

# 壹、中文摘要

本實驗以纖維酵素降解幾丁聚醣製備低分子量之幾丁聚醣。選擇四種低分子量之幾丁聚醣水解物 (chitosan hydrolysate, CS)，分別配置不同濃度 (0.67、1.00、1.34、1.68 及 2.00 mg/mL) 及不同 pH (3.0、4.7 及 6.0) 之幾丁聚醣溶液。將上述幾丁聚醣溶液分別與不同 pH (3.0、5.0 及 9.0) 之三聚磷酸鈉 (TPP) 溶液 (0.84 mg/mL)，使其 CS/TPP 重量比為 2/1、3/1、4/1、5/1 及 6/1 反應，製備 CS-TPP 奈米顆粒及包覆不同濃度 (0.1、0.2、0.3、0.4 及 0.5 mg/mL CS solution) 之 EGCG (epigallocatechin gallate) 以製備幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG (CS-TPP-EGCG) 奈米顆粒，並測定 EGCG 之包覆率、CS-TPP 及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒粒徑大小、表面電荷。掃瞄式電子顯微鏡 (SEM) 照相觀察，以及利用 FTIR 分析幾丁聚醣、TPP 及 EGCG 之間是否產生交互作用，之後模擬 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒在模擬胃液 (pH 1.2) 及腸液 (pH 7.4) 下之安定性。

結果發現，在 EGCG 包覆率方面，以幾丁聚醣溶液 pH 4.7 和 TPP 溶液 pH 9.0 反應、愈小分子量之幾丁聚醣、高 CS/TPP 之重量比及愈低 EGCG 之濃度條件下反應作用，可得較高 EGCG 之包覆率。在 CS-TPP-EGCG 顆粒粒徑方面，愈高 pH 之 TPP 溶液、CS/TPP 重量比及 EGCG 濃度，其顆粒粒徑愈大。CS-TPP-EGCG 顆粒對 EGCG 包覆率範圍為 29-47 %。CS-TPP-EGCG 顆粒粒徑均屬奈米級，範圍約為 244-438 nm。此外 CS-TPP-EGCG 顆粒粒徑均為大於 CS-TPP 顆粒粒徑 (226-315 nm)。在 FTIR 方面，幾丁聚醣和 TPP 產生離子交聯反應，而 EGCG 與幾丁聚醣或與 TPP 之間交互作用很小，以物理性包覆作用。CS-TPP 及 CS-TPP-EGCG 顆粒表面均帶正電荷，兩者正電

荷之差異不大，約為 25.1-28.8 mV。在安定性方面，CS-TPP-EGCG 奈米顆粒在模擬胃液 (pH 1.2 buffer) 及腸液 (pH 7.4 buffer) 下皆具有良好的安定性。

關鍵字：幾丁聚醣水解物，三聚磷酸鈉，表沒食子兒茶素沒食子酸酯 (EGCG)，奈米顆粒，包覆率，安定性

## 貳、英文摘要

### ABSTRACT

Low molecular weight of chitosans were prepared by cellulase hydrolysis. Four kinds of molecular weight of chitosan hydrolysates (CS) were chosen and prepared for different concentrations (0.67, 1.00, 1.34, 1.68 and 2.00 mg/mL ) and pH (3.0, 4.7 and 6.0) of CS solution. Sodium tripolyphosphate (TPP) solution ( 0.84 mg/mL ) was prepared at different pHs of 3.0, 5.0 and 9.0. CS-TPP nanoparticles were prepared by mixing the above CS and TPP solutions with different CS/TPP mass ratio 2/1-6/1. CS-TPP-EGCG nanoparticles were also prepared by adding different concentrations (0.1-0.5 mg/mL CS solution) of epigallocatechin gallate (EGCG) to the TPP solution before mixing with CS solutions. EGCG encapsulation efficiency, particles size and zeta potential of the nanoparticles were investigated. Cross linking among CS, TPP and EGCG, SEM and stabilities (at pH 1.2 and 7.4) of the nanoparticles were also determined.

As result, a high encapsulation efficiency obtained in the following conditions : at pH 4.7 and pH 9.0 for the CS solution and the TPP solution, respectively, small CS Mw, high CS/TPP mass ratio and low EGCG concentration while large nanoparticle size appeared in case of small CS Mw, high CS/TPP mass ratio and high EGCG concentration. The EGCG encapsulation efficiency changed in a range of 29-47%. The nanoparticle size of CS-TPP-EGCG appeared at 244-438nm, and larger

than that of CS-TPP particle (226-315nm). FTIR analysis showed that cross linking occurred between CS and TPP, but not between CS and EGCG or between TPP and EGCG. All the nanoparticles showed positive charge (+25.1-+28.8 mV). The nanoparticles were very stable in the pH 1.2 and pH 7.4 buffers for 2 hr and 6hr, respectively.

Key word: Chitosan hydrolysate, Sodium tripolyphosphate (TPP), Epigallocatechin gallate (EGCG), Nanoparticles, Entrapment efficiency, stability.

## 參、前言

綠茶中主要成分為兒茶素 (catechins)，包括 catechin (C)、epicatechin (EC)、epigallocatechin (EGC)、epicatechin gallate (ECG) 及 epigallocatechin gallate (EGCG)，其中 EGCG 佔 50 % 以上的含量 (Yang and Koo, 1997)。近年來研究兒茶素以 EGCG 生理活性為主，EGCG 是兒茶素成分中抗氧化作用最強，是維他命 E 的 20 倍以及 SOD (superoxide dismutase) 的 6 倍 (徐等人, 2006)，具有清除體內自由基的能力、抗發炎、抗癌、抗突變、抗衰老及抗腫瘤等生理活性 (Koo and Cho, 2004)。在中美等國廣泛性被研究，列為抗癌藥物 (王等人, 2005) 以及被視為保健飲料 (顏, 2007)。

兒茶素通過食道進入胃腸道，經由小腸黏膜吸收進入血液中，再由肝臟代謝，但是兒茶素對腸道系統細胞膜之通透性差 (Hollman, 2004)。Cai 等人(2002)指出有 90 % 以上的兒茶素在體內代謝快速(體內系統清除速率 9.0 mL/min)，使其半衰期短，約 0.5- 4 小時左右。因此可能造成兒茶素口服生體利用率(bioavailability)不超過 5 % (2-5%) (Catterall et al., 2003)。Fang 等人(2006)以 liposomes 結合具陰離子之 deoxycholic acid (DA) 包覆 EGCG 抑制皮膚癌細胞，因 liposomes 為脂溶性物質可輕易滲透過脂質雙層細胞膜，進而增加 EGCG 的吸收、抑制皮膚癌細胞以及防止 EGCG 活性被降解，其效果比單獨使用 EGCG 之效果高達 20 倍左右。

幾丁聚醣是由 N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine) 及葡萄糖胺 (glucosamine) 以  $\beta$ -1,4 鍵結而成的高分子聚合物，其具有生物黏著性、生物相容性、生物分解性及無毒性等優點 (Chandy and Sharma,

1990)，近年來已被廣泛應用於口服藥物及物質傳遞系統上。因幾丁聚醣分子結構之-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> group 易於吸附黏膜細胞表面，增加傳遞物質的滯留時間 (Thanou et al., 2001)，亦可暫時性的打開細胞間隙的 tight junction，促使物質在細胞間 (paracellular) 傳送 (Lin et al., 2007)，故有助於藥物、機能性物質及大分子物質的吸收。

幾丁聚醣做為兒茶素的載體，製備為幾丁聚醣微奈米級顆粒，不但可以控制延緩兒茶素在胃腸道中的釋放 (Zhang and Kosaraju., 2007; Hu et al., 2008)，亦可增加兒茶素的吸收 (郭，2003)。擬欲利用低分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 提升 EGCG 的吸收，增加其生理活性，故本研究先進行將幾丁聚醣以酵素水解至不同分子量之水解物後，製備各種幾丁聚醣水解物-三聚磷酸鈉-EGCG 奈米顆粒 (CS-TPP-EGCG nanoparticles)，探討 EGCG 之包覆率、其顆粒粒徑大小、觀察顆粒表面型態及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒之安定性。

## 肆、文獻整理

### 一、幾丁質與幾丁聚醣

#### (一) 幾丁質與幾丁聚醣簡介

幾丁質最早被發現是在 1799 年，由英國人 Hachett 利用酸處理蝦、蟹及龍蝦外骨骼，發現會產生泡沫及轉變成黃色膠狀軟骨物質，但當時不知為何物質(賴，1979)。在 1811 年法國植物學家 Braconnot 以氫氧化鈉的稀溶液加熱處理洋菇時，發現有不溶於水的物質，將其命名為“fungine”。1823 年於昆蟲表面堅硬部未發現類似物質，並命名為幾丁質(chitin)，原意是希臘語“包裹物”之義(Ruiz-Herrera, 1978)。另外，1859 年 Rouget 將幾丁質以濃氫氧化鈉加熱後，發現其物質可溶於有機酸，1894 年 Hoppe-Seyler 將此物質命名為幾丁聚醣(chitosan)。

幾丁質在自然界中的含量，僅次於纖維素，為第二豐富的天然高分子聚合物，具有高彈性和延展性性質，經常與蛋白質結合成為黏多醣(mucopolysaccharide)形式(Zhang et al., 2002)。幾丁質主要存在於蝦蟹外殼、昆蟲的外殼及真菌或酵母菌的細胞壁中，具有保護和支持生物體的作用(Allan and Hadiger, 1979)。在漁業加工產業上，全球每年約有數百萬噸的蝦殼、蟹殼廢棄物產量，由於蝦蟹殼廢棄物中富含蛋白質、蝦紅素、幾丁質、鈣等有價值的成分，可加以回收利用，產生高附加價值之物質，以減少環境污染的問題。

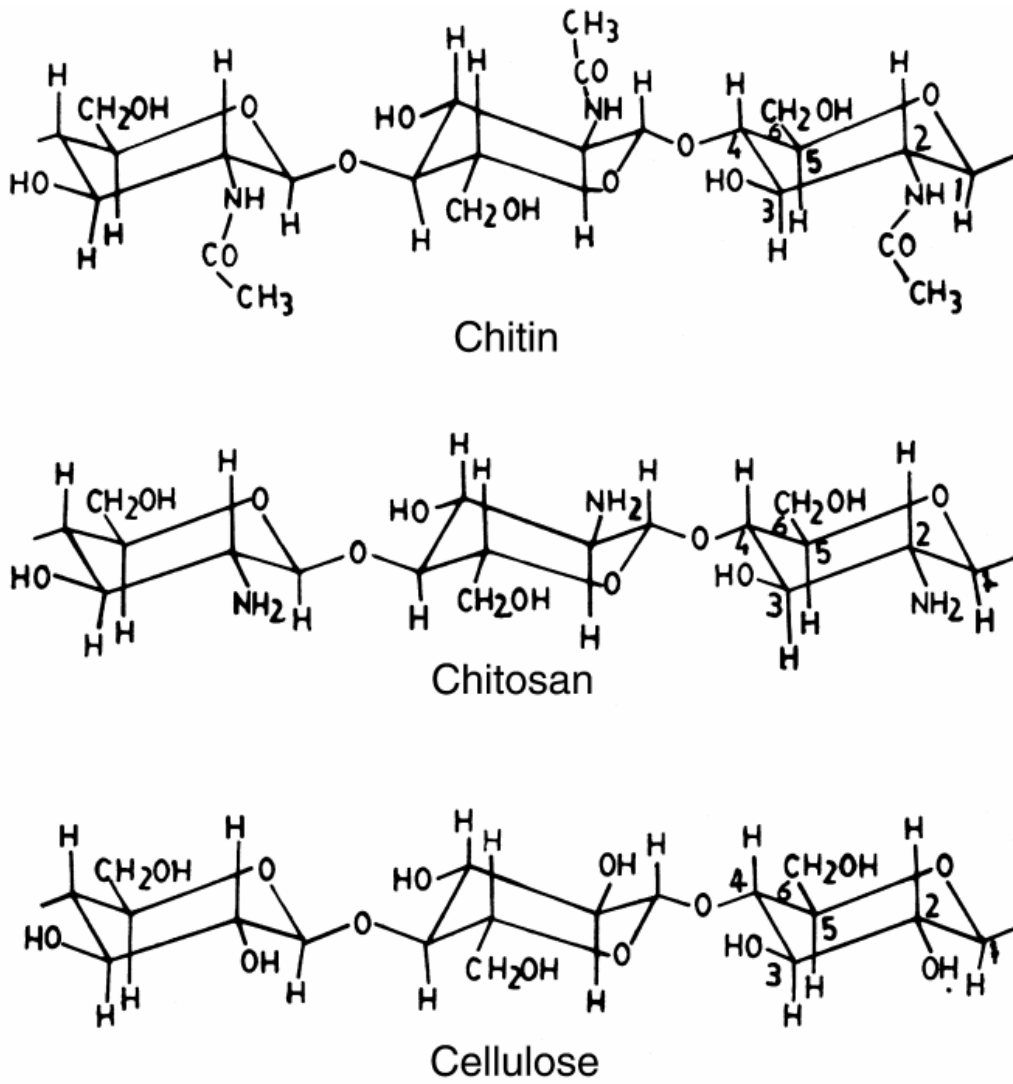
## (二) 幾丁質與幾丁聚醣結構

幾丁質約由 1000-3000 個 N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetyl glucosamine) 及葡萄糖胺 (glucosamine) 以  $\beta$ -1,4 鍵結而成的直鏈狀多醣聚合物。是一種構造類似纖維素的生物性高分子，與纖維素不同之處，在於 C-2 位置上所接的是乙醯胺基 (-NHCOCH<sub>3</sub>) 或少數的胺基 (-NH<sub>2</sub>)。將幾丁質以高溫及濃鹼處理進行去乙醯化作用 (deacetylation)，除去部份或全部乙醯基，游離胺基會露出，所得到產物即為幾丁聚醣。幾丁質、幾丁聚醣與纖維素的結構圖，如圖一所示。幾丁質和幾丁聚醣在去乙醯程度上的差異，目前並無明顯的定義將其劃分。只有 Muzzarelli 及 Rocchett 在 1985 年提出總氮量佔聚合物的百分之七 (w/w) 以上者為幾丁聚醣。

## (三) 幾丁聚醣溶液之特性

幾丁質不溶於一般無機酸或有機酸，且也不溶於鹼液中，只溶於強無機酸，例如氟化醇 (fluoroalcohol)。幾丁質具有強吸濕性，保濕效果相當良好，分子在自然狀態下不易斷裂、不易變性，具有相當良好的機械強度。





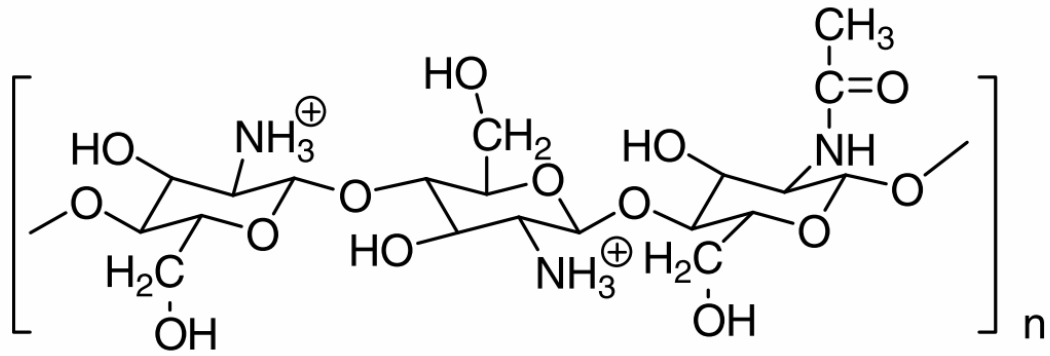
圖一、幾丁質、幾丁聚醣及纖維素之結構。

Fig 1. Structure of chitin, chitosan and cellulose.

幾丁聚醣可溶於酸性或弱酸性溶液中，包括有機酸或無機酸，例如醋酸、甲酸、硫酸、磷酸、檸檬酸、蘋果酸及琥珀酸等，其中以甲酸是為最佳溶劑。幾丁聚醣亦可溶於酸性緩衝溶液中，例如醋酸緩衝溶液，其溶解度可達 4 % 以上。幾丁聚醣在酸性溶液中且小於其 pKa (pH~6.3) 時，會形成帶正電荷的聚合物 (具-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> group)，如圖二，此特性使得幾丁聚醣與生物體的細胞膜間具有高度的黏著性。在藥物傳遞系統上，可以延長物質或藥物在黏膜組織上的滯留時間，以增加物質或藥物的吸收作用 (Soane et al., 1999)。

#### (四) 幾丁聚醣之製備

可利用熱鹼液、酵素或微生物將幾丁質去乙醯基即可得幾丁聚醣。熱鹼液處理法是目前最常被使用的方法，幾丁聚醣的去乙醯程度會受鹼液的濃度、溫度、鹼液作用時間及幾丁聚醣本身的分子量、結構差異上的影響，其方法優點為反應時間短、去乙醯程度高及製備成本較低(徐，2001；柯，2006)。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，雖然此方法不會對幾丁聚醣分子鏈造成降解，也沒有鹼液的廢液處理問題，但其作用時間時間長且產率太低，酵素成本高，所以實用性較低(徐，2001；陳等人，2000)。微生物法是利用 *Aeromonas sp.* 之類的幾丁質去乙醯生產菌發酵反應來製造幾丁聚醣，其優缺點與酵素法相似，所以也較不實用(陳等人，2000；莊，2002)。



圖二、幾丁聚醣在酸性溶液中之結構。

Fig 2. Segment of chitosan molecule in acidic aqueous solutions.

(Liu et al., 2006)

## (五) 低分子量幾丁聚醣之製備

幾丁聚醣應用範圍十分廣泛，尤其低分子量幾丁聚醣比高分子量幾丁聚醣的溶解性佳，溶液黏度低，更易於利用，且因幾丁聚醣具有陽離子分子結構，更增加其應用性 (Qin et al., 2004)，以及提高幾丁聚醣被腸道吸收的能力，增加其生理活性 (Zeng et al., 2007)。可以化學法或酵素法水解高分子量之幾丁聚醣製備低分子量之幾丁聚醣。

### 1. 化學法

傳統上的化學法是以酸水解方式為主，利用鹽酸、亞硝酸、磷酸等破壞幾丁質或幾丁聚醣的糖苷鍵以降解其分子，酸濃度、水解時間、溫度等與其水解程度有關。若以高濃度之強酸，則會造成大量廢液處理及環境污染問題，而且酸水解反應條件不易控制，分子分子量再現性差。但因酸水解方法之成本低且處理量大，故目前工業上較常採用。亦可利用亞硝酸鈉 ( $\text{NaNO}_2$ ) 進行水解幾丁聚醣，其水解反應機制為亞硝酸鈉會對幾丁聚醣的胺基進行選擇性之脫胺反應，並打斷  $\beta$ -1,4 糖苷鍵，而產生氮氣。幾丁寡醣因脫胺作用，使其在還原端有 2,5-anhydro-D-mannose 的衍生物產生；幾丁聚醣降解速率與亞硝酸鈉濃度呈一級反應關係 (Allan and Peyron, 1995)，其水解物中可能有殘留亞硝酸鈉故有安全性之考量 (食品中殘留安全劑量為 0.03 g/kg 以下)。

## 2. 酵素法

文獻上用於水解幾丁質與幾丁聚糖的酵素有幾丁質酶(chitinase)及幾丁聚糖酶(chitosanase)，具有高專一性，但其價格較昂貴，限制了在工業上之應用(Jeon et al., 2000)。Pantaleone 等人(1992)指出有10種葡聚糖酶(glycanase)、21種蛋白質分解酶(protease)、五種解脂酶(lipase)和一種單寧酶(tannase)具有水解幾丁聚糖活性，如表一。Yalpani 及 Pantaleone (1994)指出纖維素酶、半纖維素酶、解脂酶、溶菌酶、木瓜酵素等價格較低，且其水解幾丁聚糖效果不亞於幾丁聚糖酶。而酵素水解法可製備出低分子量幾丁聚糖產物，亦無強酸鹼或亞硝酸鈉的殘留問題之考量。

表一、常見之幾丁質類物質分解酵素。

Table 1. Enzyme for the degradation of chitinous materials.

Type	Enzymes	Sources
Glycanases	Cellulase TV	<i>Trichoderma viride</i>
	Cellulase 300P	<i>Trichoderma reesei</i>
	Cellulase AP	<i>Aspergillus niger</i>
	Biocellulase	<i>Aspergillus niger</i>
	Hemicellulase	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Bioxylanase	<i>Trichoderma reesei</i>
	Pectinase G	<i>Aspergillus niger</i>
	Pectinex 3XL	<i>Aspergillus niger</i>
	Dextranase 50L	<i>Penicillium Lilacimum</i>
	Fungamyl 1600S	<i>Aspergillus oryzae</i>
Carbohydrates	Lactozyme	<i>Kluyveromyces fragliils</i>
Protease	Papain	<i>Carica papaya</i>
	Acid-stable protease	<i>Rhizopus sp.</i>
	Fungal protease 3100	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Protease M	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Protease N	<i>Bacillus subtilis</i>
	Protease 2A	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Prozyme 6	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Peptidase A	<i>Aspergillus oryzae</i>
	HT Proteolytic 200	<i>Bacillus subtilis</i>
	Protease S	<i>Bacillus sp.</i>
	Newlase	<i>Aspergillus niger</i>
	Proleather	<i>Bacillus subtilis</i>
	Fungal protease	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Fungal protease S202	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Bacterial protease S203	<i>Bacillus sp.</i>
	Rhizome P41	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Rhizome P11	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Rhizome P64	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Thermoase	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>
	Alcalase 2.4L	<i>Bacillus licheniformis</i>
Neutrrase 0.5L	<i>Bacillus subtilis</i>	
Lipase	Lipase MAP-10	<i>Mucor ap.</i>
	Lipase AIE	<i>Aspergillus niger</i>
	PPLipase	<i>Procine pancrease</i>
	Lipase 3TBU	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Lipase	<i>Microbial Lipase</i>
other	Trannze	<i>Aspergillus oryzae</i>

( Pantaleone et al., 1992 )

## 二、奈米科技在藥物傳遞上之應用

### (一) 奈米科技

奈米科技是一個熱門話題，以生產小於微米的產品為主要目的，依照美國國家奈米科技開創中心（National Nanotechnology Initiative, NNI）的定義，奈米科技包括：研究介於約 1-100 奈米（nm）的原子、分子或聚分子的結構、現象、基本性質的相關科技；創造或應用一些由於粒子小而具有特殊性質或功能的結構、設計、或系統；操控原子大小的物質的能力（葉，2004）。奈米科技具有三種基本特性：表面效應、體績效應及量子效應（孫等人，2006）。當顆粒縮小時，表面積增大，表面原子數增多，表面電位提高，此種『表面效應』會造成電磁吸附力、化學與光催化反應改變，例如經過奈米化的材料將提高光及微波的吸收度、塑性、延展性及擴張力，熔點則降低，並且有助於提高吸收吸附能力與化學活性（Guan et al., 2006）。對於生物體的影響，奈米材料在生物體內的生物活性、目標器官與暴露途徑發生改變，會產生放大生物效應的效果（謝，2007）。另外，奈米顆粒具有很強的表面吸附力，容易攜帶其他物質進入細胞、細胞核內（孫等人，2006）。

### (二) 奈米藥物傳遞系統

控制性藥物傳遞技術是藥物研究科學這其中含了使用多種科學技術來精進人類健康技術。奈米藥物傳遞系統可藉由達到藥物控制釋放、攜帶藥物至特定器官或組織、提高藥物生體可用率、增加藥物耐受性、增加藥效及減少藥物毒性的目的。目前發展的主要藥物傳遞技

術與它們潛在用途列於表二（李，2001）。不過奈米顆粒的傳遞效果受到奈米顆粒的大小、顆粒表面特性（藥物載體材料-聚合物本身特性）及藥物包覆特性等因素的影響（Mohanraj and Chen, 2006），以下加以說明：

### 1. 顆粒粒徑大小

許多文獻已證明奈米級顆粒在藥物傳遞系統上比微米級顆粒傳遞效果佳（Panyam and Labhasetwar, 2003）。Desai 等人(1997) 已證明 100 nm 的奈米級顆粒在 Caco-2 細胞模式下，其細胞穿透能力比 1  $\mu\text{m}$  的微米級顆粒來得高 2.5 倍、比 10  $\mu\text{m}$  的微米級顆粒的穿透能力高 6 倍。愈小粒徑的顆粒會欲快速通過腸黏膜，抵達具有吸收作用的腸細胞，粒徑 14 nm 的顆粒在 2 分鐘內到達，粒徑 415 nm 的顆粒，到達時間 30 分鐘，而粒徑 1000 nm 的顆粒卻無法通過腸黏膜屏障（謝，2007）。

### 2. 顆粒表面特性

由於細胞的細胞膜主要是由脂質雙層所構成，所以親油性分子可輕易地藉由 transcellular pathway 直接穿透細胞膜，而親水性分子無法直接穿過疏水性的細胞膜，需要經由 paracellular pathway 通透細胞，然而 paracellular pathway 受到 tight junction 的嚴格限制，親水性分子難以由此通道通透細胞（如圖三）。Tight junction 為調控親水性分子進出上皮細胞的蛋白質錯合物，它可以選擇性地讓一些親水性分子通過上皮細胞間隙（Ballard et al., 1995 ; Ward et al., 2000）。所以顆粒表面呈疏水性性質就可以輕易的通透細胞膜進入血液中，或者是顆



表二、藥物傳遞技術的主要用途。

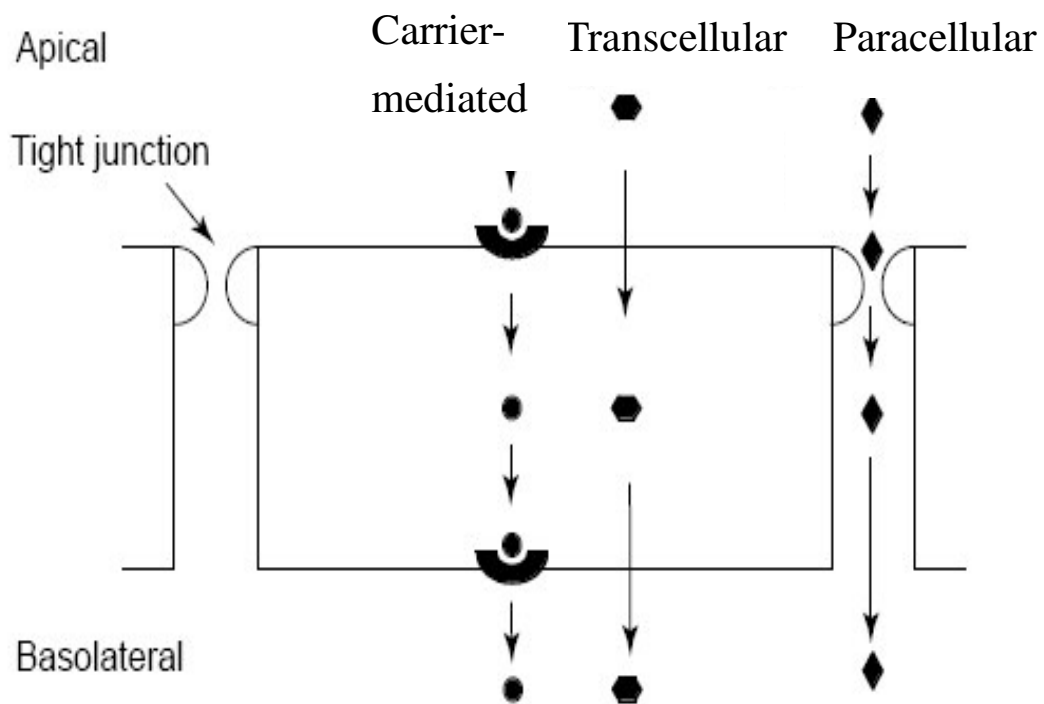
Table 2. The applications of novel drug delivery system.

藥物傳遞技術	主要用途
微脂體	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎被動性腫瘤標的投藥</li> <li>◎疫苗佐藥</li> <li>◎基因治療時被動性標的肺部內皮</li> <li>◎標的局部淋巴結</li> <li>◎標的不同器官/病變不為之細胞表面的抗體</li> <li>◎注射局部儲藥系統</li> </ul>
Niosomes, Non-ionic surfactant vesicles	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎被動性腫瘤標的投藥</li> <li>◎藥物持續釋放系統</li> <li>◎疫苗佐藥</li> </ul>
奈米級顆粒	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎被動性腫瘤標的投藥</li> <li>◎藥物持續釋放系統</li> <li>◎疫苗佐藥</li> </ul>
微米級顆粒	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎注射局部儲藥系統</li> <li>◎藥物持續釋放系統</li> <li>◎疫苗佐藥</li> </ul>
環狀糊精	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎脂溶性藥物的注射用溶解劑</li> </ul>
乳劑	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎脂溶性藥物的給藥載體</li> <li>◎以細胞表面抗體為標的</li> </ul>
ADFPT, antibody directed enzyme prodrug therapy	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎主動性腫瘤標的投藥</li> </ul>
聚合物-藥物結合物	<ul style="list-style-type: none"> <li>◎被動性腫瘤標的投藥</li> </ul>

(接上頁)

植入系統	◎治療感染症及癌症的局部儲藥系統 ◎全身性治療用藥物持續釋放系統
無針式注射	◎降低注射時的疼痛 ◎增加皮膚間疫苗的生體可利用率

(李，2001)



圖三、經由腸上皮細胞之三種穿透模式。

Fig 3. Transport across intestinal epithelium. olecules 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)

粒表面帶有正電荷，可以增加對帶有負電荷細胞膜的吸附作用，進而調控 tight junction，提高物質的通透性 (Feng and Chien, 2003)。

### 3. 藥物包覆特性

由於奈米顆粒藥物載體模式能有效的傳遞藥物，是因其包覆能力佳。而藥物的包覆率的高低取決於藥物的溶解度特性以及藥物載體材料與藥物間的相互作用。如蛋白質  $pI=4.8$ ，當溶液  $pH > 4.8$  (一般製備幾丁聚醣奈米顆粒溶液  $pH$  值為 4.5-5.0)，蛋白質結構帶負電荷 ( $-COO^-$ ) 會與幾丁聚醣的正電荷 ( $-NH_3^+$ ) 產生離子交互作用，使幾丁聚醣奈米顆粒的包覆效果提高 (Calvo et al., 1997)。

### (三) 應用於製備奈米顆粒之分子材料

近年來，利用生物降解聚合物所製成的奈米顆粒受到極大的關注，他們被認為是相當有潛力的藥物傳遞系統。早期藥物傳遞載體所使用的材料以疏水性聚合物 poly(D, L-lactide)、poly(lactic acid) [PLA]、poly(glycolide) [PLG]、poly(lactide-co-glycolide) [PLGA] 及 poly(cyanoacrylate) 等為主 (李, 2001)。而近年來，親水性高分子天然聚合物幾丁聚醣 (chitosan)、海藻酸鈉 (sodium alginate) 及果膠 (pectin) 等亦被廣泛利用於製備奈米級顆粒的材料，主要原因他們都具有生物分解性及生物黏著性特性，對人體不會造成毒性傷害亦可增加藥物或物質在黏膜細胞的滯留時間 (He et al., 1998)。

## （四）生物高分子材料應用上的優點（鄭，2008）

### 1. 阻隔性

以生物高分子材料包覆對熱、氧敏感及亦揮發成分以減少機能性成分在加工過程、儲存過程的損失以及消化過程減少胃腸道消化系統的破壞，增加生體利用率。

### 2. 控制釋放速率

親水性高分子聚合物膠體構成的 3 維網狀結構，具有吸水膨潤、保持高比例水含量 (>20%) 而不溶於水的特性。可因為溫度、酸鹼值等外界環境變化而使結構產生膨潤或收縮作用，而且不同的材料形成的膠體具有不同的釋放特性和應用，因此可以根據不同的需求而設計不同的藥物傳遞系統。

### 3. 提高生體利用率

生體利用率 (bioavailability) 是指一種營養素在體內被吸收和利用的程度。許多機能性成分，如植物固醇、類胡蘿蔔素物質，在水及油中溶解度低，且在胃腸道的滯留時間短、無法滲透進入腸道上皮組織而被吸收，導致生體利用率不高 (Besse et al., 2006)。藉由高分子材料的黏著性黏附於小腸黏膜上皮部位，提高機能性成分與黏膜接觸的緊密性及持續性，延長胃腸道的滯留時間，以增加機能性物質有效被吸收及有效的控制釋放時間，以提高生體利用率 (He et al., 1998)。生物高分子材料中，海藻酸與幾丁聚糖皆具有這種特性 (George and

Abraham, 2006)。

## (五) 奈米科技的安全性評估

目前沒有專屬於奈米材料的生物安全評估方式，也沒有統一的安全標準，現階段，其毒性及安全性多為短期實驗，例如，口服急毒性（如半致死量 LD<sub>50</sub>）、細胞毒性測試（如 MTT 細胞活性分析）、發炎反應（如 IL-8 細胞激素分析）等（謝，2007），卻忽略奈米材料在生物體內代謝過程及訊號傳導的影響（Liu et al., 2006）。有學者提出，在毒性安全研究上應重視慢性毒性（如致癌、致畸形及致突變等）（孫等人，2006）。

針對奈米微粒毒性評估，美國國際生命科學研究院針對奈米材料提出整合型的評估重點（謝，2007）：

1. 物理化學性質的鑑定試驗-包括粒徑大小、粒徑大小分佈、表面積、形狀、表面電位、可溶性及聚集性等。
2. 體外試驗-包括細胞毒性、細胞凋亡及基因毒性等。
3. 體內試驗-包括第一級評估炎症、氧化壓力及細胞增值，第二級根據第一級評估結果針對性評估，例如毒理代謝動力學及生體相容性評估等。

### 三、幾丁聚醣在藥物運送系統上之應用

幾丁質與幾丁聚醣是由生質 (biomass) 所製取的天然高分子物質，因此與生物體細胞有良好的相容性，因幾丁聚醣為陽離子型高分子 (具  $\text{NH}_3^+$  group) 與生物體的細胞膜間亦具有生物黏著性 (mucoadhesiveness)，又可被生物體分解 (biodegradable) (Struszczyk et al., 1991)，所以幾乎不具毒性 (nontoxicity)，且具有生物相容性 (biocompatibility) (Chandy and Sharma, 1990)。因此在機能性食品及醫藥上引起廣泛注意和應用。經過多年的努力，已經將幾丁聚醣成功應用於農業廢水處理食品加工化妝品紡織工業保健食品及生醫材料等，如表三 (徐，2001)。

#### (一) 幾丁聚醣於生醫材料上之應用

幾丁聚醣在生物醫學材料方面的應用很廣，包括手術縫合線、傷口癒合、無毒性的抗癌效果、改善消化吸收機能、降低膽固醇、降低高血壓及藥物釋放控制等 (徐，2001；Rinaudo，2006)。如以下應用方面：

##### 1. 調節免疫活性及抗腫瘤

幾丁質及幾丁聚醣具有調節免疫活性、抑制腫瘤細胞及抵抗微生物感染的保護作用。由 Nishimura 等人(1987)以靜脈注射及腹腔注射的方式注射去乙酰度 30 及 70 (DD 30%，DD 70%) 之幾丁質/幾丁聚醣，發現其可活化小白鼠體內巨噬細胞，抑制 Meth-A 腫瘤細胞，以及增強小白鼠對抗 *Escherichia coli* 之感染。且 Nishimura 等人(1992)

表三、幾丁質和幾丁聚醣之應用。

Table 3. Application of Chitin and Chitosan.

農業上之應用	醫學上之應用
<ul style="list-style-type: none"><li>◎ 有免疫力的植物</li><li>◎ 種子保存</li><li>◎ 作物生長調節</li><li>◎ 促進家畜、家禽生長</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>◎ 傷口癒合</li><li>◎ 藥物控制釋放</li><li>◎ 殺菌貼布</li><li>◎ 手術縫合線</li><li>◎ 抗凝血劑</li><li>◎ 洗腎機之逆滲透膜</li><li>◎ 人造皮膚</li><li>◎ 抗癌藥</li></ul>
生理功能之研究	
<ul style="list-style-type: none"><li>◎ 止血性質</li><li>◎ 降低膽固醇</li><li>◎ 產生抗體</li><li>◎ 免疫力增強劑</li></ul>	
食品加工	其他應用
<ul style="list-style-type: none"><li>◎ 水果保鮮劑</li><li>◎ 功能性質、成膠、乳化</li><li>◎ 膠衣</li><li>◎ 果汁澄清</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>◎ 廢水處理：工業廢水(重金屬)</li><li>◎ 抗菌、抗靜電防臭纖維</li><li>◎ 分離薄膜</li><li>◎ 吸附、分離、純化</li><li>◎ 液晶</li><li>◎ 固定化酵素、細胞膜</li><li>◎ 抗菌塗料</li></ul>
介面活性劑	
<ul style="list-style-type: none"><li>◎ 保濕產品</li><li>◎ 功能性清潔劑</li><li>◎ 化妝品</li></ul>	

(徐, 2001)



更進一步證實，藉由殺手 T 細胞淋巴球的活化，幾丁質/幾丁聚醣可提昇動物體內抗原專一性的免疫反應。Peluso 等人(1994) 發現幾丁聚醣會誘發巨噬細胞並活化巨噬細胞分泌一氧化氮 (NO)，而一氧化氮亦是活化巨噬細胞對抗腫瘤細胞所分泌的重要物質之一，此證明了幾丁聚醣活化巨噬細胞與抗腫作用有關。

## 2. 凝血作用

幾丁聚醣具有促進凝血的效果，主要是由於幾丁聚醣帶有陽離子性質會使紅血球及血小板等聚集(林及林, 2002)。Hoekstra 等人(1998) 利用晶微結構幾丁聚醣 (microcrystalline chitosan) 經與氯化鈣螯合 (18 wt % , chelated  $\text{CaCl}_2$ ) 後所形成的水膠進行實驗動物血管壁傷口的止血性測試，發現植入的幾丁聚醣可促進內皮組織的再生，經過一段時間會完全被生物體所分解而不具生物毒性。

## 3. 人工皮膚及傷口覆材

傷口復原初期大略分成兩個階段，第一階段是發炎，第二階段是新組織增生。在發炎階段，白血球會聚集並且清除外來物，而幾丁聚醣有助於白血球滲入已發炎的細胞中，加速傷口清潔效果，並抑制細菌及黴菌滋生。在組織增生階段，幾丁聚醣的陽離子，促使傷口凝血作用並可加速纖維母細胞生成膠原蛋白的速率，進而加速傷口的癒合，使得傷口疤痕大小有縮的跡象 (Okamoto et al., 1995; 林及林, 2002)。而且幾丁聚醣可被生物體自然分解並代謝，不毒性，亦不會造成患者在移除敷料時對傷口的二次傷害。

#### 4. 藥物包覆基質

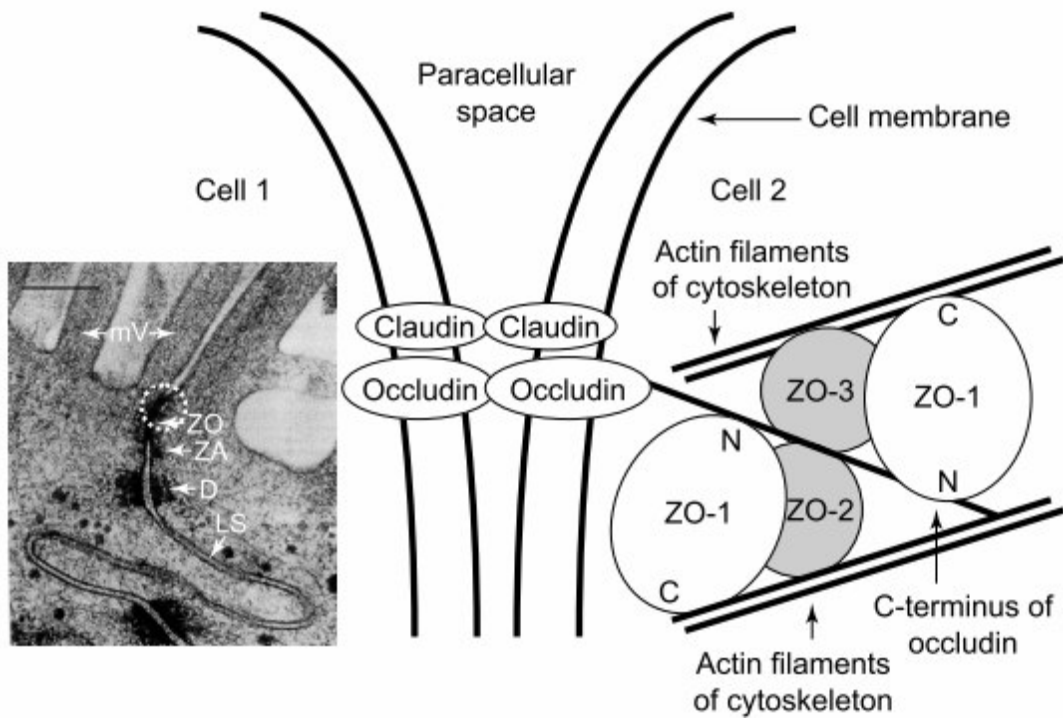
幾丁聚醣具有生物相溶性及生物可分解性，並同時具有陽離子特性，可製備膠體及薄膜，在藥物控制系統上被廣泛的應用（林及林，2002），其特性有（1）穩定和包覆亦中之成分，如 Ribeiro 等人(1999)利用幾丁聚醣包覆脂溶性藥物，可避免使用有機溶劑或受熱作用，以增加藥物的穩定性和生體利用率；（2）促進藥物的吸收；（3）延緩或控制藥物釋放；（4）攜帶藥物至特定器官或組織。

##### （二）幾丁聚醣於藥物傳遞系統上之重要特性

當藥物經由口腔吞服近進入體內，經過食道、胃以及腸內，藥物分子會經由腸腔穿過上皮細胞（intestinal epithelium， $>200\text{ m}^2$ ），進入血液循環系統，而達到治療效果。而一般分子要穿過上皮細胞進入血液中可分為三個主要路徑：a. 經由擴散直接穿過細胞膜（transcellular pathway）；b. 經由擴散通過鄰近細胞間隙通道（paracellular pathway）；c. 藉由載體傳遞（carrier-mediated transcellular pathway），如圖五。一般來說  $\text{O}_2$ 、 $\text{CO}_2$ 、水、小分子如醣類、氨基酸及脂溶性分子，因濃度梯度可以輕易通過 transcellular pathway 穿透細胞，而親水性分子及大分子如蛋白質是藉由載體蛋白辨識，穿透細胞，亦可利用 paracellular pathway 進入細胞，但由於 paracellular pathway 的 tight junction（蛋白質錯合物）選擇性通透，造成親水性分子及大分子難以此通道通透細胞進入血液中（Ward et al., 2000）。

Tight junction 蛋白質錯合物是由 occludin、claudin 及 cytoplasmic plaque proteins 所組成，而 cytoplasmic plaque proteins 又是由 Zonula Occludens-1 (ZO-1)、Zonula Occludens-2 (ZO-2)、Zonula Occludens-3 (ZO-3) 及 cingulin 等蛋白質所構成，如圖四。ZO-1 位於 occludin 與 cytoskeleton 間，在調控細胞間隙上的 tight junction 緊密度具有重要的角色 (Furuse et al., 1994; Yamamoto et al., 1997)，已證實 tryosine kinases、 $\text{Ca}^{2+}$  及 protein kinase C (PKC) 可調控 ZO-1，令 tight junction 產生開合反應 (Collares-Buzato et al., 1998; Mullin et al., 1998; Tai et al., 1996)。

腸黏膜細胞膜間隙可藉由  $\text{Ca}^{2+}$  離子、介面活性劑及陽離子聚合物等，可增加其通透性 (Ward et al., 2000)。幾丁聚醣屬於陽離子聚合物，在細胞試驗中，已被證實可以暫時性的打開 tight junction，提高藥物的滲透能力 (Lin et al., 2005)。由於幾丁聚醣帶正電荷的胺基 ( $-\text{NH}_3^+$  group) 會與負電荷的細胞膜產生吸附作用，進而影響 tight junction 上的 ZO-1 蛋白質，增加細胞膜的細胞間隙通透性，而且幾丁聚醣是一種有效而且安全的 paracellular permeability enhancers (PPEs) (Thanou et al., 2001)。利用幾丁聚醣當藥物載體，可以增加親水性物質或大分子在小腸的吸收，進而提升物質的生體可用率。



圖四、Tight junction 蛋白錯合物之概略結構。

Fig 4. Schematic representation of interactions among tight junction proteins. (Ward et al., 2000)

### (三) 幾丁聚醣具有促進物質滲透腸黏膜細胞進而幫助吸收的原因

#### 1. 生物附著性

陽離子聚合物幾丁聚醣具有帶正電荷的胺基，與帶負電荷的腸黏膜細胞表面產生吸附作用，延長物質的滯留時間，提高物質被吸收的能力。

#### 2. 暫時性的打開 tight junction

幾丁聚醣上的正電荷與 tight junction 產生相互作用，調控 tight junction 打開，使親水性分子或大分子有能力從 paracellular pathway 通透細胞進入血液中。在 Caco-2 細胞實驗，利用量測 monolayers 上的 transepithelial electrical resistance (TEER) 數值代表離子穿過上皮細胞所遭受到的阻礙程度，所以當幾丁聚醣打開 tight junction 時，則 TEER 數值將會因為通過上皮細胞的離子數目增多而降低(Ward et al., 2000)，但將幾丁聚醣移除細胞培養基後，TEER 數值可以恢復，接近原 TEER 數值，因幾丁聚醣強黏著特性，無法將細胞上的幾丁聚醣完全移除所致，卻也證實表面帶正電荷幾丁聚醣具有可逆性調控 tight junction 的能力 (Lin et al., 2005 ; Lin et al., 2007)。

## 四、幾丁聚醣奈米顆粒

### (一) 幾丁聚醣微米級/奈米級顆粒的製備方法

Agnihotri 等人(2004) 指出可利用不同的方法來製備幾丁聚醣微米/奈米顆粒，不過其顆粒大小、顆粒分佈範圍、耐熱與化學安定性以及對藥物控制能力等特性，會有所差異。其製備方法如下：

#### 1. 乳化交聯法 (emulsion cross-linking)

乳化交聯法是利用幾丁聚醣胺基與交聯劑中的醛基產生反應。將幾丁聚醣滴入油相中形成乳化作用 (W/O 型乳劑)，加入界面活性劑安定乳化液滴，再加入交聯劑，如戊二醛 (glutaraldehyde)，強化顆粒硬度。顆粒經過過濾、乙醇清洗及乾燥，即可得幾丁聚醣微米/奈米顆粒 (Akbugu and Durmaz, 1994)。

#### 2. 膠凝/沈澱法 (coacervation and precipitation)

膠凝/沉澱法有兩種方法，第一種方法是利用幾丁聚醣不溶於鹼性溶液的特性，當幾丁聚醣溶液接觸到鹼性溶液後，會產生有膠凝/沈澱的反應。利用空氣壓縮機將幾丁聚醣溶液噴入鹼性溶液 (如 NaOH、NaOH-methanol 或 ethanediamine) 中，再經過濾及多次離心水洗作用，去除殘留的鹼性溶液，即可得幾丁聚醣微米/奈米顆粒 (Nishimura et al., 1986)。此方法的所使用空氣壓縮機的壓力大小 (流速快慢) 及噴嘴的直徑大小都會影響顆粒的粒徑大小。亦可加入交聯劑以增加顆粒的硬度。第二種方法是將 sodium sulfate 溶液滴入幾丁

聚醣酸性溶液中，再加入適當的濃度的交聯劑（glutaraldehyde），攪拌 30 分鐘，再經過離心水洗作用，即可得幾丁聚醣微米/奈米顆粒（Berthod and Kreuter, 1996），此方法製備的顆粒穩定性比上述第一種製備方法佳，但顆粒呈現不規則球型。

### 3. 噴霧乾燥法(spray-drying)

噴霧乾燥法是將幾丁聚醣與藥物溶解在酸性溶液中，再加入適當量的交聯劑，以噴霧乾燥設備的噴嘴器將溶液噴出，使得溶液表面積變大，經過高溫熱空氣作用下，溶液中水分瞬間蒸發，便可得乾燥顆粒，即為幾丁聚醣微米/奈米顆粒（He et al., 1999）。

### 4. 乳化液滴交聯法(emulsion-droplet coalescence method)

乳化液滴交聯法是在 1999 年 Tokumitsu 等人所發展，是利用乳化交聯和沉澱方式，藉由交聯劑使得顆粒結構較為穩定，以幾丁聚醣在 NaOH 溶液中產生沈澱作用，兩種特性的結合製備方式。製備幾丁聚醣乳化液與幾丁聚醣-NaOH 乳化液，將兩溶液高速攪拌，過濾取得顆粒，經過離心水洗作用，即可得幾丁聚醣微米/奈米顆粒。

### 5. 離子膠聯法(ion gelation method)

離子膠凝法是藉由幾丁聚醣在酸性條件下，其胺基帶正電荷與帶負電荷離子進行化學交聯反應。將幾丁聚醣溶解於酸性溶液中，緩慢的加入聚陰離子溶液（如：三聚磷酸鈉），即可得幾丁聚醣微米/奈米顆粒（Kawashima et al., 1985）。

## 7. 逆微胞法(reverse micellar method)

逆微胞法是藉由水、油、表面活性劑組成穩定混合物，以巨觀觀察溶液是否均質及等相。先將介面活性劑與有機溶劑混合，再加入幾丁聚醣及交聯劑後，去除有機溶劑和介面活性劑，即可得幾丁聚醣微米/奈米顆粒 (Leong and Candau, 1982)。

## 8. 篩分法(sieving method)

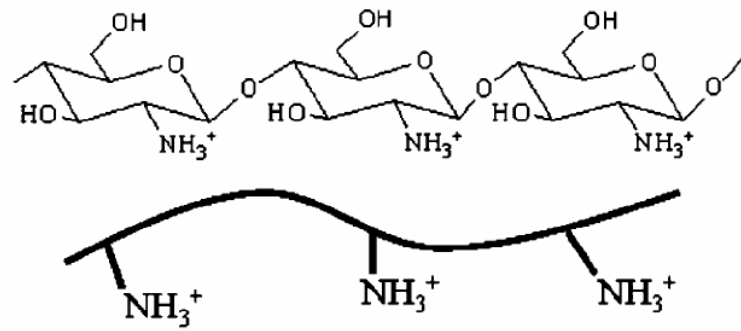
篩分法是由 Agnihotri 及 Aminabhavi (2004)所發展出的，已經是廣泛被應用來製備幾丁聚醣微米顆粒的方法。將幾丁聚醣溶於 4%的醋酸後，加入 glutaraldehyde，形成透明的凍狀物質，再將凍狀物質通過篩網後，顆粒再用 0.1N NaOH 去除 glutaraldehyde，即可得幾丁聚醣微米/奈米顆粒。

### (二) 離子交聯法製備幾丁聚醣奈米顆粒之應用

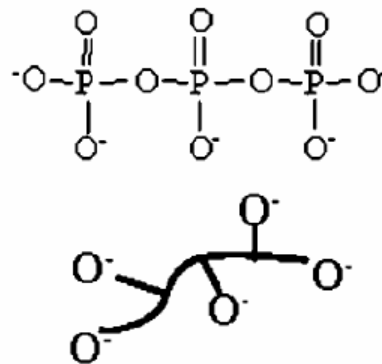
離子交聯法是製備奈米級顆粒最常使用的方法，。將幾丁聚醣溶解於醋酸中，幾丁聚醣在酸性環境下帶有正電荷之 $-NH_3^+$  group 易與負電荷分子進行離子交聯反應 (Ionic cross-linking) 而產生奈米顆粒，最常用之帶負電分子為三聚磷酸鈉 (sodium tripolyphosphate, TPP)，TPP 溶液中具有 $-OH^-$  及 $-P_3O_{10}^{-5}$  與幾丁聚醣之 $-NH_3^+$  進行離子交聯反應 (Mi et al., 1999a)，如圖五。此方法優點在於製備過程簡單，操作方便，且不需要提高溫度也不需使用有機溶劑，有利於維持物質或藥物的活性 (Soppimath et al., 2001)。



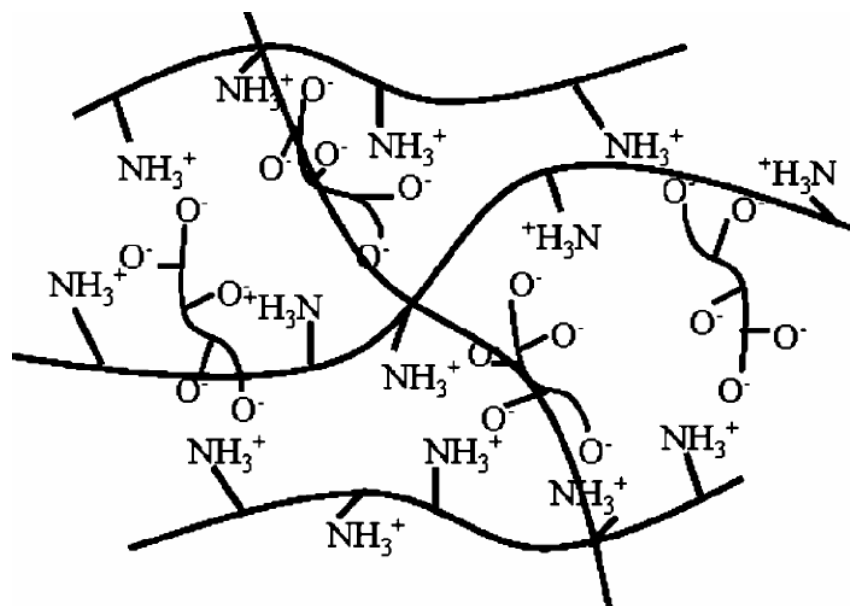
(a) Chitosan in acid solution



(b) Sodium triphosphate (TPP)



(c) Chitosan-TPP crosslinking



圖五、(a) 幾丁聚醣在酸性溶液中的分子結構；(b) 三聚磷酸鈉的分子結構；(c) Chitosan-TPP crosslinking。

Fig 5. (a) Molecular structure of chitosan in acid solution, (b) that of triphosphate (TPP) and (c) ionic crosslinking between chitosan and TPP. (Hsieh et al., 2008).

Calvo 等人(1997)以 chitosan/polyethylene oxide - polypropylene oxide (CS/PEO-PPO)奈米顆粒，包覆 BSA，其奈米顆粒粒徑為 200-1000nm，顆粒表面電荷為+20 mV ~ +60 mV，包覆 BSA 之包覆率高達 80%，且在釋放試驗，奈米顆粒可以持續釋放 BSA 一週之上。

Fernandez-Urrusuno 等人(1999)以幾丁聚醣奈米顆粒為藥物載體，包覆胰島素，經兔子鼻黏膜傳遞試驗，結果發現幾丁聚醣奈米顆粒比幾丁聚醣溶液更可提高鼻黏膜吸收胰島素的能力。

Janes 等人(2001)製備幾丁聚醣奈米顆粒，包覆抗癌藥物 DOX (doxorubicin)，研究在細胞類毒素之體外釋放時，顯示僅微小的突釋 (burst release)，共焦影像發現這些微小粒子可經由細胞的內攝機制 (endocytic mechanism) 進入細胞，且 DOX 可在細胞內釋放，而達到治療的療效。

Pan 等人(2002)以幾丁聚醣奈米顆粒包埋胰島素以不同劑量餵食白老鼠，觀察其血糖變化，結果認為幾丁聚醣奈米顆粒可提高胰島素在腸道的被吸收力，使有糖尿病的白老鼠血糖降低，包覆 21 I.U./kg 的胰島素能使血糖減少延長 15 小時，且生物可利用性比用注射方式高多達 14.9 % 以上。

Janes 及 Alonso (2003)利用  $\text{NaNO}_2$  降解幾丁聚醣分子量製備低分子量幾丁聚醣，低分子量幾丁聚醣與 TPP 離子交聯反應來包覆胰島素，形成具有較小粒徑之幾丁聚醣奈米顆粒，結果得知，顆粒粒徑為 280-360 nm，表面電荷為+40 mV ~ +48 mV，包覆蛋胰島素之包覆率達 70-81 %。

Xu 及 Du (2003)則指出當不同去乙醯度和不同分子量的丁聚醣在製備奈米顆粒，對於 BSA 的包覆率和其體外釋放實驗，結果得知，分子量越高 (80-210 kDa) 其包覆率越高 (18.8-54.4 %)，但是累積釋放率卻越低 (73.9-17.6 %)。

Qi 等人(2004)製備幾丁聚醣奈米微粒包覆 BSA，改變參數包括溫度、pH 值和 CS/TPP 比例，當幾丁聚醣去乙醯度愈高且有較窄的分子量分佈時，愈可控制粒徑大小分佈。當在低 pH 值 (pH 3-5) 環境下，其粒徑越大。在釋放方面，模擬腸道時可有效延長超過 6 天。幾丁聚醣具有抗菌性，在 Qi 等人(2004)發現製備幾丁聚醣奈米顆粒，其結果顆粒粒徑平均為 40 nm，表面電荷為+51 mV，其抗菌活性比幾丁聚醣來得效果更佳。

Vila 等人(2004)在老鼠試驗中，利用低分子量幾丁聚醣 (Mw 23、38 及 70 kDa) 包覆 Tetanus toxoid (TT) 製備幾丁聚醣奈米顆粒作為鼻黏膜給藥。其奈米顆粒粒徑約為 350 nm、表面電荷約為+40 mV 及包覆率為 50-60 %，以共振掃描式顯微鏡觀察鼻黏膜細胞發現幾丁聚醣奈米顆粒較幾丁聚醣溶液通透力高；在動物試驗，幾丁聚醣奈米顆粒可持續控制釋放藥物達六個月以上，達到長期治療效果。

Wu 等人(2005)以不同低分子量幾丁聚醣包覆 ammonium glycyrrhizinate 在奈米顆粒內，其顆粒粒徑小 (>210 nm)，粒徑範圍窄，而可包覆 ammonium glycyrrhizinate 濃度高達 0.5 mg/mL，釋放曲線明顯有突釋現象，但於後續釋放時有緩慢連續釋放的功能。

Deng 等人(2006)利用不同分子量幾丁聚醣包覆 lysozyme 製備幾丁聚醣奈米顆粒，結果得知增加幾丁聚醣分子量、三聚磷酸鈉濃度以及降低 lysozyme 濃度可增加 lysozyme 包覆率(encapsulation efficiency, EE %) 以及控制釋放效果越佳。

Qi 等人(2006)以幾丁聚醣奈米顆粒抑制肝癌細胞。在細胞試驗中粒徑 40 nm 之幾丁聚醣顆粒可有效抑制肝癌細胞；在動物試驗中，以 40、70 及 100 nm 之幾丁聚醣奈米顆粒抑制肝癌細胞，發現粒徑愈小其抑制癌細胞生長能力愈高(抑制能力分別為 61.7、58.9 及 34.9 %)。

Papadimitriou 等人(2008)以幾丁聚醣奈米顆粒包覆 dorzolamid 和 pramipexole，增加藥物在眼角膜上的滯留時間，且延長藥物釋放時間，提高藥物之生體利用率。而當增加幾丁聚醣濃度時，其包覆率及控制持續釋放時間效果較佳，可維持 12 小時以上釋放效果。

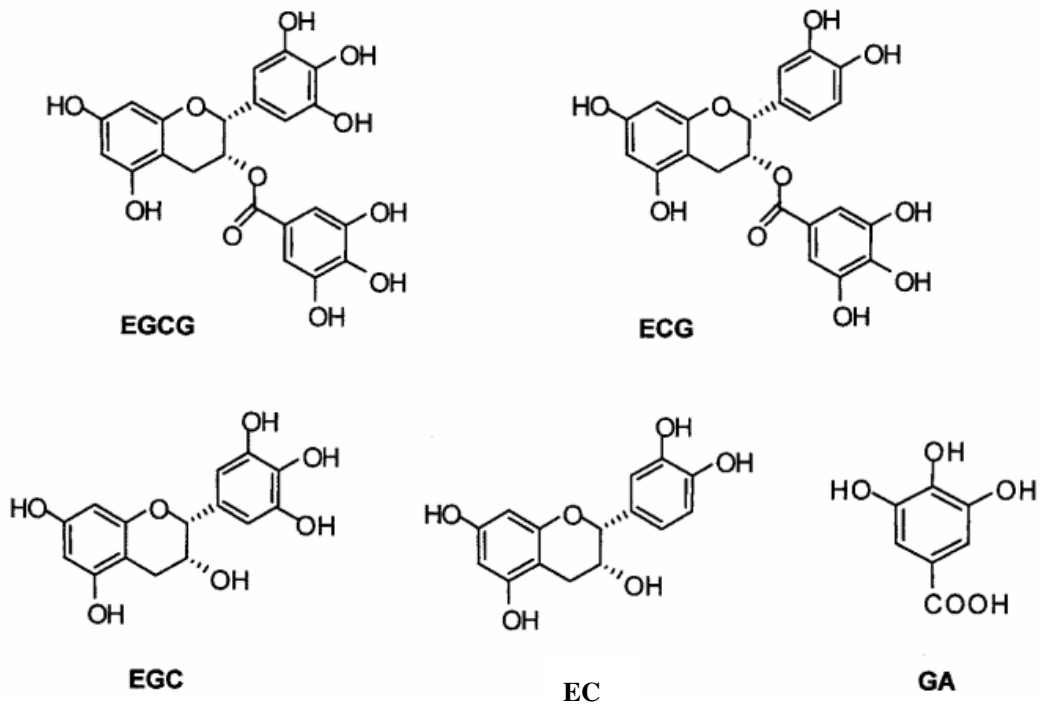
## 四、兒茶素

從古至今，「茶」一直是我們生活中不可或缺的飲料，再加上近年來天然健康食品的提倡，茶所扮演的角色更是舉足輕重，並成為相當熱門的研究主題。茶在中國最初是作為藥材被使用，到西漢初期才逐漸普及為飲料，到了宋朝，飲茶風氣盛，直到如今，茶飲料已成為世界流行的三大非酒精嗜好性飲料之一，更由於茶中含有多種保健及機能性成分，所以茶飲料已被視為保健飲料(顏，2006)。

### (一) 茶葉的化學組成

茶葉中可溶性成分約佔茶葉乾物重量的 30-40% 左右，其中兒茶素是茶中可溶性成分含量最多的。茶中可溶性成分依據組成可分為下列八種：茶多元酚類：其含量佔茶中可溶性成分絕大部分，是茶湯苦澀味的主要來源。依據其結構之差異，可分為以下五大類，其中兒茶素為茶多分類的主要成分：

- 1.黃烷醇類 (flavanols)：又稱兒茶素類 (catechins)，是茶葉中含量最高的多元酚類，約佔總量的 75-80%，其主要成分為游離型的包括 catechin (C)、epicatechin (EC)、epigallocatechin (EGC) 三種，以及酯化的沒食子酸(gallic acid) 之 epicatechin gallate (ECG) 及 epigallocatechin gallate (EGCG) 兩種，其中以 EGCG 含量最高，佔 40~50%。兒茶素類之化學結構如圖六。兒茶素類也是茶湯中澀味主要來源。
- 2.黃酮醇類 (flavonols) 及其配醣體：構造類似花青素，屬於黃色素類化合物，是茶湯水色及澀味主要來源之一。
- 3.無色花青素 (leucoanthocyanins)：花青素具有抗氧化活性，其結構和其抗氧化力有相當大的關係，可以預防心血管疾病，具有肝臟保健功效，以及降低氧化壓力和其它治療效果。
- 4.酚酸 (phenolic acid)：如沒食子酸 (gallic acid)、香豆酸 (coumaric acid) 等。
- 5.氧化態聚合酚類：如茶黃質 (theaflavin)、茶紅質 (thearubigin) 等成分，是兒茶素類經過發酵作用而氧化所形成的產物。



圖六、沒食子酸及兒茶素類之化學結構。

Fig 6. Chemical structure of gallic acid and the four major catechins in green tea: gallic acid (GA); (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG); (-)-epigallocatechin (EGC); (-)-epicatechin-3-gallate (ECG); (-)-epicatechin (EC). (Cabrera et al., 2006)

## (二) 兒茶素類的生理機能性

根據國內外發表的研究報告，證實兒茶素類和其氧化聚合物具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗細胞突變作用、強化微血管活性、增加體內維生素攝取量、降低血液中膽固醇和低密度脂蛋白含量、防護輻射傷害、抑制血壓上升和抗過敏等多種生理功效。近來來，兒茶素的機能性大都集中在細胞或動物試驗其抗氧化性、抑菌、抗癌及抗腫瘤等方面研究，且主要著重在 EGCG 的研究。EGCG 具有很强的抗氧化、抗 DNA 損傷、抗輻射、抗癌及抗腫瘤等活性。

### 1. 抗炎、抗腫瘤作用

兒茶素具有顯著的抗腫瘤活性及抗炎效應，但主要生理活性成分 是 EGCG (Ahmad et al., 2000)。EGCG 抑制了 BALB /3T3 細胞中崗田酸(okadaic acid)誘導的腫瘤壞死因子 2 $\alpha$  (tumor necrosis factor 2 $\alpha$ , TNF2 $\alpha$ ) 的產量和基因的表達 (Suganuma et al., 1996)。EGCG 能抑制巨噬細胞中由脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和干擾 2 $\gamma$ (interferon 2 $\gamma$ ) 誘導的 50 % 以上的 NO 量 (Chan et al., 1995)。在動物模式研究中，使用 EGCG 能抑制已注射致死劑量 LPS 小鼠的死亡率。EGCG 還能減緩患有炎症性結腸病小鼠 (IL222/ 2 C57BL /6 小鼠) 的自體免疫性的炎症反應 (Varilek et al., 2001)。這些結果皆顯示 EGCG 具有 抗炎活性。

## 2. 抑菌作用:

已有大量的研究證明，兒茶素等多酚化合物質具有殺菌或抑菌作用。EGCG 和其他茶多酚類皆有明顯的殺菌或抑菌金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhi*)、腸炎沙門菌 (*Salmonella enteritidis*)、志賀氏流感菌 (*Shigella flexneri*)、志賀氏痢疾菌 (*Shigella dysenteriae*) 綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus*) 及霍亂弧菌 (*Vibrio cholera*) (Bandyopadhyay et al., 2005)，及至胃潰瘍、胃癌的幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) (Yanagawa et al., 2003)、殺滅產孢之肉毒桿菌 (*Clostridium botulinum*)，甚至其他耐熱細菌及食物致病菌 (Ishigami, 1991)。對絕大多微生物而言，EGCG 和 ECG 抑制或殺菌作用比其他兒茶素類型或抗菌素，如四環素 (tetracycline) 和萬古黴素 (vancomycin) 來得效果佳 (Cheng et al., 2007)。

## 3. 消臭作用

茶多酚具有除臭作用，能消除氨 (廁所異味)、三甲胺 (魚腥味)、亞硫酸己二烯酯 (蒜味)、甲硫醇 (口臭) 等異味，且濃度愈高，清除效果愈佳 (河內二郎，1987)。兒茶素，特別是 EGCG，具有明顯快速的除臭作用，對消除口臭物質巯基乙醇 (MeSH) 的效果比常用的除臭劑綠素銅鈉 (SCC) 強 (安田英之，1992)。



#### 4. 降低血脂

兒茶素具有降低低密度脂蛋白，並提高高密度脂蛋白的功效。日本學者曾針對 33 名健康者，每天給予 500 毫克兒茶素類（約 10 杯茶），經 3 個月後測定其血脂含量的變化，結果總膽固醇濃度沒有變化，但高密度脂蛋白膽固醇濃度顯著上升（陳，2005）。

#### 5. 預防齲齒

兒茶素類能強烈抑制生齲菌，臨床上已證明兒茶素類可明顯減少牙菌斑和牙周病指數，但是對口腔中的其他微生物並沒有影響。因此茶中的兒茶素類與氟，可對牙齒構成綜合性的防齲效果（陳，2005）。

## 伍、材料與方法

### 一、實驗材料

粗幾丁質（蟹殼，Chitin）來源：購自高雄應化公司，高雄 台灣。

表沒食子兒茶素沒食子酸酯（Epigallocatechin gallate，EGCG）：  
Sigma，美國。

其他藥品：

1. 醋酸（Acetic acid，17N）：聯工化學廠股份有限公司，台灣。
2. 氫氧化鈉（Sodium hydroxide）：聯工化學廠股份有限公司，台灣。
3. Potassium polyvinyl sulfate soluteon (P.V.S.K)：和光純藥，日本。纖
4. Toluidine blue：Sigma，美國。
5. 纖維酵素（Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC，6.9 units/mg solid）：Sigma，美國。
6. 三聚磷酸鈉（Sodium tripolyphosphate，TPP）：和光純藥，日本。
7. Folin-Ciocalteu's phenol reagent (2N)：Sigma，美國。

### 二、實驗儀器

1. 磨粉機：1hp 型，群策電機工業股份有限公司，台灣。
2. 分析篩網：Tyler 標準規格篩網，Eedecotts 公司，英國。
3. 電磁式過篩機：OCTAGON<sup>DIGITAL</sup>2000 型，Eedecotts 公司，英國。
4. 往復式恆溫震盪器：BT-350，Yih Der 公司，台灣。
5. 真空冷凍乾燥機：EYELAFD-5N，Tokyo 公司，日本。

6. 毛細管黏度計：CANNON 50 型，Cannon 公司，美國。
7. 恆溫水浴槽：TV 4000 型，Tamson 公司，荷蘭。
8. 微量超高速離心機：CS 120GX 型，Hitachi 公司，日本。
9. 超音波細胞打碎機：SONIFER，Branson 公司，德國。
10. 雷射奈米粒徑及界面電位分析儀：Zetasizer Nano 3000HS 型，Malvern Instrument 公司，英國。
11. 掃描式電子顯微鏡：JSM 7000F 型，Jeol 公司，日本。
12. 傅立葉轉換紅外線光譜儀：IR Prestige-21 型，Shimadzu 公司，日本。

### 三、樣品製備

#### (一) 幾丁聚醣之製備

片狀粗幾丁質經磨粉後，過篩，得到介於 40-60 mesh 顆粒之幾丁質。參考沈 (2004) 之方法，將幾丁質加入 57 % (w/v) NaOH 溶液 (20 mL/g chitin)，在  $100 \pm 2^\circ\text{C}$  的溫度下攪拌 160 min，之後去除 NaOH 廢液及逆滲透水沖洗幾丁聚醣去除 NaOH 至中性 pH，乾燥 ( $80^\circ\text{C}$ ，8 hr)，測定其去乙酰度並取得大於 85 % 去乙酰度之幾丁聚醣。

#### (二) 不同分子量幾丁聚醣之製備

參考 Qin 等人(2004)及 Lin 等人(2005)纖維酵素水解幾丁聚醣之實驗方法。取 1g 之幾丁聚醣 (Mw 481.3 kDa) 溶解於 100 mL 之 0.2M 醋酸溶液中，配置 1 % (w/v) 幾丁聚醣溶液，以 4N NaOH 調整溶液 pH 至 5.0，接著加入不同濃度 (1.0、2.5、5.0、7.5 及 10 mg/g chitosan)

之纖維酵素 (cellulase, 6.9 units/mg solid), 於 37°C 水浴震盪反應 12 小時後, 立刻加熱 (100°C, 15 min) 以停止酵素作用, 待溶液冷卻至室溫, 以 4 號濾紙過濾溶液, 再用 4N NaOH 調整溶液 pH 至 7.0 使幾丁聚醣析出, 析出物經過多次高速離心 (21000×g, 30 min)、水洗去除鹽類後, 冷凍乾燥, 測定其分子量並取得所需分子量之幾丁聚醣水解物 (chitosan hydrolysates, CS)。

## 四、實驗方法

### (一) 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉 (CS-TPP) 奈米顆粒之製備

參考 Calvo 等人(1997)之幾丁聚醣奈米顆粒製備方法, 幾丁聚醣之-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> group 正電荷與三聚磷酸鈉 (sodium tripolyphosphate, TPP) 之-P<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>5-</sup>、-HP<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>4-</sup>及-OH<sup>-</sup> group 負電荷產生離子交聯作用 (ionic-crosslinking) 形成幾丁聚醣奈米顆粒。

#### 1. pH 對 CS-TPP 奈米顆粒製備影響之試驗

將幾丁聚醣 (Mw 481.3 kDa) 溶於 1 % (v/v)之醋酸中, 使其濃度為 2.00 mg/mL, 調其 pH 至 3.4(original)、4.7 及 6.0; 另外將 TPP 溶於去離子水中, 為 0.84 mg/mL 之濃度, 並將 TPP 溶液調 pH 至 3.0、5.0 及 9.0(original)。各別取 5 mL 之不同 pH (3.4、4.7 及 6.0) 之幾丁聚醣溶液緩慢滴入 2 mL 之不同 pH (3.0、5.0 及 9.0) TPP 溶液中, 使得 CS/TPP 重量比為 6/1, 溶液攪拌 1 hr 後, 觀察其懸浮液的巨觀型態, 再將懸浮液離心 (16000×g, 30 min, 15°C), 得沈澱物, 即

CS-TPP 奈米顆粒，並測定其粒徑。

## 2. 幾丁聚醣分子量及 CS/TPP 重量比對 CS-TPP 奈米顆粒影響之試驗

將不同分子量 (Mw 481.3、353.3、163.2 及 85.2 kDa) 之幾丁聚醣溶於 1 % (v/v) 之醋酸中，各別配置 0.67、1.00、1.34、1.68 及 2.00 mg/mL 之濃度及調 pH 至 4.7。各別取 5 mL 上述幾丁聚醣溶液，緩慢滴入 2 mL TPP 溶液 (0.84 mg/mL, pH 9.0) 中，使得混和液中 CS/TPP 重量比為 2/1、3/1、4/1、5/1 及 6/1，攪拌 1 hr，加入 1 mL 之 1 % (v/v) 甘油，再攪拌 5 min 後，離心 (16000×g, 30 min, 15°C)，得沈澱物，即 CS-TPP 奈米顆粒，並測定其粒徑、表面電荷及 SEM 照相觀察。

## (二) 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG (CS-TPP-EGCG) 奈米顆粒之製備

### 1. TPP 溶液之 pH 對不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 之效率及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒粒徑影響之試驗

參考 Zhang 及 Kosaraju (2007)，即將不同分子量 (481.3、353.3、163.2 及 85.2 kDa) 之幾丁聚醣各別溶於 1 % (v/v) 之醋酸中，使其濃度為 2.00 mg/mL，並調 pH 至 4.7。另外，將 EGCG 各別加入不同 pH (3.0、5.0 及 9.0) 之 TPP 溶液 (0.84 mg/mL)，使其濃度為 0.5 mg EGCG /mL TPP solution，攪拌溶解 10 min。將 5 mL 上述幾丁聚醣樣品溶液緩慢滴入 2 mL 含 EGCG 之 TPP 溶液，此時 EGCG 濃度及 CS/TPP 重量比分別為 0.2 mg/mL CS solution 及 6/1，攪拌 1 hr，加入 1 mL 之 1 %

(v/v)甘油，再攪拌 5 min 後，離心 (16000×g, 30 min, 15°C)，得沈澱物，即 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒，取上清液測 EGCG 含量，計算其包覆率，並測定其顆粒粒徑。

## 2. CS/TPP 重量比對不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 之效率及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒粒徑影響之試驗

將 1 mg 之 EGCG 溶於 2 mL TPP 溶液(0.84 mg/mL, pH 9.0)中 10 min。取 5 mL 不同濃度 (0.67、1.00、1.34、1.68 及 2.00 mg/mL) 之不同分子量 (481.3、353.3、163.2 及 85.2 kDa) 之幾丁聚醣溶液 (pH 4.7)，各別緩慢加入 2 mL 含有 EGCG 之 TPP 溶液中，此時 EGCG/CS solution 及 CS/TPP 重量比分別為 0.2 mg/mL 及 2/1、3/1、4/1、5/1 及 6/1，攪拌 1 hr，加入 1 mL 之 1% (v/v)甘油，再攪拌 5 min 後，將懸浮液離心 (16000×g, 30 min, 15°C)，得沈澱物，即 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒，取上清液測 EGCG 含量，計算其包覆率，並測定其顆粒粒徑、表面電位以及 SEM 觀察照相。

$$\text{EGCG 包覆率}(\%) = \frac{\text{EGCG 總含量} - \text{上清液中測得之 EGCG 含量}}{\text{EGCG 總含量}} \times 100$$

### 3. EGCG 濃度對不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 之效率及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒粒徑影響之試驗

將 0.5、1.0、1.5、2.0 及 2.5 mg EGCG 分別溶於 2 mL TPP 溶液 (0.84 mg/mL, pH 9.0) 中 10 min。各別取 5 mL 之不同分子量 (481.3、353.3、163.2 及 85.2 kDa) 之幾丁聚醣溶液 (2.00 mg/mL, pH 4.7) 緩慢加入含有 EGCG 之 TPP 溶液中，此時 CS/TPP 重量比為 6/1 及 EGCG 濃度分別為 0.1、0.2、0.3、0.4 及 0.5 mg/mL CS solution，攪拌 1 hr 後，加入 1 mL 之 1% (v/v) 甘油，再攪拌 5 min 後，離心 (16000×g, 30 min, 15°C)，得沈澱物，即 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒取上清液測 EGCG 含量，計算其包覆率，並測定其粒徑。

### (三) 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 奈米顆粒於模擬胃或腸液 pH 之安定性

#### 1. CS-TPP-EGCG 奈米顆粒之製備

將 1 mg EGCG 溶於 2 mL TPP 溶液 (0.84 mg/mL, pH 9.0) 中 10 min。各取 5 mL 不同分子量 (481.3、353.3、163.2 及 85.2 kDa) 之幾丁聚醣溶液 (2.00 mg/mL, pH 4.7)，緩慢加入 2 mL 含有 EGCG 之 TPP 溶液中，使得 CS/TPP 重量比為 6/1，攪拌 1 hr 後，離心 (16000×g, 30 min, 15°C)，得 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒，並取上清液測 EGCG 含量，計算 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒中 EGCG 含量。

## 2. 模擬胃液中 (pH 1.2) 之安定性 (Zhang and Kosaraju, 2007)

將 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒置於 6 mL 鹽酸緩衝溶液 (pH 1.2) 之 50 mL 三角錐形瓶，於恆溫水浴槽中震盪 (37°C, 75 rpm)，按時 0.5、1 及 2 小時取出 0.5 mL 溶液樣品，測定其 EGCG 之含量並以下列公式計算其時間累積 EGCG 之釋放率，同時再加回 0.5 mL 鹽酸緩衝溶液，使瓶內維持一定體積。

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

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

$W_n$ ：時間累積 EGCG 總含量

$W$ ：CS-TPP-EGCG 奈米顆粒中 EGCG 總含量

$n, a$ ：取樣次數

$C$ ：測定 EGCG 之濃度

$V$ ：總溶液體積

$V_s$ ：採取樣品體積

## 3. 模擬腸液中 (pH 7.4) 之安定性 (Zhang and Kosaraju, 2007)

將 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒置於 6 mL 磷酸緩衝溶液 (pH 7.4) 之 50 mL 三角錐形瓶於恆溫水浴槽中震盪 (37°C, 75 rpm)，按時 0.5、1、2、3、4、5 及 6 小時取出 0.5 mL 溶液樣品，測定其 EGCG 之含量並以上述公式計算其時間累積 EGCG 之釋放率，同時再加回 0.5 mL 磷酸緩衝溶液，使瓶內維持一定體積。



## 五、分析方法

### (一) 幾丁聚醣去乙醯程度之測定

約取 0.02g 幾丁聚醣樣品及標準品，並紀錄其精確重量值，再溶於 10 mL 之 0.2M 醋酸中，室溫下攪拌一小時後加入 40 mL 蒸餾水稀釋體積五倍；取 5 mL 樣品溶液，滴定前才加入 0.5 mL 之 toluidine blue 指試劑，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，表示溶液到達滴定終點。利用標準品之滴定量與重量和樣品之滴定量和重量做計算即可知樣品的去乙醯度 (Toei and Kohara, 1976)。

### (二) 幾丁聚醣分子量之測定

參考 Wang et al. (1991) 利用毛細管黏度計測定幾丁聚醣樣品溶液黏度並求其平均分子量。即將 0.10g 幾丁聚醣樣品溶於 200 mL 之 0.2M CH<sub>3</sub>COOH / 0.1M CH<sub>3</sub>COONa 溶媒中，配置 0.01、0.02、0.03、0.04 和 0.05 g/dL 五種幾丁聚醣溶液濃度 (C, g/dL)。取 7 mL 溶媒及各取 7 mL 上述幾丁聚醣樣品溶液，注入毛細管黏度計(Cannon)中，測量溶液通過毛細管柱上下線的所需時間，測定三重複，求時間平均。恆溫水浴槽溫度設定 30 ± 0.05°C。可得到以下列各數據：

溶媒 (0.2M CH<sub>3</sub>COOH / 0.1M CH<sub>3</sub>COONa) 溶液通過毛細管柱上下線的所需時間：t<sub>0</sub>

幾丁聚醣溶液通過毛細管柱上下線的所需時間：t

毛細管黏度計校正常數：K

溶媒 (0.2M CH<sub>3</sub>COOH / 0.1M CH<sub>3</sub>COONa) 溶液黏度： $\eta_{\text{solvent}} = Kt_0$

幾丁聚醣樣品溶液黏度： $\eta_{\text{solution}} = Kt$

相對黏度： $\eta_r = \eta_{\text{solution}} / \eta_{\text{solvent}}$

比黏度： $\eta_{\text{sp}} = (\eta_{\text{solution}} - \eta_{\text{solvent}}) / \eta_{\text{solvent}}$

還原黏度： $\eta_{\text{reduced}} = \eta_{\text{sp}} / C$

將上述數據代入 Huggins Plot ( $\eta_{\text{sp}}/C$  V.S.  $C$ ) 和 Kraemer Plot

( $\ln(\eta_r/C)$  V.S.  $C$ )，求得極限黏度 (intrinsic viscosity)， $[\eta]$ 。

$[\eta] = (\eta_{\text{sp}} / C)_{C \rightarrow 0} = (\eta_{\text{reduced}})_{C \rightarrow 0}$ ，

所得的極限黏度  $[\eta]$  再代入 Mark-Houwink Equation 則可求得幾丁聚醣之黏度平均分子量。

Mark-Houwink Equation 方程式： $[\eta] = k MW^a$

$$k = 1.64 \times 10^{-30} DD^{14}$$

$$a = -1.02 \times 10^{-2} DD + 1.82$$

不同去乙醯度幾丁聚醣之  $k$  值和  $a$  值，如表五。此實驗採用 91% 乙醯度之幾丁聚醣。

表四、不同去乙醯度幾丁聚醣之  $k$  值和  $a$  值

Table 4.  $k$  value and  $a$  value of different deacetylated degree of chitosan

Solvent	Degree of deacetylation (DD%)	$k$ (dL/g)	$a$
0.2M	69	$0.104 \times 10^{-5}$	1.12
CH <sub>3</sub> COOH	84	$1.424 \times 10^{-5}$	0.96
/0.1M	91	$6.589 \times 10^{-5}$	0.88
CH <sub>3</sub> COONa	100	$16.80 \times 10^{-5}$	0.81

(Wang et al., 1991)

### (三) 奈米顆粒粒徑和表面電荷之測定

利用奈米粒徑及界面電位分析儀 (Zetasizer Nano) 測定奈米顆粒大小及表面電荷。為了避免偵測到灰塵等顆粒較大的雜質，實驗前所有樣品等溶液先以 0.45  $\mu\text{m}$  過濾膜過濾再製備奈米顆粒。將 CS-TPP 奈米顆粒及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒懸浮於 3 mL 之 1% tween 20 溶液中，使用超音波細胞打碎機打散樣品 (40% duty cycle, 20 secs)，使顆粒均勻分散於溶液中，待靜置 10-15 min 後，取 1 mL 上層溶液，以動態光散射法 (dynamic light scattering method) 測定粒子粒徑大小。將 CS-TPP 奈米顆粒及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒懸浮於 5 mL 之 0.1 mM KCl 溶液中，測定樣品表面電荷。所有樣品皆測定三次，求其平均值 (mean  $\pm$ SD)。

### (四) EGCG 含量之測定

用總酚量分析 (total phenolic assay) 之 folin-ciocalteu 方法 (Kujala et al., 2000)，測定上清液中未包覆之 EGCG 總含量。以沒食子酸 (gallic acid) 為標準品進行測定。取 0.5 mL 不同濃度 (5, 10, 15, 20 及 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 沒食子酸於 15 mL 試管中，加入 0.5 mL 之 folin-ciocalteu 試劑 (1N)，混合均勻並靜置 5 min 後，添加 1 mL 之 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  在室溫下靜置 10 min，將溶液離心 (1000 rpm, 8 min) 使沉澱物與溶液分離，取上層澄清液，利用分光光譜儀測量波長 730 nm 之吸收值，並根據此吸光值與沒食子酸濃度之關係求出標準曲線之迴歸式。取樣品上清液取代標準品，並依照相同方式進行反應與吸收值測量。即可計算出上清液中未被包覆之總 EGCG 含量。

## (五) 幾丁聚醣、三聚磷酸鈉及 EGCG 間之交互作用 (cross-linking)

CS-TPP 奈米顆粒及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒經冷凍乾燥，取得其粉末顆粒，儲存備用。將 CS 粉末、CS-TPP 奈米顆粒粉末及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒粉末分別與 KBr 以 1:99 比例研磨混和，利用傅利葉轉換紅外線光譜分析 (FTIR) 測量波數  $400-4000\text{ cm}^{-1}$  之間的吸收光譜。

## (六) 掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察

CS-TPP-EGCG 奈米顆粒以去離子水多次反覆離心水洗作用，去除樣品中的鹽類，再將顆粒覆懸於 1 mL 去離子水中，在超音波震盪機下震盪 30 min 後，冷凍乾燥，將樣品中水分完全去除 (顯微鏡觀看前，將樣品乾燥皿中)，再以離子附膜機將樣品鍍上一層適當厚度的白金後，方能觀察照相。

## 六、統計分析

試驗數據 SAS 套裝軟體進行全隨機設計 (completely randomized design) 並以變異分析 (ANOVA) 及 Duncan's new multiple Range test 比較樣品間差異顯著性， $p < 0.05$  為有顯著差異。

## 陸、結果與討論

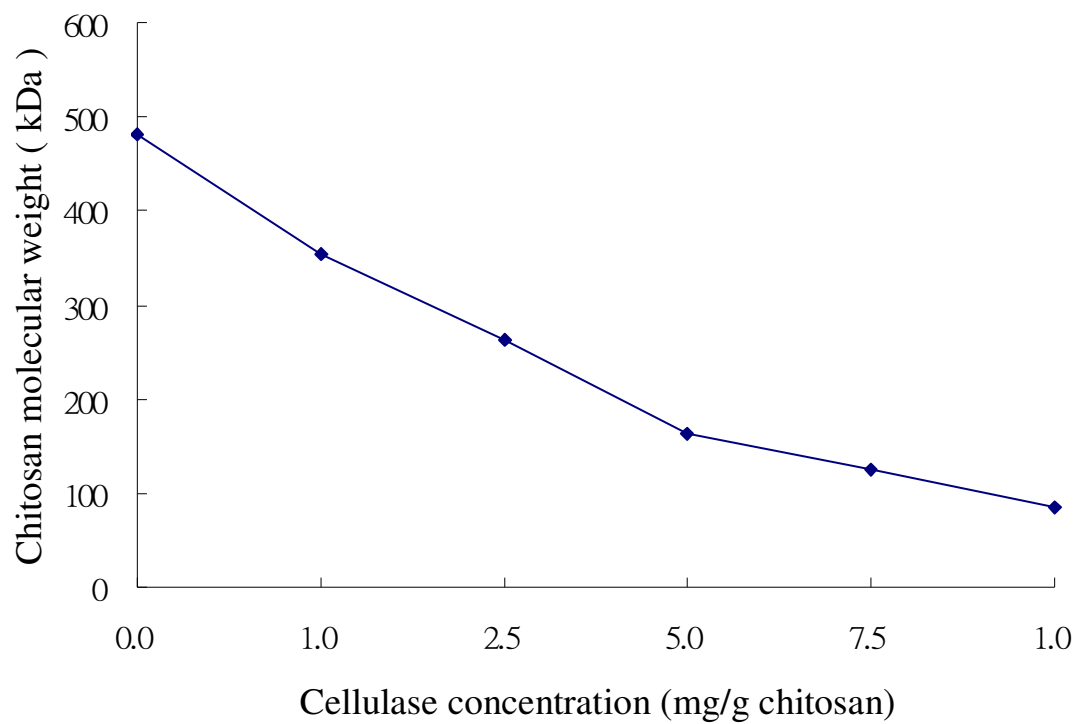
### 一、樣品製備

#### (一) 幾丁聚醣之製備

幾丁質經過高溫及強鹼處理後，會使得幾丁質結構上的乙醯基 (-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, acetyl group) 去除，轉變成胺基 (-NH<sub>2</sub>, amino group)，為幾丁聚醣。本實驗，參考沈 (2004) 實驗方法，欲製備大於 85 % 去乙醯度之幾丁聚醣，條件以 1g chitin/20mL NaOH (57 %, w/v) 比例在 100 ±2°C 的溫度下攪拌 160 min。結果可將幾丁聚醣去乙醯度至 91 %。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 tight junctions，有利於藥物、營養物質等滲透吸收 (Huang et al., 2004; Lin et al., 2005)。Wu 及 Du (2003) 研究指出增加幾丁聚醣去乙醯度 (75.5-92 %)，可增加 BSA 之包覆率及降低 BSA 之釋放速率。

#### (二) 不同分子量幾丁聚醣之製備

纖維酵素水解幾丁聚醣製備不同分子量幾丁聚醣，其專一性高，產率高，且反應效果佳。本實驗取 91 % 去乙醯度之幾丁聚醣 (Mw 481.3 kDa) 經不同濃度之纖維酵素 (6.9 units/mg solid) (1.0、2.5、5.0、7.5 及 10 mg/g chitosan) 水解 12 小時後，可製備出不同分子量之幾丁聚醣，分別為 353.3、262.2、163.2、125.0 及 85.2 kDa (圖七)，其反應之再生性佳，可製出低分子量之幾丁聚醣水解物 (chitosan hydrolysates, CS) 至 85.2 kDa。在醫學方面，商業性纖維酵素應用



圖七、纖維酵素濃度對幾丁聚醣水解度之影響。

Fig 7. Effect of cellulase concentration on the degree of chitosan hydrolysis.

於製備低分子量之幾丁聚醣，具有抗腫瘤活性（Qin et al., 2004）及免疫活性（Wu and Tsai, 2004）等功效。

## 二、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉（CS-TPP） 奈米顆粒之製備

### （一）巨觀觀察

幾丁聚醣溶於酸性溶液時，呈現正電荷之胺基（ $-\text{NH}_3^+$ ），當其溶液之 pH 接近其  $\text{pKa} \sim 6.3$ ，其  $-\text{NH}_3^+$  會再度轉為不帶電荷之  $-\text{NH}_2$ 。TPP 溶水中時，pH 約為 9.0 (original)，其溶液呈現負電荷為  $-\text{OH}^-$ 、 $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  及  $-\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ ；當 TPP 溶液在 pH 5.0 時，則呈現  $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  及  $-\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ ；而 TPP 溶液在 pH 3.0 時，完全解離為  $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 。當 TPP 溶液與幾丁聚醣溶液混合時，這些負電荷會互相競爭與幾丁聚醣之  $-\text{NH}_3^+$  產生離子交聯反應（Mi et al., 1999a,b；Ko et al., 2002）。

圖八（a）所示幾丁聚醣溶液在 pH 3.4(original)各別與 TPP 溶液在 pH 3.0、5.0 及 9.0 交互作用（由左至右），由圖中看出這些混合溶液均呈澄清狀，此代表均無形成 CS-TPP 顆粒。此可能因幾丁聚醣在 pH 3.4 溶液中，其結構上帶有較多正電荷（ $-\text{NH}_3^+$  group），互相排斥作用使得幾丁聚醣結構形成長鏈狀，成骨架伸展狀態，而其分子量愈大，分子鏈愈長（Mi et al., 1999a）（如圖九），使 TPP 之負電荷與幾丁聚醣不易產生離子交互作用，不易形成凝膠顆粒。圖八（b）所示幾丁聚醣溶液在 pH 4.7 各別與 TPP 溶液在 pH 3.0、5.0 及 9.0 交互作用（由左至右），由圖中看出溶液呈現明顯的乳白色懸浮液，表示幾丁聚醣與 TPP 交互作用形成 CS-TPP 奈米顆粒。此可能因幾丁聚



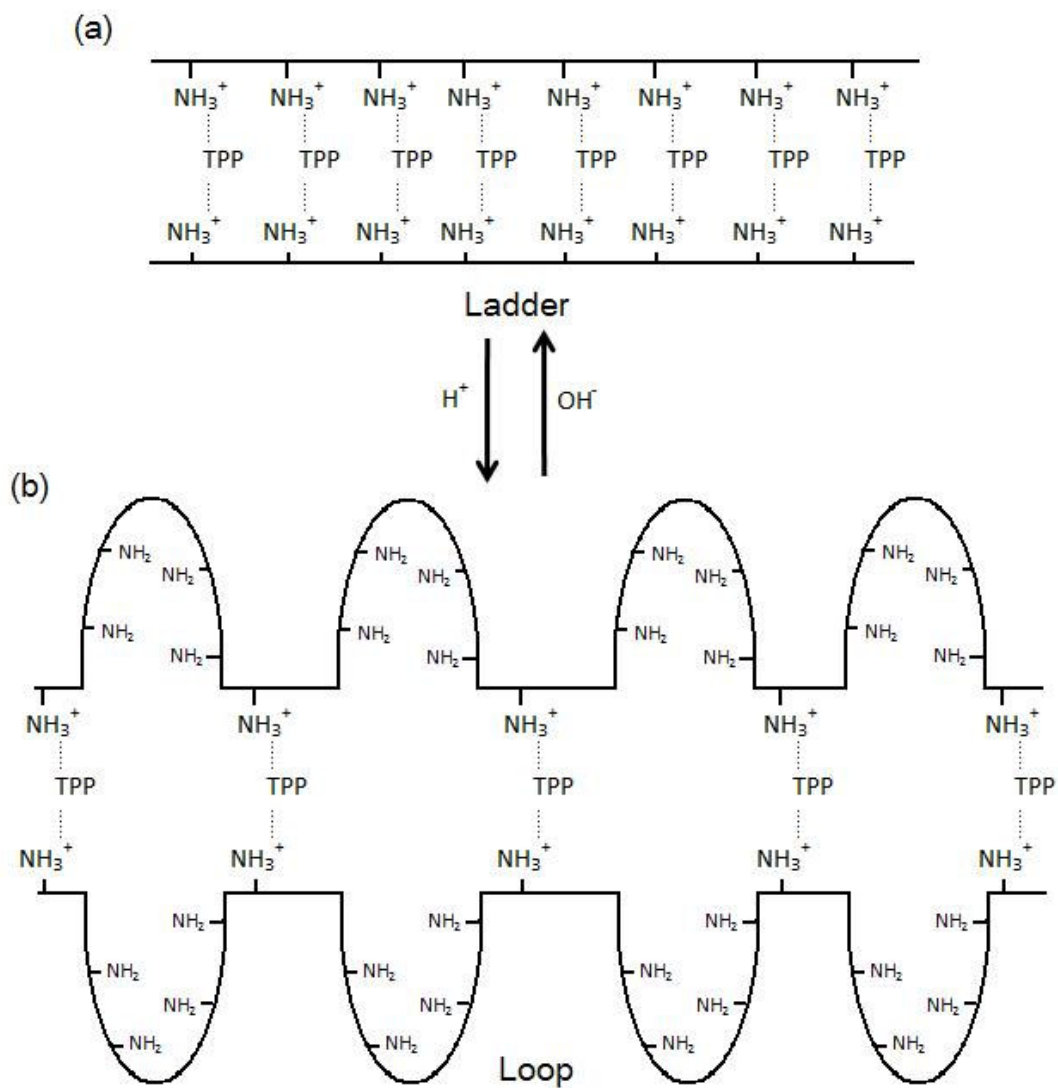
圖八、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉奈米顆粒懸浮液之巨觀分析。

Fig 8. The suspension of CS-TPP nanoparticles by visual observation.

(a) CS solution' pH 3.4 (original) and TPP solution's pH 3.0, 5.0 and 9.0 (left→right); (b) CS solution's pH 4.7 and TPP solution's pH 3.0, 5.0 and 9.0 (left→right); (c) CS solution's pH 6.0 and TPP solution's pH 3.0, 5.0 and 9.0 (left→right).

(CS Mw: 481.3 kDa; CS/TPP mass ratio: 6/1)





圖九、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉在不同 pH 值下之鍵結情形。

Fig 9. Ladder-loop transition of chitosan-TPP complex structures:

(a) ladder type; (b) loop type. (Mi et al., 1999a)

醣溶液在 pH 4.7 時，其鏈上帶有部分的未解離之胺基 (-NH<sub>2</sub> group)，使結構呈現部分捲曲狀，使結構比伸展狀態結構較為安定，而與 TPP 負電荷產生離子交互作用，易形成膠體顆粒 (Mi et al., 1999a) (如圖九)。圖八(c)所示幾丁聚醣溶液在 pH 6.0 各別與 TPP 溶液在 pH 3.0、5.0 及 9.0 交互作用 (由左至右)，由圖中看出溶液中顆粒產生聚集沉澱現象，顆粒大小介於奈米級和微米級之間，且顆粒大小分布範圍寬 (莊，2004)。其顆粒較大之原因，由於 CS-TPP 混合溶液之 pH 為 6.0~6.1，接近幾丁聚醣之 pKa~6.3，使幾丁聚醣變性，溶解性差，其溶液變為霧狀、沈澱而形成幾丁聚醣顆粒顆粒大。整合上述結果，得知以幾丁聚醣溶液在 pH 4.7 下，CS-TPP 之懸浮液中幾丁聚醣顆粒為奈米級，而 TPP 溶液於 pH 9.0 時有三種負電荷 (-OH<sup>-</sup>、-P<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>5-</sup>及 -HP<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>4-</sup>)，故更有效與幾丁聚醣之-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>發生作用產生更多 CS-TPP 奈米顆粒 (霧狀較濃)。

## (二) TPP 溶液 pH 值、幾丁聚醣分子量、CS/TPP 重量比對 CS-TPP 奈米顆粒粒徑之影響

由上述巨觀觀察，幾丁聚醣溶液之 pH 3.0 或 pH 6.0 不宜製備 CS-TPP 奈米顆粒。故本實驗以下皆以幾丁聚醣溶液 pH 4.7 為樣品，探討不同 pH 之 TPP 溶液及不同 CS/TPP 重量比對不同分子量幾丁聚醣產生 CS-TPP 奈米顆粒粒徑之影響。

### 1. TPP 溶液 pH 值對 CS-TPP 奈米顆粒粒徑之影響

表五所示不同分子量之幾丁聚醣溶液 (pH 4.7) 各別與不同 pH (3.0、5.0 及 9.0) 之 TPP 溶液混合作用產生交聯反應，CS-TPP

表五、幾丁聚醣分子量及三聚磷酸鈉溶液 pH 對幾丁聚醣-三聚磷酸鈉  
奈米顆粒粒徑之影響。

Table 5. Effect of CS molecular weight and pHs of TPP solution on the  
particle size of CS-TPP nanoparticles.

CS Mw ( kDa )	Particle size (nm)			
	85.2	163.2	353.3	481.3
TPP solution's pH				
3.0	226.6 ±8.7 <sup>Ca</sup>	242.0 ±5.0 <sup>Ca</sup>	253.5 ±8.5 <sup>Bab</sup>	250.8 ±3.3 <sup>Ab</sup>
5.0	250.5 ±2.0 <sup>Bab</sup>	262.6 ±2.8 <sup>Ba</sup>	241.9 ±8.1 <sup>Bbc</sup>	237.1 ±4.9 <sup>Bc</sup>
9.0 (original)	315.2 ±3.1 <sup>Aa</sup>	297.7 ±1.5 <sup>Ab</sup>	278.9 ±1.8 <sup>Ac</sup>	256.9 ±5.9 <sup>Ad</sup>

\* CS solution: pH 4.7; CS/TPP mass ratio: 6/1.

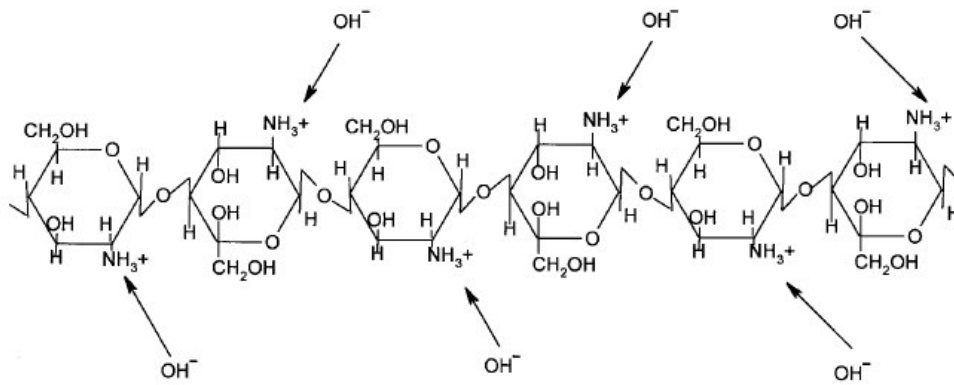
\* The result of particle size (nm) as mean ±SD (n=3).

\* <sup>A-B</sup> mean in the same column (TPP solution's pH) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

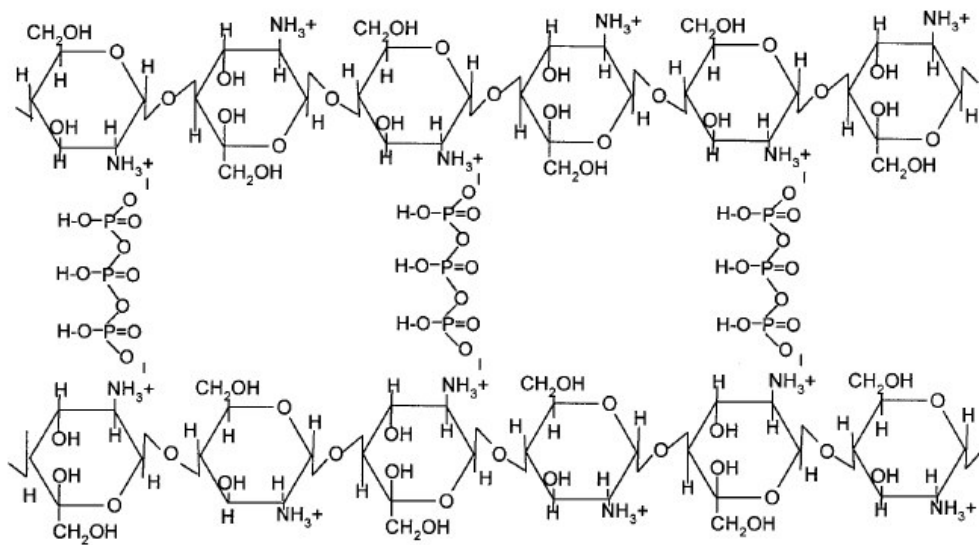
\* <sup>a-d</sup> mean in the same column (CS Mw) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

奈米顆粒粒徑大小之結果。結果顯示，在 TPP 溶液在 pH 3.0 及 5.0 下，幾丁聚醣分子量對於 CS-TPP 奈米顆粒粒徑大小並無明顯的差異性，顆粒徑約 226.6-262.6 nm，但 TPP 溶液在 pH 9.0 下，則隨著幾丁聚醣分子量愈小 (481.3-85.2 kDa)，CS-TPP 奈米顆粒粒徑幾乎愈大 (256.9-315.2 nm)，推測可能是低分子量幾丁聚醣緩慢滴入 TPP 溶液時，因其分子鏈短，結構立體障礙小，與 TPP 有更大的空間交互作用，可充分的產生離子交聯反應，使得顆粒粒徑愈大，且因 TPP 溶液中  $-\text{OH}^-$ 、 $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  及  $-\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$  此三種負電荷離子與幾丁聚醣之  $-\text{NH}_3^+$  結合，使其顆粒粒徑較大之故。

Mi 等人(1999a) 研究指出 TPP 溶液 pH 會影響 TPP 的解離狀況，當 TPP 溶液在 pH 9.0 時，溶液中  $-\text{OH}^-$ 、 $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  及  $-\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$  三種負電荷會互相競爭與幾丁聚醣之  $-\text{NH}_3^+$  結合， $-\text{OH}^-$  與幾丁聚醣之  $-\text{NH}_3^+$  作用為去質子交聯反應，而  $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  與幾丁聚醣之  $-\text{NH}_3^+$  作用為離子交聯反應，兩者交互反應作用，形成幾丁聚醣顆粒 (如圖十)。當 TPP 溶液在 pH 5.0 時，溶液中存在  $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  及  $-\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ ，會與幾丁聚醣之  $-\text{NH}_3^+$  產生離子交聯反應。當 TPP 溶液在 pH 3.0 時，TPP 溶液中只有  $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  存在，此時幾丁聚醣之  $-\text{NH}_3^+$  與  $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  完全離子交聯反應。Bhumkar 及 Pokharkar (2006) 將幾丁聚醣溶液分別與 TPP 溶液在 pH 3.0 及 9.0 混合反應作用，藉由 SEM 觀察幾丁聚醣-TPP 離子交聯結構，發現 TPP 溶液在 pH 3.0 時，其膜表面結構較為緊密，孔隙小，而 TPP 溶液在 pH 9.0 時，其膜表面結構較為鬆散，孔隙較大。



(a) Deprotonation



(b) Ionic Crosslinking

圖十、幾丁聚醣與三聚磷酸五鈉鍵結機制：(a) 去質子作用；(b) 離子交聯。

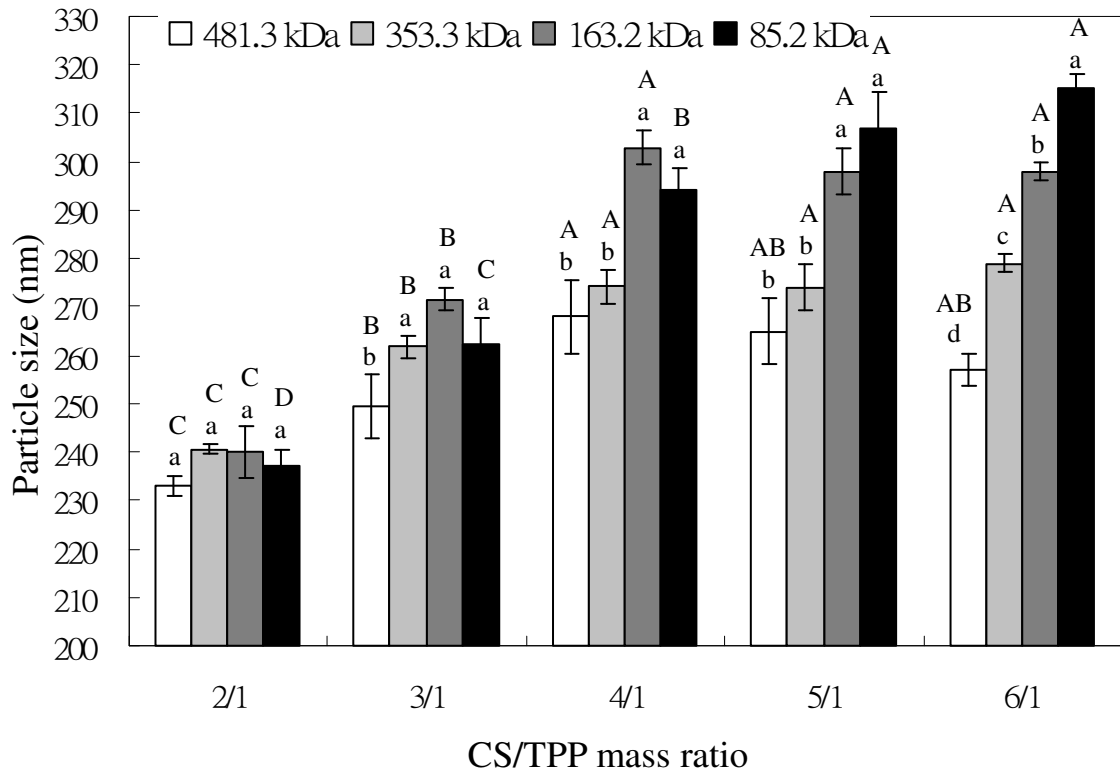
Fig 10. Ionic interaction of chitosan in pentasodium tripolyphosphate aqueous (a) deprotonation, (b) ionic crosslinking.

(Mi et al., 1999a)

## 2. CS/TPP 重量比對 CS-TPP 奈米顆粒粒徑之影響

將不同濃度 (0.67、1.00、1.34、1.68 及 2.00 mg/mL) 之不同分子量幾丁聚醣溶液 (pH 4.7), 緩慢滴入 TPP 溶液 (0.84 mg/mL, pH 9.0) 中, 使 CS/TPP 重量比為 2/1、3/1、4/1、5/1 及 6/1, 攪拌作用, 產生 CS-TPP 奈米顆粒, 其粒徑大小結果如圖十一。無論幾丁聚醣之分子量大小, CS/TPP 重量比愈大, 其 CS-TPP 奈米顆粒之粒徑愈大, 範圍為 232.8-315.2 nm。其原因為 CS/TPP 重量比較小時, 表示幾丁聚醣量少,  $-\text{NH}_3^+$  亦少, 使 CS-TPP-CS 交聯作用不夠多而形成較小之 CS-TPP 顆粒。Gan 等人(2005)以不同濃度 (0.05-0.3 %, w/v) 之幾丁聚醣溶液與固定濃度 (0.7 mg/mL) 之 TPP 溶液反應 (CS/TPP 重量比為 3/1-7/1) 製備幾丁聚醣奈米顆粒粒徑分佈趨勢結果相符。

在幾丁聚醣分子量之影響而言, 以 CS/TPP 重量比 6/1 為例, 其分子量愈小 (Mw 481.3、353.3、163.2 及 85.2 kDa), 其顆粒粒徑愈大 (256.9、278.9、297.7 及 315.2 nm), 推測可能低分子量之幾丁聚醣, 其溶液黏度較低, 立體障礙小, 與 TPP 產生交聯作用容易之結果。Ko 等人(2002)將不同分子量 ( $2.5 \times 10^6$ - $6.5 \times 10^6$  Da) 之幾丁聚醣乳化液 (O/W emulsion) 噴入 TPP 溶液 (pH 5.0), 製備幾丁聚醣微米顆粒, 粒徑大小為 500-710 $\mu\text{m}$ , 進一步以掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察微米顆粒結構, 發現低分子量者, 其內部結構較鬆散, 孔隙大。因此本實驗 85.2 kDa 者其粒徑結構可能較為鬆散, 造成粒徑較大。



圖十一、幾丁聚醣分子量及幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比對幾丁聚醣-三聚磷酸鈉顆粒粒徑之影響。

Fig 11. Effect of CS molecular weight and CS/TPP mass ratio on the CS-TPP particle size.

( CS solution: pH 4.7; TPP solution: pH 9.0)

<sup>A-D</sup> mean in the same bar (CS/TPP mass ratio) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>a-d</sup> mean in the same bar (CS Mw) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 3. CS-TPP 奈米顆粒之表面電荷

由表六，可知所有 CS-TPP 奈米顆粒之表面電荷均為帶正電，其改變範圍約 +25.1~ +28.8 mV。幾丁聚醣分子量之大小對顆粒表面電荷之影響並不明顯。此結果與 Wu 等人(2005)相似，作者以 24-360 kDa 之幾丁聚醣與 TPP 離子交聯反應製備 CS-TPP 奈米顆粒，其表面電荷並無顯著差異性，約+45 mV 左右。CS/TPP 重量比為 2/1 者之電荷較其他 CS/TPP 重量比者稍低些，因為幾丁聚醣濃度較低（CS 帶正電荷）；CS/TPP 重量比為 3/1-6/1 者，雖幾丁聚醣濃度增加，其表面電荷並無明顯差異，此原因可能幾丁聚醣與 TPP 反應結合為顆粒時，幾丁聚醣本身亦被包覆在顆粒中或 TPP 離子之負電荷與幾丁聚醣之正電荷反應完全之故。



表六、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉奈米顆粒之表面電荷 (mV)。

Table 6. Zeta potential (mV) of CS-TPP nanoparticles.

CS Mw ( kDa )	Zeta potential (mV)			
	85.2	163.2	383.3	481.3
CS/TPP mass ratio				
2/1	26.0 ±0.7 <sup>Bab</sup>	27.0 ±0.4 <sup>Aa</sup>	25.1 ±0.6 <sup>Bb</sup>	25.1 ±0.6 <sup>Bb</sup>
3/1	27.9 ±0.7 <sup>Aa</sup>	27.6 ±0.2 <sup>Aa</sup>	27.4 ±1.0 <sup>Aa</sup>	27.5 ±0.9 <sup>Aa</sup>
4/1	27.4 ±0.5 <sup>Aa</sup>	27.4 ±0.5 <sup>Aa</sup>	27.5 ±0.6 <sup>Aa</sup>	28.0 ±0.4 <sup>Aa</sup>
5/1	27.9 ±0.2 <sup>Ab</sup>	27.2 ±0.2 <sup>Ab</sup>	27.0 ±0.5 <sup>Ab</sup>	28.8 ±0.5 <sup>Aa</sup>
6/1	27.8 ±1.4 <sup>Aa</sup>	27.3 ±0.8 <sup>Aa</sup>	27.2 ±0.4 <sup>Aa</sup>	27.9 ±0.4 <sup>Aa</sup>

\*CS solution: pH 4.7; TPP solution: pH 9.0.

\*The result of zeta potential (mV) as mean ±SD (n =3).

\*<sup>A-B</sup> mean in the same column (CS/TPP mass ratio) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

\*<sup>a-b</sup> mean in the same column (CS Mw) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 三、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG (CS-TPP-EGCG) 奈米顆粒之製備

#### (一) TPP 溶液 pH、CS/TPP 重量比及 EGCG 濃度對 不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 效率之影響

##### 1. TPP 溶液 pH 之影響

表七所示 TPP 溶液 pH 對不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 效率 (%) 之影響。在 TPP 溶液 3 種 pH 中，以 pH 9.0 者使幾丁聚醣對 EGCG 包覆率比較高，而其 pH 3.0 及 pH 5.0 者則無顯著性差異。此可能由於在 TPP 溶液 pH 9.0 時，TPP 溶液施放多種負電荷離子 ( $-\text{OH}^-$ 、 $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  及  $-\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ ) 與帶正電荷  $-\text{NH}_3^+$  之幾丁聚醣有良好的結合作用而有效地將 EGCG 包覆。另外 TPP 溶液 pH 9.0 下，分子量較小之幾丁聚醣具有 EGCG 包覆率較高之趨勢，如 481.3、383.3、163.2 及 85.2 kDa 者對 EGCG 包覆率依序約為 41.3、42.5、42.6 及 47.1 %。此可能因 85.2 kDa 者在溶液中分子立體結構障礙較小且溶液黏度較低，與 TPP 離子可充分混合反應而有效地捕捉較多的 EGCG 之故。

Ko 等人(2002)以不同 pH (2.0、5.0 及 8.6) TPP 溶液與不同分子量 ( $2.5 \times 10^6$ - $6.5 \times 10^6$  Da) 之幾丁聚醣產生交聯反應，製備幾丁聚醣微米顆粒。在 SEM 下觀察顆粒外觀，顯示 TPP 溶液 pH 2.0 酸性環境時，其顆粒較圓且表面呈光滑狀，結構較為緊密，而 TPP 溶液 pH 8.6 時，其顆粒表面呈現粗糙且孔隙大，結構較不緊密。因高分子量幾丁聚醣溶液具有高黏度性，與 TPP 反應後使其表面呈較為光滑、孔隙較小，結構較為緊密。因此，TPP 溶液 pH 9.0 與幾丁聚醣 85.2 kDa 者(pH 4.7)

表七、TPP 溶液 pH 對不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 效率之影響。  
 Table 7. Effect of TPP solution's pH on the encapsulation efficiency (%) of EGCG on chitosans of different molecular weight.

CS Mw ( kDa )	Encapsulation efficiency ( % )			
	85.2	163.2	383.3	481.3
TPP solution's pH				
3.0	32.1 ±0.1 <sup>Ba</sup>	31.7 ±0.8 <sup>Ba</sup>	30.9 ±2.1 <sup>Ba</sup>	31.5 ±1.3 <sup>Ba</sup>
5.0	30.1 ±1.7 <sup>Ba</sup>	28.8 ±1.3 <sup>Ba</sup>	28.5 ±1.5 <sup>Ba</sup>	29.2 ±0.7 <sup>Ba</sup>
9.0 (original)	47.1 ±2.7 <sup>Aa</sup>	42.6 ±1.8 <sup>Ab</sup>	42.5 ±0.4 <sup>Ab</sup>	41.3 ±2.5 <sup>Ab</sup>

\* CS solution: pH 4.7; CS/TPP mass ratio: 6/1.

\* EGCG concentration: 0.2 mg/mL CS solution.

\* The result of encapsulation efficiency ( % ) as mean ±SD (n=3).

\* <sup>A-B</sup> mean in the same column (TPP solution's pH) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

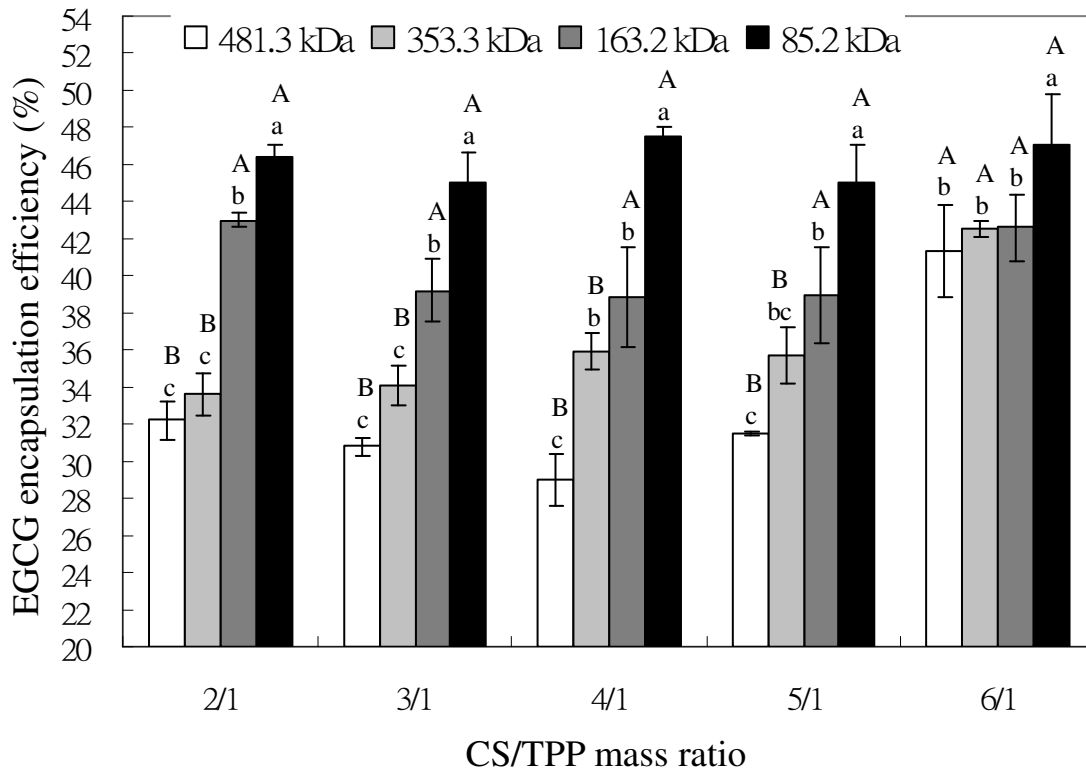
\* <sup>a-b</sup> mean in the same column (CS Mw) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

混合製備 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒，其結構較為鬆散、孔隙較大，EGCG 被捕捉機會提高或 EGCG 嵌入顆粒孔隙中含量增加，使其對 EGCG 包覆率增加之故。

## 2. CS/TPP 重量比之影響

圖十二所示，CS/TPP 重量比對不同分子量 (481.3、353.3、163.2 及 85.2 kDa) 之幾丁聚醣包覆 EGCG 效率之影響。於 CS/TPP 重量比自 2/1 至 5/1 下，幾丁聚醣之分子量愈小，其 EGCG 包覆率愈高，但每幾丁聚醣分子量組別之 CS/TPP 重量比，其 EGCG 包覆率變化之趨勢幾乎類似，即幾丁聚醣之分子量自 483.3-85.2 kDa，其 EGCG 包覆率約為 30-47 %。而 CS/TPP 重量比為 6/1 時，幾丁聚醣包覆 EGCG 效率有提高現象，約為 41-47 %，但仍以低分子量 85.2 kDa 者為高。幾丁聚醣分子量較小具包覆率較高之原因與前面討論相似，即其分子立體結構障礙較小，且溶液黏度低所致。而 CS/TPP 重量比為 6/1，幾丁聚醣與 TPP 之離子反應結合不如 CS/TPP 重量比 2/1-5/1 緊密，故有足夠空間捕捉 EGCG 分子使其包覆率增加。

Janes 及 Alonso (2003) 以低分子量幾丁聚醣與 TPP 離子交聯反應，CS/TPP 重量比為 6/1 者對胰島素之包覆率達 70-81%，顆粒產率高達 85 % 以上，而 3/1 者卻只有 11-21 %。Ko 等人(2002)將幾丁聚醣-oil 混和液以噴霧器噴入不同濃度的 TPP 溶液中 (1、10 及 50 %，w/v)，結果顯示，增加 TPP 溶液濃度，微米顆粒粒徑愈大 (500-710  $\mu\text{m}$ )，包覆能力也會提高 (92.7-98.2 %)。Deng 等人(2006)文獻得知幾丁聚醣溶液濃度增加，溶液黏度增加情況下，使得幾丁聚醣包覆 lysozyme 能力受阻，可能因溶液黏度大造成 lysozyme 在溶液中分散



圖十二、幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比對不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 效率之影響。

Fig 12. Effect of CS/TPP mass ratio on the encapsulation efficiency of EGCG on chitosans of different molecular weight.

(CS solution: pH 4.7; TPP solution: pH 9.0; EGCG concentration: 0.2 mg/ml CS solution)

<sup>A-B</sup> mean in the same bar (CS/TPP mass ratio) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>a-c</sup> mean in the same bar (CS Mw) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

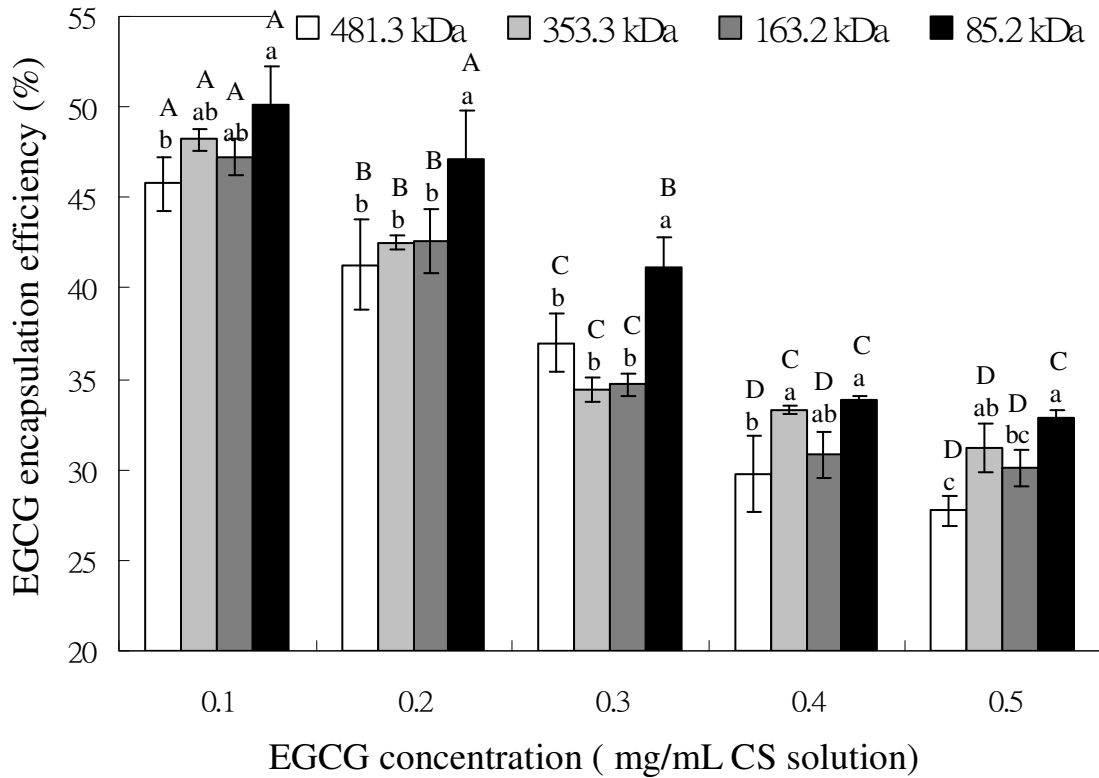
不均勻。

### 3. EGCG 濃度之影響

圖十三所示，以不同分子量幾丁聚醣包覆不同濃度之 EGCG 對 EGCG 包覆率之影響。隨著 EGCG 的濃度增加，其包覆率有顯著的下降趨勢。以不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG，無論 EGCG 濃度高低，均以 85.2 kDa 者包覆率較高，此原因與之前所述相同，即 85.2 kDa 者在溶液中分子立體結構障礙小，且溶液黏度較低，與 EGCG 可充分混合而有效地捕捉較多 EGCG 之故。以 85.2 kDa 而言，EGCG 濃度改變 (0.1-0.5 mg/mL CS solution) 時，其包覆率之範圍 50-33 %。

圖十四所示，以 85.2 kD 幾丁聚醣包覆不同濃度之 EGCG 對 EGCG 包覆率及含量的影響。隨著 EGCG 的濃度增加，其包覆率有顯著的下降趨勢。而將 EGCG 包覆率換算成 EGCG 含量 (mg/mg CS)，隨著 EGCG 濃度增加，其 EGCG 含量有顯著性上升趨勢。

Hu 等人(2008)以幾丁聚醣包覆兒茶素其包覆率範圍為 24-53%。Wu 等人(2005)以 24 及 200 kDa 之幾丁聚醣包覆 ammonium glycyrrhizinate，結果得知增加 ammonium glycyrrhizinate 濃度，明顯顯示其包覆率會隨之愈低。Deng 等人(2006)以 55 kDa 之幾丁聚醣 (1 mg/mL)與 TPP (4 mg/mL)混合反應包覆 lysozyme，隨著 lysozyme 濃度 0.23 mg/mL 增加至 1.17 mg/mL，反而其對 lysozyme 包覆率自 47.3 %下降至 14.4 %。



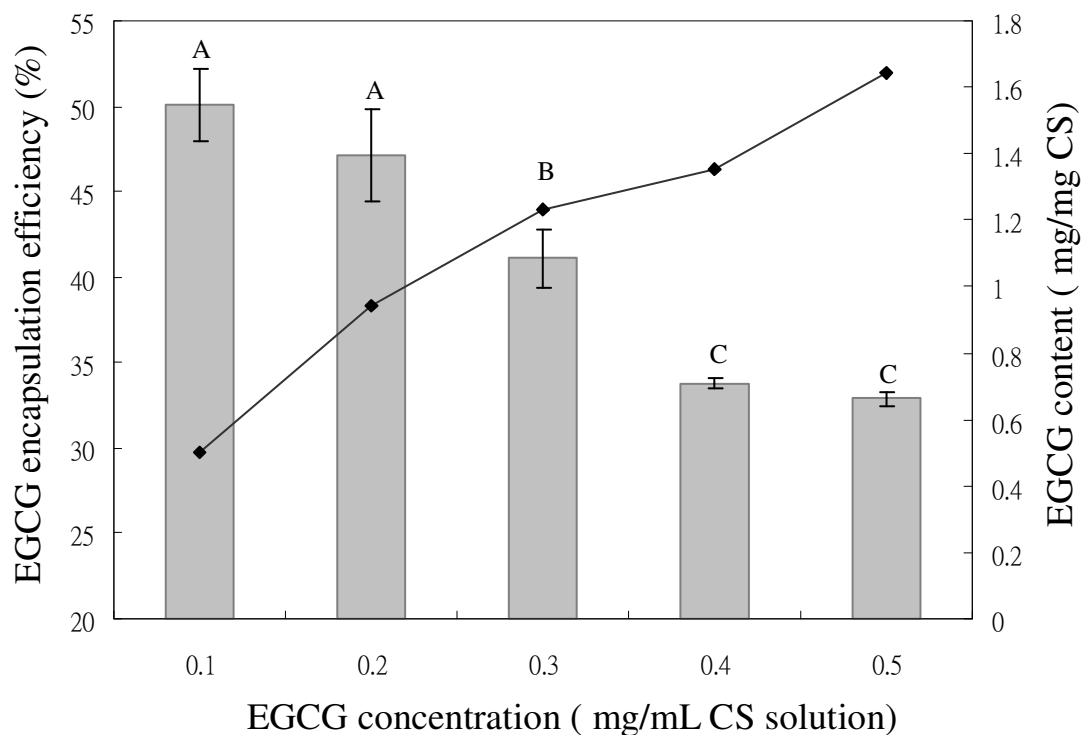
圖十三、EGCG 濃度對不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 之效率。

Fig 13. Effect of EGCG concentration on the encapsulation efficiency of EGCG on chitosans of different molecular weight.

( CS solution: pH 4.7; TPP solution: pH 9.0; CS/TPP mass ratio: 6/1 )

A-D mean in the same bar (EGCG concentration) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

a-c mean in the same bar (CS Mw) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).



圖十四、EGCG 濃度對幾丁聚醣包覆 EGCG 效率及 EGCG 含量之影響。

Fig 14. Effect of EGCG concentration on the encapsulation efficiency of EGCG and EGCG content on the chitosan.(CS Mw: 85.2 kDa)

<sup>A-C</sup> mean in the same bar (EGCG concentration) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).



## (二) TPP 溶液 pH、CS/TPP 重量比及 EGCG 濃度對不同分子量幾丁聚醣之 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒粒徑之影響

將 0.5、1.0、1.5、2.0 及 2.5 mg EGCG 分別溶於 TPP 溶液 (0.84 mg/mL, pH 9.0) (EGCG 濃度分別為 0.1、0.2、0.3、0.4 及 0.5 mg/mL CS solution), 溶液攪拌 10min, 並將這些混合液, 各別加入不同分子量和不同濃度之幾丁聚醣溶液 (pH 4.7), 使 CS/TPP 有不同重量比, 攪拌反應, 離心, 取出 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒, 並測定其粒徑大小。

### 1. TPP 溶液 pH 對 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒粒徑之影響

表八所示 TPP 溶液 pH 對不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 奈米顆粒粒徑大小之影響。在不同 pH 之 TPP 溶液下, 幾丁聚醣分子量愈小, 其粒徑愈大趨勢, 顆粒粒徑約 266.1-438.1 nm。推測可能是低分子量幾丁聚醣緩慢滴入 TPP 溶液時, 因其分子鏈短, 結構立體障礙小, 與 TPP 有更大的空間交互作用, 可充分的產生離子交聯反應, 使得顆粒粒徑愈大。以幾丁聚醣分子量 85.2 kDa 者, 隨著 TPP 溶液 pH 愈大 (pH 3.0, 5.0 及 9.0), 粒徑分別為 331.9、314.8 及 415.8 nm, 其粒徑大小較 163.2 kDa 者小。推測可能 85.2 kDa 者, 分子鏈短時, 反應液中的 EGCG 存在, 會使幾丁聚醣與 TPP 交互作用有某程度影響所致。在 TPP 溶液 pH 9.0 下, 其粒徑大小較 TPP 溶液在 pH 3.0 及 5.0 下來得大。可能由於在 TPP 溶液 pH 9.0 時, TPP 溶液施放多種負電荷離子 ( $-\text{OH}^-$ 、 $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  及  $-\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ ) 與帶正電荷  $-\text{NH}_3^+$  之幾丁聚醣有良好的結合作用而有效地將 EGCG 包覆, 產生較大之粒徑。

表八、幾丁聚醣分子量及三聚磷酸鈉溶液 pH 對幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 奈米顆粒粒徑之影響。

Table 8. Effect of CS molecular weight and pHs of TPP solution on the particle size of CS-TPP-EGCG nanoparticles.

CS Mw (kDa)	Particle size (nm)			
	85.2	163.2	353.3	481.3
TPP solution's pH				
3.0	331.9 ±0.1 <sup>Ba</sup>	294.3 ±3.5 <sup>Cb</sup>	275.7 ±5.3 <sup>Bc</sup>	266.1 ±8.2 <sup>Bd</sup>
5.0	314.8 ±2.0 <sup>Cb</sup>	329.6 ±7.4 <sup>Ba</sup>	279.8 ±9.8 <sup>Bc</sup>	273.3 ±5.1 <sup>Bc</sup>
9.0 (Original)	415.8 ±1.8 <sup>Ab</sup>	438.1 ±9.4 <sup>Aa</sup>	390.5 ±9.4 <sup>Ac</sup>	331.0 ±6.7 <sup>Ad</sup>

\* CS solution: pH 4.7; CS/TPP mass ration: 6/1;

\* EGCG concentration: 0.2 mg/mL CS solution.

\* The result of particle size(nm) as mean±SD (n=3).

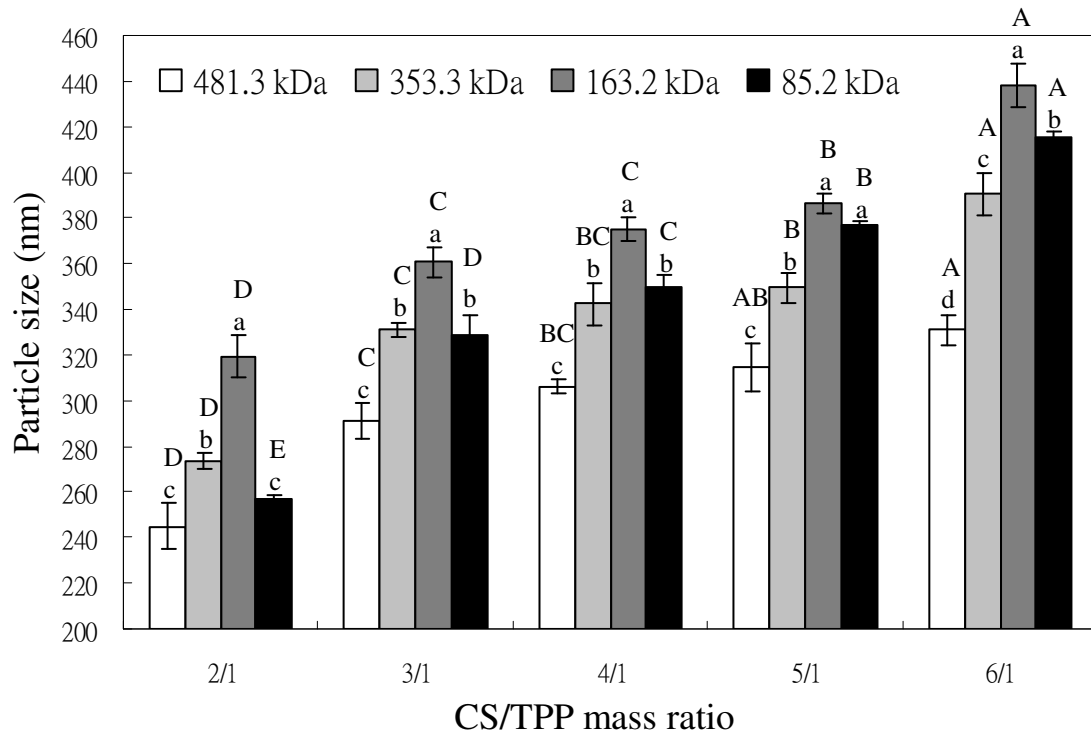
\* <sup>A-C</sup> mean in the same column (TPP solution's pH) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

\* <sup>a-d</sup> mean in the same column (CS Mw) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Wu 及 Du (2002)證實高分子量幾丁聚醣 (Mw 210 kDa) 比低分子量幾丁聚醣 (Mw 80 kDa) 對 BSA 具有較高的包覆率，是因高分子量幾丁聚醣具有較長的分子量鏈，其分子鏈上有較多胺基與 TPP 相互作用增加其對 BSA 包覆率，但此結果與本實驗結果恰好相反，猜測原因可能是因為幾丁聚醣對 EGCG 是物理性包覆，高分子量幾丁聚醣因分子鏈長，溶液黏度大，分子立體障礙大，使得 EGCG 進入顆粒能力受限。

## 2. CS/TPP 重量比對 CS-TPP-EGCG 顆粒粒徑之影響

由圖十五所示，隨著 CS/TPP 重量比之增加，其粒徑則變大。此由於幾丁聚醣濃度增加，CS-TPP-CS 交聯作用提高，形成其粒徑變大之原因。由圖中亦可看出，無論 CS/TPP 重量比及 EGCG 濃度之改變，幾丁聚醣之分子量降低 (481.3、353.3 及 163.2 kDa)，均使 CS-TPP-EGCG 顆粒粒徑增加，以 CS/TPP 重量比為 6/1 及 EGCG 濃度為 0.2 mg/mL CS solution 為例，其粒徑大小依序為 331.1、390.5 及 438.1 nm。此由於較低分子量幾丁聚醣之立體結構障礙較小，溶液黏度較低，與 TPP 離子和 EGCG 作用較均勻所致。但幾丁聚醣降低至 85.2 kDa 時，CS-TPP-EGCG 顆粒粒徑則變小些。此可能幾丁聚醣分子鏈太短時，反應液中有 EGCG 存在，會使幾丁聚醣與 TPP 交互作用有某程度影響所致。



圖十五、幾丁聚醣分子量及幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比對幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 顆粒粒徑之影響。

Fig 15. Effect of CS molecular weight and CS/TPP mass ratio on the CS-TPP-EGCG particle size.

( CS solution: pH 4.7; TPP solution: pH 9.0; EGCG concentration: 0.2 mg/mL chitosan solution).

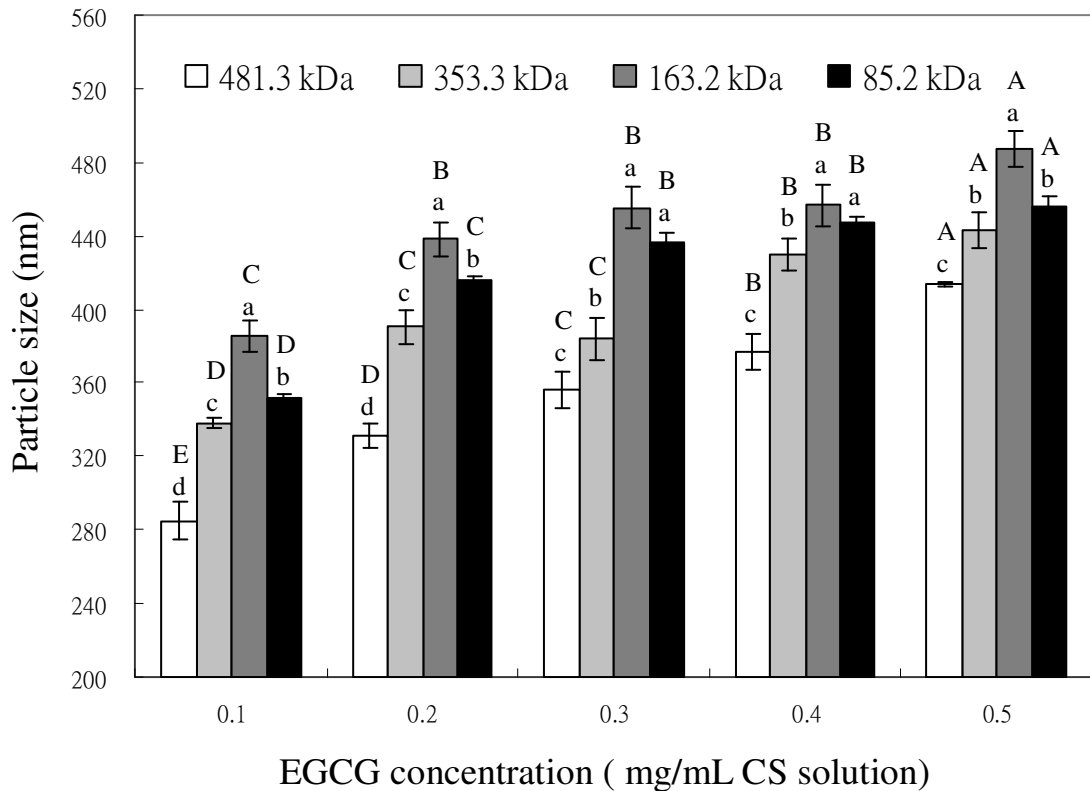
<sup>A-E</sup> mean in the same bar (CS/TPP mass ratio) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>a-d</sup> mean in the same bar (CS Mw) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Janes 及 Alonso (2003)以低分子量幾丁聚醣與 TPP 離子交聯反應，包覆胰島素，使 CS/TPP 重量比為 3/1 及 6/1，其粒徑大小範圍分別為 200-250 nm 及 280-360 nm。Wu 及 Du (2002)證實高分子量幾丁聚醣 (Mw 210 kDa) 比低分子量幾丁聚醣 (Mw 80 kDa) 對 BSA 具有較高的包覆率，是因高分子量幾丁聚醣具有較長的分子量鏈，其分子鏈上有較多胺基與 TPP 相互作用增加其對 BSA 包覆率，但此結果與本實驗結果恰好相反，猜測原因可能是因為幾丁聚醣對 EGCG 是物理性包覆，高分子量幾丁聚醣因分子鏈長，溶液黏度大，分子立體障礙大，使得 EGCG 進入顆粒能力受限。

### 3. EGCG 濃度對 CS-TPP-EGCG 顆粒粒徑大小之影響

由圖十六所示，EGCG 濃度對 CS-TPP-EGCG 顆粒粒徑之影響。由圖中可看出，隨著 EGCG 濃度之增加，其顆粒粒徑有變大之趨勢。此由於 CS-TPP 包覆更多 EGCG 之原因。當 EGCG 濃度由 0.1 增加至 0.5 mg/mL CS solution 時，幾丁聚醣分子量之降低，CS-TPP-EGCG 顆粒粒徑變化之趨勢幾乎類似，即幾丁聚醣之分子量由 481.3 降至 163.2 kDa 時，CS-TPP-EGCG 顆粒均為趨大。而低分子量 85.2 kDa 者，粒徑比 163.2 kDa 者較為小。此可能幾丁聚醣分子鏈太短時，反應液中有 EGCG 存在，會使幾丁聚醣與 TPP 交互作用有某程度影響所致。



圖十六、幾丁聚醣分子量及 EGCG 濃度對幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 顆粒粒徑之影響。

Fig 16. Effect of CS molecular weight and EGCG concentration on the CS-TPP-EGCG particle size.

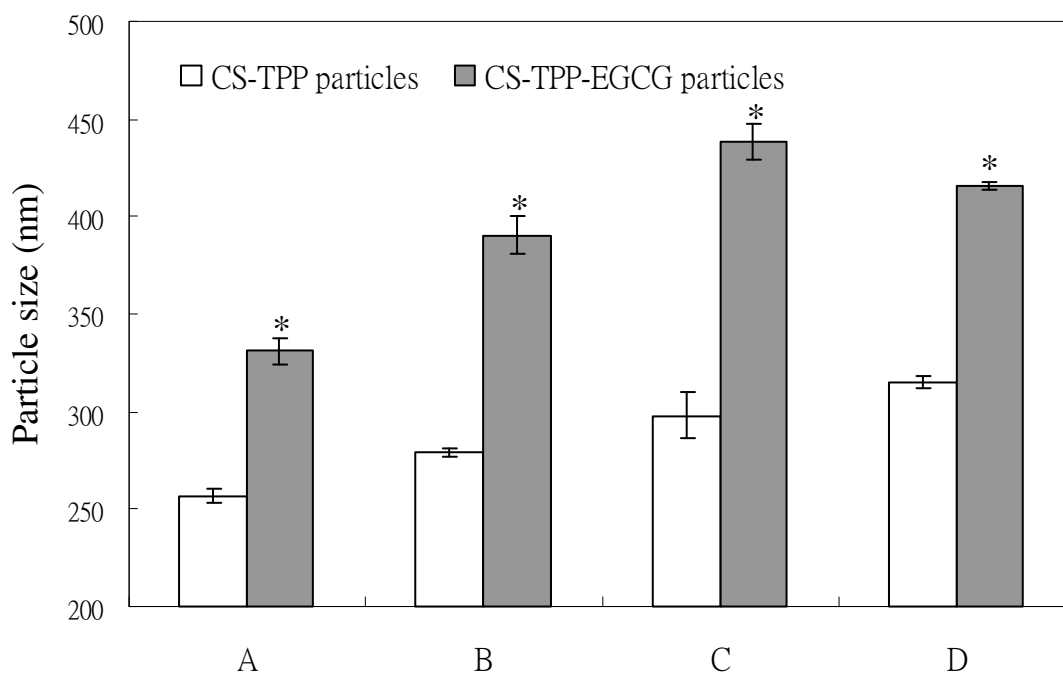
( CS solution: pH 4.7; TPP solution: pH 9.0; CS/TPP mass ratio: 6/1 )

<sup>A-E</sup> mean in the same bar (EGCG concentration) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>a-d</sup> mean in the same bar (CS Mw) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

另外，由圖十七所示，不同分子量（481.3、363.3、163.2 及 85.2 kDa）幾丁聚醣之 CS-TPP 及 CS-TPP-EGCG 顆粒粒徑之比較。結果顯示所有 CS-TPP-EGCG 顆粒粒徑均比未包覆 EGCG 之 CS-TPP 顆粒粒徑較大。

圖十八亦所示 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒之 SEM 圖。在 SEM 圖中其奈米顆粒粒徑均小於 100 nm。此與以奈米顆粒粒徑分析儀所測定出粒徑較小，故經冷凍乾燥處理後方以 SEM 照相所致。



圖十七、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉奈米顆粒及幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 顆粒粒徑之比較。

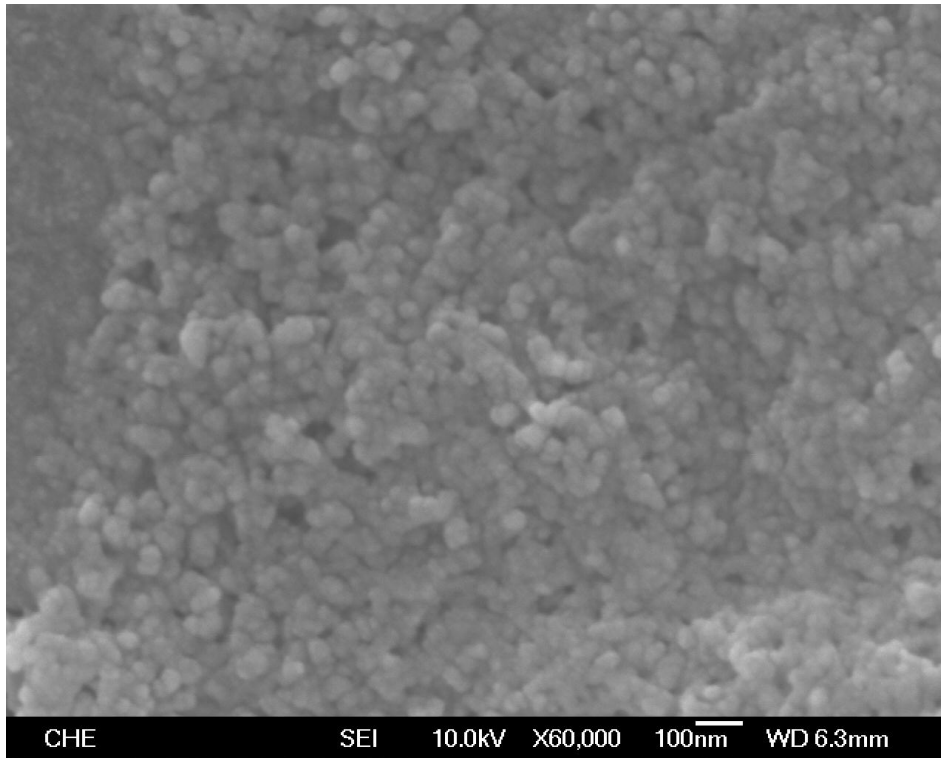
Fig 17. Comparison of CS-TPP and CS-TPP EGCG particle size:

CS molecular weight 481.3 kDa, A; 353.3 kDa, B; 163.2 kDa, C; 85.2 kDa, D.

(CS solution: pH 4.7; TPP solution: pH 9.0; CS/TPP mass ratio: 6/1; EGCG concentration: 0.2 mg/mL CS solution)

\* mean in the same bar with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).





圖十八、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 奈米顆粒之掃瞄式電子顯微鏡觀察。

Fig 18. SEM of CS-TPP-EGCG nanoparticles.

(CS Mw: 353.3 kDa; CS solution: pH 4.7; TPP solution: pH 9.0; EGCG concentration: 0.2 mg/mL CS solution)

### (三) 幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 奈米顆粒之表面電荷

表九所示，CS/TPP 重量比對不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 後，其奈米顆粒之表面電荷之情形。此與 CS-TPP 奈米顆粒（即未包覆 EGCG）之表面電荷結果類似，其表面電荷範圍 25.1-28.1 mV，且包覆 EGCG 後，其表面電荷幾乎無影響，原因於 EGCG 不帶電之關係。

幾丁聚醣是陽離子聚合物，在細胞試驗中，已被證實可以暫時性的打開 tight junction，提高藥物的滲透能力（Lin et al., 2005）。由於幾丁聚醣帶正電荷的胺基（ $-\text{NH}_3^+$  group）會與負電荷的細胞膜產生吸附作用，延長物質在腸道上滯留時間，進而影響 tight junction 上的 Zonula Occludens-1(ZO-1)蛋白質，增加細胞膜的通透性，而且幾丁聚醣是一種有效而且安全的 paracellular permeability enhancers (PPEs)（Thanou et al., 2001）。

Lin et al. (2007)以帶有正電荷之幾丁聚醣與帶負電荷之  $\gamma$ -PGA (poly-[ $\gamma$ -glutamic acid]) 混合作用，以不同濃度之幾丁聚醣和  $\gamma$ -PGA 製備幾丁聚醣奈米顆粒，在 Caco-2 細胞試驗，結果顯示幾丁聚醣奈米顆粒表面電位為正電荷時，可以有效的降低 transepithelial electrical resistance (TEER)值，表示細胞間隙的 tight junction 緊密度被改變，而表面電荷正電荷愈高，TEER 值會愈低；當顆粒表面電位為負電荷時，TEER 並無顯著改變。所以表示幾丁聚醣奈米顆粒表面電位正電荷愈高，其對細胞膜之通透力愈高。

表九、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 奈米顆粒之表面電荷 (mV)。

Table 9. Zeta potential (mV) of CS-TPP-EGCG nanoparticles.

CS Mw ( kDa )	Zeta potential (mV)			
	85.2	163.2	383.3	481.3
CS/TPP mass ratio				
2/1	26.7 ±0.7 <sup>Aa</sup>	27.4 ±0.3 <sup>Aa</sup>	25.1 ±0.4 <sup>Bb</sup>	27.5 ±0.3 <sup>Aa</sup>
3/1	27.2 ±0.2 <sup>Aa</sup>	27.6 ±0.8 <sup>Aa</sup>	27.4 ±0.3 <sup>Aa</sup>	27.7 ±0.9 <sup>Aa</sup>
4/1	27.2 ±0.4 <sup>Aa</sup>	27.1 ±1.4 <sup>Aa</sup>	28.0 ±0.6 <sup>Aa</sup>	28.1 ±0.3 <sup>Aa</sup>
5/1	27.3 ±0.6 <sup>Aa</sup>	28.0 ±0.2 <sup>Aa</sup>	27.7 ±1.3 <sup>Aa</sup>	28.1 ±0.7 <sup>Aa</sup>
6/1	27.5 ±0.7 <sup>Aa</sup>	27.2 ±0.1 <sup>Aa</sup>	27.8 ±0.5 <sup>Aa</sup>	27.9 ±0.7 <sup>Aa</sup>

\* CS solution: pH 4.7; TPP solution: pH 9.0.

\* EGCG concentration: 0.2 mg/mL CS solution.

\* The result of zeta potential (mV) as mean ±SD (n =3).

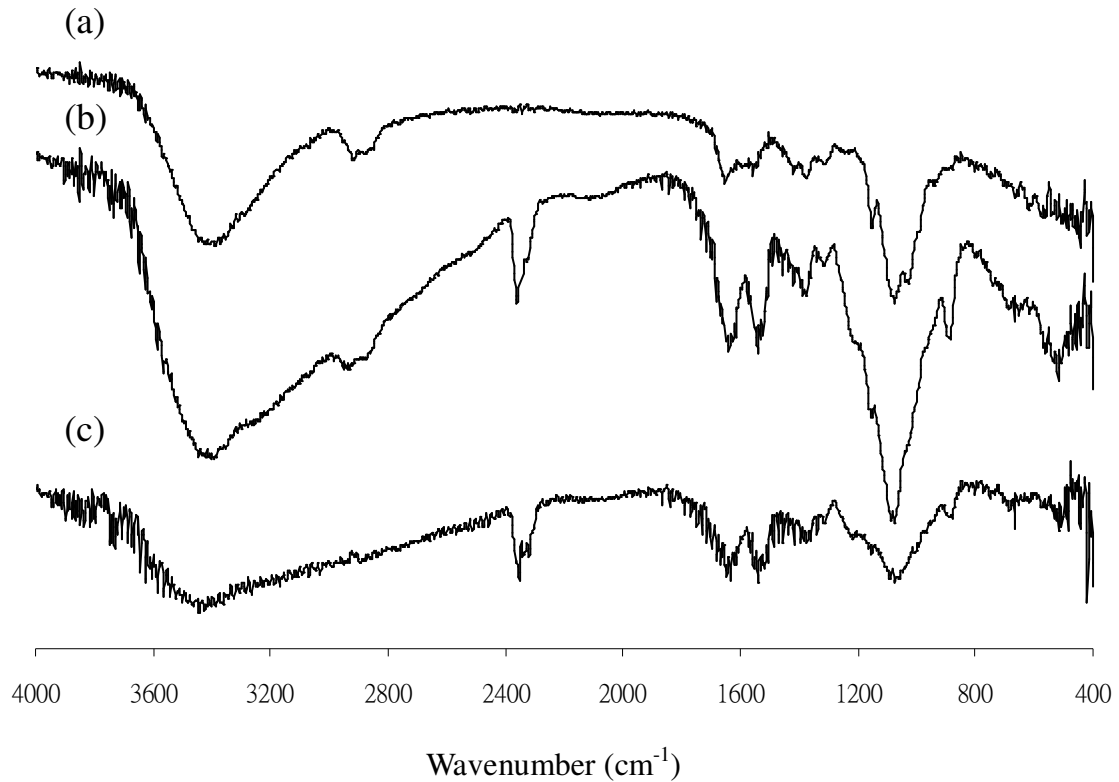
\* <sup>A-B</sup> mean in the same column (CS/TPP mass ratio) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

\* <sup>a-b</sup> mean in the same column (CS Mw) with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

#### (四) 幾丁聚醣、TPP 及 EGCG 間之交聯反應 (FTIR)

以幾丁聚醣結構上的胺基 ( $-\text{NH}_3^+$ ) 與 TPP 離子 ( $-\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  及  $-\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ ) 形成離子交聯反應，製備 CS-TPP 奈米顆粒，以及包覆 EGCG 製備 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒，藉由 FTIR 光譜圖來探討幾丁聚醣、CS-TPP 奈米顆粒及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒之化學結構特性。

圖十九表示幾丁聚醣、CS-TPP 奈米顆粒及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒之 FTIR 光譜圖，由此圖可知，在區域  $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ ，幾丁聚醣光譜圖中，其  $3433\text{ cm}^{-1}$  代表幾丁聚醣之  $-\text{NH}_2$  和  $-\text{OH}$  基的伸張振動；在 CS-TPP 奈米顆粒光譜圖中位移到  $3400\text{ cm}^{-1}$ ，波峰變寬，是因氫鍵增加所致 (Yu et al., 1999)；而在 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒位移至，波峰變得更寬，是因 EGCG 結構富含 OH 基，使得氫鍵增加；在區域  $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ，幾丁聚醣光譜圖中出現  $1654$  及  $1558\text{ cm}^{-1}$ ，在 CS-TPP 奈米顆粒光譜圖中  $1654$  及  $1558\text{ cm}^{-1}$  消失，位移至  $1637$  及  $1541\text{ cm}^{-1}$ ，是因幾丁聚醣上的  $-\text{NH}_2$  (ammonium ion) 與 TPP 離子產生交聯反應，是因提升了分子間與分子內的作用力所致 (Knaul et al., 1999; Xu and Du, 2003)，且在 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒光譜圖中， $1654$  及  $1558\text{ cm}^{-1}$  也消失，位移至  $1633$  及  $1539\text{ cm}^{-1}$ 。此實驗結果與 Hu 等人(2008)的相似。Zhang 及 Kosargju (2007) 作者推測兒茶素結構上的氫氧基 ( $-\text{OH}$  group) 會與幾丁聚醣結構上的胺基 ( $-\text{NH}_3^+$ ) 產生輕微的交互作用。但由實驗 FTIR 結果得知，CS-TPP-EGCG 奈米顆粒中  $1539\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{N-H}$  bending) 波峰位置幾乎與 CS-TPP 奈米顆粒中  $1541\text{ cm}^{-1}$  波峰一樣，表示幾丁聚醣與 EGCG 之間交互作用很小。



圖十九、幾丁聚醣 (a)、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉奈米顆粒 (b) 及幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 奈米顆粒 (c) 之 FTIR 光譜圖。

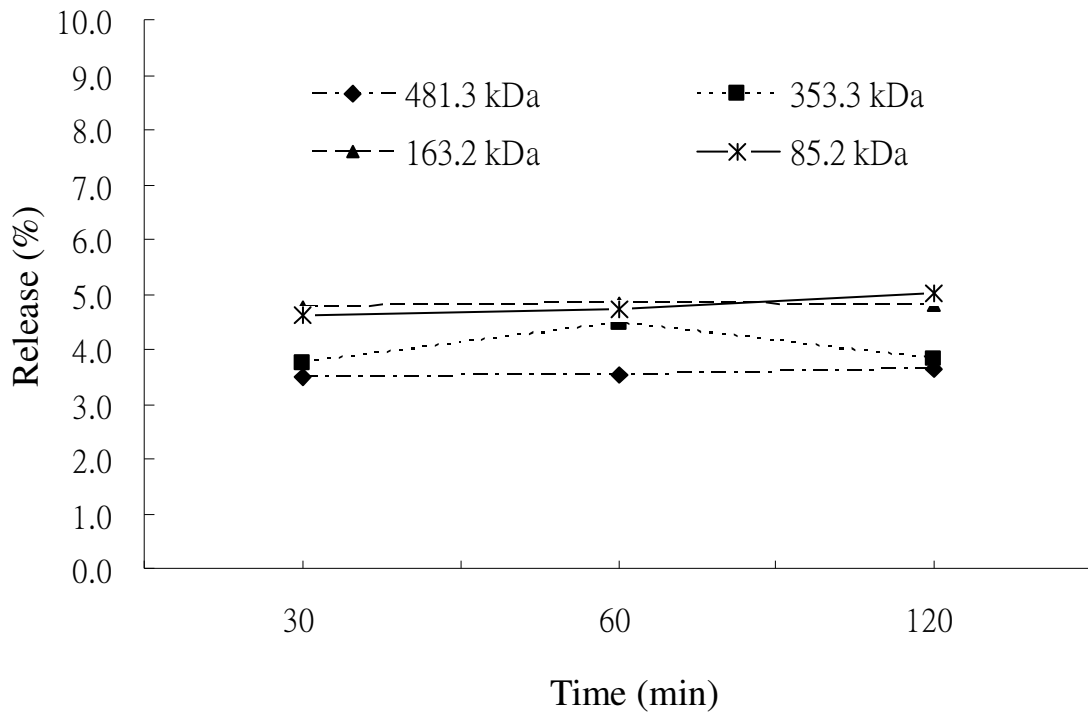
Fig 19. FTIR spectra of CS (a), CS-TPP nanoparticles (b) and CS-TPP-EGCG nanoparticles (c). (CS Mw: 85.2 kDa; CS/TPP mass ratio: 6/1; EGCG concentration: 0.2 mg/mL CS solution).

## 四、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 奈米顆粒安定性之試驗

將 1 mg EGCG 溶於 2 mL TPP 溶液(0.84 mg/mL, pH 9.0)中 10min。各取 5 mL 不同分子量 (481.3、353.3、163.2 及 85.2 kDa) 之幾丁聚醣溶液 (2.00 mg/mL, pH 4.7), 緩慢加入 2 mL 含有 EGCG 之 TPP 溶液中, 使得 CS/TPP 重量比為 6/1, 攪拌 1 hr 後, 離心(16000×g, 30 min, 15°C), 得 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒。將其置於 pH 1.2 或 pH 7.4 緩衝溶液下, 模擬胃液或腸液之 pH, 觀察其安定性。

### (一) 模擬胃液中 (pH 1.2) 之安定性

CS-TPP-EGCG 奈米顆粒置於 pH 1.2 緩衝溶液下 2 小時, 測試其安定性。由圖二十所示, 將顆粒置於 pH 1.2 緩衝溶液下 2 小時後, 其累積釋放率約 3.5-5.0%, 表示約有 95% 以上之 EGCG, 能有效被包覆於顆粒中, 使其安定性佳。幾丁聚醣分子量愈大, 其安定性愈佳, 其可能原因是低分子量 (Mw 163.2 及 85.2 kDa) 之幾丁聚醣, 溶液黏度低, 分子立體障礙小, 其顆粒之結構較為鬆散, 孔隙大, 使得顆粒較不耐酸, 其安定性較差, 所以內部之 EGCG 易被釋放出。相關文獻研究指出幾丁聚醣溶液黏度影響顆粒之釋放行為, 增加幾丁聚醣溶液黏度 (高分子量之幾丁聚醣及高濃度之幾丁聚醣溶液) 與 TPP 溶液反應, 其顆粒結構較為緊密與穩定, 因此釋放速率會降低 (Ko et al., 2002; Deng et al., 2006)。



圖二十、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 奈米顆粒在模擬胃液中  
(pH 1.2 buffer) 之安定性。

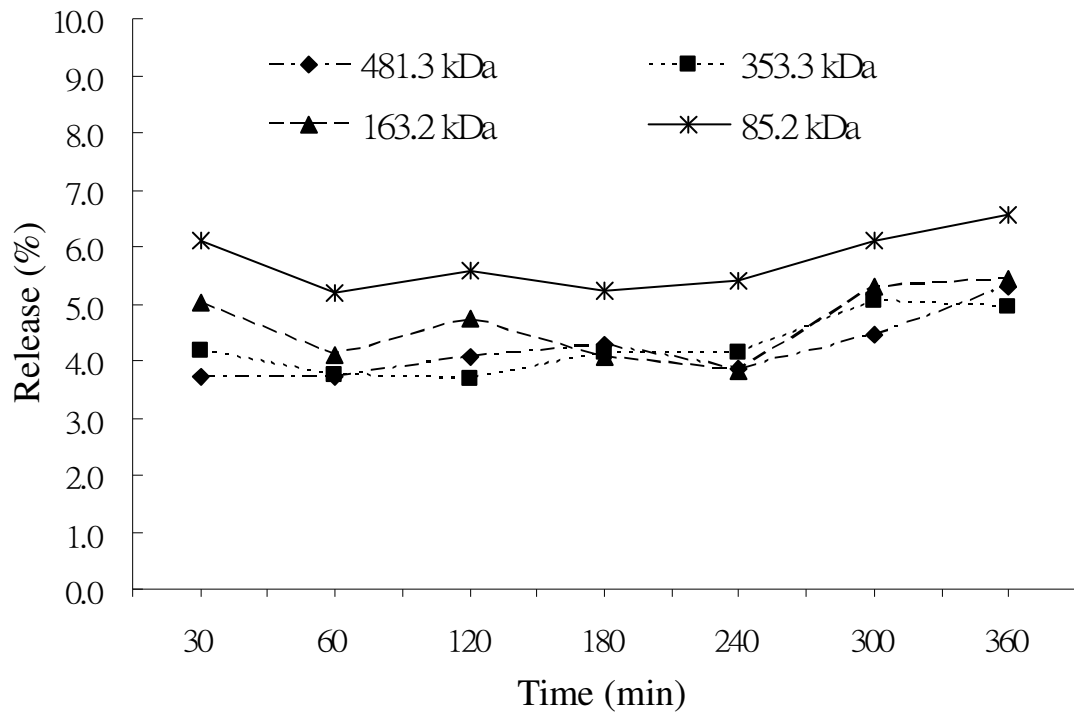
Fig 20. The stability of CS-TPP-EGCG nanoparticles in the pH 1.2 buffer.  
(CS solution: pH 4.7; TPP solution: pH 9.0; CS/TPP mass  
ratio: 6/1; EGCG concentration: 0.2 mg/mL CS solution)

## (二) 模擬腸液中 (pH 7.4) 之安定性

CS-TPP-EGCG 奈米顆粒置於 pH 7.4 緩衝溶液下 6 小時，測試其安定性。由圖二十一所示，將顆粒置於 pH 7.4 緩衝溶液下 6 小時後，其累積釋放率約 3.7-6.6 %。幾丁聚醣分子量愈大，其安定性愈佳，與置於 pH 1.2 緩衝溶液下安定性結果趨勢相似，其可能原因低分子量 (Mw 85.2 kDa) 之幾丁聚醣，溶液黏度低，分子立體障礙小，其顆粒之結構較為鬆散，孔隙大，使得顆粒較不耐酸，其安定性較差，所以內部之 EGCG 易被釋放出。

一般來說，物質經胃腸道消化吸收，會因不耐胃酸，有效營養物質會被嚴重破壞，再經腸道酵素消化水解作用，進而由腸黏膜細胞吸收利用。兒茶素最適安定之 pH 值為 4.0-6.2 左右，與胃腸道 pH 值相差甚遠 (沈，1993；屠，1994)。何等人 (2005) 將兒茶素置於不同 pH 條件下及模擬胃腸液 (不含消化酵素) 環境下，探討其穩定穩定性。結果顯示兒茶素在 pH 4.8-6.8 下 1 hr 後，其穩定性較高，回收率為 91.7-96.7 %，但 5 hr 後，其穩定性下降 8 % 左右。在模擬胃液下 (pH 1.3) 1、2 及 5 hr 後，其回收率分別為 49.5、45.7 及 40.2 %，兒茶素顯著性降低，表示兒茶素在胃液 pH 值下是不穩定的。在模擬腸液下 (pH 7.6) 1、2 及 5 hr 後，其回收率分別為 85.0、79.1 及 69.8 % (如表十)。進一步的研究發現，模擬胃腸緩衝溶液中鹽類礦物質並不是導致兒茶素穩定性下降原因，而是 pH 環境才是引起兒茶素穩定性差異性的原因。因此，口服兒茶素以藥物載體包覆著，可有效避開胃液低 pH 下破壞，提高兒茶素在小腸中的活性含量，且藥物載體的幫助吸收，以利於增加兒茶素的生體利用率 (bioavailability)。





圖二十一、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG 奈米顆粒在模擬腸液中 (pH 7.4 buffer) 之安定性。

Fig 21. The stability of CS-TPP-EGCG nanoparticles in the pH 7.4 buffer. (CS solution: pH 4.7; TPP solution: pH 9.0; CS/TPP mass ratio: 6/1; EGCG concentration: 0.2 mg/mL CS solution )

表十、兒茶素在模擬胃液及腸液 pH 中的回收率。

Table 10. The recovery of tea catechins in artificial simulation gastric and intestinal solution (the pH 1.3 and 7.6 buffer).

Time (hr)	Recovery (%)				
	1	2	3	4	5
Treatment					
Water (contrast )	96.5	93.8	91.6	90.7	89.2
pH 1.3 buffer	49.5	49.7	43.4	40.8	40.2
pH 7.6 buffer	85.0	79.1	75.6	72.7	69.8

## 柒、結論

### 一、不同分子量幾丁聚醣製備

利用商業酵素水解幾丁聚醣，其水解效果不亞於幾丁聚醣酶，對幾丁聚醣專一性高，再現性高，且沒有化學法造成的化學殘留及廢液處理問題。每克幾丁聚醣使用 10 毫克纖維酵素進行水解作用，可以有效製備低分子量之幾丁聚醣至 85.2 kDa。

### 二、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉 (CS-TPP) 奈米顆粒之製備

以不同分子量之幾丁聚醣配置不同濃度之幾丁聚醣溶液 (pH 3.4、4.7 及 6.0) 與 TPP 溶液 (pH 3.0、5.0 及 9.0) 混合製備不同幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比之幾丁聚醣-三聚磷酸鈉奈米顆粒。以 pH 4.7 之幾丁聚醣溶液與 pH 9.0 之 TPP 溶液混合，其顆粒懸浮液具有較好的分散及產量較多 (霧狀較濃)。幾丁聚醣分子量愈小，其粒徑越大趨勢。幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比愈大，其粒徑愈大。所有奈米顆粒均帶正電荷，幾丁聚醣之分子量及幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比對 CS-TPP 顆粒電荷均無顯著性之影響。

### 三、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG (CS-TPP-EGCG) 奈米顆粒之製備

#### (一) TPP 溶液 pH、CS/TPP 重量比及 EGCG 濃度對不同分子量幾丁聚醣包覆 EGCG 效率之影響

以 pH 4.7 之幾丁聚醣溶液與 pH 9.0 之 TPP 溶液混合，其對 EGCG 包覆率較高。幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比，以幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比為 2/1-5/1 者，其 EGCG 包覆率變化之趨勢幾乎類似，以幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比為 6/1 者，具有較高包覆 EGCG 效率。幾丁聚醣之分子量愈小，其 EGCG 包覆率顯著性愈高趨勢。隨著 EGCG 的濃度增加，其包覆率有顯著性的下降趨勢。

#### (二) 不同分子量幾丁聚醣、CS/TPP 重量比及 EGCG 濃度對 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒粒徑大小之影響

幾丁聚醣之分子量降低，其粒徑有增加趨勢，但幾丁聚醣分子量為 85.2 kDa 者，其粒徑並無比 163.2 kDa 者大。幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比或 EGCG 濃度增加，其粒徑皆顯著性的增加。所有顆粒均帶正電荷，幾丁聚醣之分子量、幾丁聚醣/三聚磷酸鈉重量比，對 CS-TPP-EGCG 顆粒電荷均無顯著性之影響。

#### 四、幾丁聚醣、三聚磷酸鈉及 EGCG 間之交聯反應

以 FTIR 測定幾丁聚醣、CS-TPP 奈米顆粒及 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒，觀察幾丁聚醣、三聚磷酸鈉及 EGCG 間之交聯反應。幾丁聚醣和 TPP 之間有顯著性交互結合反應作用，而幾丁聚醣與 EGCG 之間交互作用很小。

## 五、幾丁聚醣-三聚磷酸鈉-EGCG (CS-TPP-EGCG) 奈米顆粒之安定性

不同分子量幾丁聚醣之 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒在 pH 1.2 或 pH 7.4 緩衝溶液下之安定性。各種 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒皆在 pH 1.2 或 pH 7.4 緩衝溶液下之安定性並無顯著性差異，其安定性佳。幾丁聚醣分子量愈小，其安定性顯示愈差之趨勢。

## 六、總結

以 pH 4.7 之低分子量幾丁聚醣溶液與 pH 9.0 之 TPP 溶液混合反應，以 CS/TPP 重量比 6/1 條件下包覆 EGCG，製備 CS-TPP-EGCG 奈米顆粒。其顆粒具有較高的包覆效力、粒徑較小且帶有高度之正電荷。奈米顆粒在胃液或腸液下其安定性佳。未來進一步以 Caco-2 細胞試驗，更瞭解顆粒粒徑大小對於細胞膜滲透能力之研究，以及顆粒之安定性。