH 4.7) 混合攪拌 3 min，再將 2 mL TPP 溶液 (1.667 mg/mL, pH 9.0) 緩慢逐滴滴入 CS 與 lycopene 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，而後添加 20 mL glycerol 攪拌 5 min (避免奈米顆粒相互黏附)，以離心機進行離心 (39000 \times

g ， 15°C ， 30 min)，而後將上清液測定 lycopene 含量並計算包覆率及裝載率，另外沉澱物部分即為 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒，測定其奈米顆粒產率、粒徑大小及表面電位。

2. CS 分子量影響：

將 12 mL lycopene 溶液 (conc. $80\ \mu\text{g/mL}$) 與 5 mL 不同分子量之 CS 溶液 (Original Mw、High Mw、Medium 及 Low Mw，conc. 2 mg/mL ，pH 4.7) 混合攪拌 3 min ，再將 2 mL TPP 溶液 (1.667 mg/mL ，pH 9.0) 緩慢逐滴滴入 CS 與 lycopene 之混合溶液中並攪拌 30 min ，使得溶液中 CS/TPP 重量比為 3/1，而後添加 $20\ \mu\text{L}$ glycerol 攪拌 5 min (避免奈米顆粒相互黏附)，以離心機進行離心 ($39000 \times g$ ， 15°C ， 30 min)，而後將上清液測定 lycopene 含量並計算包覆率，另外沉澱物部分即為 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒，測定其奈米顆粒粒徑大小及表面電位。

3. CS/TPP 重量比之影響：

將 12 mL lycopene 溶液 (conc. $80\ \mu\text{g/mL}$) 與 5 mL CS 溶液 (Medium Mw， 2 mg/mL ，pH 4.7) 混合攪拌 3 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) 緩慢逐滴滴入 CS 與 lycopene 之混合溶液中並攪拌 30 min ，使得反應液中 CS/TPP 重量比分別為 3/1、4/1、5/1 及 6/1，而後添加

20 μL glycerol 攪拌 5 *min* (避免奈米顆粒相互黏附)，以離心機進行離心 (39000 $\times g$, 15 $^{\circ}\text{C}$, 30 *min*)，而後將上清液測定 lycopene 含量並計算包覆率，另外沉澱物部分即為 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒，測定其奈米顆粒粒徑大小及表面電位。

(二) CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之安定性試驗

1. 熱處理 (heat treatment) 試驗：

對照組部分分別取 1 *mg* lycopene 粉末置於烘箱中，分別以 30、60、90 及 120 $^{\circ}\text{C}$ 加熱處理 1 小時，巨觀觀察各種不同加熱溫度對於 lycopene 顏色變化，並將其溶解後分析樣品濃度，以推算茄紅素降解程度。

實驗組部分先製備奈米顆粒，將 12 *mL* lycopene 溶液 (conc. 80 *mg/mL*) 與 5 *mL* CS 溶液 (Medium Mw, conc. 2 *mg/mL*, pH 4.7) 混合攪拌 3 *min*，再將 2 *mL* TPP 溶液 (1.667 *mg/mL*, pH 9.0) 緩慢逐滴滴入 CS 與 lycopene 之混合溶液中並攪拌 30 *min*，使得溶液中 CS/TPP 重量比為 3/1，而後添加 20 μL glycerol 攪拌 5 *min* (避免奈米顆粒相互黏附)，以離心機進行離心 (39000 $\times g$, 15 $^{\circ}\text{C}$, 30 *min*)，得到沉澱物即為 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒。將 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒置於烘箱以 120 $^{\circ}\text{C}$ 加熱處理 1 小時，

巨觀觀察熱處理對於奈米顆粒顏色變化，而後將此奈米顆粒分散於 2 mL 的 1%醋酸水溶液中，攪拌 30 min，利用細胞粉碎機震散奈米顆粒，加入 2 mL THF 於超音波震盪萃取 3 min，接著加入 2 mL 正己烷使有機相與水相分層，收集上層含有茄紅素之有機相層，利用以上步驟反覆萃取至有機相層無顏色，收集所有有機相並分析其 lycopene 濃度，以推算降解程度。

2. 儲存 (storage) 試驗：

對照組部分取 4 mg lycopene 粉末置於培養箱，以 25 °C 分別避光培養不同天數，巨觀觀察不同儲存時間 (0、7、14、21 及 28 天) 對於 lycopene 顏色變化，並將其溶解後分析樣品濃度，以推算降解程度。

實驗組部分先製備奈米顆粒，將 12 mL lycopene 溶液 (conc. 80 mg/mL) 與 5 mL CS 溶液 (Medium Mw, conc. 2 mg/mL, pH 4.7) 混合攪拌 3 min，再將 2 mL TPP 溶液 (1.667 mg/mL, pH 9.0) 緩慢逐滴滴入 CS 與 lycopene 之混合溶液中並攪拌 30 min，使得溶液中 CS/TPP 重量比為 3/1，而後添加 20 µL glycerol 攪拌 5 min (避免奈米顆粒相互黏附)，以離心機進行離心 (39000 × g, 15 °C, 30 min)，得到沉澱物即為 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒。將 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒置於培養箱，以 25 °C 分別培養 0、7、

14、21 及 28 天，巨觀觀察儲存時間對於奈米顆粒顏色變化，而後將此奈米顆粒分散於 2 mL 的 1% 醋酸水溶液中，攪拌 30 min，利用細胞粉碎機震散奈米顆粒，加入 2 mL THF 於超音波震盪萃取 3 min，接著加入 2 mL 正己烷使有機相與水相分層，收集上層含有茄紅素之有機相層，利用以上步驟反覆萃取至有機相層無顏色，收集所有有機相並分析其 lycopene 濃度，以推算降解程度。

3. 胃腸道模擬試驗：

參考 USP (美國藥典) 方法 (2004) 先配置 simulated gastric fluid (將 2 g NaCl、7 mL 37% HCl、3.2 g pepsin (3200 units/mg of protein) 及 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 pH 至 7.4，再以 double-distilled water 定量至 1000 mL)。接著製備奈米顆粒，將 12 mL lycopene 溶液 (conc. 80 mg/mL) 與 5 mL CS 溶液 (Medium Mw, conc. 2 mg/mL, pH 4.7) 混合攪拌 3 min，再將 2 mL TPP 溶液 (1.667 mg/mL, pH 9.0) 緩慢逐滴滴入 CS 與 lycopene 之混合溶液中並攪拌 30 min，使得溶液中 CS/TPP 重量比為 3/1，而後添加 20 μL glycerol 攪拌 5 min (避免奈米顆粒相互黏附)，以離心機進行離心 ($39000 \times g$ ，

15 °C, 30 min), 得到沉澱物即為 CS-TPP-Lycopene 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, 置於恆溫水浴槽以 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 lycopene 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 繼續置於恆溫水浴槽以 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 lycopene 濃度。最後利用公式及測量之濃度結果計算 lycopene 之累積釋放率, 其計算方式如下:

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

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

W_n : 時間累積 Lycopene 總含量

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

n, a : 取樣次數

C : 測定 Lycopene 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) 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 醋酸溶液中，置於室溫下攪拌一小時待其溶解後，再以蒸餾水定量至 50 mL，攪拌 30 min。接著，取 5 mL 樣品及標準品溶液於三角錐形瓶中，加入 0.05 mL toluidine blue 指示劑後，以 N / 400 potassium polyvinyl sulfate solution (P.V.S.K) 進行滴定，滴定至溶液由藍色變成紅紫色，此為其滴定終點，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知去乙醯度。

(二) 降解之幾丁聚醣樣品分子量測定

參考吳 (2008) 之方法，精秤 10 mg pullulan 標準品及幾丁聚醣樣品，分別溶於 10 mL 之去離子水及 1% 醋酸水溶液中，於冰箱靜置隔夜後，以 0.45 μm filter 進行過濾。利用 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 11800、22800、47300、112000、212000、404000 及 788000 Da。測定樣品遲滯時間 (retention time) 並與檢量線相互對照，即可推算幾丁聚醣樣品之平均分子量。

系統：L-6000 pump、D-2500 chromatointegrator 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 μL

偵測時間：15 min

(三) 茄紅素包覆率、裝載率及奈米顆粒產率之測定

製備 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒時，將 CS-TPP-Lycopene 反應液離心，取上清液，利用高效液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 之測定方法測定 lycopene 含量，並對照茄紅素標準品建立之檢量線，計算其包覆率 (encapsulation efficiency %)。

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

接著離心後所得之沉澱物即 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒，利用烘箱烘

乾秤重，至恆重，即可得 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之乾重，並計算其裝載率 (loading capacity %)。

$$\text{Loading capacity} = \frac{\text{total Lycopene amount} - \text{supernatant Lycopene amount}}{\text{nanoparticle weight (dry weight)}} \times 100$$

產率 (process yield %) 分析則是以 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之乾重，除以所添加進入之固形物重量，即 CS、TPP 即 lycopene 起始添加進入之重量 (w/w)。

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

(四) 茄紅素定量方式

參考 Giovanelli 及 Pagliarini (2009) 利用高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 測定樣品中茄紅素之含量。其原理為利用移動相通過固定相時，混和物中成分與固定相、移動相之間分離係數不同，使其在管柱之遲滯時間不同而達到分離之目的，利用積分面積與濃度之關係，進行定量分析。

- HPLC 測定條件：

主機體：Agilent 1100 series (Agilent, 美國)

積分儀：Chromatocorder 21 (System Instruments, 日本)

偵測器：UV-VIS Detector/S3702 (Soma, 日本)

管柱：Luna C18 (2) column 250*4.6 mm (Phenomenex, 美國)

移動相：Methanol：Tetrahydrofuran = 90：10

偵測波長：475 nm

流速：1.0 mL/min

注射量：20 μ L

偵測時間：25 min

● HPLC 測定方法：

首先配製茄紅素標準溶液 (Sigma-Aldrich, 美國), 濃度為 2、4、6、8、10、20、40、60、80 及 100 ppm, 建立茄紅素之檢量線, 而後樣品與標準品皆以 0.45 μ m filter 進行過濾, 利用 HPLC 方法分析茄紅素含量。測定樣品遲滯時間 (retention time) 並與檢量線相互對照, 即可計算出樣品中茄紅素之濃度, 推算其茄紅素含量。

由番茄中萃取之茄紅素, 經過純化後會利用此法測量其樣品純度, 首先將茄紅素樣品溶於 ethyl acetate：dichloromethane：hexane = 80：16：4 (v/v/v) 的溶劑中, 利用上述 HPLC 條件進行偵測其濃度, 與茄紅素標準品檢量線對照推算樣品純度。另外, 進行 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之安定性試驗時, 熱處理試驗及儲存試驗所收集的有機相, 皆由此方式測定其茄紅素含量, 進而推算其茄紅素損耗; 而胃腸道模擬試驗部分, 奈米顆粒經由離心後, 取 1 mL 上清液加入 0.5 mL THF,

而後同樣利用此法進行分析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) 測定奈米顆粒大小及表面電位。製備奈米顆粒之實驗容器務必清洗乾淨，實驗使用之溶液皆以 $0.45\ \mu\text{m}$ 膜過濾才可進行實驗。將 CS-TPP 及 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒懸浮於適量的去離子水中，使用超音波細胞粉碎機將聚集顆粒震碎 (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-Lycopene 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 (SEM) 觀察

CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒以去離子水多次反覆水洗離心，去除樣品中的鹽類，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 $4\text{mm} \times 4\text{mm}$ 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表面型態。

(七) 統計分析

本實驗數據皆以平均±標準誤差 (means±SEM) 表示。所有組別之試驗數據皆利用 SAS 9.1 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

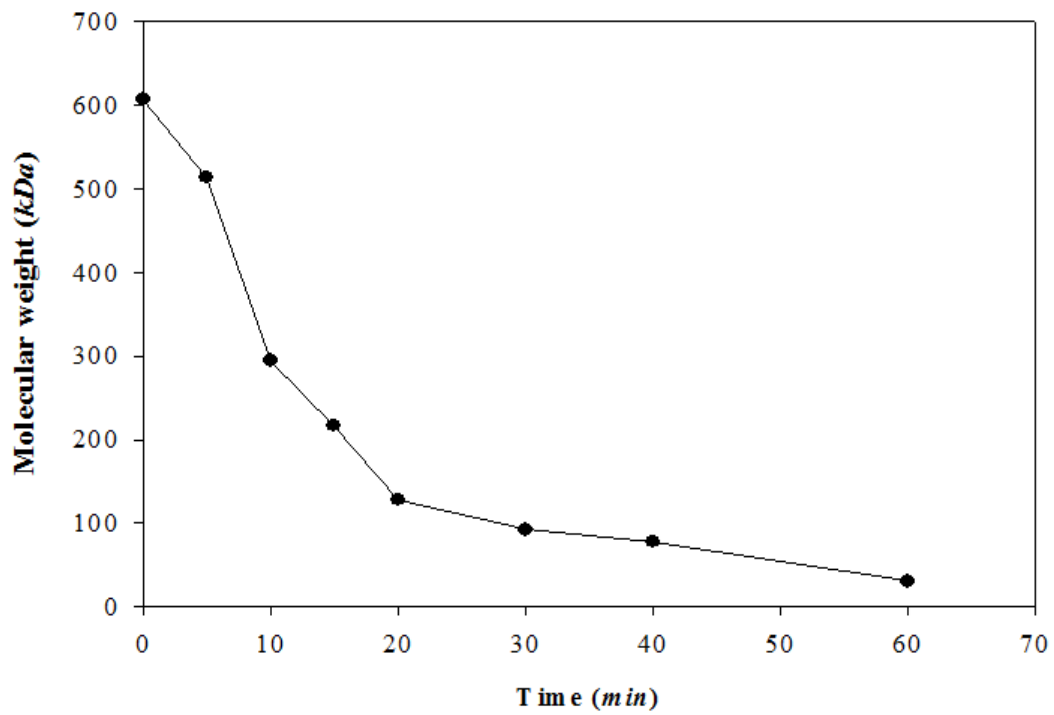
(一) 幾丁聚醣製備

參考沈 (2004) 之方法，利用 57% (w/v) NaOH 加熱處理幾丁質粉末，於 $102\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加熱攪拌處理 2 小時，而後洗淨並烘乾，接著利用 Toei 及 Kohara (1976) 之方法測定幾丁聚醣之去乙醯程度。結果顯示可以得到去乙醯度為 90% 之幾丁聚醣。

幾丁聚醣去乙醯度是決定其應用性的一大因素，幾丁聚醣的去乙醯度高低會影響其溶解性、分子鏈型態、黏度及電荷等特性。在藥物傳遞方面，由於高去乙醯度幾丁聚醣溶解在酸性溶液中時，具有高度陽離子之特性，可以提高對腸黏膜的吸附力以及可暫時性的打開腸黏膜上的緊密連結 (tight junctions)，有利於藥物、營養物質等滲透吸收 (Huang *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005)。故本研究選取去乙醯度大於 85% 者作為實驗材料。

(二) 不同分子量幾丁聚醣之製備

參考林 (2012) 以臭氧氧化降解幾丁聚醣較佳之條件，即利用臭氧之濃度為 6.3 g/m^3 於 $50\text{-}55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下作用不同時間，由圖二十四得知，隨



圖二十四、臭氧處理時間對幾丁聚醣降解程度之影響。

Fig. 24. Effect of ozone treatment time on the degree of chitosan degradation. (Ozone concentration : 6.3 g/m^3)

著臭氣作用時間越長，幾丁聚醣分子量被剪切得越小，經過一小時作用後，可觀察到幾丁聚醣分子量由 607 *kDa* 被降解至 31 *kDa*。

幾丁聚醣分子量對於奈米顆粒特性及形成有重要的影響，包括顆粒之粒徑大小、樣品包覆率、裝載率、安定性及表面電位等。文獻指出幾丁聚醣分子量較高，形成的奈米顆粒粒徑較大，表面電位越高；分子量越低，溶解性越佳，有助於奈米顆粒膠體在溶液中之穩定性 (Fernández-Urrusuno *et al.*, 1999)，而奈米顆粒粒徑愈小，其在腸道中滯留時間延長，可提高其與腸道上皮細胞的接觸機會或直接被細胞吸收，可增加營養物質之吸收與利用 (Chen *et al.*, 2006b; Chau *et al.*, 2007)。因此參考林 (2012) 及洪 (2014) 之研究，選取四種分子量：Original Mw (607 *kDa*)、High Mw (200-250 *kDa*)、Medium Mw (100-150 *kDa*) 及 Low Mw (<50 *kDa*) 之幾丁聚醣於後續實驗製備奈米顆粒並探討其特性。

(三) 茄紅素之製備

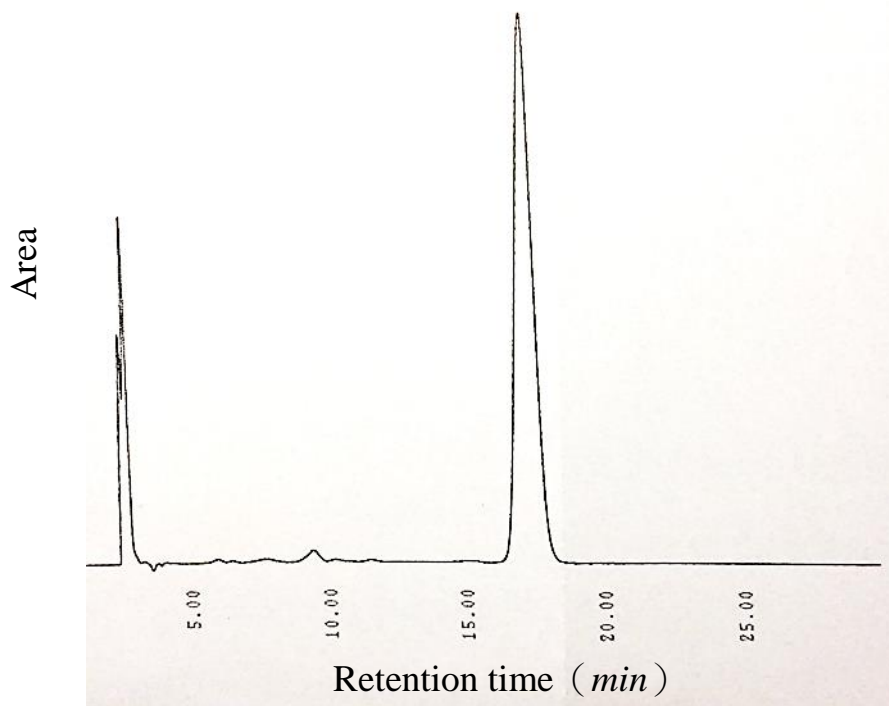
利用熱風乾燥機將番茄以 60 °C 乾燥 24 小時，得到的乾燥番茄推算出含水率約為 95%。而經溶劑萃取、再結晶純化及冷凍乾燥後得到之茄紅素樣品，推算後得知其每 100 g 乾燥番茄可萃取純化出 25.5 mg 之茄紅素，對照於 Sadler 等人 (1990) 之研究，其利用此萃取方式萃

取番茄泥中之茄紅素，每 100 g 番茄泥可萃得 15.8 mg 的 lycopene。萃取出之茄紅素量存在差異，推測本實驗萃取出較多茄紅素的原因為本實驗使用的是乾燥的番茄，而 Sadler 等人使用的為番茄泥，可能因原料含水率之不同造成萃取結果略有差異。而利用含水率推算得知 1 g 生鮮番茄內可萃取出約 12.75 μg 之茄紅素，此含量符合 Rao and Agarwal (1999) 之研究結果。

圖二十五是經由 HPLC 分析萃取出之茄紅素樣品結果圖，首先出現的波峰為溶劑，接著在 6-12 min 會出現一些微小的波峰，參考 Lin 和 Chen (2003) 之研究，推測其為茄紅素之順式結構 (cis-lycopene)，而於 17 min 會出現全反式茄紅素 (all-trans lycopene) 之波峰，與標準品檢量線對照後，推算出此樣品純度高於 90%，證實利用本實驗之方法乾燥、萃取及純化茄紅素是有效率的，而後續實驗皆使用純度高於 90% 之茄紅素進行。

(四) 茄紅素溶解性測試

由於茄紅素為脂溶性物質，故為了將其溶解，同時又須將其與幾丁聚醣水溶液混合，因此做了茄紅素溶解性測試。表三為茄紅素於水、冰醋酸、甲醇、乙醇、正己烷、丙酮、四氫呋喃及二氯甲烷等溶劑之溶解情形。由此結果得知，因為茄紅素的疏水性極強，故極性較高的



圖二十五、茄紅素樣品利用HPLC分析結果圖。

Fig. 25. The HPLC chromatogram of lycopene sample.

表三、茄紅素對若干溶劑之溶解性。

Table 3. Solubility of lycopene in a number of solvents.

水	冰醋酸	甲醇	乙醇
▲	▲	◆	◆
正己烷	丙酮	四氫呋喃	二氯甲烷
◆	◆	●	●

▲：precipitate（完全不溶解）

◆：precipitate and creamy suspension（部分溶解）

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

溶劑皆無法溶解茄紅素，其只可完全溶解於四氫呋喃及二氯甲烷中，但由於二氯甲烷為毒性化學物質，且其在利用離子交聯法製備奈米顆粒時，因為極性關係會與幾丁聚醣溶液產生分層，故無法使用二氯甲烷來溶解樣品製備奈米顆粒，因此選擇四氫呋喃作為茄紅素之溶劑，其可與幾丁聚醣溶液均勻混合用於製備奈米顆粒。



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

如圖二十六所示，圖左為幾丁聚醣溶液與茄紅素溶液之混合溶液，為澄清的橘紅色溶液，且均勻混合並無分層或析出現象。當加入三聚磷酸鈉溶液後(右圖)，因幾丁聚醣與三聚磷酸鈉產生離子交聯作用，使整瓶溶液出現雲霧狀懸浮顆粒，此懸浮顆粒即為CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒。而根據不同條件包括茄紅素濃度、幾丁聚醣分子量及幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比，皆會對奈米顆粒之特性產生不同的影響，因此接下來本實驗將對這些條件逐一進行探討。

(一) 茄紅素濃度之影響

參考孫(2010)之研究，其利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆分離大豆蛋白水解物(Isolate soy protein hydrolysates, ISPH)，發現當幾丁聚醣分子量越高、CS/TPP 重量比越低時，所製備出來的奈米顆粒於胃腸道模擬試驗安定性越高。而林(2012)利用槲皮素(Quercetin, QT)製備幾丁聚醣-槲皮素-三聚磷酸鈉(CS-QT-TPP)奈米顆粒，進行胃腸道模擬試驗，發現原分子量幾丁聚醣、CS/TPP 重量比為3/1時，所製備出之奈米顆粒擁有較佳之胃腸道安定性。因此，本實驗擬先使用未降解之原分子量幾丁聚醣(Original Mw CS, 607 kDa)，



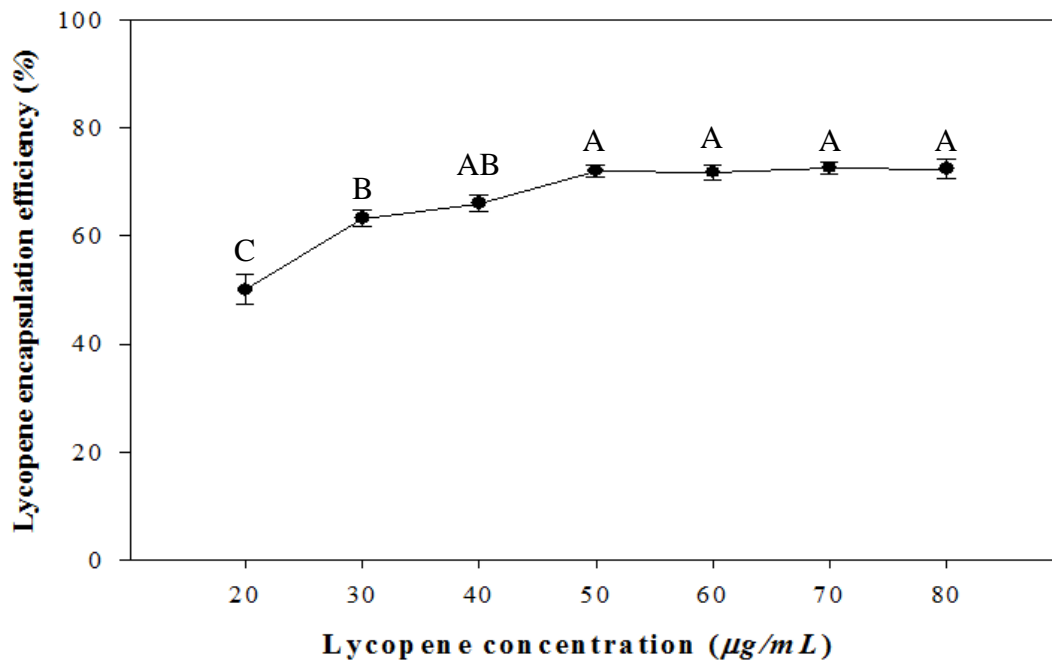
圖二十六、奈米顆粒形成之巨觀現象。

Fig. 26. Macroscopic phenomenon of CS-TPP-Lycopene NPs formation.

並固定 CS/TPP 重量比為 3/1，探討不同茄紅素濃度 (0-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 對於 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒特性之影響，包括茄紅素包覆率及裝載率、奈米顆粒產率、粒徑及表面電位等。

1. 對茄紅素包覆率之影響：

圖二十七為不同茄紅素濃度對於 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之茄紅素包覆率的影響。可以觀察到當茄紅素濃度在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，包覆率只有 51.3%，而隨著濃度的上升包覆率有逐漸上升之趨勢，在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 達到 71.9% 之包覆率。推測造成此現象之原因為，在低濃度時茄紅素分散在溶液裡的溶質密度較低，因此當幾丁聚醣與三聚磷酸鈉交聯形成網狀結構時，茄紅素能被嵌入的機會與量就較低；而當茄紅素濃度上升，溶質於溶劑中之密度隨之上升，因此在行成網狀結構時被包覆的茄紅素量就上升，所以才造成低濃度包覆率較差而高濃度包覆率較佳的現象。而後在濃度由 50 至 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包覆率呈現持平現象，這是因為包覆率一個總量概念，代表所有添加進入樣品之茄紅素被包覆的百分比，因此當添加進入之茄紅素濃度上升時，即便包覆率呈現持平仍是代表茄紅素被包覆的量是上升的。而由於包覆率未下降，一般實驗情況理應進行更高濃度之測試，但由於更高濃度茄紅素於此系統中會產生析出的問題，故最高只可使用 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度。



圖二十七、茄紅素濃度對於茄紅素包覆率的影響。

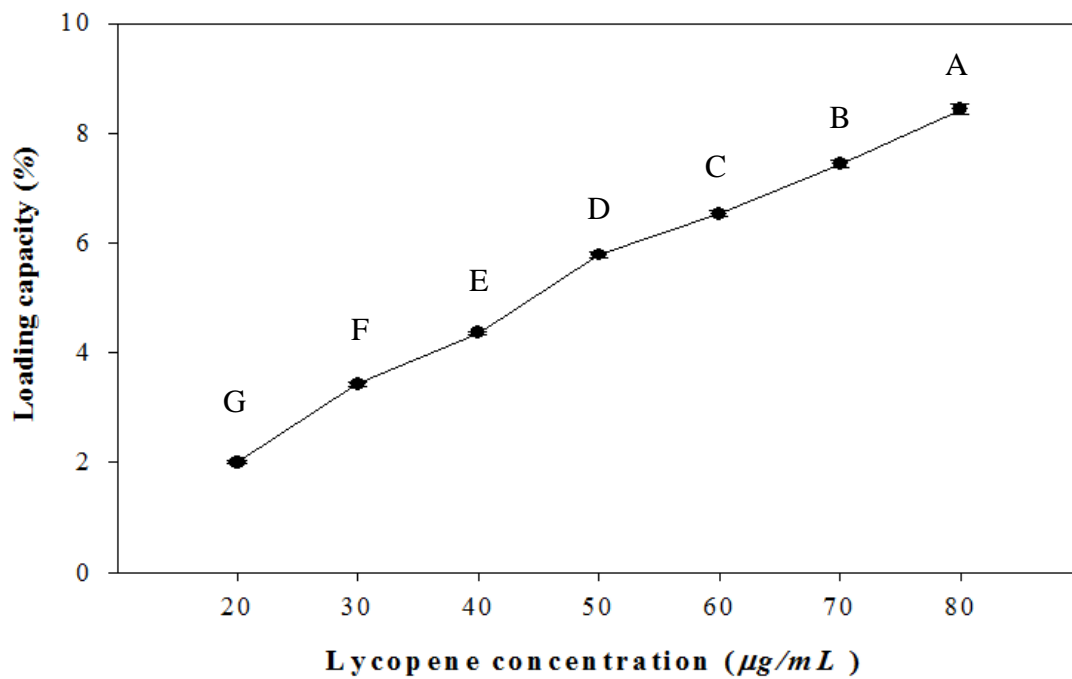
Fig. 27. Effect of lycopene concentration on the lycopene encapsulation efficiency. (Original Mw CS ; CS/TPP mass ratio : 3/1) .

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

Gan 與 Wang (2007) 研究以幾丁聚醣包覆牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 後與 TPP 形成奈米顆粒，結果顯示 BSA 濃度自 0.25 mg/mL 上升至 1.5 mg/mL，BSA 包覆率從 38.7% 增加至 72.5%。其實驗結果趨勢與本實驗相同，包覆率隨著 BSA 濃度增加而上升，但其除了因為上述提到的溶質密度外，另一個原因為 BSA 與 CS 間以靜電交互作用方式結合，形成之微粒為雙層結構，而 TPP 可與兩者間產生協同作用，幫助較多之 BSA 吸附，使得包覆率上升。而本實驗樣品之茄紅素因不帶有電荷，故造成包覆率上升原因單純是因為溶液中溶質之密度上升影響。林 (2012) 以幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆槲皮素製備奈米顆粒，結果顯示，槲皮素濃度由 0.15 mg/mL 上升至 0.45 mg/mL 時，包覆率顯著上升，而當其濃度提升至更高 > 0.45 mg/mL 後，包覆率則開始逐漸下降。推測原因與本研究相同，因低濃度時溶質密度低故包覆不佳，而隨著濃度上升包覆率上升，但到更高濃度後因奈米顆粒可包覆之容量已達飽和，故造成包覆率之下降。

2. 對茄紅素裝載率之影響：

茄紅素裝載率的概念為，單位奈米顆粒內攜帶多少量的茄紅素。圖二十八所示，茄紅素的裝載率隨著濃度由低到高有逐漸上升的趨勢，濃度自 20 增至 80 $\mu\text{g/mL}$ ，其裝載率由 2 提升至 8.5%，



圖二十八、茄紅素濃度對於茄紅素裝載率的影響。

Fig. 28. Effect of lycopene concentration on on the lycopene loading capacity. (Original Mw CS ; CS/TPP mass ratio : 3/1) .

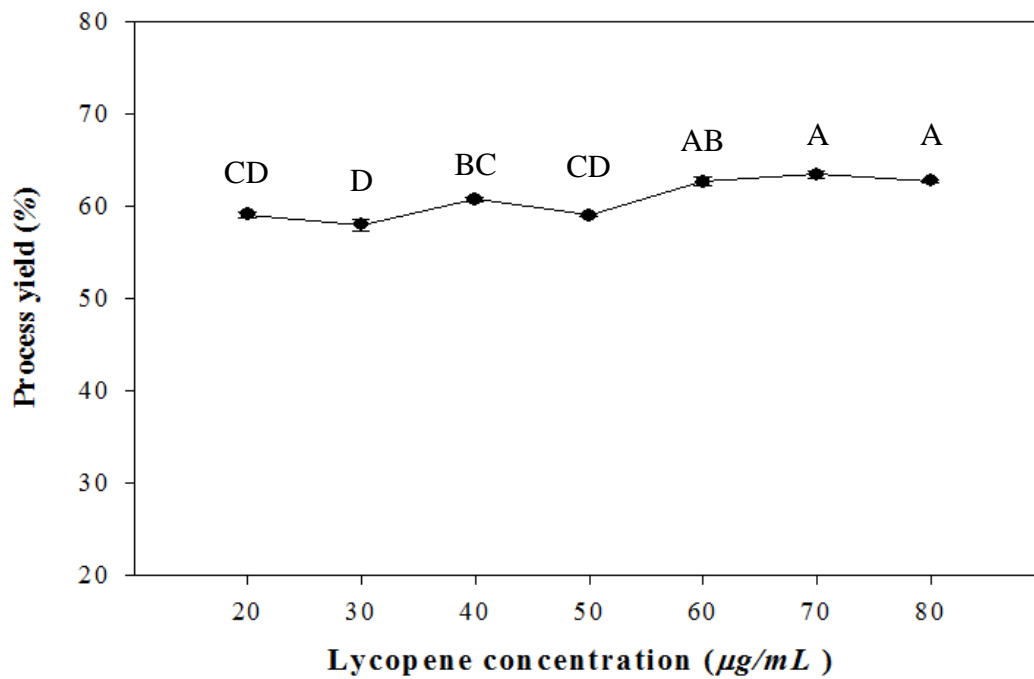
* A-G mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.

推測原因與包覆率上升之原因相同，低濃度時溶質於溶液中密度較低，因此較難被包覆到；反之，當濃度上升，溶質增加，使得溶質更易被包覆於奈米顆粒中。此結果與圖二十七之包覆率結果互相呼應，假設奈米顆粒之產率不變，那麼隨著包覆率的上升，裝載率也會跟著上升。而同樣因為前面所敘述之茄紅素析出問題，故此部分最高濃度也只能做到 $80 \mu\text{g/mL}$ 。

孫 (2010) 研究幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆分離大豆蛋白水解物 (ISPH) 製備成奈米顆粒，其 ISPH 之裝載率隨著 ISPH 濃度上升，ISPH 濃度為 1 mg/mL 時，裝載率為 3%，當 ISPH 濃度上升至 9 mg/mL 時，裝載率亦上升達 12%。作者推測因為 ISPH 濃度較低時，ISPH 被包覆進奈米微粒的量少造成此現象，此結果與本研究相符合。Wu (2005) 以幾丁聚醣 (200 及 24 kDa) 與 TPP 進行離子交聯來包覆甘草酸銨 (ammonium glycyrrhizinate) 製備奈米顆粒，結果也指出隨著甘草酸銨濃度的增加，裝載率隨之上升。

3. 對奈米顆粒產率之影響：

圖二十九為不同濃度之茄紅素對於 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之產率影響，由結果得知，濃度對於奈米顆粒產率之影響似乎不大。單由數據來看，濃度從低到高產率大約都在 60% (58 - 63%)



圖二十九、茄紅素濃度對於奈米顆粒產率的影響。

Fig. 29. Effect of lycopene concentration on on the nanoparticles process yield. (Original Mw CS ; CS/TPP mass ratio : 3/1) .

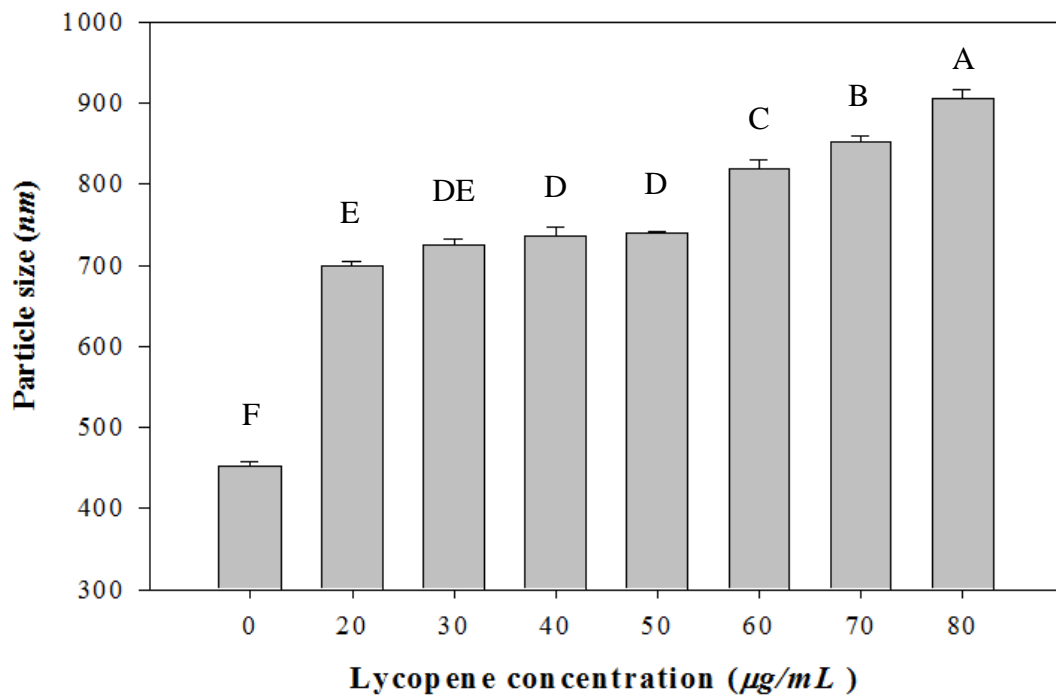
* A-D mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.

左右，推測是因為沒有變動幾丁聚醣與三聚磷酸鈉的濃度，故形成奈米顆粒的主要材料比例不變，使奈米顆粒產率變化不大。但在統計上可以看到隨著濃度上升，產率有微微上升的趨勢，推測造成此現象的原因，是因為在高濃度時，較多的茄紅素被包覆於奈米顆粒中，而後在乾燥秤重時造成重量上升，因此產生此趨勢，由此也可呼應包覆率與裝載率之結果，當包覆率與裝載率上升時，奈米顆粒產率也有上升趨勢。

4. 對奈米顆粒平均粒徑之影響：

圖三十為不同茄紅素濃度對於奈米顆粒粒徑大小影響，由此圖可知，尚未包覆茄紅素之奈米顆粒其平均粒徑為 452.7 nm ，包覆低濃度 $20\ \mu\text{g/mL}$ 的茄紅素後，平均粒徑上升至 690 nm ，推測造成粒徑上升的原因是茄紅素被包覆奈米顆粒內所造成。而隨著茄紅素濃度的上升，粒徑也隨之上升，推測造成此現象是因更多的茄紅素被包覆於奈米顆粒中，因此造成粒徑變大，當茄紅素濃度達 $80\ \mu\text{g/mL}$ 時，奈米顆粒粒徑上升至 906 nm 。由結果可知粒徑大小與包覆率及裝載率互相呼應，當包覆率及裝載率上升時，奈米顆粒內包覆的茄紅素量增多，因此造成奈米顆粒粒徑較大。

Pan 等人 (2002) 利用幾丁聚醣包覆胰島素製備奈米顆粒，指出胰島素濃度自 0 提高至 10.0% (w/v)，其奈米顆粒粒徑隨之



圖三十、茄紅素濃度對於CS-TPP-Lycopene奈米顆粒粒徑大小之影響。

Fig. 30. Effect of lycopene concentration on the particle size of CS-TPP-Lycopene nanoparticles. (Original Mw CS ; CS/TPP mass ratio : 3/1) .

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

增加。Wu (2005) 指出使用分子量為 200 *kDa* 之幾丁聚醣包覆甘草酸銨 (ammonium glycyrrhizinate) 時，顆粒粒徑會隨著甘草酸銨濃度增加而增加。Gan 及 Wang (2007) 也有相同的指出，包覆有 BSA 者之顆粒粒徑皆大於未包覆者。孫 (2010) 利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉包覆 ISPH 製備奈米顆粒，結果指出，隨 ISPH 濃度增加，CS-ISPH-TPP 奈米顆粒粒徑有變大的趨勢，其推測也是因為包覆了更多的 ISPH 所致。上述之研究結果皆與本實驗有相同趨勢。

5. 對奈米顆粒表面電位之影響：

表四為不同茄紅素濃度對於奈米顆粒表面電位之影響。結果顯示，不論包覆的茄紅素濃度多寡，奈米顆粒表面皆帶有正電位，原因是因為幾丁聚醣溶解於酸性溶液時，其結構上 NH_2 基團會轉變成 NH_3^+ 形式所造成，因此形成奈米顆粒以後仍保有幾丁聚醣帶正電荷之特性。另外，茄紅素濃度高低對於奈米顆粒表面電位影響不大，表面電位大約落在 +49 至 +52 *mV* 之間。但經由統計之結果發現隨著茄紅素濃度的上升，表面電位有略微下降之趨勢，推測造成此現象的原因為，高茄紅素濃度時奈米顆粒之包覆率及裝載率都較高，代表奈米顆粒內包覆了較多量的茄紅素，而這些被包覆的茄紅素分子可能會遮蔽住幾丁聚醣上少部分的 NH_3^+ 基團

表四、茄紅素濃度對於 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒表面電位之影響。

Table 4. Effect of lycopene concentration on the zeta potential of CS-TPP-Lycopene nanoparticles.

Lycopene concentration ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	ζ potential (mV)
20	+ 51.74 \pm 1.33 ^A
30	+ 52.98 \pm 3.56 ^A
40	+ 52.90 \pm 3.23 ^A
50	+ 49.07 \pm 3.82 ^B
60	+ 49.08 \pm 4.43 ^B
70	+ 49.50 \pm 2.85 ^B
80	+ 49.07 \pm 2.24 ^B

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

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

，使奈米顆粒在偵測時表面電位微微下降，造成此實驗結果。

孫(2010)探討了分離大豆蛋白(ISPH)濃度對於 CS-ISPH-TPP 奈米顆粒表面電位之影響，結果顯示，隨著 ISPH 濃度之增加，CS-ISPH-TPP 奈米顆粒之表面電位並無明顯改變，奈米顆粒表面均帶正電荷，介於+42.1 至+43.7 *mV* 之間。此外，林(2012)利用幾丁聚醣奈米顆粒包覆不帶電荷的槲皮素製備成奈米顆粒，結果發現包覆了槲皮素之後，奈米顆粒表面電位有微幅的下降，其推測原因為槲皮素被包覆後，其分子部分遮蔽了幾丁聚醣上的 NH_3^+ 所造成。

綜合上述的實驗結果得知，當茄紅素濃度上升 (0-80 $\mu\text{g/mL}$)，CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒的茄紅素包覆率 (51.3-71.7%) 及裝載率 (2-8.5%) 也會跟著上升，雖奈米顆粒粒徑亦會升高 (690-906 *nm*)，但仍屬於奈米等級的範圍；對於奈米顆粒產率 (58-63%) 及表面電位 (+49- +52 *mV*) 影響不大。因此為了製備出攜帶較多茄紅素的奈米顆粒，選擇擁有較佳的茄紅素包覆率及裝載率之濃度條件，以茄紅素濃度 80 $\mu\text{g/mL}$ 作為接下來探討幾丁聚醣分子量不同之影響。

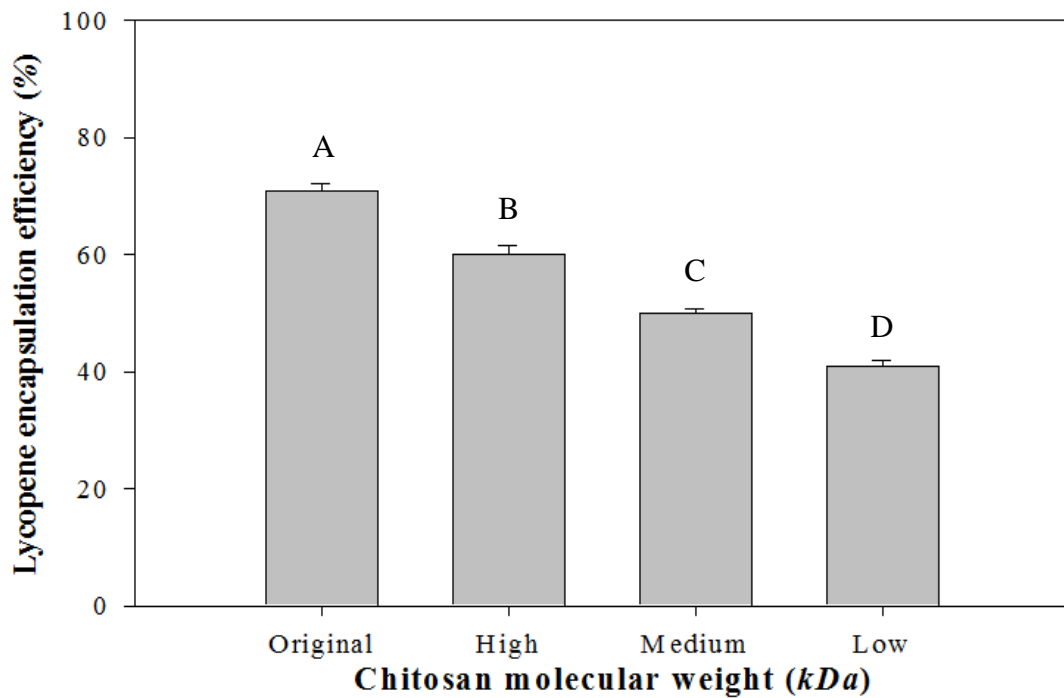
(二) 幾丁聚醣分子量之影響

根據前文得知，茄紅素濃度對於製備出的 CS-TPP-Lycopene 奈米

顆粒之特性是有影響的，故接下來實驗選擇最佳茄紅素濃度 $80 \mu\text{g/mL}$ ，並固定 CS/TPP 重量比為 3/1，來探討不同幾丁聚醣分子量(Original Mw : 607 kDa、High Mw : 200-250 kDa、Medium Mw : 100-150 kDa 及 Low Mw : <50 kDa) 對於茄紅素包覆率、奈米顆粒粒徑大小及表面電位之影響。

1. 對茄紅素包覆率之影響：

圖三十一為不同幾丁聚醣濃度對於茄紅素包覆率之影響，由圖可觀察到，原分子量幾丁聚醣對於茄紅素擁有較高的包覆率，而隨著幾丁聚醣分子量之下降，茄紅素包覆率跟著下降，其包覆率分別為 Original Mw : 70.8%; High Mw : 60% ; Medium Mw : 49.9%及 Low Mw : 41%。推測分子量較高之幾丁聚醣對於茄紅素擁有較佳包覆率原因有三，其一為分子量較大之幾丁聚醣因其分子結構鏈長較長，在進行離子交聯時，可與三聚磷酸鈉形成更多的網狀結構，因此可以將更多的茄紅素包覆於其中；其二可能是因為茄紅素不帶電荷，故屬於物理性包覆，而當幾丁聚醣分子量高時，其溶解於溶液中之黏度會較高，適當的黏度提升在包覆時有助於幾丁聚醣捕獲茄紅素，因此使包覆率上升；最後一個可能原因為，本實驗之低分子量幾丁聚醣是利用臭氧降解法製備而成，臭氧降解法雖快速無殘留，但其在降解過程可能會剪切掉部分幾



圖三十一、幾丁聚醣分子量對於茄紅素包覆率之影響。

Fig. 31. Effect of chitosan molecular weight on the lycopene encapsulation efficiency of CS-TPP-Lycopene nanoparticles. (Lycopene concentration : $80 \mu\text{g/mL}$; 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.

丁聚糖分子鏈上之 NH^{3+} ，使得幾丁聚糖在與三聚磷酸鈉交聯時形成的網狀結構會較少，因此造成低分子量之幾丁聚糖對於茄紅素的包覆率較差。

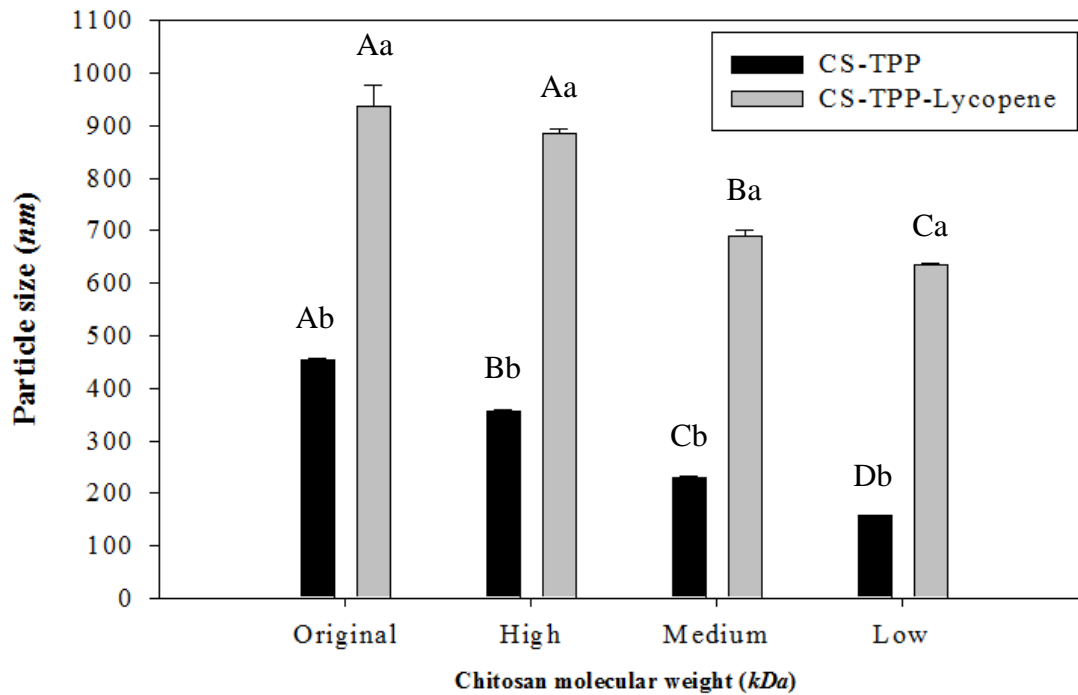
Xu 與 Du (2003) 等人以幾丁聚糖包覆牛血清蛋白，結果顯示隨著幾丁聚糖分子量之提高，包覆率由 9.5% 增加至 19%，作者認為因較高分子量的幾丁聚糖具有較長的結構鏈，可與三聚磷酸鈉鍵結形成更多網狀結構以包覆牛血清蛋白，故造成包覆率上升。

吳 (2008) 以不同分子量之幾丁聚糖包覆舞菇多醣體製備成奈米顆粒，結果顯示高分子量比低分子量幾丁聚糖之包覆率高 (約 20%)，其認為幾丁聚糖與舞菇多醣體之間屬於物理性包覆，而高分子量幾丁聚糖具有較長鏈分子，且其溶液黏度較高使其較佳之包覆率。洪 (2014) 利用臭氧降解出不同分子量之幾丁聚糖，而後用於包覆 Ca^{2+} 製備成奈米顆粒，結果發現當幾丁聚糖分子量較大時，對於 Ca^{2+} 有較佳的包覆率 (約 10%)，其推測原因為分子量較大的幾丁聚糖，其分子鏈長較長，一方面可與 TPP 結合形成更多網狀結構可包住更多的 Ca^{2+} 於其中，另一方面利用其分子上之 OH 與 Ca^{2+} 產生螯合作用亦可包覆更多 Ca^{2+} ，且高分子量之幾丁聚糖黏度較高，可包覆較多之 Ca^{2+} 。以上許多研究皆與本研究結果互相呼應。

2. 對奈米顆粒平均粒徑之影響：

圖三十二為不同的幾丁聚醣分子量對於 CS-TPP (未包覆者) 及 CS-TPP-Lycopene(有包覆者)奈米顆粒平均粒徑大小之影響。首先為未包覆者，可發現原分子量(未降解)之幾丁聚醣所形成之 CS-TPP 奈米顆粒粒徑最大，約為 452.7 nm，而後隨著幾丁聚醣分子量變小，其形成之奈米顆粒粒徑最小可至 156.5 nm。推測其原因為，分子量較大的幾丁聚醣鏈長較長，鏈與鏈之間的立體結構障礙較大，因此所形成之奈米顆粒粒徑就較大；低分子量幾丁聚醣因為溶液黏度較低，粒體結構障礙小，形成奈米顆粒時作用較均勻，因此奈米顆粒粒徑較小。而包覆茄紅素者無論幾丁聚醣分子量大小，其奈米顆粒粒徑均大於未包覆者，其原因為茄紅素被包覆於奈米顆粒內之故。而幾丁聚醣之分子量越小，其奈米顆粒粒徑亦越小，推測原因與前文相同，是受到幾丁聚醣鏈長、黏度及立體結構障礙等因素影響。

Gan 及 Wang(2007)研究以幾丁聚醣包覆牛血清蛋白(BSA)製備奈米顆粒，結果顯示包覆 BSA 者皆高於未包覆者，而隨著幾丁聚醣分子量從高到低，奈米顆粒的平均粒徑自 582.5 nm 下降至 388.4 nm，此趨勢與本研究相同。孫(2010)利用不同分子量之幾丁聚醣包覆分離大豆蛋白水解物(ISPH)製備奈米顆粒，結果



圖三十二、幾丁聚醣分子量對於 CS-TPP 及 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒粒徑大小之影響。

Fig. 32. Effect of chitosan molecular weight on the particle size of CS-TPP and CS-TPP-Lycopene nanoparticles.

(Lycopene concentration : $80 \mu\text{g/mL}$; 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.

顯示隨著幾丁聚醣分子量增加 (131.1 *kDa* 至 475.5 *kDa*)，奈米顆粒粒徑也隨之上升 (約上升 200 *nm*)，而包覆 ISPH 者皆高於未包覆者，此趨勢與本實驗亦同。洪 (2014) 利用臭氧降解法降解出不同分子量之幾丁聚醣，而後包覆 Ca^{2+} 及維生素 D 製備成奈米顆粒，其粒徑大小結果之趨勢亦與本實驗相同，隨幾丁聚醣分子量下降，奈米顆粒粒徑亦下降。

3. 對奈米顆粒表面電位之影響：

表五為不同幾丁聚醣分子量對於 CS-TPP 及 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒表面電位之影響。由表中可見未包覆者及包覆者，隨著幾丁聚醣分子量的下降，奈米顆粒表面電位跟著下降，其原因為以臭氧氧化降解幾丁聚醣時會切除部分幾丁聚醣鏈上的 NH_3^+ 所致，降解程度越高者 (即幾丁聚醣分子量越小)， NH_3^+ 被切除越多之故。另外，包覆者之表面電位均比未包覆者低，其原因為當茄紅素被包覆於奈米顆粒中時，其結構分子會部分遮蔽住幾丁聚醣結構上之 NH_3^+ ，進而造成表面電位的些微下降。

林 (2012) 及洪 (2014) 研究利用臭氧降解方式降解幾丁聚醣分子量，而後應用於包覆機能性物質製備成奈米顆粒，結果其研究皆顯示，當幾丁聚醣分子量較小時，奈米顆粒無論包覆與否，表面電位皆會下降。而 Wu 等人 (2005) 利用幾丁聚醣包覆甘草

表五、幾丁聚醣分子量對於 CS-TPP 及 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒
表面電位之影響。

Table 5. Effect of chitosan molecular weight on the zeta potential of
CS-TPP and CS-TPP-Lycopene nanoparticles.

Chitosan molecular weight (<i>kDa</i>)	Type of nanoparticle	
	Unloaded	Lycopene-loaded
ζ potential (<i>mV</i>)		
Original chitosan	+55.2 ± 1.3 ^{Aa}	+51.8 ± 1.5 ^{Ab}
High Mw	+54.4 ± 0.5 ^{Aa}	+48.7 ± 2.4 ^{Bb}
Medium Mw	+51.4 ± 2.1 ^{Ba}	+45.8 ± 1.7 ^{Cb}
Low Mw	+39.6 ± 0.8 ^{Ca}	+33.4 ± 1.3 ^{Db}

(CS/TPP mass ratio : 3/1 ; Lycopene concentration : 80 $\mu\text{g/mL}$).

* A-D 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.

酸銨製備成奈米顆粒；孫（2010）利用幾丁聚醣包覆大豆蛋白水解物製備成奈米顆粒，其利用酵素水解幾丁聚醣之分子量，兩者研究結果皆顯示，幾丁聚醣分子量之大小，對於奈米顆粒之表面電位影響差異不大。由此推論，本研究表面電位之減少是因為利用臭氧降解幾丁聚醣分子量所造成，其過程會剪切部分 NH_3^+ 基團之故。

綜合上述實驗結果得知，當幾丁聚醣分子量減小（607-31 *kDa*），製備出的 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之茄紅素包覆率會隨之下降（70.8-41%），同時奈米顆粒平均粒徑也會變小（936.1-634.4 *nm*），而奈米顆粒表面電位也隨著幾丁聚醣分子量下降跟著降低（51.8-33.4 *mV*）。因此為了使製備出來的奈米顆粒擁有較小的粒徑及較高的表面電位，同時又不損失太多的包覆率，最後選擇 Medium Mw 幾丁聚醣作為後續探討不同 CS/TPP 時使用之條件。

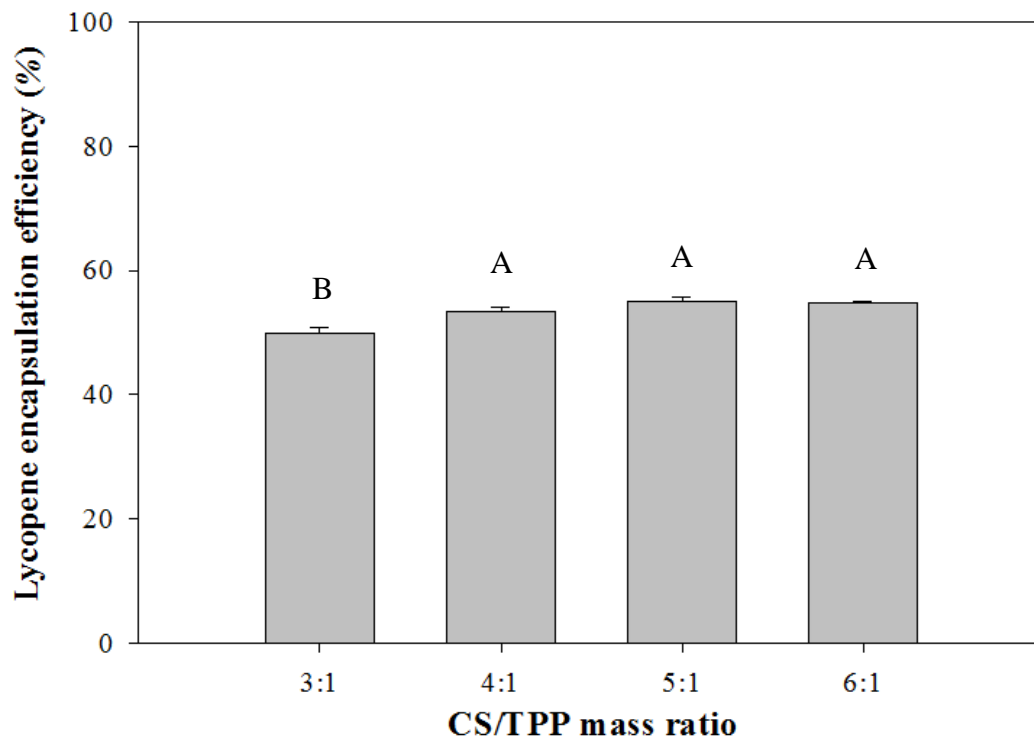
（三） CS/TPP 重量比之影響

由上述結果，先以中分子量幾丁聚醣及 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度之茄紅素進行製備 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒具有較佳特性。故接下來實驗固定此兩條件並探討不同 CS/TPP 重量比（3/1、4/1、5/1 及 6/1）對於茄紅素包覆率、奈米顆粒粒徑大小及表面電位之影響。

1. 對茄紅素包覆率之影響：

圖三十三為 CS/TPP 重量比對於茄紅素包覆率的影響，當 CS/TPP 重量比由 3/1 上升至 4/1 時，茄紅素的包覆率有上升的趨勢，推測其原因為，適當增加幾丁聚醣的量，會使幾丁聚醣上的 NH_3^+ 與 TPP 上的負電基團產生交聯的機會增加，形成較多的網狀結構，因此使包覆率上升。而 CS/TPP 由 4/1 至 6/1 包覆率沒有顯著差異，推測原因為幾丁聚醣與 TPP 作用達到飽和，更多的幾丁聚醣加入只會使結構趨向鬆散，不會包覆更多的茄紅素之故。

孫(2010)利用低分子量幾丁聚醣包覆分離大豆蛋白水解物，發現當 CS/TPP 重量比 3/1 及 4/1 擁有較佳的包覆率，其推測原因為幾丁聚醣上的 NH_3^+ 與 TPP 產生離子交聯的機會增加所致，而於 CS/TPP 重量比為 5/1 及 6/1 時，幾丁聚醣與 TPP 之離子交聯反應不夠緊密，因此對分離大豆蛋白水解物包覆率下降。林(2012)研究利用原分子量幾丁聚醣包覆槲皮素製備奈米顆粒，其結果發現當 CS/TPP 重量比由 3/1 上升至 4/1 時，槲皮素包覆率會跟著上升，而 CS/TPP 重量比上升至 5/1 及 6/1 時，槲皮素包覆率會略為下降 2%，推測原因與孫(2010)相同。此些研究結果與本研究趨勢相同但略有差異，主要差別在於本篇之茄紅素包覆率於 CS/TPP 重量比為 5/1 及 6/1 時包覆率無下降，推測原因可能為茄



圖三十三、CS/TPP 重量比對於茄紅素包覆率之影響。

Fig. 33. Effect of CS/TPP mass ratio on the lycopene encapsulation efficiency. (Medium molecular weight chitosan ; Lycopene concentration : $80 \mu\text{g}/\text{mL}$) .

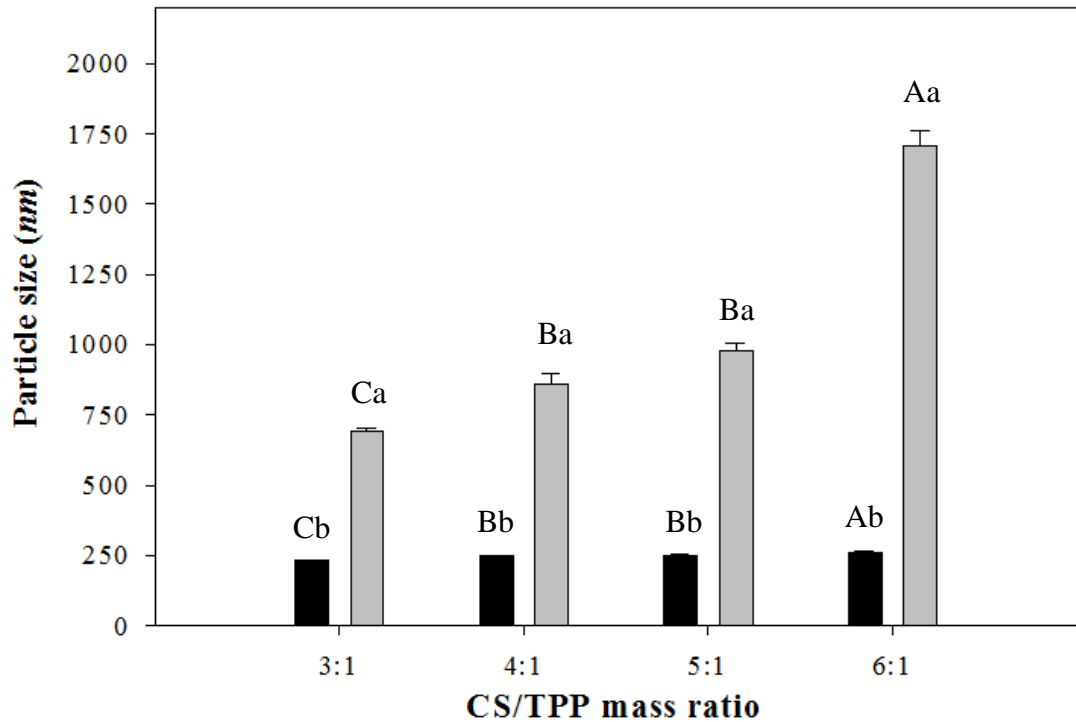
* A-B mean bars (CS/TPP mass ratio) with different letters are significantly different ($p < 0.05$) . Each value is expressed as mean \pm SD, n=3.

紅素具有長鏈結構，於奈米顆粒較為鬆散時，仍鑲嵌於奈米顆粒中，使其包覆率未有下降。

2. 對奈米顆粒平均粒徑之影響：

圖三十四為 CS/TPP 重量比對於 CS-TPP 及 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒粒徑大小的影響。在未包覆之 CS-TPP 奈米顆粒部分，隨著 CS/TPP 比例由 6/1 下降至 3/1 時，形成的奈米顆粒粒徑會跟著下降，其原因為 CS 與 TPP 比例較接近時，形成之顆粒結構較為緊密，故粒徑較小。包覆茄紅素後之奈米顆粒平均粒徑皆大於未包覆者，是因為茄紅素被包覆於其中的關係。另外，包覆茄紅素之 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒部分，隨著 CS/TPP 重量比由 3/1 上升至 5/1 時，粒徑會跟著上升，推測原因是較多幾丁聚醣參與奈米顆粒之形成，而當 CS/TPP 比例上升至 6/1 時，因幾丁聚醣太多導致形成的顆粒結構已鬆散到超過奈米等級 ($>1000\text{ nm}$)，其粒徑已達微米 (μm)。

造成奈米顆粒結構鬆散的原因推測是因為幾丁聚醣具有長鏈帶正電荷之分子結構，當製備條件為 CS/TPP 重量比 3/1 時，幾丁聚醣量較少，因此當受到三聚磷酸鈉上之負電荷吸引時，其分子長鏈會為了接上負電荷而彎曲，因此形成較緊密之奈米顆粒結構；而當製備條件為 CS/TPP 重量比 6/1 時，其幾丁聚醣量極大



圖三十四、CS/TPP重量比對於CS-TPP及CS-TPP-Lycopene奈米顆粒粒徑大小之影響。

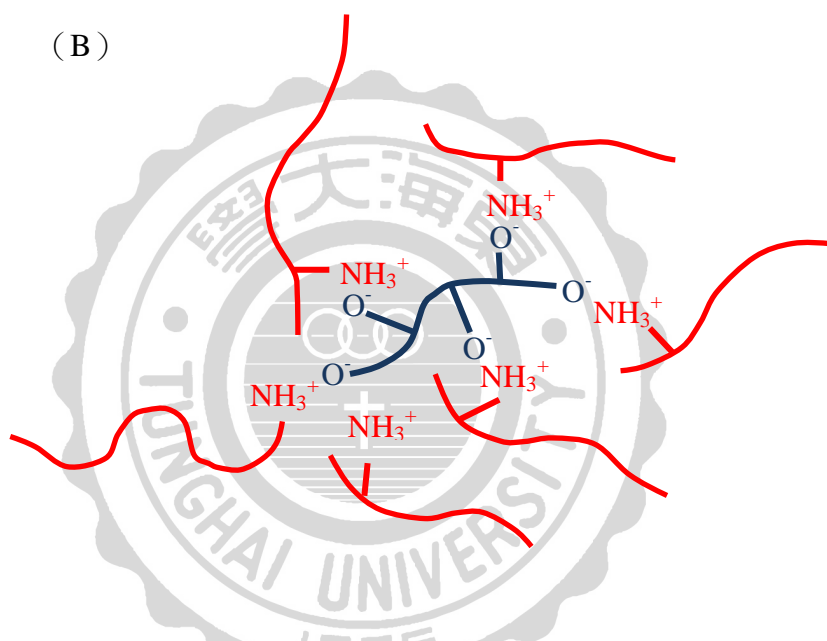
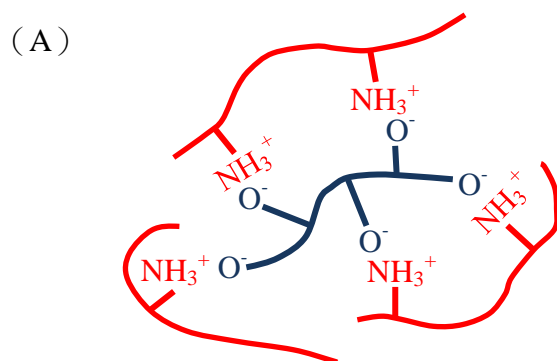
Fig. 34. Effect of CS/TPP mass ratio on the particle size of CS-TPP and CS-TPP-Lycopene nanoparticles. (Medium molecular weight chitosan ; Lycopene concentration : $80 \mu\text{g/mL}$) .

* 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.

於三聚磷酸鈉的量，因此在形成奈米顆粒時，幾丁聚醣分子鏈可能會搶著與三聚磷酸鈉交聯，最後造成一條幾丁聚醣鏈只接上三聚磷酸鈉分子上其中一個負電荷基團的情況，此種狀態下形成之奈米顆粒是膨大且鬆散的，如圖三十五之示意圖所示，同時又因為本研究包覆物質為茄紅素，其具有長鏈結構，因此受到立體結構障礙的關係，導致本來就較為鬆散的奈米顆粒在形成時，因幾丁聚醣、三聚磷酸鈉及茄紅素三者之間互相交織成鬆散的網狀結構，因此產生更大的顆粒，所以才造成本實驗中 CS/TPP 重量比為 6/1 時產生之顆粒超過奈米等級。

Gan (2005) 使用三種不同分子量之幾丁聚醣對不同比例之 TPP 製備奈米顆粒 (CS/TPP 重量比為 3/1-7/1)，結果指出奈米顆粒粒徑會隨著幾丁聚醣分子量增加及 CS/TPP 重量提高而跟著增加(100-250 nm)。Liu 與 Gao (2008) 研究指出包覆 ciprofloxacin，其顆粒粒徑皆大於未包覆之組別，且隨 CS/TPP 重量比增加，顆粒大小亦增加。洪 (2014) 研究利用低分子量幾丁聚醣包覆 Ca^{2+} 及維生素 D_3 製備奈米顆粒，研究發現當 CS/TPP 重量比由 3/1 上升至 5/1 時，奈米顆粒粒徑會跟著上升，此部分與本研究相同，而當 CS/TPP 上升至 6/1 時，粒徑有些微下降，其推測原因為三聚磷酸鈉不足因此形成較少的網狀結構，導致粒徑下降。此部分



圖三十五、不同CS/TPP重量比之三聚磷酸鈉與幾丁聚醣離子交聯示意圖。

Fig. 35. Schematic representation of ionic crosslinking between chitosan and TPP in different CS/TPP mass ratio. (A) CS/TPP=3/1 (B) CS/TPP=6/1

*———NH³⁺, mean CS.

*———5O⁻, mean TPP.

與本研究略有差異，推測原因為本研究包覆之樣品為具有長鏈結構的茄紅素，因此當幾丁聚醣與三聚磷酸鈉交聯卡住茄紅素一部分結構時，茄紅素另一部分結構可能會突出奈米顆粒，而突出的部分又被另外的幾丁聚醣與三聚磷酸鈉交聯鑲嵌，如此重複交織成鬆散的網狀結構，因此造成粒徑大幅上升。

3. 對奈米顆粒表面電位之影響：

表六為不同 CS/TPP 重量比對於 CS-TPP 及 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒表面電位的影響。在未包覆的 CS-TPP 奈米顆粒部分，其表面電位隨著 CS/TPP 重量比由 3/1 上升至 6/1，表面電位跟著由 +51.4 mV 升至 +56.8 mV，推測原因是幾丁聚醣帶有正電荷，因此當較多的幾丁聚醣與相同量的三聚磷酸鈉作用，所形成的奈米顆粒就會帶較多的正電荷。而包覆茄紅素後的 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒，其正電荷比未包覆者低，推測原因為當茄紅素被包覆於奈米顆粒內時，其分子會部分遮蔽住幾丁聚醣上的 NH_3^+ ，使得其形成奈米顆粒後表面電位略為下降，此部分趨勢與表五互相呼應。而 CS/TPP 重量比較大，其正電荷較高，此是由於幾丁聚醣較多， NH_3^+ 增加所造成。

林（2012）利用幾丁聚醣包覆槲皮素製備成奈米顆粒，其研究顯示當 CS/TPP 重量比上升時，表面電位會略為增加約 +5 mV，

表六、CS/TPP 重量比對於 CS-TPP 及 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒

表面電位之影響。

Table 6. Effect of CS/TPP mass ratio on the zeta potential of CS-TPP and CS-TPP-Lycopene nanoparticles.

CS/TPP mass ratio	Type of nanoparticle	
	Unloaded	Lycopene-loaded
	ζ potential (mV)	
6/1	+56.8 ± 2.6 ^{Aa}	+49.1 ± 2.9 ^{Ab}
5/1	+55.3 ± 1.1 ^{Aa}	+47.3 ± 1.2 ^{Bb}
4/1	+53.3 ± 0.5 ^{Ba}	+47.1 ± 1.8 ^{Bb}
3/1	+51.4 ± 2.1 ^{Ba}	+45.8 ± 1.7 ^{Bb}

(Medium molecular weight chitosan ; Lycopene concentration : 80 μg/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 ± 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 ± SD, n=3.

作者推測原因為較多的幾丁聚醣作用使奈米顆粒上之 NH_3^+ 增加造成此現象，而包覆槲皮素後表面電位會部分下降，作者推測是因為槲皮素遮蔽住了部分幾丁聚醣上之 NH_3^+ 基團所造成。洪 (2014) 利用幾丁聚醣包覆 Ca^{2+} 及維生素 D_3 製備奈米顆粒，研究結果顯示，隨著 CS/TPP 重量比由 3/1 上升至 6/1，奈米顆粒表面電位也跟著上升，推測原因與本研究相同，而在包覆 Ca^{2+} 及維生素 D_3 後奈米顆粒表面電位大幅下降，此部分下降幅度大於本研究之原因推測為，其包覆之物質為帶有電荷之 Ca^{2+} ，因此在形成奈米顆粒後， Ca^{2+} 會參與幾丁聚醣與三聚磷酸鈉之交聯作用，因離子交聯作用力較強，使其形成之奈米顆粒更為緊密，導致幾丁聚醣鏈上之 NH_3^+ 被包藏於顆粒中，因此造成表面電位較大幅度的下降。

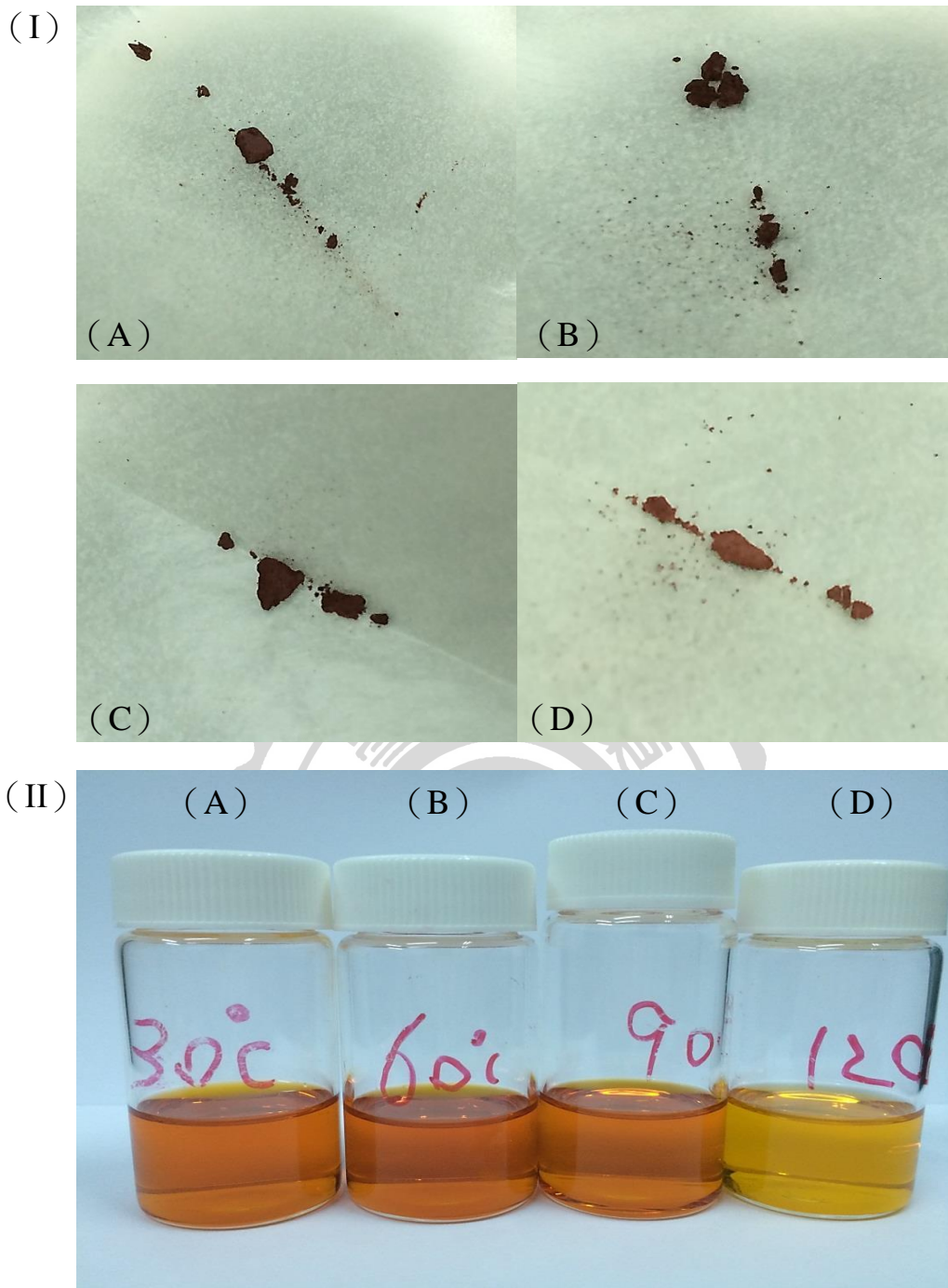
綜合上述實驗結果得知，當 CS/TPP 重量比上升時 (3/1- 6/1)，所形成的奈米顆粒平均粒徑會上升 (689-1707 nm)，表面電位亦會上升 (45.8-49.1 mV)，而對於包覆率影響不大 (50-54.8%)。故考量擁有良好之顆粒大小及表面電位，最後選擇 CS/TPP 重量比為 3/1 之條件用於製備 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒最為良好。

三、 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之安定性試驗

由於茄紅素容易受到光、熱、氧及酸作用破壞(Liaaen-Jensen, 1971; Sharma and Mague, 1996; Nguyen and Schwartz, 1999)，同時因其高疏水性(Tyssandier *et al.*, 1998)及易受飲食組成物之影響(Castenmiller and West, 1998)，導致生物利用率不到 2% (Tang *et al.*, 2005)，因此本研究利用幾丁聚醣與三聚磷酸鈉，以離子交聯方式包覆茄紅素製備成奈米顆粒，欲改善茄紅素於環境中之安定性進而提高其生物利用率。綜合前面章節之 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒特性研究結果，選擇出最佳條件製備奈米顆粒，使 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒擁有較佳的茄紅素包覆率、平均粒徑及表面電位等，結果顯示使用茄紅素濃度為 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、中分子量幾丁聚醣(100-150 kDa)及 CS/TPP 重量比為 3/1 之條件製備奈米顆粒為最佳條件。利用此條件製備出的奈米顆粒，經由熱處理試驗、儲存試驗及胃腸道模擬試驗，來探討經由幾丁聚醣包覆之後的茄紅素安定性變化情形，以下逐一探討之。

(一) 熱處理 (heat treatment) 試驗

文獻指出，茄紅素加熱後會因其結構異構或裂解導致其原本具有的顏色喪失 (Cole and Kapur, 1975a,1975b)，圖三十六為茄紅素於不同溫度加熱後粉末顏色及其溶解於 THF 中之顏色變化。首先未加熱

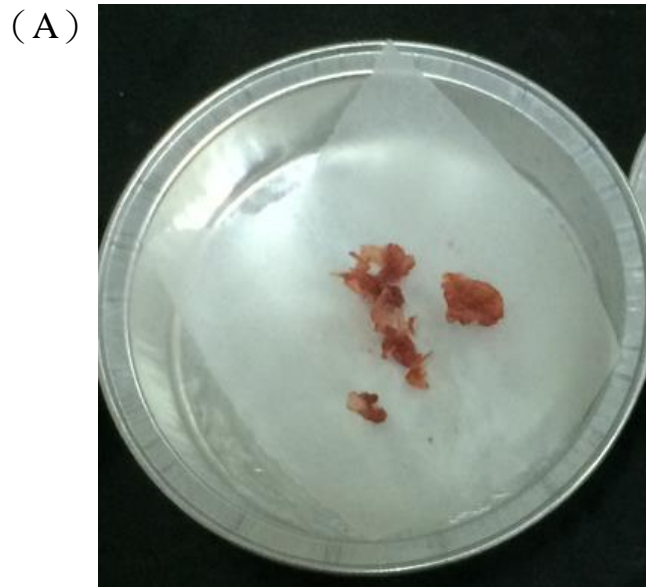


圖三十六、茄紅素於不同溫度加熱處理一小時後顏色變化。

Fig. 36. Effect of heating on the color change of lycopene powder for 1 hour at different temperature : (A) 30, (B) 60, (C) 90 and (D) 120 $^{\circ}\text{C}$. (I) Powder, (II) Lycopene dissolved in THF (1 mg/10 mL) .

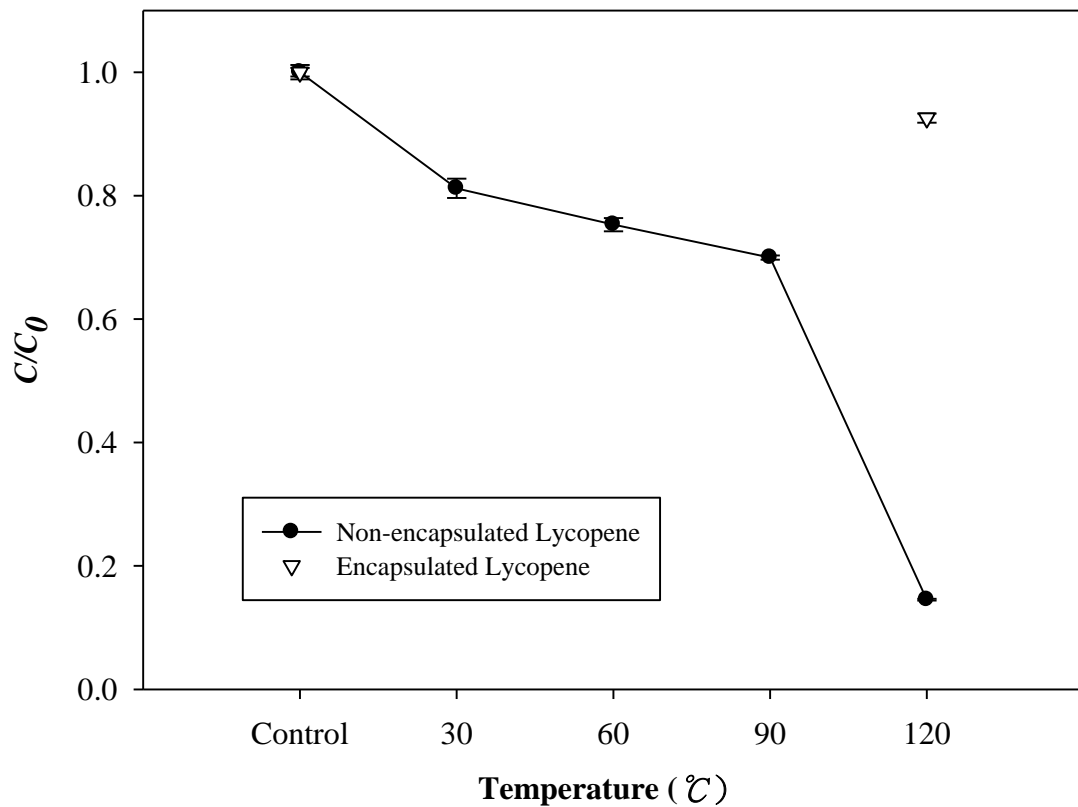
部分，隨著加熱溫度上升，顏色有些微的改變，其中以 120℃ 最為明顯，由暗紅色轉為淡紅色。而當這些加熱過後的茄紅素粉末溶解於 THF 後其顏色變化更明顯，提高其加熱溫度 (30-120℃)，顏色由橘紅色變成黃色，推測原因可能為，茄紅素結構之共軛雙鍵被熱能作用打斷，使其吸光值改變，進而造成其顏色上的變化。而 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒於 120℃ 加熱一小時後期顏色變化並不明顯 (如圖三十七)。推測可能是茄紅素被包覆後被幾丁聚醣保護之緣故。另外，將 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒於 120℃ 下加熱一小時，而後利用溶劑萃取，並經 HPLC 分析其濃度損失，結果如圖三十八。未包覆者隨加熱溫度越高，茄紅素損失越嚴重，其於 120℃ 加熱一小時處理後僅剩下 14.3% 之濃度，而包覆者仍保留約 92.2%。

Lee 及 Chen (2002) 研究光照及加熱對茄紅素之影響，結果發現一些大分子的物質 (果膠) 具有保護茄紅素減少其遭受破壞的功能。Chiu 等人 (2007) 以超臨界萃取番茄渣中的茄紅素，並以 7.5% 及 10% 之 γ -聚麩胺酸分別與 3% 及 4.5% 的動物膠混合，作為基質製成微膠囊，以差示掃描量熱法 (DSC) 分析發現微膠囊之熱穩定性高達 120℃。其推測高的熱穩定性是因為 γ -聚麩胺酸本身具有負電可與帶正電之動物膠之間因靜電交互作用形成熱穩定之複合物。故推測本研究使用帶正電荷之幾丁聚醣與帶負電荷之三聚磷酸鈉作為基質製備奈米顆



圖三十七、CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒於加熱 (120°C , 1 hr) 前 (A) 後 (B) 之顏色變化。

Fig. 37. Color change of CS-TPP-Lycopene nanoparticles before (A) and after (B) heating for one hour at 120°C .



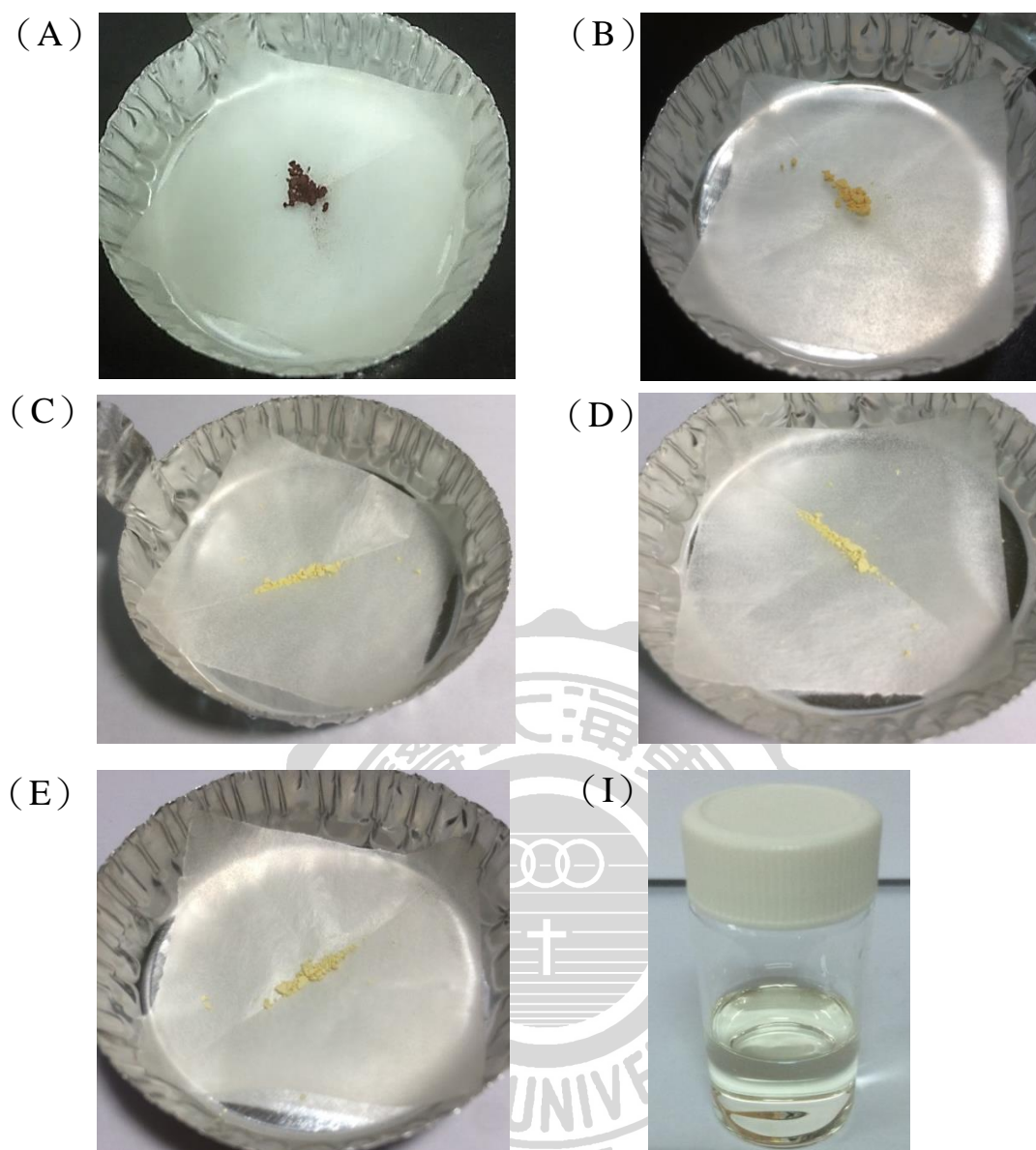
圖三十八、包覆與否之茄紅素於不同溫度加熱一小時後降解情形。

Fig. 38. Degradation of lycopene in non-encapsulated lycopene and CS-TPP-lycopene nanoparticles at different temperature treatment of one hour.

粒可能亦有相同提升熱穩定之效果。Woranucha 及 Yoksana (2013) 研究利用幾丁聚醣包覆丁香酚 (Eugenol) 製備成奈米顆粒，並探討其熱安定性，結果發現經由 155 °C 熱擠壓處理後，經由幾丁聚醣包覆的丁香酚留量高於未經包覆的，作者推測幾丁聚醣包覆有助於改善丁香酚的熱穩定性。此外其做了一個間接實驗，將熱處理後的丁香酚與幾丁聚醣-丁香酚奈米顆粒進行自由基清除試驗，發現幾丁聚醣-丁香酚奈米顆粒之清除能力高於未經包覆之丁香酚達 2.7 倍之多，其推測原因是因為經由幾丁聚醣奈米顆粒包覆的丁香酚遭受熱破壞程度減少，因此保留較多含量，故清除自由基能力較佳。而後作者又進行 DSC 之檢測，發現未包覆之丁香酚轉變溫度為 159 °C，而幾丁聚醣-丁香酚奈米顆粒轉化溫度上升至 223 °C，證實了丁香酚被幾丁聚醣包覆之後熱穩定性上升了。

(二) 儲存 (storage) 試驗

文獻指出，茄紅素儲存時會受氧化作用，導致其結構異構或裂解使其原本具有的顏色喪失 (Cole and Kapur, 1975a,1975b)。圖三十九所示於 25 °C 下儲存時間對茄紅素粉末顏色的變化影響。隨著儲存天數的增加，茄紅素顏色明顯變淺，由第 0 天 (A) 的暗紅色粉末，至第 7 天 (B) 的黃色，而後轉變為淡黃色。將儲存七天 (I) 之茄紅素

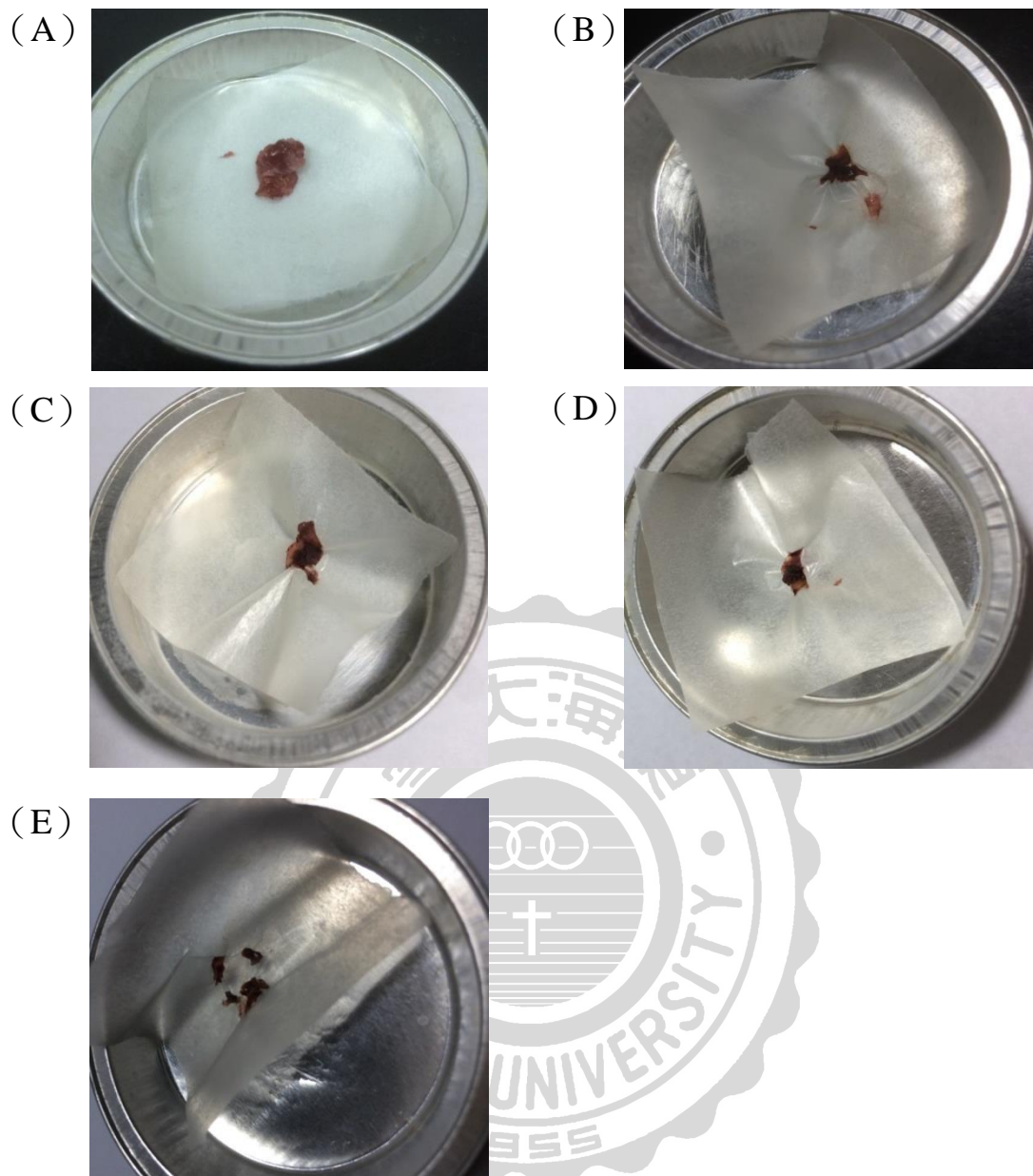


圖三十九、儲存時間對茄紅素粉末之影響 (25 °C)。

Fig. 39. Effect of storage time on the color change of lycopene powder (25 °C). (A) 0, (B) 7, (C) 14, (D) 21 and (E) 28 days storage, (I) 7 days storage of lycopene dissolved in THF (1 mg/10 mL).

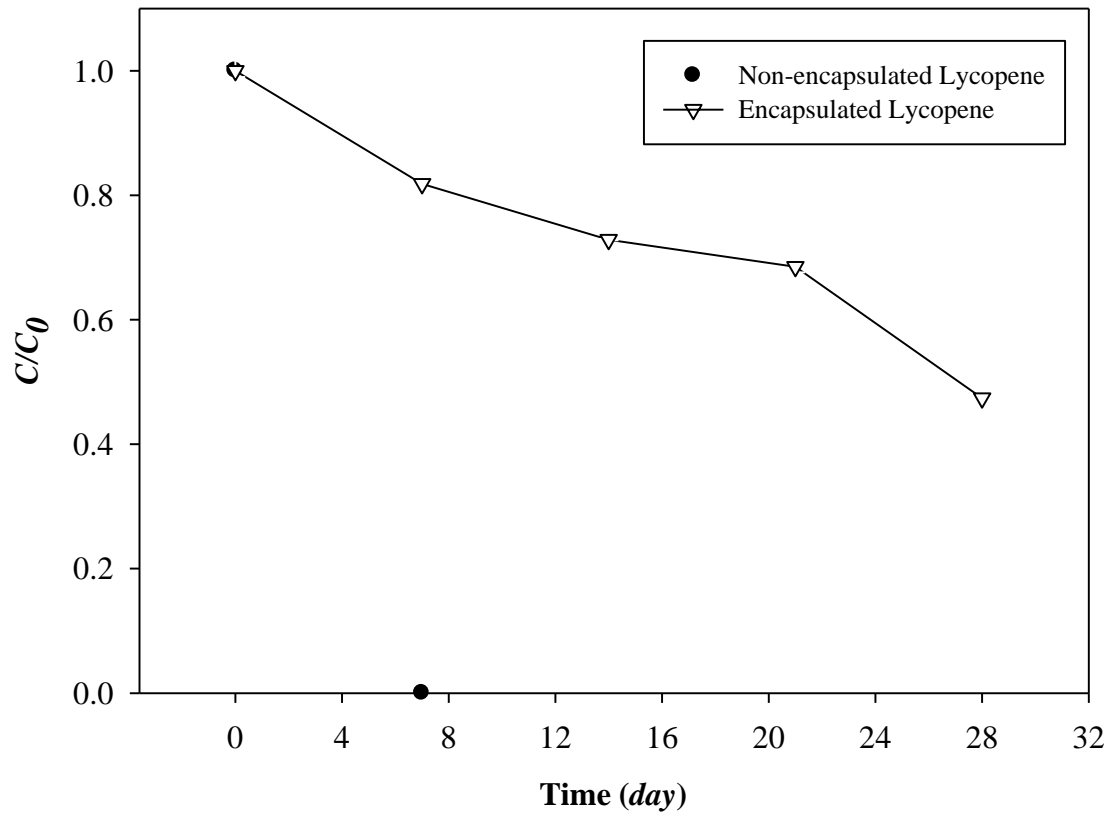
粉末溶解於 THF 中觀察，發現已幾乎呈現無色狀態，可能為氧化使茄紅素裂解之故。而圖四十所示為 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒於 25 °C 下儲存時間對其顏色之影響。發現其顏色並無太大變化，皆為暗紅色。此可能由於幾丁聚醣奈米顆粒包覆茄紅素，有隔絕氧氣進而抑制氧化作用之故。若將不同天數儲存之茄紅素粉末溶解及奈米顆粒以溶劑萃取，並利用 HPLC 分析其茄紅素損失之程度，結果如圖四十一。其中，茄紅素粉末於儲存第七天時皆完全損失，而奈米顆粒部分在第七天及第二十八天儲存仍保留約 82 及 47% 之茄紅素。

Shu 等人 (2006) 研究利用噴霧乾燥法製備茄紅素微膠囊，其利用明膠與蔗糖做為原料，製備出 2-15 μm 之顆粒，將其儲存於 0 °C 不同天數，分析有包覆及未包覆之茄紅素保留率，結果顯示在第 28 天後未經包覆的茄紅素保留率僅剩 10%，而經由微膠囊保護的茄紅素仍有 90% 之多，因此其推測微膠囊化可以有效保護茄紅素，減少其受氧化破壞，此研究結果與本研究相符合但略有差異，主要差別在於此作者之保留率高於本研究，推測是因為其儲存溫度設定在 0 °C，而本研究之儲存溫度為 25 °C，故茄紅素保留率較低。劉 (2007) 利用以乳化方式製備茄紅素微膠囊顆粒，並進行安定性試驗，結果發現經由膠囊化之茄紅素對於氧化耐受性明顯提高，此研究亦與本研究相符合。



圖四十、儲存時間對 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒顏色變化之影響 (25 °C)。

Fig. 40. Effect of storage time on the color change of CS-TPP-Lycopene nanoparticles. (A) 0, (B) 7, (C) 14, (D) 21 and (E) 28 day storage.



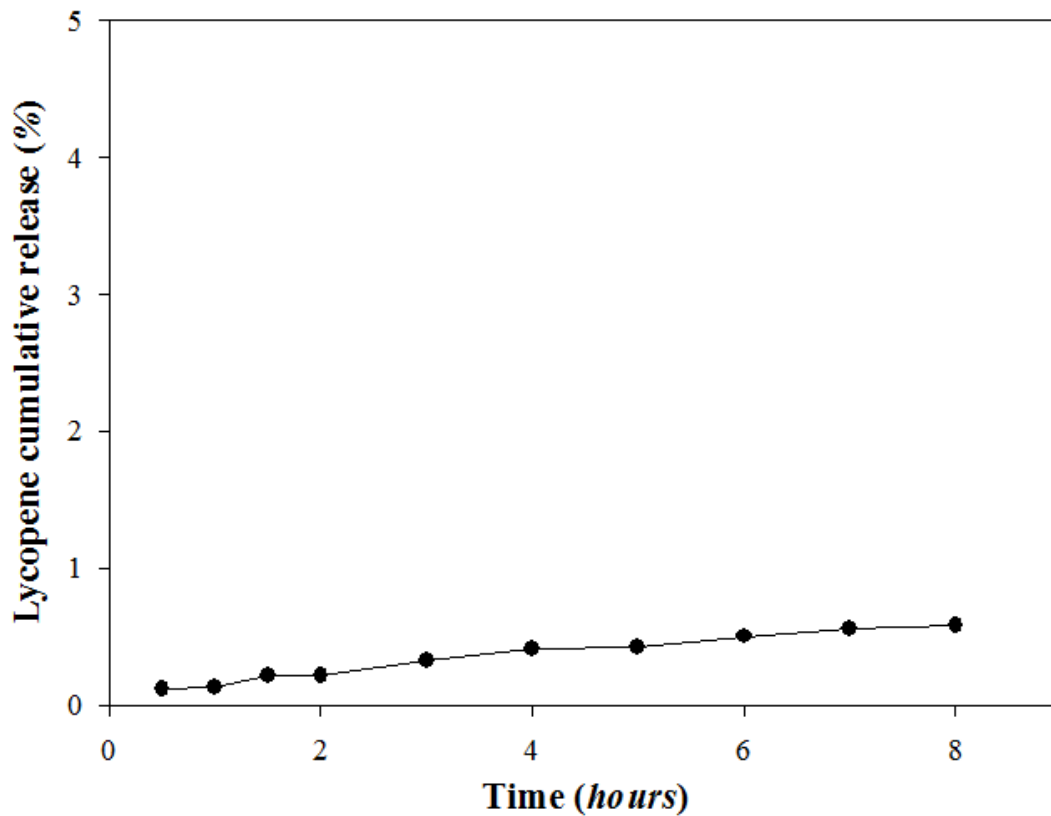
圖四十一、包覆與否之茄紅素於不同儲存時間之降解情形。

Fig. 41. Degradation of lycopene in non-encapsulated lycopene and CS-TPP-lycopene nanoparticles during the different storage time.

(三) 胃腸道模擬試驗

由熱處理試驗及儲存試驗結果得知，經由 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒具有保護茄紅素，提升其於環境中之安定性，但研究指出，當 CS-TPP 奈米顆粒在 pH 值太高或太低之環境，會造成幾丁聚醣與 TPP 之間離子交聯鍵結之特性改變，導致奈米顆粒變為不安定或瓦解 (Zhang and Kosaraju, 2007)，因此接下來本實驗利用胃腸道模擬試驗來探討 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒於人體中之安定性。使用由本文中研究出之最佳條件來製備 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒，而後將此奈米顆粒培養於模擬胃液兩小時後置入模擬腸液中六小時，其茄紅素釋放率如圖四十二，可觀察到 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒不論在胃中及腸中釋放率極低，其累積釋放率都低於 1%，此結果證實經由幾丁聚醣包覆之茄紅素於消化道中不受胃酸及酵素破壞，擁有良好之穩定性。

前文提到茄紅素的低生物利用率是因為其不易從食物基質釋出 (Jeffery *et al.*, 2012; Palmero *et al.*, 2013)、不易溶入油脂 (Deming *et al.*, 2000; Hoppe *et al.*, 2003) 且受飲食成分影響很大 (Castenmiller and West, 1998)。而當茄紅素經由幾丁聚醣奈米顆粒包覆之後，因為幾丁聚醣本身為親水性，故當其進入胃腸道時，可以分散於水相基質中，在腸道中又可利用其帶正電荷之特性貼附於腸道上皮，延長滯留時



圖四十二、CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒於模擬胃液2小時後置入模擬腸液6小時的茄紅素累積釋放率。

Fig. 42. Lycopene cumulative release of CS-TPP-Lycopene 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.

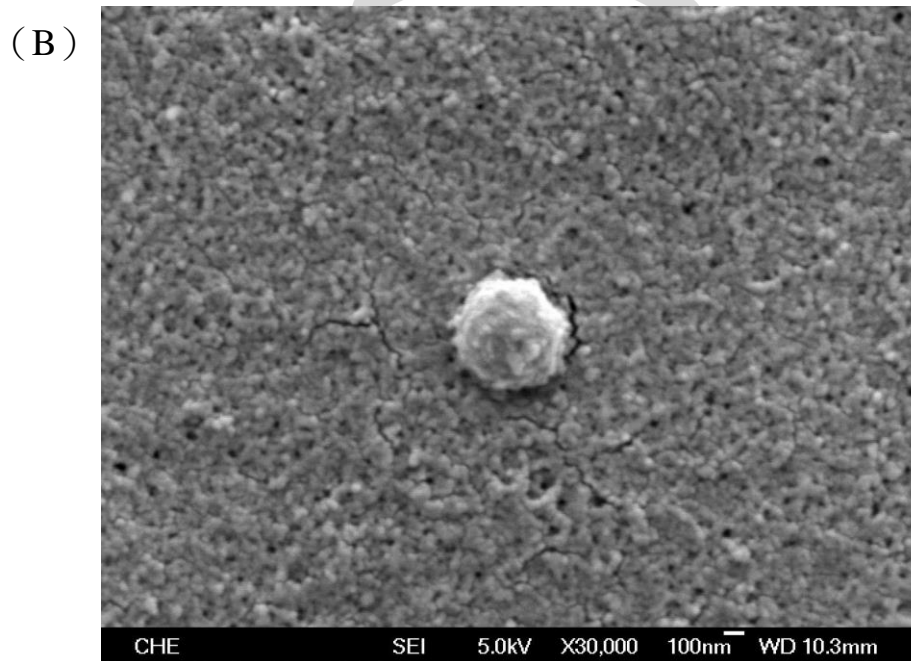
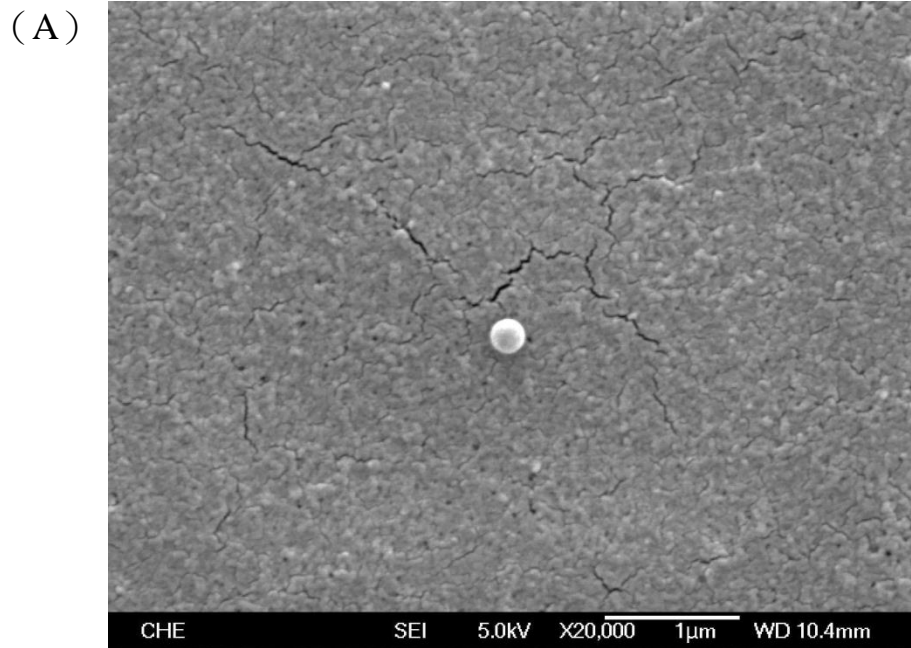
間，同時打開細胞間隙之緊密連結，將茄紅素帶入體內達到提高吸收率之效果。研究指出奈米顆粒相較於微米顆粒更容易通過腸道上皮細胞 (Desai *et al.*, 1996)，並會增加其與腸道上皮細胞接觸之面積與機會，甚至可直接穿透細胞進入體內被利用，進而提高營養物質之生物利用率 (Peppas, 1995; Kawashima, 2001; Arbo's *et al.*, 2002)。洪(2014)研究利用幾丁聚醣包覆 Ca^{2+} 及維生素 D_3 製備成奈米顆粒，經由胃腸道模擬之後發現 Ca^{2+} 之累積釋放率約為 0.6-0.8%，與本文趨勢相同。



四、掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒外觀型態

圖四十二(A)為利用掃描式電子顯微鏡拍攝未經包覆之 CS-TPP 奈米顆粒，其表面光滑呈現球型，粒徑大小約為 200 nm，比粒徑分析儀(Zetasizer)所測定出之結果(233 nm)比較略為小了一些，此由於樣品經乾燥所致，而乾燥這個步驟使本來在水溶液中微澎潤的奈米顆粒粒徑部分下降。另外圖四十二之(B)所示 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒亦為球型，但表面較不光滑，推測原因是包覆了茄紅素對其結構產生影響，造成較為不平整之奈米顆粒，其粒徑約為 500 nm 左右，比未包覆之 CS-TPP 奈米顆粒大。

Ko 等人(2002)透過幾丁聚醣與 TPP 離子交聯作用製備奈米顆粒，並包覆 felodipine，結果製備出表面平滑且呈球狀之微/奈米顆粒，與本實驗結果相符。林(2012)利用幾丁聚醣包覆槲皮素製備成奈米顆粒，其顆粒在未包覆時也為光滑球型，包覆後表面變得較為粗糙，這特性皆與本研究相符合。



圖四十三、掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察。

Fig. 43. Scanning electron micrograph (SEM) of (A) CS-TPP and (B) CS-TPP-Lycopene nanoparticles.

伍、結論

一、不同分子量幾丁聚醣之製備

幾丁聚醣 (Original Mw : 607 kDa) 利用臭氧降解法以 6.3 g/m^3 臭氧濃度降解不同時間，發現隨作用時間增加幾丁聚醣分子量被剪切得越小，經 60 min 降解後即可得到分子量為 31 kDa 之低分子量幾丁聚醣，證實此法為簡單、快速、無殘留且效率佳之降解方式。

二、茄紅素之製備

利用熱風乾燥以 60°C 作用 24 小時可將新鮮番茄水分去除製備成乾燥番茄，經由混合溶劑萃取及再結晶法純化後，可由每 100 g 乾燥番茄中萃取出 25.5 mg 純度高於 90% 之茄紅素。

三、不同製備條件對於幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-茄紅素 (CS-TPP-Lycopene) 奈米顆粒特性之影響

(一) 茄紅素濃度之影響

當茄紅素濃度由 20 上升 80 $\mu\text{g/mL}$ 時，CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒的茄紅素包覆率會由 51.3% 上升至 71.7%，而裝載率也會跟著上升，由 2% 至 8.5%，而奈米顆粒粒徑亦會由 690 nm 增加至 906 nm。此外，

對奈米顆粒產率 (58 至 63%) 及表面電位 (+49 至 +52 mV) 影響不大，故考量茄紅素包覆率與裝載率後，認為 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 為較佳的製備 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之條件。

(二) 幾丁聚醣分子量之影響

當幾丁聚醣分子量由 original Mw (607 kDa) 減小至 low Mw (31 kDa) 時，所製備出的 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之茄紅素包覆率會隨之下降由 70.8% 減少至 41%，但奈米顆粒平均粒徑也會由 936.1 nm 下降至 634.4 nm，而奈米顆粒表面電位也隨著幾丁聚醣分子量下降跟著降低由 +51.8 mV 降低為 +33.4 mV。因此為了使製備出來的奈米顆粒擁有較小的粒徑及較高的表面電位，同時又不損失太多的包覆率，故使用 Medium Mw 幾丁聚醣為較佳的製備 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之製備條件。

(三) CS/TPP 重量比之影響

當 CS/TPP 重量比由 3/1 上升至 6/1 時，所形成的奈米顆粒平均粒徑會由 689 nm 上升至 1707 nm，表面電位亦會由 +45.8 mV 增加至 +49.1 mV，而對於茄紅素包覆率則影響不大 (50 至 54.8%)。故考量擁有良好之顆粒大小及表面電位，CS/TPP 重量比為 3/1 之條件用於製備 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒最為良好。

四、CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之安定性試驗

利用最佳條件：茄紅素濃度為 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、中分子量幾丁聚醣 (100-150 kDa) 及 CS/TPP 重量比為 3/1，製備 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒，並進行熱處理試驗、儲存試驗及胃腸道模擬試驗，以探討茄紅素於環境之安定性。

(一) 熱處理試驗

經由不同溫度加熱處理一小時之後，未經包覆的茄紅素粉末於隨著溫度由 30 $^{\circ}\text{C}$ 上升至 120 $^{\circ}\text{C}$ ，其顏色會因熱破壞而改變，由暗紅色轉為淡紅色，將茄紅素溶於溶劑中時顏色改變更為明顯，由橘紅色變為淡黃色液體，而經由奈米顆粒包覆之茄紅素加熱前後顏色並無明顯改變。經由 HPLC 分析後顯示，未包覆之茄紅素於 120 $^{\circ}\text{C}$ 加熱一小時後其茄紅素僅存原來濃度的 14.34%，而經由奈米顆粒包覆之茄紅素保留率高達 93.12%，證實幾丁聚醣奈米顆粒可以保護茄紅素，降低其受環境溫度之破壞。

(二) 儲存試驗

經由室溫 (25 $^{\circ}\text{C}$) 儲存不同天數處理後，未經包覆的茄紅素粉末隨著儲存天數由 0 天至 28 天，茄紅素顏色由暗紅色轉為淡黃色，而在

第 7 天時將茄紅素粉末溶解於溶劑中已呈現無色狀態，而經由奈米顆粒包覆之茄紅素於儲存過程顏色皆無明顯改變。經由 HPLC 分析後顯示，未包覆之茄紅素於儲存第 7 天皆全部裂解，已偵測不到茄紅素濃度，而經奈米包覆之茄紅素儲存至第 28 天，仍保有 47.4%之茄紅素，證實幾丁聚醣奈米顆粒可以保護茄紅素，降低其受氧化降解之影響。

(三) 胃腸道模擬試驗

將 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒置於 pH 1.2 (含 pepsin) 之模擬胃液培養 2 小時而後置於 pH 7.4 (含 pancreatin) 之模擬腸液下培養 6 小時，結果發現 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒之茄紅素累積釋放率不到 1%，顯示其於胃腸道不同酸鹼值下極為安定且不受酵素破壞。

五、掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒外觀型態

使用茄紅素濃度為 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、中分子量幾丁聚醣 (100-150 kDa) 及 CS/TPP 重量比為 3/1，製備 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒，經由 SEM 觀察發現 CS-TPP 及 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒皆為圓形球狀顆粒，而 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒表面因茄紅素包覆之關係較為粗糙，其平均粒徑皆因為乾燥之故略為小於粒徑分析儀之偵測結果 (CS-TPP

奈米顆粒為 200 nm；CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒約為 500 nm)。

六、總結

將中分子量幾丁聚醣 (128 kDa) 溶於 1% 醋酸水溶液，配置濃度為 0.2% 之幾丁聚醣溶液後，接著將 80 $\mu\text{g/mL}$ 濃度之茄紅素溶液加入混合，接著逐滴滴入 TPP 溶液至 CS/TPP 重量比為 3/1，製備 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒。此奈米顆粒之茄紅素包覆率約為 50%，SEM 觀察顯示顆粒為圓形球狀，粒徑約 689 nm，表面電位約為 +45.8 mV。而此 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒具有保護茄紅素之能力，可降低其遭受熱及氧化作用之破壞，於熱處理實驗可減少 78% 之茄紅素損失率，而於儲存實驗保存 28 天後仍有 47.4% 之茄紅素保留率，相較於未包覆之茄紅素保留量明顯上升。而於胃腸道模擬試驗，茄紅素之累積釋放率不到 1%，證實其十分安定。未來可進一步利用 Caco-2 細胞研究奈米顆粒於細胞之通透性，並經由動物試驗，探討 CS-TPP-Lycopene 奈米顆粒對於促進茄紅素在體內吸收之相關情形。

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。
- 于文利，趙亞平，沈紅，王大璞及陶萍(2003)。番茄中番茄紅素的
純化及表徵。上海交通大學。37：654-657。
- 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系碩士班碩
士論文。
- 李華佳、辛志宏及胡秋輝(2006)。食品納米技術與納米食品研究進
展。食品科學。27：271-274。
- 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
拉醬之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。
- 周志輝(2010)。新穎性食品科技之安全性。最新食品衛生安全學。
20：478-495。
- 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
學食品科學系碩士班碩士論文。
- 洪偉珊(2014)。幾丁聚醣水解物-三聚磷酸鈉-鈣-維生素 D₃ 奈米顆
粒之製備及特性研究。私立東海大學食品科學系碩士班碩士論
文。
- 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。
- 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系碩士班碩士論文。
- 徐世昌(2001)。生物性高分子幾丁質與幾丁聚醣之介紹與應用。化
工資訊。2：36-45。

- 徐珠璽 (1995)。水溶性幾丁聚醣的製備及與其物化特性。國立台灣海洋大學水產食品科學研究所碩士論文。
- 陳仲仁 (2008)。食品奈米技術與奈米食品。食品工業。40：1-3。
- 陳美惠、莊淑惠及吳志律 (1999)。幾丁聚醣的物化特性。食品工業。31：1-6。
- 陳家慶 (2002)。高溫下以臭氧降解幾丁聚醣製備幾丁寡醣之研究。國立台灣大學食品科學研究所碩士論文。
- 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系碩士班碩士論文。
- 葉安義 (2004)。奈米科技與食品。科學發展。348：44-49。
- 葉安義 (2007)。藥用及保健植物：奈米科技與食品。科學發展。418：42-47。
- 趙成萍及田野 (2006)。納米級維生素的研究。飼料工業。27：62。
- 劉德禧 (2007)。超微米及奈米膠囊化茄紅素之安定性及其裂解動力學研究。輔仁大學食品科學系碩士班論文。
- 蕭寧馨 (2004)。透視營養學。3：82。
- 賴淑琪 (1979)。水產廢棄物蝦、蟹外殼之高度利用。食品工業。31：1-6。
- Acosta E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr. Opin. Colloid Inter. Sci.*, 14: 3-15.
- Agnihotri S. A., Mallikarjuna N.N. and Aminabhavi T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control Rel.*, 100: 5-28.

- Aiba S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozyme hydrolysis of partially N-acetylated chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 14: 225-228.
- Aiba S., Fujiwara Y., Hideshima T., Kakizaki M., Izume N., Shojij T., Tsutsumi A., Hwang C., Rha C.K. and Sinskey A.J. (1986). Filmogenic properties of chitin/chitosan. In: Chitin in nature and technology. Muzzarelli R.A.A., Jeuniaux C. and Gooday G.M. (Eds), *Plenum Press. New York.*, 389-396.
- Akbuga J. and Durmaz G. (1994). Preparation and evaluation of cross-linked chitosan microspheres containing furosemide. *Int. J. Pharm.*, 11: 217-222.
- Alonso M. J., Janes K. A., Fresneau M. P., Marazuela A. and Fabra A. (2001). Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *J. Controll. Rel.*, 73: 255-267.
- Alonso M.J., Garcia-Fuentes M., Prego C., Torres D. (2005). A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly (ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery. *Eurp. J. of Pharm. Sci.*, 25: 133-143.
- Al-Qadi S., Grenha A., Carrión-Recio D., Seijo B. and Remuñán-López C. (2011). Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery : In vivo evaluation of insulin-loaded formulations, *J. Control. Release* Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.*, 31: 303-632.
- Arbo´s P., Arangoa M. A., Campanero M. A., and Irache J. M. (2002). Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 242: 129-136.

- Artursson P., Lindmark T., Davis S. S., Illum L. (1994). Effect of chitosan on permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.*, 11: 1358-1361.
- Blackwell J. (1988). Physical methods for the determination of chitin structure and conformation. *Methods Enzymol.*, 16: 435-442.
- Boileau A.C., Merchen N.R., Wasson K., Atkinson C.A. and Erdman J.W. (1999). Cis-lycopene is more bioavailable than trans lycopene in vitro and also in vivo in the lymph cannulated ferret. *Journal of Nutrition*, 129: 1176-1181.
- Boileau T.W. M., Boileau A.C. and Erdman J. J.W. (2002). Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 227: 914-919.
- Bramley P.M. (2000). Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry*, 54: 233-236.
- Brine C. J. (1989). Controlled release pharmaceutical applications of chitosan. In "Chitin and Chitosan". Skjak-Braek G., Anthonsen T. and Sandford P. (eds.), *Eisevier Applied Science*: 679-691.
- Britton G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.*, 9: 1551-1558.
- Calvo P., Remuñán-López C., Vila-Jato J. L. and Alonso M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Applied Poly. Sci.*, 63: 125-132.
- Casettari L. and Illum L. (2014). Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *Journal of Controlled.*, 190: 189-200.
- Castenmiller J. and West C. (1998). Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, 18: 19-38.

- Chau C. F., Wu S. H. and Yen G. C. (2007). The development of regulations for food nanotechnology. *Trends Food Sci. Tech.*, 18: 269-280.
- Chen H., Weiss J., and Shahidi F. (2006a). Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods. *Food Technol.*, 60: 30-31.
- Chen L., Remondetto G. E. and Subirade M. (2006b). Food protein-based materials as Nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.*, 17: 272-283.
- Chiu Y.T., Chiu C.P., Chien J.T., Ho G.H., Yang J. and Chen B.H. (2007). Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly (γ -glutamic acid) as carrier. *J Agri Food Chem.*, 55: 5123-5130.
- Clinton, S. K. (1998). Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition Reviews*. 56: 35-51.
- Cole E. R. and Kapur N. S. (1975a). The stability of lycopene I, degradation by oxygen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 8: 360-365.
- Cole E. R. and Kapur N. S. (1975b). The stability of lycopene II, oxidation during heating of tomato pulps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 8: 366-368.
- Conn P. F., Schalch W., and Truscott T. G. (1991). The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 11: 41-47.
- Deming D.M., Boileau A.C., Lee C.M. and Erdman J.W. (2000). Amount of dietary fat and type of soluble fiber independently modulate postabsorptive conversion of β -carotene to vitamin A in Mongolian Gerbils. *Journal of Nutrition*, 130: 2789-2796.

- Demiray E., Tulek Y. and Yilmaz Y. (2013). Degradation kinetics of lycopene, b-carotene and ascorbic acid in tomatoes during hot air drying. *LWT - Food Science and Technology*, 50: 172-176.
- Deprez S., Mila I., Huneau J.F., Tome D., Scalbert A. (2001). Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 3: 957-967.
- Desai M. P., Labhasetwar V., Amidon G. L., and Levy R. J. (1996). Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. *Pharm Res.*, 13: 1838-1845.
- Desai M. P., Labhasetwar V., Walter E., Levy R. J., and Amidon G. L. (1997). The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res.*, 14: 1568-1573.
- Devasagayam T. P. A., Werner T., Ippendorf H., Martin H. D. and Sies H. (1992). Syn-thetic carotenoids, novel polyene polyketones and new capsorubin isomers as efficient quenchers of singlet molecular oxygen. *Photochem. Photobiol.*, 55: 511-514.
- Di Mascio P., Kaiser S. and Sies H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.*, 274: 532-538.
- Di Mascio P., Murphy M. C. and Sies H. (1991). Antioxidant defense systems, the role of carotenoid, tocopherol and thiols. *Am. J. Clin. Nutr. Suppl.*, 53: 194-200.
- Dodane V., Khan M. A. and Merwin J. R. (1999). Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int. J. Pharm.*, 182: 21-32.

- Faisal W., O'Driscoll C. M. and Griffin B. T. (2010). Bioavailability of lycopene in the rat: the role of intestinal lymphatic transport. *J. Pharm. Pharmacol.*, 62: 323-331.
- Felt O., Furrer P., Mayer J. M., Plazonner B., Buri P. and Gurny R. (1999). Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *Int. J. Pharm.*, 180: 185-193.
- Fernández-Urrusuno R., Calvo P., Remuñán-López C., Vila-Jato J. L. and Alonso M. J. (1999). Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.*, 16: 1576-1581.
- Franceschi S., Bidoli E., La Vecchia C., Talamini R., D'Avanzo, B. and Negri, E. (1994). Tomatoes and risk of digestive-tractcancers. *Int. J. Cancer.*, 59: 181-184.
- Gan Q. and Wang T. (2007). Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 59: 24-34.
- Ganza-Gonzalez A., Anguiano-Igea S., Otero-Espinar F. J. and Blanco Mendez J. (1999). Chitosan and Chondroitin microspheres for oral-administration controlled release of metociopramide. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 48: 149-155.
- Gerster H. (1997). The potential role of lycopene for human health. *J. Am. Coll. Nutr.*, 16: 109-126.
- Gerster, H. (1997). The potential role of lycopene for human health. *J. Am. Coll. Nutr.* 16: 109-126.
- Giovanelli G. and Pagliarini E. (2009). Antioxidant composition of tomato products typically consumed in Italy. *Italy Journal of Food Science.*, 21: 305-316.

- Guan R. F., Qian B., Ye X. Q. and Hao Y. B. (2006). Recent study of nanotechnology in food science. *Food Sci.*, 27: 270-271.
- He P., Davis S. S. and Illum L. (1998). In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.* 166: 75-88.
- Henry L.K., Catignani G.L. and Schwartz S.J. (1998). Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and all-trans β -carotene. *JAOCS*. 75: 823-829.
- Hoigne J. and Bader H. (1976). The role of hydroxyl radical reaction in ozonation process in aqueous solution. *Water Res.*, 10: 377-383.
- Hoigne J. and Bader H. (1983). Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water- II : Dissociating organic compounds. *J. Water Res.*, 17: 185-194.
- Hoppe P.P., Krämer K., Van den Berg H., Steenge G. and Vliet V. T. (2003). Synthetic and tomato-based lycopene have identical bioavailability in humans. *European Journal of Nutrition*, 42: 272-278.
- 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.
- Hsu L.W., Ho Y.C., Chuang E.Y., Chen C.T., Juang J.H., Su F.Y., Hwang S.M. and Sung H.W. (2013). Effects of pH on molecular mechanisms of chitosane-integrin interactions and resulting tight-junction disruptions. *Biomaterials*, 34: 784-793.

- Huang M., Khor E. and Lim L. Y. (2004). Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm. Res.*, 21: 344-353.
- Huo T., Ferruzzi M.G., Schwartz S.J. and Failla M.L. (2007). Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8950-8957.
- Illum L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Res.*, 15: 1326-1331.
- Illum L., Farraj N. F. and Davis S. S. (1994). Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm. Res.*, 11: 1186-1189.
- Illum L., Farraj N.F. and Davis S.S. (1994). Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm. Res.*, 11: 1186-1189.
- Jared M. D. (1977). The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist.*, 20: 10-18.
- Jeffery J., Holzenburg A. and King S. (2012). Physical barriers to carotenoid bioaccessibility. Ultrastructure survey of chromoplast and cell wall morphology in nine carotenoid-containing fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 2594-2602.
- 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.
- Jiskoot W., Amidi M., Romeijn S. G., Borchard G. and Junginger H. E. (2006). Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *J. Control. Rel.*, 111: 107-116.

- Jumaa M. and Muller B. W. (1999). Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability. *Int. J. Pharm.*, 183: 175-184.
- Kabal'nova N. N., Murinov K. Y., Mullagaliev I. R., Krasnogorskaya N. N., Shereshovets V. V., Monakov Y. B. and Zaikov G. E. (2001). Oxidative destruction of chitosan under the effect of ozone and hydrogen peroxide. *J. Appl. Polym. Sci.*, 81: 875-881.
- Karakaya S. and Yılmaz N. (2007). Lycopene content and antioxidant activity of fresh and processed tomatoes and in vitro bioavailability of lycopene. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 2342-2347.
- Kawashima Y. (2001). Nanoparticulate systems for improved drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47: 1-2.
- Kawashima Y., Handa T., Kasai A., Takananka H., Lin S. Y. and Ando Y. (1985a). Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan. *J. Pharm. Sci.*, 74: 264-268.
- Kawashima Y., Handa T., Kasai A., Takenaka H. and Lin S. Y. (1985b). The effects of thickness and hardness of the coating film on the drug release rate of theophylline granules coated with chitosan-sodium tripolyphosphate complex. *Chem. Pharm. Bull.*, 33: 2469-2474.
- Kawashima Y., Handa T., Kasai A., Takenaka H. and Lin S. Y. (1985). The effects of thickness and hardness of the coating film on the drug release rate of theophylline granules coated with chitosan-sodium tripolyphosphate complex. *Chem. Pharm. Bull.*, 33: 2469-2474.
- Kipp J. E. (2004). The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.*, 284: 109-122.

- Knorr D. (1984). Used of chitinous polymers in food-A challenge for food research and development. *Food Technol.*, 38: 85-97.
- Ko J. A., Park H. J., Hwang S. J., Park J. B. and Lee J. S. (2002). Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 249: 165-174.
- Kong K. W., Khoo H. E., Prasad K. N., Ismail A., Tan C. P. and Rajab N. F. (2010). Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules*, 15: 959-87.
- Krajewska B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol.*, 35: 126-139.
- Krinsky N.I. (1988). Overview of lycopene, carotenoids, and disease prevention. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 218: 95-97.
- Krinsky N.I. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 200: 248-254.
- Kristenson M., Zieden B., Kucinaskiene Z., Elinder L. S., Bergdahl B., Elwing B., Abaravicius A., Razinkoviene L., Calkauskas H. and Olsson, A. (1997). Antioxidant State and Mortality from Coronary Heart Disease in Lithuanian and Swedish Men: Concomitant Cross Sectional Study of Men Aged 50. *BMJ*, 314: 629-633.
- Kumbar S.G., Kulkarni A.R. and Aminabhavi T.M. (2002). Cross-linked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of cross-linking agent. *J. Microencapsulation*, 19: 173-180.
- Kundu P. P., Mukhopadhyay P., Sarkar K., Chakraborty M., Bhattacharya S. and Mishra R. (2013). Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo studies in diabetic animal model. *Materials Sci. Engineering.*, 33: 376-382.

- Lamprecht A., Saumet J. L., Roux J. and Benoit J. P. (2004). Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int. J. Pharm.*, 278: 407-414.
- Lan E. H., Dunn B. and Zink J. I. (2005). Nanostructure 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.T. and Chen B.H. (2002). Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry*, 78: 425-432.
- Leong Y. S. and Candau F. (1982). Inverse microemulsion polymerization. *J. Phys. Chem.*, 86:2269-2271.
- Liaaen-Jensen S. (1971). Isolation, reactions in "carotenoids". Ed. Isler, O., *Halsted press. New York*, 61-188.
- Lin C.H. and Chen B.H. (2003). Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1012: 103-109.
- Lin Y., Tang J., Chen X. and Xin H. (2005). A templating route to nanoporous chitosan materials. *Carbohydr. Res.*, 340: 2816-2820.
- Liu H. and Gao C. (2008). Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. *Polym. Adv. Technol.*, 20: 613-619.
- Liu Y., Tang J., Chen X. and Xin J. H. (2005). Decoration of carbon nanotubes with chitosan. *Carbohydr. Res.*, 43: 3178-3180.

- Luessen H. L., de Leeuw B. J., Langemeijer M.W., de Boer A. B., 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 busserelin in vivo. *Pharm. Res.*, 13: 1668-1672.
- Magri V., Trinchieri A., Perletti G. and Marras E. (2008). Activity of *Serenoa repens*, lycopene and selenium on prostatic disease: Evidences and hypotheses. *Arch. Ital. Urol. Androl.*, 80: 65-78.
- Mi F. L., Shyu S. S., Lee S. H., 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. *J. Polymer Sci.*, 37: 1551-1564.
- Mitra S., Gaur U., Ghosh P.C. and Maitra A. N. (2001). Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Controlled Rel.*, 74: 317-323.
- Miwa A., Ishibe A., Nakano M., Yamahira T., Itai S. and Kawahara H. (1998). Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol. *Pharm. Res.*, 15: 1844-1850.
- Muzzarelli R. A. A. (1977). Chitin. *Oxford: Pergamon*. 220-228.
- Nguyen M. L. and Schwartz S. J. (1999). Lycopene: Chemical and biological properties. *Food Technology*, 53: 38-45.
- Nigalaye A.G., Adusumilli P. and Bolton S. (1990). Investigation of Prolonged Drug Release from Matrix Formulations of Chitosan. *Drug Devel. Ind. Pharm.*, 16: 449-467.
- Palmero P., Lemmens L., Hendrickx M. and Van Loey A. (2014). Role of carotenoid type on the effect of thermal processing on bioaccessibility. *Food Chemistry*, 157: 275-282.

- Palmero P., Lemmens L., Ribas-Agustí A., Sosa C., Met K., de Dieu Umutoni J., Hendrickx M. and Loey A. V. (2013). Novel targeted approach to better understand how natural structural barriers govern carotenoid in vitro bioaccessibility in vegetable-based systems. *Food Chemistry*, 141: 2036-2043.
- 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. *Int. J. Pharm.*, 249: 139-147.
- Peppas L. B. (1995). Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 116: 1-9.
- Rao A. V. and Agarwal S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutrition Research*, 19: 305-323.
- Ribaya-Mercado J. D., Garmyn M., Gilchrest B. A. and Russell R. M. (1995). Skin lycopene is destroyed preferentially over β -carotene during ultraviolet irradiation in humans. *Journal of Nutrition*, 125: 1854-9.
- Sadler G., Davis J. and Dezman D. (1990). Rapid extraction of lycopene and β -carotene from reconstituted tomato paste and pink grapefruit homogenates. *Journal of Food Science*, 55: 1460-1461.
- Sadowski D.C. and Meddings J.B. (1993). Luminal nutrients alter tight-junction permeability in the rat jejunum: an in-vivo perfusion model. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 71: 835-839.

- Schafer V., Briesen H., Andreesen R., Steffan A.M., Royer C., Tröster S., Kreuter J. and Rübsamen-Waigmann H. (1992). Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: A possibility for antiviral drug targeting. *Pharm Res.*, 9: 541–546.
- Schipper N. G., Varum K. M., Stenberg P., Ocklind G., Lennernäs H. and Artursson P. (1999). Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 8: 335-43.
- Schipper N. G., Varum K. M., Stenberg P., Ocklind G., Lennernäs H. and Artursson P. (1999). Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 8: 335-43.
- Shahidi F. and Han X.Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 33: 501-547.
- Sharma S. K. and Mague M. L. (1996). Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. *Food Research International*, 29: 309-315.
- Shu B., Yu W., Zhao Y. and Liu X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 76: 664-669.
- Sonaje K., Lin K.J., Tseng M.T., Wey S.P., Su F.Y., Chuang E.Y., Hsu C.W., Chen C.T. and Sung H.W. (2011). Effects of chitosan-nanoparticle-mediated tight junction opening on the oral absorption of endotoxins. *Biomaterials*, 32: 8712-8721.
- Staehelin J. and Hoigné J. (1985). Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Envir. Sci. Technol.*, 19: 1206-1213.

- Stahl, W. and Sies, H. (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch. Biochem. Biophys.*, 336: 1-9.
- Sung H.W., Lin Y. H., Mi F. L. Chen C.T., Chang W. C., Peng S. F. and Liang H.F. (2007). Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacro.*, 8: 146-152.
- Sung H.W., Lin Y.H., Sonaje K., Linc K. M., Juang J. H., Mi F. L. and Yang H. W. (2008). Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. *J. control.*, 132: 141-14.
- Tang G., Ferreira A. L., Grusak M. A., Qin J., Dolnikowski G. G., Russell R. M. and Krinsky N. I. (2005). Bioavailability of synthetic and biosynthetic deuterated lycopene in humans. *J. Nutr. Biochem.*, 16: 229-35.
- Tengamnuay S. P. and Mitra A. K. (1997). Chitosans as nasal absorption enhancers of salmon calcitonin: comparison with hydroxypropyl- and dimethyl-bcyclodextrins. *Pharm. Res.*, 14: S129.
- The United States Pharmacopeial Convention. (2004). General Tests and Assays. *USP Convention Inc.: Rockville*, 1-6.
- The United States Pharmacopeial Convention. (2004). Test Solutions. *USP Convention Inc.: Rockville*, 9-23.
- 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. *Pharm Res.*, 16: 1830-1835.

- Tydeman E.A., Parker M.L., Wickham M.S., Rich G.T., Faulks R.M., Gidley M.J., Fillery-Travis A. and Waldron K.W. (2010). Effect of carrot (*Daucus carota*) microstructure on carotene bioaccessibility in the upper gastrointestinal tract. 1. In vitro simulations of carrot digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 9847-9854.
- Tyssandier V., Borel P., Choubert G., Grolier P., Alexandre-Gouabau M.C. and Azais Braesco V. (1998). The bioavailability of carotenoids is positively related to their polarity. *Sciences des Aliments*, 18. Van den Berg H. (1999). Carotenoid interactions. *Nutrition Reviews*, 57: 1-10.
- Ukai N., Lu Y., Etoh H., Yagia A., Inaa K., Oshimaab S., Ojimaab F., Sakamotoab H. and Ishiguro Y. (1994). Photosensitized oxygenation of lycopene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 1718-1719.
- Unlu N.Z., Bohn T., Clinton S.K. and Schwartz S.J. (2005). Carotenoid absorption from salad and salsa by humans is enhanced by the addition of avocado or avocado oil. *The Journal of Nutrition*, 135: 431-436.
- 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
- Wan A., Sun Y., Gao L. and Li H. (2009). Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. *Carbohydr. Polym.*, 75: 566-574.
- Ward P. D., Tippin T. K. and Thakker D. R. (2000). Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharm. Sci. Technolo. Today*, 3: 346-358.

- Weiss J. (1935). Investigations on the radical HO₂ in solution. *Trans. Far Soc.*, 31: 668-687.
- Woranucha S. and Yoksana R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 96: 578- 585.
- Wu Y., Yang W., Wang C., Hu J. and Fu S. (2005). Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.*, 295: 235-245.
- Xu Y. and Du Y. (2003). Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 250: 215-226.
- Yaghobi N. and Hormozi F. (2010). Multistage deacetylation of chitin: Kinetics study. *Carbohydrate Polymers.*, 81:892-896
- Yang Y., Wang S., Wang Y., Wang X., Wang Q. and Chen M. (2014). Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery. *Biotechnology Advances*, 32: 1301-1316.
- Yeum K.J. and Russell R.M. (2002). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual Review of Nutrition*, 22: 483-504.
- Yonekura L. and Nagao A. (2007). Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51: 107-15.
- 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 Chem.*, 108: 1082-1087.

- 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 Chem.*, 108: 1082-1087.
- Zanoni B., Peri C., Nani R. and Lavelli V. (1999). Oxidative heat damage of tomato halves as affected by drying. *Food Research International*, 31: 395-401.
- Zanoni B., Peri C., Nanib R. and Lavellia V. (1999). Oxidative heat damage of tomato halves as affected by drying. *Food Research International*, 31: 395-401.
- Zhang L. and Kosaraju S. L. (2007). Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *Eur. Polym. J.*, 43: 2956-2966.
- Zhang L. X., Cooney R. V. and Bertram J. S. (1992). Carotenoids up-regulate connexin-43 gene expression independent of their provitamin- A or antioxidant properties. *Cancer Res.*, 52: 5707-5712.
- Zhu J., Wang Y. B. and Zhang S. P. (2006). Preparation and development of nanofood. *Food Sci. Technol.*, 11: 25.
- Zofia O.B. (2006). Lycopene (synthetic): chemical and technical assessment (CTA). *Office of Food Additive Safety, Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. College Park, Maryland, USA.*