

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

碩士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis



探討薏仁油乳液製備以及抑制黑色素生成功效之研究

Effect of emulsification on the ability of adlay oil to
inhibit melanin production

胡尹婷

Yin-Ting Hu

指導教授：謝淑貞 博士

共同指導教授：丁俞文 博士

Advisor: Shu-Chen Hsieh, Ph.D.

Co-advisor: Yu-Wen Ting, Ph.D.

中華民國 107 年 1 月

January 2018

誌謝

碩士兩年歲月如梭，一下就過去了，這兩年來一路從懵懵懂懂，成長茁壯到可以獨力完成一篇論文，收穫許多，這兩年來最要感謝的我的兩位指導教授—謝淑貞教授與丁俞文教授，謝謝兩位教授平時的指導，無論是研究論文方面還是平時處理事務與待人處世上的教導，都受益良多，也謝謝兩位指導教授對於學生的信任，讓學生能自由的發展。十分感謝口試委員郝為華副總經理、梁弘人教授與黃智興副研究員於口試時給予的專業建議，令學生的論文能夠更加完整。這兩年來也十分感謝謝家與丁家的學長姐、同學與學弟妹們，因為有你們無數夜晚的一起奮鬥與分擔事務，在研究所的路上並不孤單。最後要感謝我的家人這兩年來支持，總是能體諒我的晚歸，支持我完成碩士的學歷，謝謝！



摘要


近年紫外線日益增強，誘使黑色素細胞生成黑色素造成黑色素沉積，導致曬斑、老人斑、黑色素瘤等疾病發生，黑色素為酪胺酸與 L-Dopa 經酪胺酸酶反應後產生，抑制酪胺酸酶活性被視為是否能抑制黑色素生成的指標。經皮藥物遞送系統在治療皮膚疾病時，為最佳的藥物使用途徑，其中乳液凝膠為新穎的劑型，具有包覆疏水性藥物、增加穩定性、具黏附性與搖變性的功能，並因為可增加藥物皮膚滲透率的優點而漸漸被研究。薏仁油是薏苡麩皮中的副產物，為低極性物質，具有抗氧化的生理活性。文獻指出利用超臨界萃取的低極性薏苡子實萃取物具有抑制 B16F10 細胞生成黑色素的能力，故推測薏仁油可能具有抑制黑色素生成的效果。本研究目的為製備不同薏仁油與 Tween 80 比例之薏仁油乳液與奈米乳液，分析其物性並用於 B16F10 細胞與斑馬魚中，以探討薏仁油抑制黑色素生成與酪胺酸酶活性的能力。確定薏仁油功效後，進行乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠等經皮給藥劑型製備，分析其物理性質與經皮吸收率。在細胞實驗中，薏仁油濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時有 29.5%與 31.6%的黑色素生成與酪胺酸酶活性抑制率，且與正控制組 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 麴酸無顯著性差異。在斑馬魚實驗中，薏仁油濃度為 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時有 46.5%與 31.7%的黑色素生成與酪胺酸酶活性抑制率，顯示薏仁油具有抑制黑色素生成與酪胺酸酶活性的功效。在經皮給藥劑型製備實驗中，當水、薏仁油與 Tween 80 比例為 60:28:12 (%) 時，粒徑可達 73.70 nm，並添加 18% Pluronic® F-127 後可形成凝膠，凝膠溫度約為 30°C。比較薏仁油、乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠之經皮吸收率後，以奈米乳液最佳，而穩定性則為奈米乳液與奈米乳液凝膠較佳。綜合上述實驗結果，推測薏仁油可抑制酪胺酸酶活性而降低黑色素生成，而奈米乳液能提高薏仁油功能性成分的經皮吸收率，雖然奈米乳液凝膠無法提高經皮吸收率，其流變性質仍較適用於皮膚上。

關鍵字：黑色素、薏仁油、經皮藥物遞送系統、斑馬魚、奈米乳液、奈米乳液凝膠

Abstract



Ultraviolet could induce melanocytes to produce melanin which will result in sunspots, age spots and melanoma, *etc.* Melanin is produced by tyrosine and L-Dopa oxidation to dopaquinone catalyzed by tyrosinase, and inhibition of tyrosinase activity is considered as a key point of whether melanin production is inhibited. Transdermal delivery is the best route for administering active ingredient to skin upon treating various skin diseases. Emulsion gel is a novel carrier which possesses the property of both emulsions and gel, and it can encapsulate hydrophobic drugs, improving stability, showing mucoadhesive and thixotropic properties to improve penetration ability. Adlay oil, exhibiting antioxidant capacity, is a by-product of adlay bran. It has been reported that the lipophilic fractions from supercritical fluid extract of adlay seeds could suppress intracellular tyrosinase activity and decrease the amount of melanin in B16F10 cells. This study aims at preparing adlay oil emulsions and nanoemulsions with different ratios of Tween 80, and analyzing their physical properties as well as *in vitro* and *in vivo* whitening activities. The results from B16F10 cells indicates that adlay oil at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ could reduce the cellular melanin production and tyrosinase activity by 29.5% and 31.6%, whereas in the zebrafish embryos model, 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of adlay oil significantly suppressed the melanin contents and tyrosinase activity by 46.5% and 31.7% while not causing toxicity effects on zebrafish. In the experiment of preparation of transdermal formulation, emulsion containing



60:28:12% water, adlay oil and Tween 80 had the smallest particle size (73.70 nm) after being homogenized by high pressure homogenization for 2 cycles at 1,000 bar pressure, and the addition of 18% Pluronic® F-127 could make nanoemulsion into nanoemulsion gel which formed gel at 30°C. We further used *in vitro* guinea pig skins to examine the permeation ability of different samples. The nanoemulsion significantly enhanced the skin penetration rate of active components when compared to adlay oil, emulsion, and nanoemulsion gel, while the stability of the nanoemulsion and nanoemulsion gel were better. According the aforementioned results, adlay oil is a potential tyrosinase inhibitor and potent skin whitening agent as proven by our *in vitro* and *in vivo* screening systems. Moreover, nanoemulsion system could enhance skin permeability of active compounds due to its smaller particle size. Although the percutaneous absorption rate of nanoemulsion gel is not the best, it is still a suitable route for administrating active ingredient to skin because of its rheological properties like thixotropic and mucoadhesive abilities.

Keywords: Melanin, adlay oil, transdermal drug delivery system, zebrafish, nanoemulsion, nanoemulsion gel

目錄



第一章	前言	1
第二章	文獻回顧	3
一、	黑色素	3
1.	黑色素細胞與黑色素體	3
2.	黑色素及其生合成途徑	4
3.	黑色素機轉訊息傳遞路徑	4
4.	抑制黑色素生成機制	6
二、	經皮給藥系統	7
2.	皮膚結構	8
3.	藥物吸收途徑	9
4.	影響藥物經皮吸收的因子	9
5.	乳液凝膠	10
三、	薏仁油	11
1.	薏仁油簡介與其組成成分	11
2.	薏仁油的保健功效	12
第三章	實驗目的與架構	14
一、	實驗目的	14
二、	實驗架構	14
1.	薏仁油抑制黑色素生成能力探討	14
2.	製備與分析不同經皮給藥劑型之性質	15
第四章	材料與方法	16
一、	實驗材料	16
1.	實驗藥品與試劑	16
2.	實驗儀器設備	17

二、	薏仁油的製備	18
三、	薏仁油美白功效試驗－體外 B16F10 細胞試驗	19
	1. 實驗細胞	19
	2. 細胞實驗培養液配製	19
	3. 細胞繼代培養	20
	4. 細胞實驗乳液與奈米乳液樣品製備	20
	5. 細胞存活率分析	21
	6. 細胞內黑色素含量測定	22
	7. 細胞內酪胺酸酶活性測定	24
	8. 細胞試驗中乳液與奈米乳液之配方評估與製備	27
四、	薏仁油美白功效試驗－體內斑馬魚動物試驗	27
	1. 實驗動物	27
	2. 動物實驗培養液配製	27
	3. 動物飼養	27
	4. 斑馬魚胚胎致死率試驗	28
	5. 動物實驗乳液與奈米乳液樣品製備	29
	6. 斑馬魚胚胎解剖顯微鏡拍攝	29
	7. 斑馬魚胚胎黑色素含量與酪胺酸酶活性測定	30
	8. 細胞試驗中乳液與奈米乳液之配方評估與製備	32
五、	經皮給藥劑型製備與物性分析	32
	1. 擬三相圖繪製	32
	2. 奈米乳液之配方評估與製備	33
	3. 粒徑分析	34
	4. 界面電位分析	34
	5. 黏度分析	35



6.	奈米乳液凝膠之配方評估與製備	35
7.	掃描電子顯微鏡分析	36
8.	流變性分析	36
9.	穩定性測試	37
六、	經皮吸收試驗	37
1.	實驗裝置	37
2.	實驗動物皮	37
3.	實驗方法	38
4.	總多酚類化合物含量測定	38
七、	統計分析	39
第五章	結果與討論	40
一、	細胞實驗	40
1.	四種非離子型界面活性劑對 B16F10 細胞存活率影響	40
2.	細胞實驗乳液與奈米乳液之配方評估與物性分析	41
3.	薏仁油乳液與奈米乳液對 B16F10 細胞內黑色素含量與酪胺酸酶活性影響	44
二、	動物實驗	46
1.	Tween 80 對斑馬魚存活率影響	46
2.	動物實驗乳液與奈米乳液之配方評估與物性分析	47
3.	經薏仁油乳液與奈米乳液處理的斑馬魚胚胎型態與其黑色素含量及酪胺酸酶活性	49
三、	經皮給藥劑型製備、物性分析、經皮吸收試驗	52
1.	薏仁油乳液與奈米乳液之配方評估與物性分析	52
2.	薏仁油奈米乳液凝膠之配方評估與掃描電子顯微鏡觀察	56
3.	薏仁油奈米乳液凝膠之流變性	57

4.	薏仁油乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠之黏度與穩定性分析	59
5.	薏仁油乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠之經皮吸收率	60
第六章	結論	95
第七章	參考文獻	97
第八章	附圖與附表	106





圖目錄

- 圖 一、以細胞模式與動物模式探討薏仁油抑制黑色素生成能力..... 14
- 圖 二、製備與分析不同經皮給藥劑型之性質..... 15
- 圖 三、斑馬魚胚胎死亡的型態 (A) 肉眼觀察—白蛋 (B) 解剖顯微鏡觀察..... 28
- 圖 四、動物實驗時程規劃示意圖..... 28
- 圖 五、四種乳化劑 (Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80) 以不同劑量處理 B16F10 細胞兩天後的細胞存活率..... 65
- 圖 六、Tween 80 以不同劑量處理 B16F10 兩天後的細胞存活率..... 66
- 圖 七、細胞實驗用的薏仁油乳液與奈米乳液之穩定性分析 (A) 儲放一天的不同薏仁油與 Tween 80 比例粗乳液 (B) 薏仁油：Tween 80=40:1 的細乳液 (C) 薏仁油：Tween 80=80:3 的細乳液 (D) 薏仁油：Tween 80=40:3 的細乳液 (E) 薏仁油：Tween 80=20:3 的細乳液 (F) 薏仁油：Tween 80=7:3 的細乳液 (G) 不同薏仁油與 Tween 80 比例的細乳液在穩定性試驗中的粒徑變化 (n=3)..... 67
- 圖 八、細胞實驗中不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液、細乳液之粒徑分佈 (A) 薏仁油：Tween 80=40:1 (B) 薏仁油：Tween 80=80:3 (C) 薏仁油：Tween 80=40:3 (D) 薏仁油：Tween 80=20:3 (E) 薏仁油：Tween 80=7:3。圖中紅線為粗乳液，藍線為細乳液。..... 69
- 圖 九、Tween 80、麴酸與不同濃度薏仁油對 B16F10 細胞內黑色素生成與酪胺酸酶活性的影響 (A) 細胞存活率 (B) 細胞內黑色素含量 (C) 細胞內酪胺酸酶活性。實驗結果以平均值±標準差表示 (n=4)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分

	析，其中字母表示實驗結果在統計上具有顯著差異 ($p < 0.05$)。	
	20:3、40:3、80:3 薏仁油與 Tween 80 比例細乳液的粒徑大小分別為	
	164.60、252.17、887.00 nm。AO：薏仁油。	71
圖 十、	Tween 80、麴酸與相同濃度薏仁油但不同粒徑細乳液對 B16F10 細胞內黑色素生成的影響 (A) 細胞存活率 (B) 細胞內黑色素含量。實驗結果以平均值±標準差表示 ($n = 3$)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分析，其中字母表示實驗結果在統計上具有顯著差異 ($p < 0.05$)。7:3、20:3、40:3、80:3 薏仁油與 Tween 80 比例細乳液的粒徑大小分別為 99.47、164.60、252.17、887.00 nm。AO：薏仁油。	72
圖 十一、	以不同濃度 Tween 80 處理後斑馬魚的存活率.....	73
圖 十二、	動物實驗用的薏仁油乳液與奈米乳液之穩定性分析 (A) 儲放一天的不同薏仁油與 Tween 80 比例粗乳液 (B) 薏仁油：Tween 80 = 10:1 的細乳液 (C) 薏仁油：Tween 80 = 7:3 的細乳液 (D) 不同薏仁油與 Tween 80 比例的細乳液在穩定性試驗中的粒徑變化 ($n = 3$)	74
圖 十三、	動物實驗中不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液、細乳液之粒徑分佈 (A) 薏仁油：Tween 80 = 10:1 (B) 薏仁油：Tween 80 = 7:3。圖中紅線為粗乳液，藍線為細乳液。	76
圖 十四、	Tween 80、PTU 與相同粒徑細乳液但不同濃度薏仁油對斑馬魚黑色素生成影響 (A) 未經任何樣品處理的控制組 (B) 200 $\mu\text{g/mL}$ Tween 80 (C) 0.2 mM PTU (D) 500 $\mu\text{g/mL}$ 薏仁油 (E) 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 薏仁油 (F) 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 薏仁油。(D)、(E)、(F) 的薏仁油細乳液粒徑為 243.80 nm。	77
圖 十五、	Tween 80、PTU 與相同粒徑細乳液但不同濃度薏仁油對斑馬	



魚黑色素生成與酪胺酸酶活性的影響 (A) 細胞存活率 (B) 黑色素含量 (C) 酪胺酸酶活性。實驗結果以平均值±標準差表示 (n=3)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分析，其中字母表示實驗結果在統計上具有顯著差異 ($p < 0.05$)。10:1 薏仁油與 Tween 80 比例細乳液的粒徑大小為 243.80 nm。AO：薏仁油。..... 78

圖 十六、Tween 80、PTU 與不同粒徑細乳液但相同濃度薏仁油對斑馬魚黑色素生成的影響 (A) 未經任何樣品處理的控制組 (B) 200 $\mu\text{g/mL}$ Tween 80 (C) 0.2 mM PTU (D) 665.50 nm 薏仁油細乳液 (E) 243.80 nm 薏仁油細乳液 (F) 97.03 nm 薏仁油細乳液。(D)、(E)、(F) 的薏仁油濃度為 500 $\mu\text{g/mL}$ 。..... 79

圖 十七、Tween 80、PTU 與不同粒徑細乳液但相同濃度薏仁油對斑馬魚黑色素生成的影響 (A) 細胞存活率 (B) 黑色素含量。實驗結果以平均值±標準差表示 (n=3)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分析，其中字母表示實驗結果在統計上具有顯著差異 ($p < 0.05$)。7:3、10:1、40:1 薏仁油與 Tween 80 比例細乳液的粒徑大小分別為 97.03、243.80、665.50 nm。AO：薏仁油。..... 80

圖 十八、不同水、薏仁油、Tween 80 比例製備樣品型態 (A) 乳霜 (B) 穩定乳液 (C) 不穩定乳液。樣品經 Oil red O 染色。..... 81

圖 十九、薏仁油、Tween 80、水的擬三相圖..... 82

圖 二十、不同薏仁油與 Tween 80 比例的粗乳液之黏度 (剪切速率 100 s^{-1}) 83

圖 二十一、薏仁油粗乳液在不同壓力與均質次數下的粒徑變化 (A) 薏仁油：Tween 80=7:3 (B) 薏仁油：Tween 80=6:4 84

圖 二十二、不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液、細乳液之粒 徑分佈 (A) 薏仁油：Tween 80=9:1 (B) 薏仁油：Tween 80=8:2 (C) 薏仁油：Tween 80=7:3 (D) 薏仁油：Tween 80=6:4。圖中紅線為 粗乳液，藍線為細乳液。.....	86
圖 二十三、不同水分含量的粗乳液之黏度 (剪切速率 100 s^{-1})	87
圖 二十四、含不同 F127 濃度的樣品凝膠情況.....	88
圖 二十五、以場發射掃描式電子顯微鏡觀察薏仁油奈米乳液凝膠內粒 子的粒徑	89
圖 二十六、不同 F127 濃度下薏仁油奈米乳液凝膠的凝膠溫度 (A) 18% F127 (B) 20% F127 (C) 22% (D) 不同濃度 F127 的水凝膠與薏仁油奈 米乳液凝膠之凝膠溫度	90
圖 二十七、不同濃度 F127 的薏仁油奈米乳液凝膠之應力掃描曲線....	91
圖 二十八、薏仁油乳液、奈米乳液與奈米乳液凝膠之穩定性分析 (A) 乳液 (B) 奈米乳液 (C) 奈米乳液凝膠。乳液與奈米乳液的水、薏 仁油、Tween 80 比例為 60:28:12%，而奈米乳液凝膠含 18% F127。	92
圖 二十九、不同經皮給藥劑型的經皮吸收率 (A) 不同 F127 濃度薏仁 油奈米乳液凝膠的經皮吸收率 (B) 不同經皮給藥劑的經皮吸收率。 實驗結果以平均值±標準差表示 ($n=3$)。	94



表目錄

表 一、細胞實驗中測試的樣品與其控制組	22
表 二、動物實驗中測試的樣品與其控制組	29
表 三、Tween®系列的 IUPAC 名稱、HLB 值與結構	64
表 四、細胞實驗中不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液、細乳 液與經穩定性試驗後細乳液的物理性質	68
表 五、界面電位與膠體穩定性的關係	70
表 六、動物實驗中不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液、細乳 液與穩定性試驗後細乳液的物理性質	75
表 七、不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液與細乳液的物理性 質	85
表 八、不同經皮給藥劑型在 37°C 時的黏度 (剪切速率 100 s^{-1})	93



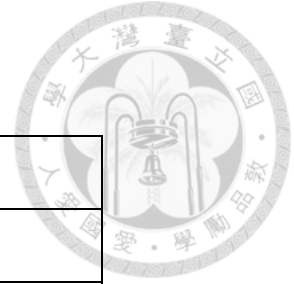
附圖目錄

附圖 一、人類表皮層	106
附圖 二、黑色素體與核內體的關係	106
附圖 三、黑色素生合成示意圖	107
附圖 四、cAMP 誘導黑色素生合成的訊號傳遞路徑	107
附圖 五、抑制黑色素生成路徑的方法歸納	108
附圖 六、人類皮膚	108
附圖 七、藥物滲透皮膚的路徑示意圖	109
附圖 八、利用乳化劑增強穩定性	109
附圖 九、膠體的搖變性	110
附圖 十、乳液凝膠滲透皮膚的示意圖	110
附圖 十一、流變儀中常見的探頭 (A) concentric cylinder (B) cone and plate (C) parallel plate	113
附圖 十二、Franz diffusion cell 裝置示意圖	113
附圖 十三、粒子懸浮在連續相中時，與帶電表面不同距離的離子濃度 與電位差	114
附圖 十四、Pluronic® F-127 為的凝膠機制	114
附圖 十五、G'與 G''示意圖	115

附表目錄

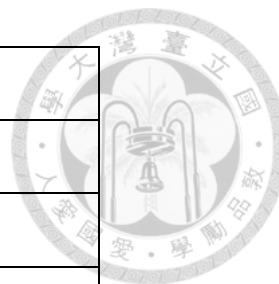
附表 一、薏苡籽實及其不同部位之一般成分組成	111
附表 二、薏苡籽實不同部位之丙酮萃取物中脂肪酸組成和含量	112

縮寫表



縮寫	英文全名
α -MSH	α -melanocyte stimulating hormone
AO	Adlay oil
Akt	Protein kinase B
AC	Adenylyl cyclase
BSA	Albumin from bovine serum
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CREB	cAMP responsive element binding protein
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ERK	Extracellular-regulated kinase
ERK 1/2	Extracellular-signal-regulated kinase 1/2
FBS	Fetal bovine serum
PF-127	Pluronic [®] F-127
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
hpf	Hour post-fertilization
MC1R	Melanocortin-1 receptor
MITF	Microphthalmia associated transcription factor
MEK	MAPK/ERK kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCE	Mixed cellulose esters
MTT	Thiazolyl blue tetrazolium bromide
RSK-1	Ribosomal S6 kinase-1

PKA	Protein kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluorid
PBS	Phosphate buffered saline
PB	Phosphate buffer
PTU	1-Phenyl-2-thiourea
P/S	Penicillin and Streptomycin





第一章 前言

皮膚為人體最大的器官，可調節體溫、形成保護屏障避免外來傷害與感染、儲藏水分與脂肪等，由表皮層 (Epidermis) 與真皮層 (Dermis) 組成。表皮層位在最外層，主要由扁平鱗狀上皮細胞 (Flat squamous cells) 組成，與外界接觸可抵禦外來的傷害。表皮層下為基底細胞 (Basal cells)，而黑色素細胞 (Melanocytes) 則分散在基底細胞中。近年來紫外線 (Ultraviolet, UV) 日益增強，其中 UVB (280-320 nm) 會造成 DNA 損傷，誘使黑色素細胞生成黑色素，黑色素為不溶於水的生物高分子聚合物，能吸收紫外線與清除自由基以減少對正常細胞的傷害，在皮膚表面形成防護層，避免皮下組織受到紫外線輻射傷害，然而過量的黑色素生成會提高黑色素瘤等癌症發生的機會，近年來衛福部雖已核可許多美白成分，然而部分成分如麴酸等對於皮膚仍有些許刺激性，故尋找對皮膚溫和且抑制黑色素生成之替代物的研究為近年的主軸。

對皮膚疾病而言，經皮給藥系統 (Transdermal delivery system) 為最佳的給藥途徑，常見的經皮藥物製劑有乳液 (Lotion) 與凝膠 (Gel) 等，但皆具缺點，為了改善兩者的缺點，以乳液為基礎的乳液凝膠即被發展，以增加穩定性並能遞送疏水性藥物，又因具搖變性與黏膜黏附性而可增加藥物之經皮吸收率。奈米技術是近年來十分熱門的新興科技，已被廣泛應用於健康食品、生物醫學、材料化學等。根據美國國家奈米中心的定義，奈米材料的標準粒徑大小介於 1-100 nm，而奈米大小的經皮藥物製劑有利於在皮膚表層形成閉鎖效應，提高角質層保水量，寬廣化物質的親水性通道，提升藥物的經皮吸收率。

薏仁為薏苡籽實經過精白後的產物，在精白過程中會產生大量的副產物如薏苡殼、薏苡種皮、薏苡麩皮等，為了再次利用這些副產物，取粗脂肪含量高的薏苡麩皮來提取薏仁油（具有降血糖與血脂、抗腫瘤生成與抗氧化等保健功效，且可能具有抑制黑色素生成的潛力）進行再利用，以達到不浪費與增加副產物附加

價值等目的。

本實驗目的為將薏仁油製備成乳液與奈米乳液，並應用於小鼠黑色素腫瘤細胞 B16F10 與斑馬魚動物試驗中，以探討薏仁油是否具有抑制黑色素生成的潛力。同時製備薏仁油乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠等經皮給藥劑型，並比較與分析其物理性質與經皮吸收率。



第二章 文獻回顧



一、黑色素

1. 黑色素細胞與黑色素體

黑色素細胞 (Melanocyte) 位在皮膚表皮層 (Epidermis) 的基底層 (Basal layer) (附圖一) (Rees, 2004)，具有黑色素體 (Melanosome) 並在其內產生黑色素 (Melanin)。具有成熟黑色素體的黑色素細胞，細胞型態為樹突狀，會伸出突觸穿梭在棘細胞層 (Stratum spinosum) 中的表皮細胞內，並將細胞內的黑色素體向樹突狀方向移動，傳送到周圍的角質細胞內，使得黑色素堆積在角質層而皮膚變黑。黑色素體在成熟的過程中可分為四個階段 (附圖二) (Wasmeier *et al.*, 2008)：

- I. 未成熟的黑色素體位於細胞核周圍與高基氏體 (Golgi) 附近，便於接收酵素和結構蛋白，以利黑色素體形成。此時黑色素體為多囊泡核內體 (Endosome)，內部無酪胺酸酶活性 (酪胺酸酶尚存在於高基氏體中)，未合成黑色素，無結構性纖維組成物。
- II. 藉由 Pmel17 調控，為黑色素體結構蛋白，將黑色素體的外型轉變成細長狀，內部出現纖維狀物質，同時黑色素體蛋白能保持細胞膜的完整性，此時，黑色素體接收到自高基氏體分泌的酪胺酸酶，並在黑色素體內部出現些微的黑色素沉澱物。
- III. 黑色素體具有完整結構，具大量的酪胺酸酶 (Tyrosinase) 和 Tyrosinase-related protein 1，開始大量產生黑色素並均勻地堆積在內部的纖維上。
- IV. 成熟的黑色素體，成橢圓球狀，具高含量的黑色素。最後黑色素經由黑色素細胞的突觸分泌進入周圍的角質細胞內，傳遞至皮膚的表皮層而使膚色變深 (Ortonne, 2002)。




2. 黑色素及其生合成途徑

人的膚色與黑色素的含量關係密切，黑色素為不溶於水的生物高分子聚合物，由黑色素細胞合成，主要功能為在皮膚表面形成防護層，避免皮下組織因為陽光照射而受到紫外線輻射傷害。另外黑色素也是具有清除自由基能力的抗氧化劑，能減少自由基對正常細胞的傷害。在哺乳動物中，黑色素可分為真黑色素 (Eu-melanin) (棕黑色聚合物) 和類黑色素 (Pheo-melanin) (黃紅色聚合物)。黑色素的生合成 (附圖三) (Chang, 2009) 主要受到酪胺酸酶所催化，酪胺酸酶為含銅離子的多酚氧化酶，在黑色素生成反應中為催化速率決定步驟的酵素，同時具有 Monophenolase 與 Diphenolase 的催化能力。酪胺酸酶氫氧化 (Hydroxylation) 酪胺酸 (L-Tyrosine, Monophenol) 後得 L-Dopa (Dihydroxyphenylalanine, Dihenol), L-Dopa 再經酪胺酸酶催化後，氧化成多巴醌 (Dopaquinone)，之後分為兩個步驟，其中的一個步驟為經過一連串的氧化反應後形成 Dopachrome，再經由 Tautomerase 與 Tyrosinase related proteins 等酵素反應後形成顏色偏黑的 Eumelanin；另一個步驟則在穀胱甘肽 (Glutathione) 或半胱氨酸 (Cysteine) 存在下形成 Cysteinyl-dopa，再經由一連串反應形成偏紅棕色的 Pheomelanin。

3. 黑色素機轉訊息傳遞路徑

黑色素生合成之機制受到許多調控因子影響，其中最常被探討的因素為 UV 光照射。UV 光因波長不同可分為三種：UVA (320-400 nm)、UVB (280-320 nm)、UVC (200-280 nm)。UVC 大多在臭氧層時即被吸收，無法穿透，僅有 UVA 與 UVB 能到達地表而影響人類。當人體接收到 UVA 與 UVB 的刺激時，會使皮膚暗沉老化並導致 DNA 損傷與發炎。UVB 為造成黑色素生成的主要原因，會造成 DNA 損傷，進而生成 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) 並調節酪胺酸酶 mRNA 與蛋白



質表現 (附圖四)。紫外線照射會刺激角質細胞與黑色素細胞分泌 α -MSH 與其接受器 Melanocortin-1 receptor (MC1R) 的表現。MC1R 為 G protein-coupled receptor，故當 α -MSH 被誘發與 MC1R 結合後，會活化接受器下方的 G 蛋白 (G protein)，使得 G_{α} 次單位與 $G_{\beta\gamma}$ 次單位分離，並活化細胞膜上的腺苷酸環化酶 (Adenylyl cyclase, AC)，進而水解 ATP 成 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)。cAMP 為細胞內調控黑色素生成的最主要二級訊息，其下游路徑主要有三條 (附圖四) (Khaled *et al.*, 2002)：

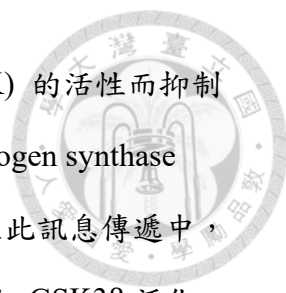
(1) cAMP/PKA pathway

cAMP/PKA pathway 為黑色素生成的訊號傳遞路徑中最被確定的一條。cAMP 會活化 Protein kinase (PKA)，活化的 PKA 會進到細胞核內並磷酸化 cAMP responsive element binding protein (CREB) 而活化之，CREB 為 Microphthalmia associated transcription factor (MITF) 的 Transcription factor，活化的 CREB 會與 MITF promoter (cAMP responsive element) 結合而大量表現 MITF，而 MITF 是酪胺酸酶的 Transcription factor，可促進酪胺酸酶及酪胺酸酶相關蛋白質的基因表現，致使黑色素生成量增加。

(2) cAMP/ERK-MAPK pathway

cAMP 會活化 Ras protein，進而活化 B-Raf，活化的 B-Raf 會磷酸化 MAPK/ERK kinase (MEK) 而活化之，MAPK 為 Mitogen-activated protein kinase 而 ERK 為 Extracellular-regulated kinase。MEK 活化後可將 MAPK 中 Extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) 磷酸化，進而活化 Ribosomal S6 kinase-1 (RSK-1)，而 ERK 1/2 會磷酸化 MITF 之 serine 73，RSK-1 則會磷酸化 MITF 之 serine 409，當 MITF 被磷酸化後即被水解，降低酪胺酸酶的表現。

(3) cAMP/PI3K pathway



cAMP 會抑制 Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) 的活性而抑制 Protein kinase B (Akt) 的磷酸化，Akt 原本會將 Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) 磷酸化，使 GSK3 β 不活化，但在此訊息傳遞中，Akt 磷酸化被抑制，使 GSK3 β 的磷酸化降低，而增加 GSK3 β 活化態，活化態的 GSK3 β 會將 MITF 之 serine 298 磷酸化，使得 MITF 與酪胺酸酶 Promoter 結合的能力增加，促進酪胺酸酶的表現。

4. 抑制黑色素生成機制


常見抑制黑色素生成的方法如附圖五所示 (Briganti *et al.*, 2003)。

(1) 調控酪胺酸酶活性或表現

- I. 抑制酪胺酸酶 mRNA 的轉錄：酪胺酸酶生成減少。C₂-ceramide 與 Tretinoin 具有此功效。
- II. 抑制酪胺酸酶的醣化作用：酪胺酸酶的成熟過程中最後會在高基氏體內被醣基化。Calcium pantetheine-S-sulfonate (PaSSO₃Ca) 可藉由此機制抑制黑色素生成。
- III. 抑制酪胺酸酶的酵素催化活性：由於酪胺酸酶的酵素活性中心含有銅離子，可藉著與銅離子螯合來降低酪胺酸酶活性。麴酸 (Kojic acid) 是利用此方法而達到美白效果。
- IV. 促進酪胺酸酶降解：減少酪胺酸酶在細胞內的含量，抑制黑色素生成。Linoleic acid 可藉由此方式使黑色素生成降低。
- V. 酪胺酸酶競爭抑制：藉由與酪胺酸酶的受質酪胺酸或 L-Dopa 競爭與酪胺酸酶的作用，使酪胺酸與酪胺酸酶的作用減少，進而減少黑色素合成。例如：對二苯酚 (Hydroquinone)。

(2) 還原黑色素生成過程中的產物

黑色素生合成為一連串的氧化反應，利用還原劑將黑色素生合成中間產物還原，減緩反應以減少黑色素產量。維生素 C 可將



Dopaquinone 還原為 L-Dopa，減緩黑色素形成，或將真黑色素還原為類黑色素以達到美白效果。抗氧化物質可減緩黑色素生合成。抗氧化劑降可與黑色素生合成的中間產物作用，使其無法繼續氧化聚合為黑色素；可與酪胺酸酶活性中心的銅離子作用，抑制酪胺酸酶的活性；可捕捉因紫外線照射所形成的自由基，直接或間接的抑制由自由基傳遞的二次訊息，抑制刺激黑色素生合成的訊息傳遞。 α -tocopherol 可干擾黑色素細胞的脂質過氧化且增加細胞內 Glutathione 含量，並可清除因日曬產生的自由基而降低黑色素生成的刺激。

(3) 抑制黑色素體的運送

黑色素體的運送對黑色素生成是非常重要的環節。人類膚色不一定隨著黑色素體數目增加而變深，黑色素體必須被黑色素細胞分泌至周圍的角質細胞內並擴散開皮膚才會變黑，故抑制黑色素體由黑色素細胞移行到角質細胞也可達到美白效果。

(4) 促進皮膚代謝，減少黑色素堆積

皮膚顏色主要決定於角質細胞內黑色素的堆積，若能增加角質代謝，加速角質脫落，則可減少黑色素的堆積，達到美白的效果。果酸 (Alpha hydroxyl acids)、水楊酸 (Salicylic acid) 則屬於這類的有效成分。

二、經皮給藥系統

1. 經皮給藥系統

自古以來，許多疾病影響著人類的健康，為了治療疾病，許多不同的藥物已被發展。為了能使藥物充分發揮其治療效果以治療疾病，不同的藥物服用途徑即被發展，如口服、注射、經皮給藥等。對皮膚疾病而言，經皮給藥系統 (Transdermal delivery system) 為最佳的選擇。經皮給藥系統的定義為將含有藥物的藥劑直接施予皮膚，以達到藥物直接作用



於特定部位的效果 (Zignani *et al.*, 1995)，而藥物經皮膚吸收後，停留在皮膚表層或肌肉等局部組織中發揮藥效。經皮給藥系統具有幾個優點：

- (1) 有選擇性的將藥物遞送到特定部位。
- (2) 為非侵襲性給藥系統。
- (3) 具持續釋放特性，可在較少的投藥次數時即達到相同的治療功效。

然而經皮給藥系統仍有部分缺點，如：在長期使用貼劑下，可能會造成皮膚過敏或發炎等不適感；皮膚本身穿透性不高，因此可應用的藥物類型與性質也有限制。

2. 皮膚結構

皮膚是人體分布最廣與最大的器官，約佔人體總面積 1.6-2.0 m²，具有許多功能，如：可形成保護屏障以阻絕物理性與化學性等外來傷害；防止水分流失並儲藏水分與脂肪；調節體溫；合成維生素 D。人體皮膚由外到內可分為表皮層 (Epidermis)、真皮層 (Dermis) 及皮下組織 (Hypodermis) (附圖六) (Volz *et al.*, 2015)。表皮層由不同代謝階段的角質細胞 (Keratinocytes) 構成，包含基底層 (Stratum basale)、棘狀層 (Stratum spinosum)、顆粒層 (Stratum granulosum) 和角質層 (Stratum corneum)，其中最表面的角質層由死掉的角質細胞與細胞間脂質互相堆疊而層，組成複雜，除了親脂性的神經醯胺 (Ceramide) 與脂肪酸等，中間也夾有親水部分，如此緻密的結構使角質層雖然只有 15-20 μm，仍為人體皮膚最大的屏障，故部分藥物會透過脫落角質層的方式以提高藥物的經皮吸收。真皮層位在皮膚的深層，主要由纖維母細胞 (Fibroblast) 及其分泌的膠原蛋白 (Collagen) 與彈性纖維 (Elastin) 組成，其中膠原蛋白與彈性纖維可賦予肌膚彈性，真皮層富含血管、淋巴、神經、汗腺、皮脂腺與毛囊，負責運送養分及氧氣到表皮層。皮下組織位於真皮層的最底層，由脂肪細胞組成，負責儲存能量與調節體溫，提供緩衝保護作用。



3. 藥物吸收途徑

經皮藥物吸收主要有三個途徑（附圖七）(Prausnitz and Langer, 2008; Volz *et al.*, 2015)：

- (1) 跨細胞運輸 (Transcellular route)：物質直接穿透角質細胞，由於細胞內含有親水性角質蛋白 (Keratin)，故小分子親水性藥物可由此穿透皮膚，但當角質細胞較多層時會增加滲透難度。
- (2) 細胞間運輸 (Intercellular route)：物質經由細胞間隙的脂質雙層 (Lipid bilayer) 穿透，適用於親脂性藥物，大部分藥物透過此方法穿透皮膚。
- (3) 濾泡運輸 (Follicular route)：物質沿著毛囊、汗腺等附屬器官，直接穿過皮膚的障礙深入皮下組織，穿透速率較快，適用於親水性或帶離子的藥物，但由於汗腺、毛囊及皮脂腺等僅占皮膚總面積的 0.1%，因此藥物穿透還是以前兩條路徑為主。

4. 影響藥物經皮吸收的因子

許多因素會影響藥物的經皮吸收，如藥物的物化特性、個體皮膚狀況差異、藥物給予條件等，整理如下 (El Maghraby *et al.*, 2008)：

- (1) 藥物分子量：分子量小於 500 的藥物較易被皮膚吸收。
- (2) 藥物的親水親脂性：油溶性藥物以細胞間運輸穿透皮膚，水溶性藥物以跨細胞運輸穿透皮膚。
- (3) 載體的特性：藥物在載體內的溶解度、載體的黏稠度等。
- (4) 皮膚生理狀態：當體表溫度升高即有助於藥物的穿透，而皮膚水分含量越高則可寬廣化親水性通道，提升藥物的穿透吸收。
- (5) 角質層厚度：角質層是藥物經皮吸收的最大阻礙，角質層越厚，經皮吸收越不容易。
- (6) 投藥濃度：基於擴散原理，當藥物濃度越高，單位面積時間下的皮膚



穿透量也會越高。

- (7) 投藥時間長短與頻率：投藥時間越長，其與皮膚的接觸越久，**穿透量**得以提升；投藥次數越頻繁，藥物在體內的累積濃度越高。

5. 乳液凝膠

常見的經皮藥物製劑有軟膏 (Ointment)、乳霜 (Cream)、乳液 (Lotion) 等，但皆具些許缺點，如穩定性較低。為了改善這些缺點，半固體製劑如凝膠 (Gel) 即被發展。凝膠的組成分為液體，可藉由少量的凝膠物質來構築大分子網絡結構，以固定化液體。然而，凝膠對於疏水性藥物的遞送較不適當，為了克服此限制，以乳液為基礎的乳液凝膠 (Emulsion gel) 亦被發展，使疏水性藥物能藉由凝膠遞送。

乳液凝膠是以水包油型 (Oil-in-water, O/W) 或油包水型 (Water-in-oil, W/O) 的乳液為基礎，在藉由凝膠劑使乳液凝膠 (Mohamed, 2004)，主要由水相、油相、乳化劑與凝膠劑組成，乳化劑 (Emulsifier) 能結合不相容的兩相：水相與油相，使得在製備時促進乳液的形成，同時可增加乳液的穩定性 (附圖八)，凝膠劑 (Gelling agent) 則可構築大分子網絡結構，將分散相液滴固定於連續相中，避免分散相液體聚合形成大液滴而分層，以增加穩定性。

乳液凝膠應用於經皮藥物遞送系統有下列優點：

- (1) 具有搖變性 (Thixotropy)，在正常情況下為黏稠，但若給予應力，則變成流動態 (黏度降低) (附圖九)，如此可提高藥物皮膚滲透率。
- (2) 將疏水性藥物 (Hydrophobic drugs) 加入凝膠製劑中：由於疏水性藥物無法溶於水，故無法溶於水溶性的凝膠中，但乳液凝膠能將疏水性藥物先加入油相中，再將油滴分散在水相中以形成乳液，再加入凝膠劑凝膠而增加穩定性。
- (3) 雙重控制釋放系統 (Dual control release system)：同時具有乳液與凝膠

的性質（附圖十）(Devada *et al.*, 2011)。乳液為藥物包覆在分散相中，再緩慢釋放至連續相中，慢慢被皮膚吸收。凝膠的網絡結構能包覆小分子藥物，可控制其釋放，又由於具黏膜黏附性 (Mucoadhesive)，故能延長藥物在皮膚上的接觸時間 (Alexander *et al.*, 2011)。

(4) 提高包覆率 (Loading capacity)

(5) 較不油膩 (Greaseless)

(6) 易塗抹開 (Spreadable)

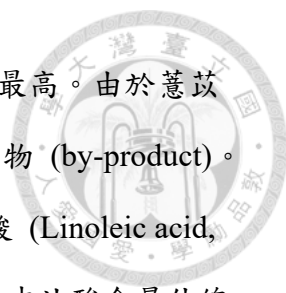
乳液凝膠仍有些限制，例如：內部的大粒子不易被皮膚吸收，而在形成乳液凝膠時也容易有氣泡被包覆 (Joshi *et al.*, 2011)。

三、薏仁油

1. 薏仁油簡介與其組成成分

薏苡籽實為禾本科 (*Poaceae*) 薏苡屬 (*Coix*) 的一年生或多年生草本植物，學名為 *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf.，英文名為 adlay 或是 Job's tears。薏苡籽實由外而內的結構分別為薏苡殼 (Adlay hull)、薏苡種皮 (Adlay testa)、薏苡麩皮 (Adlay bran) 及精白薏仁 (Polished adlay)，其中薏苡籽實去除薏苡殼後俗稱為紅薏仁或糙薏仁，糙薏仁再去除薏苡麩皮後剩下的種仁部分即為俗稱的薏仁。在臺灣薏苡主要栽培於南投縣草屯鎮、臺中市大雅區、彰化縣二林鎮及嘉義縣朴子市等地，而為了降低生育期及提高產量，臺中區農業改良場育種出台中 1、2、3、4 號，其中國產臺中選育四號 (Taichung selective No. 4, TCS4) 品系的薏苡籽實經黃與江 (黃和江, 1999) 分析後得每個部位的重量百分比為薏苡殼 35.8%、薏苡種皮 6.8%、薏苡麩皮 4.3%、精白薏仁 53.1% (黃和江, 1999)，而每個部位的一般組成成分結果也如附表一所示，其中薏苡麩皮的粗脂肪含量高達 24.4%。

根據黃與江 (黃和江, 1999) 的研究可得知薏苡籽實為高油脂的穀

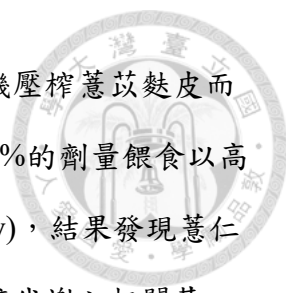


物，其中薏苡麩皮的粗脂肪含量更在一般組成成分中占最高。由於薏苡富含油脂，故產生薏仁油 (Adlay oil, Coix seed oil) 副產物 (by-product)。薏仁油的脂肪酸組成以油酸 (Oleic acid, 18:1)、亞麻油酸 (Linoleic acid, 18:2) 與棕櫚酸 (Palmitic acid, 16:0) 為主 (附表二)，其中油酸含量佔總脂肪酸的 48%，為單元不飽和脂肪酸 (monounsaturated fatty acid) 含量較高的油脂 (黃和江，1999)，而亞麻油酸為人體無法自行合成的必需脂肪酸。除了脂肪酸，薏仁油中也富含多種脂溶性維生素與植物化學成分，例如：維生素 E、維生素 A、薏仁酯、固醇類等。

2. 薏仁油的保健功效

(1) 降血糖與血脂

在薏苡籽實各個部位中，降低血清中膽固醇的效果以薏苡麩皮最顯著，而薏仁油更又佔薏苡麩皮的 24-25%，脂肪酸組成多為不飽和脂肪酸 (Unsaturated fatty acid)，能降低心血管疾病的發生。此外，薏仁油富含植物固醇 (Phytosterol) 與多酚類物質 (Polyphenolic substances) (Yu *et al.*, 2011)；植物固醇能有效地降低血脂並增加膽酸的分泌，而多酚類能減少氧化壓力並增強胰島素功效。黃 (黃，2003) 曾指出自糙薏苡以擠壓 (Press) 方式得到的薏仁油具有改善糖尿病的功效，在以高果糖飼料和高脂飼料誘導大鼠 (Wistar rats) 高血糖與高血脂的實驗中發現，當薏仁油佔大鼠飼料的 5% 及 10% 時，能顯著降低脂肪組織重量、降低血清中胰島素與受體素 (Leptin) 濃度，而當薏仁油佔飼料的 5% 時，能顯著降低血清中膽固醇、三酸甘油酯與低密度脂蛋白濃度。Yu *et al.* (Yu *et al.*, 2011) 以超臨界二氧化碳流體 (Supercritical CO₂ extraction) 萃取薏仁油，並以 1.25 mL kg⁻¹、2.5 mL kg⁻¹、5 mL kg⁻¹ 劑量的薏仁油餵食以高脂飼料誘導的大鼠 (Sprague Dawley)，實驗結果發現 5 mL kg⁻¹ 的薏仁油能降低腹部脂肪組織重量、血清中膽



固醇與低密度脂蛋白濃度。張（張，2015）以榨油機壓榨薏苡麩皮而得薏仁油，並以 100 g 高脂飼料中薏仁油佔 5%及 10%的劑量餵食以高脂飲食及 Streptozotocin 誘導的大鼠 (Sprague Dawley)，結果發現薏仁油能提高胰島素敏感度、降低血脂並影響肝臟葡萄糖代謝之相關基因，而有效降低大鼠因 Streptozotocin 所造成的高血糖。

(2) 抗腫瘤生成

近年研究指出薏仁油脂具有抑制癌細胞生長、轉移和抗腫瘤之功效。中國大陸學者使用超臨界二氧化碳萃取薏苡籽實所得的油狀萃取物，以針劑—康萊特注射劑 (Kanglaite[®], Coix seed oil) 方式施打於實驗動物後發現，可有效抑制腫瘤生長並延長其壽命，具有抗腫瘤與抗惡質化之效用。

(3) 抗氧化與美白

薏仁油內富含脂溶性維生素，如：維生素 A 與 E，維生素 E 具有良好的抗氧化能力，能防止人體內細胞膜的多元不飽和脂肪酸及磷脂質被氧化，維持細胞膜的完整性。薏仁油內的多酚類物質亦能減少氧化壓力。Yu *et al.* (Yu *et al.*, 2011) 以超臨界二氧化碳流體萃取薏仁油，並餵食以高脂飼料誘導的大鼠 (Sprague Dawley)，實驗結果發現薏仁油能顯著地降低血清中丙二醛 (Malondialdehyde) 含量，增加超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase) 活性，故薏仁油藉由清除超氧陰離子自由基 (Superoxide anion free radical) 以增加總抗氧化能力。以超臨界二氧化碳流體萃取薏苡籽實而得的萃取物具有抑制細胞內酪胺酸酶活性，以減少 B16F10 細胞黑色素含量，薏苡子實萃取物能減少 Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)、Tyrosinase、Tyrosinase related protein-1 與 Tyrosinase related protein-2 的表現，而減少黑色素的生成 (Huang *et al.*, 2014)。

第三章 實驗目的與架構



一、實驗目的

1. 將薏仁油製備成乳液與奈米乳液後，應用於小鼠黑色素腫瘤細胞 B16F10 與斑馬魚中，以探討薏仁油抑制黑色素生成的能力。
2. 製備薏仁油乳液、奈米乳液、奈米化乳液凝膠 (Nanoemulsion gel)，並分析其物理性質與比較不同外用製劑之間的藥物皮膚滲透率、黏度、穩定性等。

二、實驗架構

1. 薏仁油抑制黑色素生成能力探討

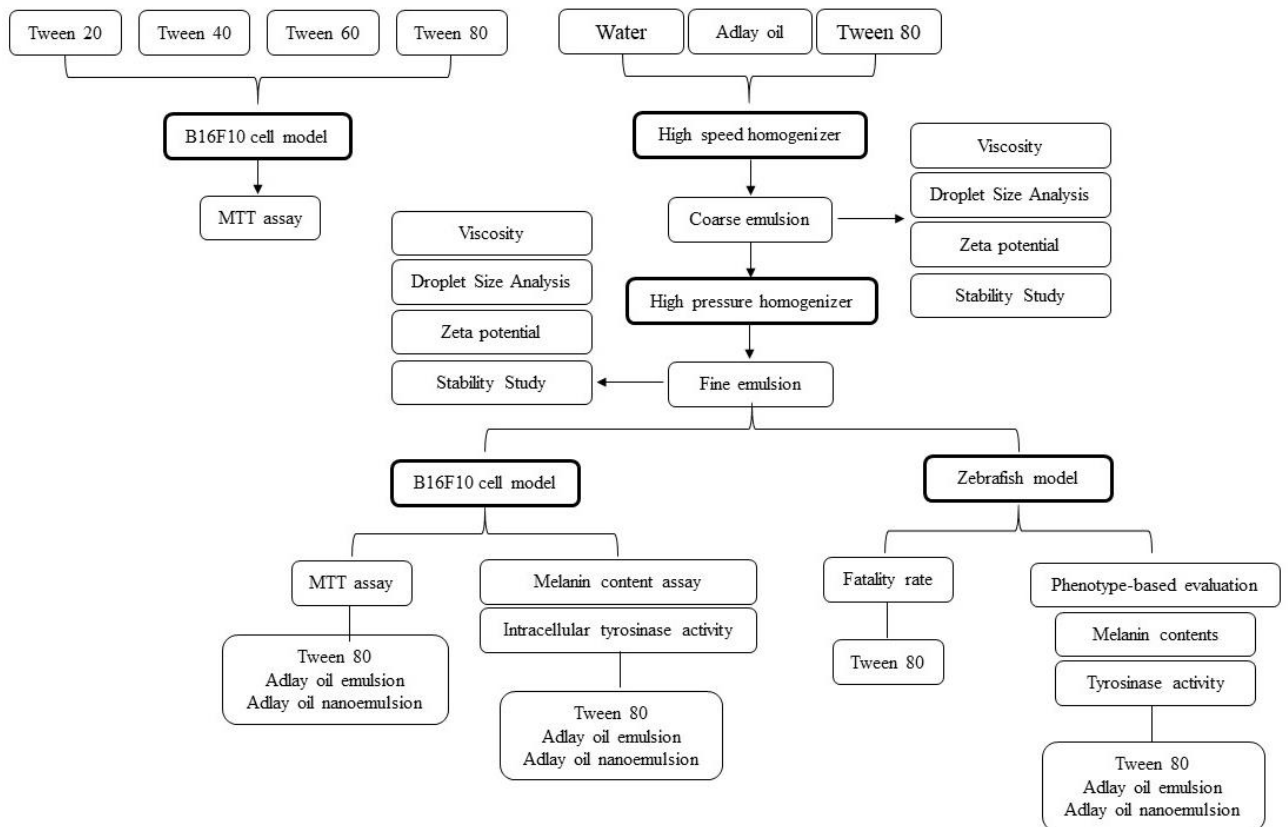
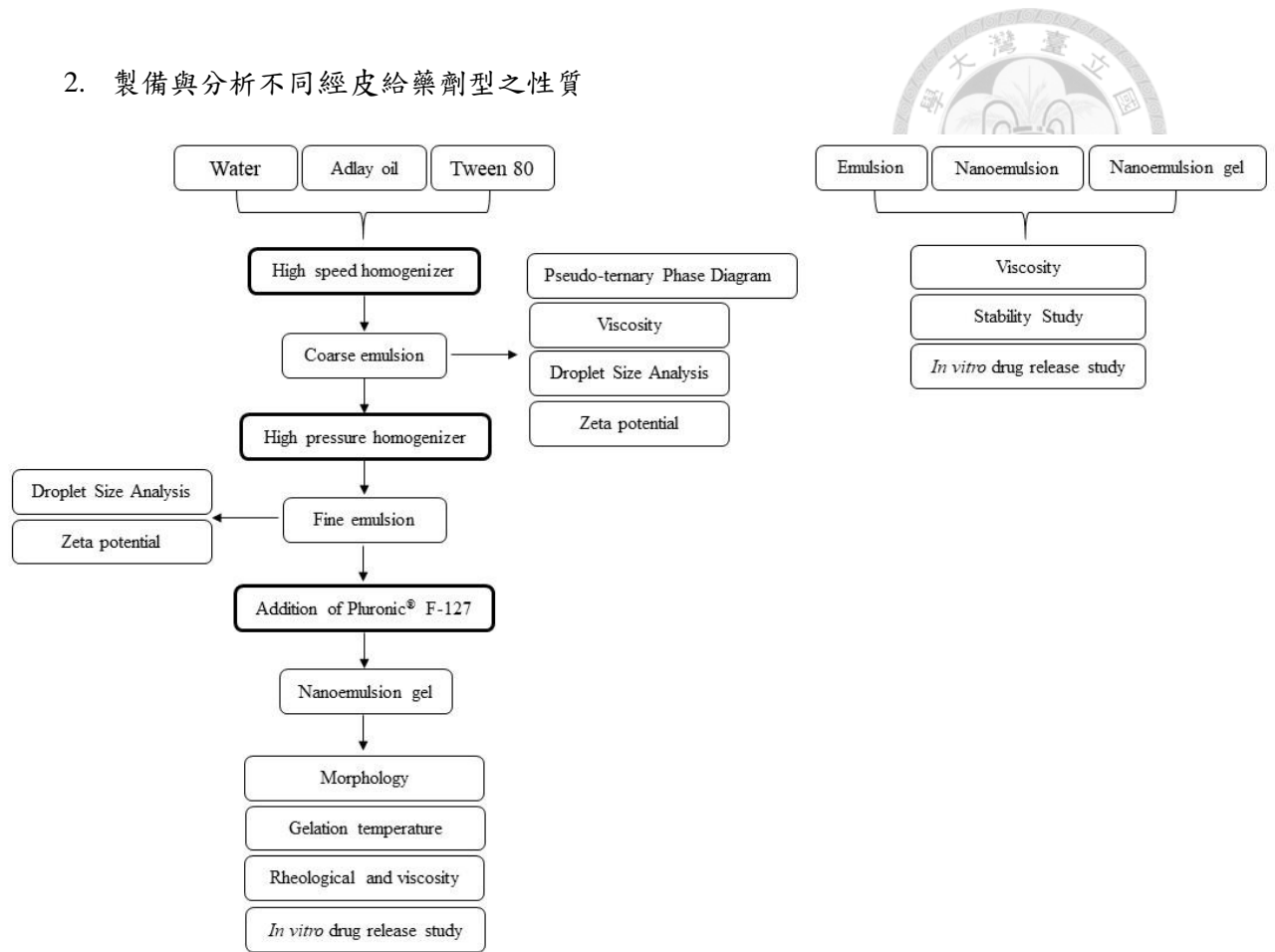


圖 一、以細胞模式與動物模式探討薏仁油抑制黑色素生成能力

Figure 1. Study on the inhibitory effect of adlay oil on melanin production by *in vitro* and *in vivo* model

2. 製備與分析不同經皮給藥劑型之性質



圖二、製備與分析不同經皮給藥劑型之性質

Figure 2. The preparation and investigation of different transdermal forms of allay oil

第四章 材料與方法



一、實驗材料

1. 實驗藥品與試劑

(1) Merck (Darmstadt, Germany)

Sodium bicarbonate (NaHCO_3)

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Isopropanol

Sodium carbonate (Na_2CO_3)

Folin-Ciocalteu' phenol reagent

Triton[®] X-100

Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)

Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

(2) J.T Baker (NJ, USA)

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)

Potassium chloride (KCl)

Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

(3) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)

L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa)

Methyl cellulose

Pluronic[®] F-127 (PF-127)

1-Phenyl-2-thiourea (PTU)

Gallic acid monohydrate



Albumin from bovine serum (BSA)

Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)

Tween[®] 20

Tween[®] 40

Tween[®] 60

Tween[®] 80

Melanin

Oil red O

(4) Invitrogen (Carlsbad, CA)

0.5% Trypsin-EDTA (10×) no phenol red

0.25% Trypsin-2.21 mM EDTA (1×) with phenol red

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) high glucose

Fetal bovine serum (FBS)

10,000 units/mL Penicillin and 10,000 µg/mL Streptomycin (P/S)

(5) G-Biosciences (Maryland Heights, MO, USA)

Tissue PE LB[™] lysis buffer

Sodium chloride (NaCl)

(6) Bio-rad (CA, USA)

Bio-rad protein assay dye reagent concentrate

(7) TCI (Tokyo, Japan)

Kojic acid

(8) 景明化工股份有限公司 (苗栗, 臺灣)

Sodium hydroxide (NaOH)

2. 實驗儀器設備

一番榨冷壓榨油機 (SP-230, 尚礫工業有限公司)



Franz diffusion cells (英特玻璃有限公司)

桌上型歧管式冷凍乾燥機 (FD-3A2D, 宏誠科儀有限公司)

恆溫培養箱 (LM-590R, 裕德科技有限公司)

低溫迴旋式震盪培養箱 (JSL-530, 見誠科技有限公司)

二氧化碳培養箱 (SCA-165PS, ASTEC Co., Ltd.)

均質乳化機 (T25 digital, IKA)

高壓均質機 (N-2, Nanolyzer)

酸鹼度計 (SP-2200, SUNTEX)

多點式加熱攪拌器 (MMS-12T, ChromTech)

解剖顯微鏡 (SZ61, Olympus Optical Co., Ltd)

倒立式光學顯微鏡 (IX51, Olympus Optical Co., Ltd.)

場發射掃描式電子顯微鏡 (Ultra plus, ZEISS)

粒徑分析儀 (NanotracTM 150, Microtrac)

界面電位分析儀 (Zetasizer Nano Z, Malvern Instruments Co., Ltd.)

動態流變儀 (AR 2000ex, TA Instruments)

低溫離心機 (3500, KUBOTA)

ELISA reader (Multiskan[®] FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific Instruments Co., Ltd.)

ELISA reader (EpochTM Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments)

恆溫乾浴器 (MD-02N-110,)

研磨器 (PowerMasher II, nippi)

二、薏仁油的製備

本次實驗樣品—薏仁油 (Adlay bran oil, ABO) 為薏苡麩皮以一番榨冷壓榨油機壓榨而得。薏苡麩皮來自國產台中選育四號 (Taichung selective No. 4, TCS4) 品系的薏苡籽實，為薏苡籽實以脫殼機脫去薏苡殼與種皮後，將取得

的糙薏仁去除精白薏仁部分，即可取得薏苡麩皮，並儲存於-20°C待製備薏仁油時使用。

製備薏仁油為將約 1.5 kg 的薏苡麩皮包於濾布中，整形至圓形狀後置入一番榨冷壓榨油機中，並於出油口放置血清瓶以收集樣品後，啟動機器。一番榨冷壓榨油機利用液壓傳動系統壓榨，過程由下而上，分兩段式進行壓榨，第一段壓力上升至 200 kg，壓榨 10 分鐘後，進入第二段壓力上升至 550 kg，壓榨 50 分鐘，整個過程約 1-1.5 小時，樣品即收集完畢，可得約 300 mL 薏仁油，萃取率約 20%。將裝有樣品的血清瓶以鋁箔紙包覆，避光儲存於 4°C 備用。

三、薏仁油美白功效試驗—體外 B16F10 細胞試驗

1. 實驗細胞

本實驗使用的細胞為小鼠黑色素瘤細胞 (*Mus musculus* skin melanoma cell) B16-F10，為貼附型 (Adherent) 細胞，型態為紡錘狀 (Spindle-shaped) 與似上皮細胞狀 (Epithelial-like cells) 的混合，由國立臺灣大學食品科技研究所鄭光成博士實驗室提供，來自食品工業發展研究所之生物資源保存及研究中心，BCRC 60031。

2. 細胞實驗培養液配製

A. 細胞培養液—DMEM

取一包 DMEM 粉末與 3.7 g NaHCO_3 至量杯中，加入適量去離子水，於加熱攪拌器上攪拌至粉末完全溶解後，調整酸鹼值至 pH 7.2，再以去離子水定量至 1 L。將量杯移至細胞培養室操作台，以 0.22 μm 血清瓶用濾杯抽氣過濾，並以每 450 mL 分裝至血清瓶中，儲存於 4°C 備用。

取 450 mL 已經濾杯過濾的 DMEM 與 45 mL 去補體胎牛血清 (FBS, 56°C 水浴反應 30 min) 和 5 mL 抗生素 (P/S) 混合均勻後儲



存於 4°C 備用，在使用前於 37°C 水浴中回溫。

B. 磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS)

取 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄、0.24 g KH₂PO₄ 至量杯中，加入去離子水定量至 1 L，於加熱攪拌器上攪拌至粉末完全溶解後分裝至血清瓶中，再於滅菌釜中以 121°C 高溫高壓滅菌 30 分鐘，待冷卻後儲存於 4°C 備用，在使用前於 37°C 水浴中回溫。

3. 細胞繼代培養

細胞於 10 公分盤中培養至八分滿時，進行繼代培養 (Subculture)。吸除 10 公分盤中的舊細胞培養液，以 2 mL PBS 清洗一次後，加入 1 mL 0.25% Trypsin-2.21 mM EDTA，搖勻潤濕細胞表面後吸除，於 37°C 培養箱反應 3-5 分鐘，反應完畢後以 5 mL 含 10% FBS 與 1 x P/S 的新鮮 DMEM 培養液打下細胞，再以十分之一繼代取 500 μL 細胞液至已添加 8 mL 新鮮細胞培養液的 10 公分盤中搖晃均勻，置於 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱培養兩天，細胞滿度即可達八分滿並再繼代。為了避免 B16-F10 細胞經過多次繼代而老化，酪胺酸酶表現量降低，本實驗所使用的細胞繼代次數皆在 10 代以內。

4. 細胞實驗乳液與奈米乳液樣品製備

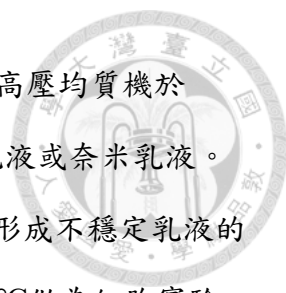
(1) 試劑配製

Oil red O stock solution

精秤 0.5 g Oil red 粉末溶於 100 mL Isopropanol 中以配製 Oil red O stock solution，以鋁箔紙包覆避光儲存於 4°C 備用。

(2) 實驗方法

為了方便觀察樣品型態的變化，薏仁油中加入 1% (v/v) Oil red O stock 進行染色。將薏仁油與 Tween 80 以 40:1、80:3、40:3、20:3、7:3 重量比加入樣品瓶中並混合均勻後，加入去離子水，以均質乳化



機於 25,000 rpm 下均質 2 分鐘製備成粗乳液，再以高壓均質機於 1,000 bar 壓力下高壓均質兩次 (2 cycles)，即可得乳液或奈米乳液。得到的乳液與奈米乳液樣品進行穩定性試驗，去除形成不穩定乳液的薏仁油與 Tween 80 比例，剩餘比例的樣品儲存於 4°C 做為細胞實驗的樣品備用。

5. 細胞存活率分析

(1) 實驗原理

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 呈色法為常用的細胞生長檢驗方法。MTT 中能溶於水的 Tetrazolium 為黃色，經活細胞粒線體中的琥珀酸去氫酶 (Succinate dehydrogenase) 還原後形成深紫色不溶於水的 Formazan，可利用 DMSO 溶解，再藉由 ELISA plate reader 偵測最大吸收波長 570 nm 之吸光值，因 Formazan 形成量與活細胞數量呈正比，故可藉由吸光值間接推估細胞存活率 (Mosmann, 1983)。利用本方法測試不同種與濃度樣品在培養細胞兩天後之細胞存活率，以確認樣品對細胞是否有毒性。

(2) 試劑配製

MTT stock solution (2 mg/mL)

精秤 0.03 g MTT 粉末溶於 15 mL 去離子水中以配製 4 倍的 MTT stock solution，溶解後以 0.22 μm 混合纖維濾膜 (Mixed cellulose esters membrane, MCE membrane) 過濾後，以鋁箔紙避光儲存於 4°C 備用。進行 MTT assay 時，將 MTT stock solution 以不含有 FBS 的 DMEM 細胞培養液稀釋至 0.5 mg/mL 後再使用。

(3) 實驗方法

根據細胞濃度標準曲線圖與細胞滿度觀察的結果，將 B16-F10 細胞以每孔 3,000 個/100 μL 的細胞濃度接種於 96 孔盤中培養 1 天待貼

盤後，吸除上清液，加入 100 μ L 以細胞培養液配製的不同樣品培養 2 天後，吸除上清液，以 100 μ L/well PBS 清洗 1 次，加入 100 μ L MTT reagent (0.5 mg/mL)，於 37°C 培養箱反應 1 小時後，吸除試劑加入 100 μ L DMSO 後於震盪器上搖晃反應 10 min 待細胞內藍紫色 Formazan 溶出，再以 ELISA plate reader 測定最大吸收波長 570 nm 之吸光值，並根據公式計算經樣品處理後的細胞存活率，從加入 MTT reagent 開始即全程避光進行。

$$\text{細胞存活率 (\%)} = \frac{\text{OD}_{570\text{nm}} \text{ of treatment} - \text{OD}_{570\text{nm}} \text{ of blank}}{\text{OD}_{570\text{nm}} \text{ of control} - \text{OD}_{570\text{nm}} \text{ of blank}} \times 100\%$$

表一、細胞實驗中測試的樣品與其控制組

Table 1. Samples tested in cell experiment and its control

樣品組 (Sample)	控制組 (Control)
Tween 20	無加樣品處理組
Tween 40	無加樣品處理組
Tween 60	無加樣品處理組
Tween 80	無加樣品處理組
Kojic acid	無加樣品處理組
薏仁油乳液／奈米乳液	薏仁油乳液／奈米乳液相對應 Tween 80 濃度處理組

6. 細胞內黑色素含量測定

(1) 實驗原理

B16-F10 細胞自身會分泌黑色素，細胞內部的黑色素可藉由加熱與 1 N 氫氧化鈉強鹼性溶液使細胞膜溶解而被提取，同時 1 N 氫氧化鈉可將黑色素由不溶性之聚合物氧化裂解成水溶性的物質而得以被溶解，並於波長 405 nm 下有吸收峰，故可測定波長 405 nm 的吸光值再去換算黑色素含量（張，2012；張，2014；劉，2014）。



(2) 試劑配製

A. Kojic acid stock solution (10,000 $\mu\text{g/mL}$)

精秤 0.01 g Kojic acid 粉末溶於 1 mL 去離子水中以配製 10,000 $\mu\text{g/mL}$ Kojic acid stock solution，溶解後以 0.22 μm MCE membrane 過濾並以 50 μL 為單位分裝儲存於 -20°C 備用。

B. 1 N NaOH (Containing 10% DMSO)

取 10 mL DMSO 溶於 90 mL 去離子水中以配製 10% (v/v) DMSO，接著精秤 2 g NaOH 粉末溶於 50 mL 10% (v/v) DMSO 以配製含有 10% DMSO 的 1 N NaOH，儲存於常溫備用。

C. BSA stock solution (2 mg/mL)

精秤 0.002 g BSA 粉末溶於 10 mL 去離子水中以配製 2 mg/mL BSA stock solution，分裝後儲存於 -20°C 備用。

D. Melanin stock solution (1,000 $\mu\text{g/mL}$)


精秤 0.001 g Melanin 粉末溶於 1 mL DMSO 中以配製 1,000 $\mu\text{g/mL}$ Melanin stock solution，以 100 μL 為單位分裝，並避光儲存於 -20°C 備用。

E. Bio-rad protein assay dye reagent (1 \times)

為使用時現配，配製過程全程避光，取 1/5 總體積的 Bio-rad protein assay dye reagent concentrate 溶於 4/5 總體積的去離子水中以配製 1 \times Bio-rad protein assay dye reagent。

(3) 實驗方法

此法參考張（張，2014）與 Hsu *et al.* (Hsu *et al.*, 2016)等文獻後部分再加以修改。由於 24 孔盤的細胞生長面積 (Cell growth area) 約為 96 孔盤的六倍，故 B16-F10 細胞以每孔 2×10^4 個/667 μL 的濃度接種於 24 孔盤中，培養 1 天待貼盤後吸除上清液，加入 667 μL 以細胞



培養液配製的不同樣品培養 2 天後吸除上清液，以 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ PBS 清洗 1 次，加入 30 $\mu\text{L}/\text{well}$ 0.5% 無 Phenol 的 Trypsin 使細胞脫離，再以 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ PBS 將細胞打下取至微量離心管中，於 4°C、20,000 g 下離心 5 分鐘後，加入 100 μL 含有 10% DMSO 的 1 N NaOH，於 80°C 恆溫乾浴器中反應 1 小時，再於 20,000 g 下離心 5 分鐘，取上清液後分兩部分進行。配製 0、5、10、20、30、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度的黑色素 (Melanin) 標準曲線並取 90 $\mu\text{L}/\text{well}$ 至 96 孔盤，同時取 90 μL 樣品上清液至 96 孔盤中，再以 ELISA plate reader 測定波長 405 nm 之吸光值，藉由黑色素標準曲線換算出每組細胞液之黑色素濃度。配製 0、100、200、400、800、1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度的牛血清白蛋白 (BSA) 標準曲線並取 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ 至 96 孔盤，同時取 10 μL 樣品上清液至 96 孔盤中，加入 190 $\mu\text{L}/\text{well}$ 1 \times Bio-rad protein assay dye reagent 避光反應 10 min，再以 ELISA plate reader 測定波長 595 nm 之吸光值，藉由牛血清白蛋白標準曲線換算出每組細胞液之蛋白質濃度。將每組測得的黑色素濃度除以蛋白質濃度作校正，實驗結果以樣品組相對應控制組的百分比表示，每個樣品組之控制組如表一所示。

$$\text{樣品組百分比 (\%)} = \frac{B}{A} \times 100\%$$

A: 樣品組相對應控制組的黑色素濃度/蛋白質濃度；B: 樣品組的黑色素濃度/蛋白質濃度。

7. 細胞內酪胺酸酶活性測定

(1) 實驗原理

黑色素 (Melanin) 形成為酪胺酸 (L-tyrosine) 被酪胺酸酶 (Tyrosinase) 羥化 (Hydroxylation) 成 L-二羥基苯丙氨酸 (L-dopa) 後，再被酪胺酸酶氧化成 Dopaquinone 並會自發性聚合環化成黑色素 (Chang, 2009)。B16-F10 細胞內含酪胺酸酶，利用冷凍解凍循環

(Freeze-thaw cycle) 方法時會產生冰晶將細胞膜打破，使得細胞內酪胺酸酶釋出，接著加入其受質 L-Dopa，若酪胺酸酶的活性越高，產生的 Dopaquinone 會越多，其最大吸收波長 475 nm 下的吸光值也會越高（張，2014）。

(2) 試劑配製

A. Kojic acid stock solution (10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

同第四章材料方法之細胞內黑色素含量測定。

B. Phosphate buffer (PB buffer, 50 mM)

精秤 5.22 g K_2HPO_4 粉末溶於 30 mL 去離子水中以配製 1 M 的 K_2HPO_4 溶液，接著精秤 4.08 g KH_2PO_4 粉末溶於 30 mL 去離子水中以配製 1 M 的 KH_2PO_4 溶液。取 1.175 mL 1M K_2HPO_4 溶液和 1.325 mL 1 M KH_2PO_4 溶液與 47.5 mL 去離子水混合均勻，以配製 50 mL、pH 6.8 的 50 mM PB buffer，儲存於常溫備用。

C. Phosphate buffer (50 mM, Containing 1% Triton X-100 and 0.1 mM PMSF)

精秤 0.0174 g PMSF 粉末溶於 10 mL 異丙醇中以配製 10 mM 的 PMSF stock solution，避光儲存於 4°C 備用。取 1.175 mL 1M K_2HPO_4 溶液、1.325 mL 1M KH_2PO_4 溶液與、0.5 mL Triton X-100、0.5 mL 10 mM PMSF stock solution 與 46.5 mL 去離子水混合均勻，以配製 50 mL 含 1% Triton X-100 和 0.1 mM PMSF 的 50 mM PB buffer，避光儲存於 4°C 備用。

D. BSA stock solution (2 mg/mL)

同第四章材料方法之細胞內黑色素含量測定。

E. Bio-rad protein assay dye reagent

同第四章材料方法之細胞內黑色素含量測定。



F. L-dopa stock solution (5 mM)

為使用時現配，配製過程全程避光。精秤 0.0099 g L-dopa 粉末溶於 10 mL 50 mM PB buffer 中以配製 5 mM 的 L-dopa stock solution。

(3) 實驗方法

此法參考張等人（張等，2009）與張（張，2009）等文獻後部分再加以修改。B16-F10 細胞以每孔 2×10^4 個/667 μ L 的濃度接種於 24 孔盤中，培養 1 天待貼盤後吸除上清液，加入 667 μ L 以細胞培養液配製的不同樣品培養 2 天後吸除上清液，以 300 μ L/well PBS 清洗 1 次後，加入 30 μ L/well 0.5% 無 Phenol 的 Trypsin 使細胞脫離，並以 300 μ L/well PBS 將細胞打下取至微量離心管中，於 4°C、20,000 g 下離心 5 min 後，加入 100 μ L 含有 1% Triton X-100 和 0.1 mM PMSF 的 50 mM PB buffer，置於 -80°C 中冷凍 30 分鐘，再於室溫中解凍 30 分鐘，此步驟重複兩次後，於 4°C、20,000 g 下離心 5 分鐘，取上清液進行蛋白質定量。配製 0、200、400、800、1,600、2,000 μ g/mL 濃度的牛血清白蛋白 (BSA) 標準曲線並取 5 μ L/well 至 96 孔盤，同時取 5 μ L 樣品上清液至 96 孔盤中，加入 195 μ L/well Bio-rad protein assay dye reagent 避光反應 10 min，再以 ELISA plate reader 測定波長 595 nm 之吸光值，藉由牛血清白蛋白標準曲線換算出每組細胞液之蛋白質濃度。取含有 50 μ g 蛋白質的細胞裂解液，加入 50 mM PB buffer 補體積至 180 μ L/well 後，加入 20 μ L 5 mM L-dopa stock solution，於 37°C 下反應 1 小時，再以 ELISA plate reader 測定波長 475 nm 之吸光值，實驗結果以樣品組相對應控制組的百分比表示，每個樣品組之控制組如表一所示。

$$\text{樣品組百分比 (\%)} = \frac{\text{OD}_{475 \text{ nm of treatment}} - \text{OD}_{475 \text{ nm of blank}}}{\text{OD}_{475 \text{ nm of control}} - \text{OD}_{475 \text{ nm of blank}}} \times 100\%$$



8. 細胞試驗中乳液與奈米乳液之配方評估與製備

依據 Tween 80 在 B16F10 細胞存活率分析試驗中無毒殺性的濃度，配製五個不同薏仁油與 Tween 80 比例的配方，薏仁油與 Tween 80 的重量比為 40:1、80:3、40:3、20:3、7:3，以均質乳化機於 25,000 rpm 下均質 2 分鐘製備成乳液後，再以高壓均質機於 1000 bar 壓力下高壓均質兩次 (2 cycles) 後，進行粒徑與穩定性分析。

四、薏仁油美白功效試驗—體內斑馬魚動物試驗

1. 實驗動物

斑馬魚胚胎購自國立臺灣大學生命科學院科技共同空間 (TechComm) 一斑馬魚核心設施，胚胎的魚種為 AB strain。斑馬魚飼養溫度為 28°C，光照期與黑暗期為 14 與 10 小時。利用光誘導斑馬魚產卵，並於 30 分鐘內完成胚胎的收集。斑馬魚胚胎取得後，飼養於斑馬魚培養液—E3 solution (含 50 units/mL Penicillin 與 50 µg/mL Streptomycin) 並飼養於 28°C 培養箱中。

2. 動物實驗培養液配製

E3 solution

E3 solution 含有 5 mM NaCl、0.17 mM KCl、0.33 mM CaCl₂、0.33 mM MgSO₄，先配製成 50 倍，再稀釋至 1 倍使用。精秤 14.61 g NaCl、0.63 g KCl、2.43 g CaCl₂·2H₂O、4.07 g MgSO₄·7H₂O 粉末溶於 1 L 去離子水中以配製 50 倍的 E3 solution。取 20 mL 50 倍 E3 solution 和 5 mL P/S 與 975 mL 去離子水混合均勻，以配製 1 L 的 1× E3 solution，其中包含 50 units/mL Penicillin 與 50 µg/mL Streptomycin，儲存於 4°C 備用。

3. 動物飼養

斑馬魚胚胎取得後，觀察胚胎的型態，去除外觀呈白色的死蛋，接著使用塑膠滴管將每孔固定數量的斑馬魚胚胎分至微量多孔盤並置於

28°C培養箱培養，待胚胎受精後 7 小時 (7 hour post-fertilization, hpf) 後，再次以肉眼與顯微鏡觀察胚胎的型態，去除死蛋後加入 E3 solution—控制組與以 E3 solution 配製的樣品進行培養，為了胚胎能均勻吸收到樣品，培養 24 小時後 (31 hpf) 置換新配製的樣品溶液，繼續培養 24 小時 (55 hpf) 後，進行後續的實驗。

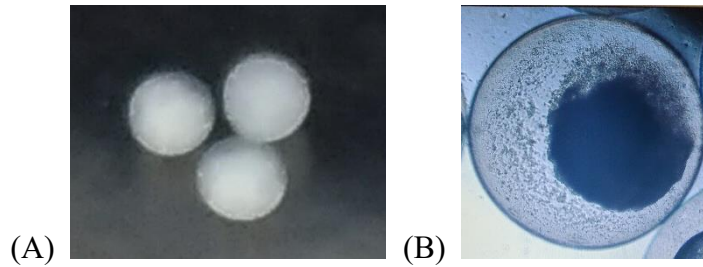


圖 三、斑馬魚胚胎死亡的型態 (A) 肉眼觀察—白蛋 (B) 解剖顯微鏡觀察
Figure 3. Dead zebrafish embryo (A) White egg observed by naked eye (B) Dead zebrafish embryo observed by stereomicroscope

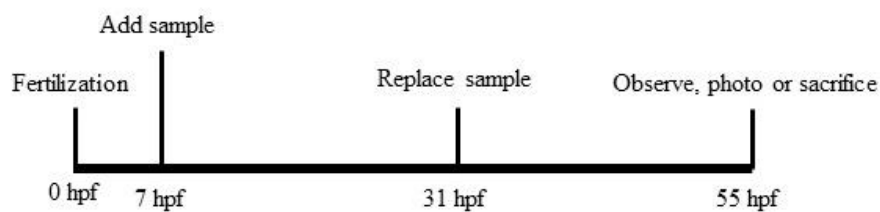


圖 四、動物實驗時程規劃示意圖

Figure 4. A schematic representation for the schedule of animal experiment

4. 斑馬魚胚胎致死率試驗

此法參考 Choi *et al.* (Choi *et al.*, 2007) 文獻後部分再加以修改。取得斑馬魚胚胎後使用塑膠滴管吸取胚胎，以每孔 3 顆胚胎為單位分配至 96 孔盤中，並置於 28°C 培養箱培養至 7 hpf 時，去除舊的斑馬魚培養液，加入 167 μ L 以斑馬魚培養液配製的不同樣品培養 1 天後，置換新配製的樣



品溶液，繼續培養至 55 hpf 時，觀察與紀錄斑馬魚胚胎死亡顆數並換算成存活率。每組樣品以 24 個胚胎為一個重複，進行三重複試驗。

表 二、動物實驗中測試的樣品與其控制組

Table 2. Samples tested in animal experiment and its control

樣品組 (Sample)	控制組 (Control)
Tween 80	無加樣品處理組
Positive control-PTU	無加樣品處理組
薏仁油乳液／奈米乳液	薏仁油乳液／奈米乳液相對應 Tween 80 濃度處理組

5. 動物實驗乳液與奈米乳液樣品製備

(1) 試劑配製

Oil red O stock solution

同第四章材料方法之細胞實驗乳液與奈米乳液樣品製備。

(2) 實驗方法

為了方便觀察樣品型態的變化，薏仁油中加入 1% (v/v) Oil red O stock 進行染色。將薏仁油與 Tween 80 以 10:1、7:3 重量比加入樣品瓶中並混合均勻後，加入去離子水，以均質乳化機於 25,000 rpm 下均質 2 分鐘製備成粗乳液，再以高壓均質機於 1,000 bar 壓力下高壓均質兩次 (2 cycles)，即可得乳液或奈米乳液。得到的乳液與奈米乳液樣品進行穩定性試驗分析其穩定性，樣品儲存於 4°C 做為動物實驗的樣品備用。

6. 斑馬魚胚胎解剖顯微鏡拍攝

(1) 試劑配製

A. PTU stock solution (2 mM)

精秤 0.03 g PTU 粉末溶於 100 mL E3 solution 中以配製 2 mM



PTU stock solution，避光儲存於 4°C 備用。

B. Methyl cellulose (2%, w/w)

精秤 2 g Methyl cellulose 粉末溶於 98 g 去離子水中以配製 2% (w/w) Methyl cellulose，於 4°C 下攪拌均勻後，儲存於 4°C 備用。

(2) 實驗方法

此法參考 Choi *et al.* (Choi *et al.*, 2007) 與 Hsu *et al.* (Hsu *et al.*, 2016) 等文獻後部分再加以修改。取得斑馬魚胚胎後使用塑膠滴管吸取胚胎，以每孔 3 顆胚胎為單位分配至 96 孔盤中，並置於 28°C 培養箱培養至 7 hpf 時，去除舊的斑馬魚培養液，加入 167 μ L 以斑馬魚培養液配製的不同樣品培養 1 天後，置換新配製的樣品溶液，繼續培養至 55 hpf 時大部分斑馬魚已孵出，以 100 μ L/well PBS 清洗 1 次後，使用塑膠滴管將斑馬魚取至凹槽載玻片 (Depression slide) 上，並以 2% (w/w) Methyl cellulose 固定後，以解剖顯微鏡觀察斑馬魚魚體之型態，以判斷樣品是否有毒性，同時以相機拍攝整隻斑馬魚魚體，以觀察黑色素的變化。

7. 斑馬魚胚胎黑色素含量與酪胺酸酶活性測定

(1) 試劑配製

A. PTU stock solution (2 mM)

同第四章材料方法之斑馬魚胚胎解剖顯微鏡拍攝。

B. BSA stock solution (2 mg/mL)

同第四章材料方法之細胞內黑色素含量測定。

C. Bio-rad protein assay dye reagent (1 \times)

同第四章材料方法之細胞內黑色素含量測定。

D. L-dopa stock solution (1 mM)

為使用時現配，配製過程全程避光。精秤 0.0020 g L-dopa 粉



未溶於 10 mL Lysis buffer 中以配製 1 mM 的 L-dopa stock solution。

E. 1 N NaOH (Containing 10% DMSO)

同第四章材料方法之細胞內黑色素含量測定。

F. Melanin stock solution (1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

同第四章材料方法之細胞內黑色素含量測定。

(2) 實驗方法

此法參考 Choi *et al.* (Choi *et al.*, 2007) 與 Hsu *et al.* (Hsu *et al.*, 2016) 等文獻後部分再加以修改。取得斑馬魚胚胎後使用塑膠滴管吸取胚胎，以每孔 100 顆胚胎為單位分配至 6 孔盤中，並置於 28°C 培養箱培養至 7 hpf 時，去除舊的斑馬魚培養液，加入 5 mL 以斑馬魚培養液配製的不同樣品培養 1 天後，置換新配製的樣品溶液，繼續培養至 55 hpf 時，以 PBS 清洗 1 次後，取斑馬魚至微量離心管中，於 4°C、20,000 g 下離心 5 min 後去除上清液，加入 150 μL Lysis buffer，以研磨器均質 2 分鐘後，於 4°C、20,000 g 下離心 5 min，得裂解液與黑色素沉澱後，分兩部分進行。

為了測定酪胺酸酶活性，裂解液稀釋 10 倍後進行蛋白質定量。配製 0、200、400、800、1,600、2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度的牛血清白蛋白 (BSA) 標準曲線並取 5 $\mu\text{L}/\text{well}$ 至 96 孔盤，同時取 5 μL 樣品裂解液至 96 孔盤中，加入 195 $\mu\text{L}/\text{well}$ Bio-rad protein assay dye reagent 避光反應 10 min，再以 ELISA plate reader 測定波長 595 nm 之吸光值，藉由牛血清白蛋白標準曲線換算出每組裂解液之蛋白質濃度。取含有 250 μg 蛋白質的裂解液，加入 Lysis buffer 補體積至 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 後，加入 100 μL 1 mM L-dopa stock solution，於 37°C 下反應 1 小時，再以 ELISA plate reader 測定波長 475 nm 之吸光值，實驗結果以樣品組相對應控



制組的百分比表示，每個樣品組之控制組如表二所示。

$$\text{樣品組百分比 (\%)} = \frac{\text{OD}_{475 \text{ nm of treatment}} - \text{OD}_{475 \text{ nm of blank}}}{\text{OD}_{475 \text{ nm of control}} - \text{OD}_{475 \text{ nm of blank}}} \times 100\%$$

為了測定黑色素含量，黑色素沉澱部分加入 200 μL 含有 10% DMSO 的 1 N NaOH，於 100°C 恆溫乾浴器中反應 1 小時，再於 20,000 g 下離心 5 分鐘，取上清液。配製 0、5、10、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度的黑色素 (Melanin) 標準曲線並取 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 至 96 孔盤，同時取 200 μL 樣品上清液至 96 孔盤中，再以 ELISA plate reader 測定波長 405 nm 之吸光值，藉由黑色素標準曲線換算出每組樣品之黑色素濃度，實驗結果以樣品組相對應控制組的百分比表示，每個樣品組之控制組如表二所示。

$$\text{樣品組百分比 (\%)} = \frac{\text{OD}_{475 \text{ nm of treatment}} - \text{OD}_{475 \text{ nm of blank}}}{\text{OD}_{475 \text{ nm of control}} - \text{OD}_{475 \text{ nm of blank}}} \times 100\%$$

8. 細胞試驗中乳液與奈米乳液之配方評估與製備

依據 Tween 80 在斑馬魚胚胎致死率試驗中無毒殺性的濃度，配製兩個不同薏仁油與 Tween 80 比例的配方，薏仁油與 Tween 80 的重量比為 10:1、7:3，以均質乳化機於 25,000 rpm 下均質 2 分鐘製備成乳液後，再以高壓均質機於 1000 bar 壓力下高壓均質兩次 (2 cycles) 後，進行粒徑與穩定性分析。

五、經皮給藥劑型製備與物性分析

1. 擬三相圖繪製


(1) 試劑配製

Oil red O stock solution

同第四章材料方法之細胞實驗乳液與奈米乳液樣品製備。

(2) 實驗方法

此法參考 Xi *et al.* (Xi *et al.*, 2009) 文獻後部分再加以修改後，建



構薏仁油、Tween 80、去離子水的擬三相圖，每個因子佔擬三相圖的一邊。為了方便觀察樣品型態的變化，薏仁油中加入 1% (v/v) Oil red O stock 進行染色。將薏仁油與 Tween 80 以 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 重量比加入樣品瓶中並加熱攪拌混合均勻後，以水滴定法 (Aqueous titration method) 加入固定重量的去離子水，以均質乳化機於 25,000 rpm 下均質 2 分鐘後，放置 1 小時觀察樣品的型態，以找出薏仁油、Tween 80、水能形成穩定乳液的比例。放置 1 小時後樣品若分層，為不穩定的乳液；樣品若倒置 5 分鐘未流動，為乳液凝膠 (Emulsion gel)；樣品若不分層且具有流動性，為穩定的乳液。

2. 奈米乳液之配方評估與製備

(1) 奈米乳液配方評估

根據擬三相圖的結果，固定水分含量為 60%，改變薏仁油與 Tween 80 的重量比為 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9，以均質乳化機於 25,000 rpm 下均質 2 分鐘製備成乳液後，進行黏度測定，由於乳液進入高壓均質機時，需具有流動性及黏度不能超過 1 Pa·s 等限制，故先去除黏度高於 1 Pa·s 的薏仁油與 Tween 80 比例，剩餘比例的乳液以高壓均質機於 1000 bar 壓力下高壓均質兩次 (2 cycles) 後，進行粒徑分析，選出粒徑小於 100 nm 且乳化劑最少的薏仁油與 Tween 80 比例為最適配方。

選出最適薏仁油與 Tween 80 比例後，據擬三相圖的結果，固定薏仁油與 Tween 80 比例，改變水分含量，以均質乳化機於 25,000 rpm 下均質 2 分鐘製備成乳液後，進行黏度測定以去除黏度高於 1 Pa·s 的水分含量，選出最適的水分含量。

(2) 奈米乳液製備

根據配方評估的結果，水：薏仁油：Tween 80=60:28:12 (%) 的



重量比混合後，以均質乳化機於 25,000 rpm 下均質 2 分鐘製備成粗乳液，再以高壓均質機於 1000 bar 壓力下高壓均質兩次 (2 cycles)，即可得奈米乳液。

3. 粒徑分析

(1) 實驗原理

動態光散射 (Dynamic Light Scattering) 原理為懸浮在液體中的粒子會與溶劑分子隨機碰撞而產生布朗運動，再量測雷射光射入含有粒子的液體後，撞擊粒子所產生的散射光，進行訊號分析，即可計算出粒子的粒徑及粒徑分佈。

(2) 實驗方法

為了避免多重光散射效應 (Multiple scattering effects)，樣品在測量前以去離子水稀釋 500 倍，取 4 μL 薏仁油乳液或奈米乳液與 1,996 μL 去離子水混合均勻後，取 2 mL 稀釋液以動態光散射分析儀 (Dynamic light scattering analyzer) 分析，所有樣品稀釋液之 Loading index 皆介於儀器之 Loading index 範圍內 (0.1-100)。在軟體中設定 Tween 80 的折射率 (Refractive index, RI) 為 1.473，粒徑結果則以體積平均粒徑 (Mean diameter of volume distribution, MV) 表示。

$$MV = \sum V_i d_i / \sum V_i$$

V: 每個粒徑的體積百分比；d: 粒徑。

4. 界面電位分析

(1) 實驗原理

界面電位 (Zeta potential) 的量測原理為在毛細管兩側施加電場，使得帶電粒子會往相反的電極移動以測量粒子移動速度，再藉由 Smoluchowski Equation 計算界面電位。

(2) 實驗方法



樣品在測量前以去離子水稀釋 500 倍，取 4 μL 薏仁油乳液或奈米乳液與 1,996 μL 去離子水混合均勻後，取 1-2 mL 稀釋液於樣品槽中，以界面電位分析儀分析。

5. 黏度分析

以流變儀 (Rheometer) 測定乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠之動態黏度 (Dynamic viscosity)，其中可流動性樣品如乳液與奈米乳液取 28 mL 進行偵測，探頭使用 Concentric cylinder；非流動性樣品如奈米乳液凝膠取 2 mL 進行偵測，探頭使用直徑 40 mm parallel plate，附圖十一為示意圖。測定的剪切速率 (shear rate) 範圍為 0-200 s^{-1} ，測量時間為 2 分鐘並每 5 秒記錄一次數據，偵測溫度為 25°C 與 37°C。實驗結果以剪切速率為 100 s^{-1} 時的黏度表示。

6. 奈米乳液凝膠之配方評估與製備

(1) 試劑配製

Pluronic[®] F-127 stock solution (30%, w/w)

精秤 30 g Pluronic[®] F-127 粉末溶於 70 g 去離子水中以配製 30% (w/w) Pluronic[®] F-127 stock solution，Pluronic[®] F-127 粉末加至去離子水中後，於 4°C 攪拌 24 小時使 Pluronic[®] F-127 粉末完全溶解並充分水合後，儲存於 4°C 備用。

(2) 實驗方法

根據配方評估的結果，製備水：薏仁油：Tween 80 = 60:28:12 (%) 的重量比奈米乳液，接著精秤不同比例的奈米乳液與 Pluronic[®] F-127 stock solution 至樣品瓶中，使 Pluronic[®] F-127 最終濃度為 10%、12%、15%、18%、20%、22%，於 4°C 攪拌 24 小時後，於室溫下凝膠，最後將樣品瓶斜放 5 分鐘若未流動，即形成奈米乳液凝膠，挑選最低能凝膠的 Pluronic[®] F-127 濃度。



7. 掃描電子顯微鏡分析

取少許奈米乳液凝膠樣品置於載台上後，以中央研究院化學研究所的場發射掃描式電子顯微鏡 (Field emission scanning electron microscope, FE-SEM) 觀察奈米乳液凝膠內的粒子大小。以加速電壓 3 kV，將樣品放大十萬倍進行觀測，內建軟體會產生粒徑大小比例尺於圖中，可依照比例尺計算奈米液滴的粒徑與觀察形狀。

8. 流變性分析

(1) Stress sweep

為了了解不同 Pluronic® F-127 濃度的奈米乳液凝膠之線性黏彈性範圍 (linear viscoelastic region, LVR) 與膠體強度，進行 Stress sweep 實驗。

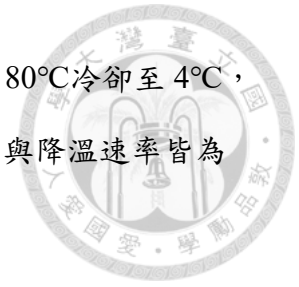
取 2 mL 不同 Pluronic® F-127 濃度的奈米乳液凝膠樣品，於 37°C 下進行偵測，探頭使用直徑 40 mm parallel plate。在 Stress sweep 實驗中，固定 Frequency 為 1 Hz，設定 osc. stress (Pa) 範圍為 0.1-1000 Pa，並偵測不同 osc. stress 下的 G' 值的變化，G' 為儲存模數 (Storage modulus)。

(2) Temperature ramp

以流變儀 (Rheometer) 測定不同 Pluronic® F-127 濃度的奈米乳液凝膠之凝膠溫度，利用 Temperature ramp 實驗可測得不同溫度下的 G' (Storage modulus)、G'' (Loss modulus) 與 $\tan \delta (= G''/G')$ ，當 $\tan \delta = 1$ 、 $G'' = G'$ ，正值溶液與膠體轉換點，此時的溫度即為奈米乳液凝膠的凝膠溫度。

取 2 mL 不同 Pluronic® F-127 濃度的奈米乳液凝膠樣品，探頭使用直徑 40 mm parallel plate，探頭與樣品的間距 (Gap) 為 1,000 μm 。在 Temperature ramp 實驗中，固定 Frequency 為 1 Hz，% strain 為

0.5，設定的溫度範圍為自 4°C 加熱至 80°C 後，再從 80°C 冷卻至 4°C，並於每 30 秒記錄 G'、G'' 與 Tan δ 的變化，升溫速率與降溫速率皆為 1°C/min。



9. 穩定性測試

此法參考 Restu *et al.* (Restu *et al.*, 2015) 與 Smrity *et al.* (Smrity *et al.*, 2016) 等文獻後部分再加以修改。為了方便觀察樣品型態的變化，薏仁油中加入 1% (v/v) Oil red O stock 進行染色。取定量的乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠至樣品瓶中，存放於 4°C、24 小時後，再存放於 45°C、24 小時，為 1 次循環，進行 10 天、5 次循環，其中每天觀察樣品是否分層，並取樣測定粒徑與界達電位，觀察粒徑與界達電位的變化，判斷樣品是否穩定，若樣品未分層且粒徑與界達電位變化不大，即為穩定的樣品。

六、經皮吸收試驗

1. 實驗裝置

本實驗使用 Franz diffusion cell 作為體外皮膚吸收裝置，附圖十二為示意圖，Franz diffusion cell 分為上下兩端可分離的容器，上端供藥端 (Donor compartment) 放置待測樣品，下端受藥端 (Receptor compartment) 放置 11 mL 接收液接收穿透的藥物，外層則會環繞水溫 37°C 的水，以仿人體體溫（於多點式加熱攪拌器上加熱至水溫 37°C），中間夾著實驗動物皮膚且角質層向上，利用金屬固定夾加以固定，有效吸收面積為 1.77cm²，另有一個取樣口 (Sampling port) 以方便定時間取樣。

2. 實驗動物皮

本實驗動物皮膚採用藍瑞斯品系無特定病源豬隻 (Specific pathogen free, SPF)，豬齡為 3-4 個月，取豬背部約 0.3-0.5 mm 厚的豬皮，一般豬體各部位的角質層厚度約介於 25-30 μm 間，表皮層則是 35-60 μm ，故本次實驗所採用的豬皮厚度並未傷及表皮層的完整性，平時儲存於 -20°C 備



用，進行試驗前取出並浸泡在接收液—PBS 內於 37°C 水浴中回溫平衡 30 分鐘。

3. 實驗方法

取 Franz diffusion cell 之下端受藥端，加入 11 mL 接收液—PBS，於多點式加熱攪拌器上加熱使水溫達 37°C 後，剪裁 2.5 × 2.5 cm 大的豬皮置於 Franz diffusion cell 中以覆蓋有效吸收面積後，利用金屬固定夾固定上下兩端，於供藥端放置薏仁油或不同經皮給藥系統劑型，其中不同劑型中的薏仁油含量皆占 0.5 g，接著於固定時間點：0、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12 小時進行取樣，以針筒從取樣口取出 500 μL 接收液，並補回同等體積的 PBS。

固定時間點採集的接收液以總多酚類化合物含量 (Total phenols) 測定方法進行定量，得到不同時間點接收液中的總多酚類濃度後，再以下列體積校正公式換算，得每單位時間的藥物穿透量，再以藥物累積穿透量對時間作圖。

$$W_n (\mu\text{g}) = C_n \times V + V_s \times (C_1 + C_2 + C_3 + \dots + C_{n-1})$$

W_n : 第 n 次取樣時，接收液中總多酚類化合物的重量； C_n : 第 n 次取樣時，接收液中總多酚類化合物的濃度； V : 接收液總體積； V_s : 每次取樣的接收液體積。

4. 總多酚類化合物含量測定

(1) 試劑配製

A. Gallic acid stock solution (10,000 μg/mL)

精秤 0.01 g Gallic acid 粉末溶於 1 mL 去離子水中中以配製 10,000 μg/mL Gallic acid stock solution，儲存於 4°C 備用。

B. Na₂CO₃ solution (5%, w/w)

精秤 2.5 g Na₂CO₃ 粉末溶於 47.5 g 去離子水中以配製 5%

(w/w) Na₂CO₃ solution，儲存於常溫備用。

(2) 實驗方法

此法參考 Singleton *et al.* (Singleton and Rossi, 1965) 文獻後部分再加以修改。配製 0、0.625、1.25、2.5、5、10、25、50 µg/mL 濃度的 Gallic acid 標準曲線並取 25 µL/well 至 96 孔盤，同時取 25 µL 樣品接收液至 96 孔盤中，加入 25 µL/well Folin-Ciocalteu reagent 避光反應 5 分鐘後，加入 50 µL/well 去離子水與 150 µL/well 5% Na₂CO₃ solution 避光反應 1 小時後，以 ELISA plate reader 測定波長 750 nm 之吸光值，藉由 Gallic acid 標準曲線換算出接收液之總多酚類化合物濃度，實驗結果以 Gallic acid 當量濃度表示 (µg/mL)。

七、統計分析

實驗數據由 SPSS 進行統計分析，以 one way ANOVA 針對組別間的差異進行變異數分析，再利用 Duncan's multiple range test 進行事後檢定，當 p value 小於 0.05 時，則表示組間具有顯著差異，結果以平均值 (Means) ± 標準差 (Standard deviation, SD) 表示。

第五章 結果與討論



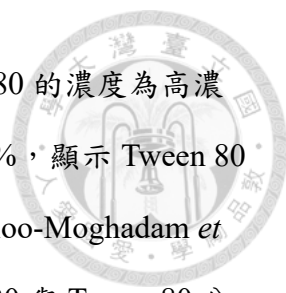
一、細胞實驗

1. 四種非離子型界面活性劑對 B16F10 細胞存活率影響

製備乳液或奈米乳液時，需要同時有親水基團 (Hydrophilic group) 與疏水基團 (Hydrophobic group) 的兩性分子 (Amphiphiles) — 界面活性劑 (Surfactants) 存在才可降低油相與水相間的表面張力，產生乳化現象使兩者互溶。界面活性劑的種類主要依照其溶於水溶液時，親水基團解離離子的帶電荷種類為依據，分為陰離子型、陽離子型、兩性型與非離子型界面活性劑，由於後續經皮給藥劑型為施予在皮膚上使用，故選擇不帶電荷的非離子型界面活性劑，對於皮膚刺激性較低，本次實驗選擇的非離子型界面活性劑為 Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80。

Tween[®] 為山梨醇與不同碳數的脂肪酸在強鹼高溫下反應生成的醇酐脂肪酯後，山梨醇的羥基 (-OH) 再與聚氧乙烯 (Poly(oxyethylene), POE) 進行縮合後產生，表三為 Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80 之 IUPAC 名稱、親水疏水平衡值 (Hydrophile-lipophile balance, HLB) 與結構，其中界面活性劑之 HLB 值代表其親油與親水的能力，若 HLB 值越大代表親水性越好，當界面活性劑之 HLB 值落在 8-16 (Michael, 2002) 時，適合製備能溶於水溶液的 O/W 型乳液，故 Tween[®] 系列的界面活性劑皆適合製備 O/W 型乳液。

由於製備的乳液與奈米乳液後續會應用於細胞實驗中，故樣品對 B16F10 細胞不能有毒性，故為了從四種 Tween[®] 系列的界面活性劑中選出一個毒性最低的界面活性劑進行後續實驗，進行 B16F10 細胞存活率分析。由圖五所示，當 Tween 20、Tween 40、Tween 60 的濃度為 100 $\mu\text{g/mL}$ 時，其 B16F10 細胞存活率分別為 88.75%、86.18%、94.23%，在



低濃度時細胞存活率才可達 80% 以上，然而當 Tween 80 的濃度為高濃度 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，其 B16F10 細胞存活率即可達 86.19%，顯示 Tween 80 在四種 Tween[®] 系列的界面活性劑中毒性最低。Hamzeloo-Moghadam *et al.* (Hamzeloo-Moghadam *et al.*, 2014) 指出將 Tween 20 與 Tween 80 分別處理人類乳癌細胞—MCF-7、人類肝癌細胞—HepG-2、人類結腸癌細胞 HT-29 三天後，Tween 80 處理的三種細胞的存活率都較 Tween 20 高，顯示 Tween 80 毒性較低，與我們的觀察相符。Yuan *et al.* (Yuan *et al.*, 2008) 文獻指出在製備奈米乳液時，在相同濃度的 Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80 下，以 Tween 20 為乳化劑製備的奈米乳液粒徑最小，顯示其乳化能力最佳，其他三個乳化劑製備的樣品粒徑無差異，但仍能達到奈米等級，又 Tween 80 對 B16F10 細胞的毒性為最低，故在後續的實驗中，選擇 Tween 80 來製備薏仁油乳液、奈米乳液與奈米乳液凝膠等樣品。

為了確認對 B16F10 細胞無毒殺性的 Tween 80 濃度，Tween 80 單獨進行 B16F10 細胞存活率分析。由圖六所示，當 Tween 80 的濃度為 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，其 B16F10 細胞存活率為 106.85%，對 B16F10 細胞無毒殺性，故在後續細胞實驗中 Tween 80 的濃度皆控制在 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下，並以此濃度為基準，製備細胞實驗的乳液與奈米乳液母液 (Stock solution)。

2. 細胞實驗乳液與奈米乳液之配方評估與物性分析

本實驗的研究目的為利用 B16F10 細胞模式與斑馬魚動物模式探討薏仁油是否具有抑制黑色素生成的潛力，然而薏仁油為油溶性物質，無法溶於細胞或斑馬魚培養液等水溶液內，故無法直接應用於細胞實驗或斑馬魚動物實驗。為了使薏仁油能溶於水溶液中，擬將薏仁油製備成水包油型乳液或奈米乳液，如此即可溶於水溶液中。過往的文獻指出為了

克服不溶性物質無法溶於水溶液中的問題，也會利用共溶劑 (Cosolvent) 或界面活性劑來增加其於水相中溶解度 (Kristmundsdóttir *et al.*, 2002)。

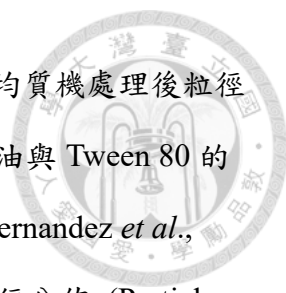
在製備細胞或斑馬魚動物實驗的薏仁油乳液與奈米乳液時，最重視的是其穩定性，而影響乳液或奈米乳液之穩定性因子有許多，其中乳化劑的濃度 (Chen and Tao, 2005) 與油脂和乳化劑的比例 (Fernandez *et al.*, 2004) 這兩個因素影響較大，故依據 Tween 80 在 B16F10 細胞存活率分析試驗中無毒殺性的濃度，配製五個不同薏仁油與 Tween 80 比例的配方：40:1、80:3、40:3、20:3、7:3，並以穩定性試驗分析其穩定性，以選擇能形成穩定的薏仁油乳液或奈米乳液之薏仁油與 Tween 80 比例。

五個配方先以均質乳化機於 25,000 rpm 下均質 2 分鐘製備成粗乳液，由圖七 (A) 所示由 40:1、80:3、40:3、20:3 的薏仁油與 Tween 80 比例製備的薏仁油粗乳液，於室溫下放置 1 天後即有分層的現象，穩定性不佳，分析五個粗乳液配方的粒徑後，結果如表四所示僅有 7:3 的薏仁油與 Tween 80 比例所製備的粗乳液粒徑小於 1 μm ，根據 Stoke's law (Hunter, 2001) 當乳液液滴粒徑越大，乳液凝結 (Creaming) 分層的速度越快、穩定性越低，為了提高薏仁油乳液的穩定性並延長儲存時間，五個粗乳液配方以高壓均質機於 1,000 bar 壓力下高壓均質兩次，以降低粒徑而增加穩定性。

$$\text{Stoke's law: } V_{\text{stokes}} = -2gr^2 \times (\rho_2 - \rho_1) / 9\eta_1$$

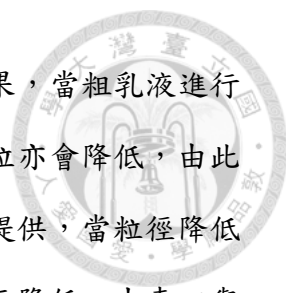
V_{stokes} : 乳液凝結 (Creaming) 速度； r : 乳液液滴半徑； g : 重力加速度； ρ_2 & ρ_1 : 兩相的密度； η_1 : 連續相的黏度。

由表四所示五個粗乳液配方的黏度皆小於 1 Pa·s，故能進入高壓均質機進行高壓均質。由表四所示五個粗乳液配方經高壓均質後其粒徑皆有顯著的下降，其中 40:1、80:3、40:3、20:3 的薏仁油與 Tween 80 比例配方即使經過高壓均質機處理，粒徑仍大於 100 nm，為一般乳液的粒徑



等級，而 7:3 的薏仁油與 Tween 80 比例配方經過高壓均質機處理後粒徑即小於 100 nm，達到奈米乳液的標準，結果顯示薏仁油與 Tween 80 的比例對於奈米乳液粒徑影響顯著，與文獻結果相符 (Fernandez *et al.*, 2004)。由圖八所示五個粗乳液配方經過高壓均質後粒徑分佈 (Particle size distribution) 的寬度明顯降低，大粒子占的量明顯減少，粒子呈高度單一分佈，Shi *et al.* (Shi *et al.*, 2011) 文獻指出利用高壓均質能大幅降低粒子粒徑與粒徑分佈的寬度，增加樣品的穩定度，故從圖七所示，五個粗乳液配方經高壓均質後樣品皆未有分層的現象。

五個配方高壓均質前後的界面電位 (Zeta potential) 表示在表四，膠體粒子 (Colloidal particle) 由電雙層 (Electrical double layer, EDL) 組成，包含固定層又稱 Stern 層 (Fixed layer; Stern layer) 與擴散層 (Diffused layer)，擴散層外層稱為滑動面 (Slipping plane)，而界面電位為滑動面與分散介質的電位差，界面電位可作為乳液與奈米乳液穩定性的指標，其大小代表帶電粒子間的靜電排斥程度 (附圖十三)，如表五所示當界面電位越高，穩定性越佳。由表四所示五個配方無論在高壓均質前或後，其界面電位皆帶負電，然而 Tween 80 為不帶電荷的非離子型界面活性劑，故推測是因為薏仁油部分水解產生游離脂肪酸而帶負電，Hsu and Nacu (Hsu and Nacu, 2003) 以大豆油與 Tween 系列的乳化劑製備的奈米乳液與 Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2006) 以礦物油與 Tween 80 和 Span 80 製備的奈米乳液也有類似的現象。以薏仁油與 Tween 80 比例為 40:1、80:3、40:3 製備的粗乳液界面電位落在-40 到-60 mV 間，而以 20:3、7:3 製備的粗乳液界面電位落在-30 到-40 mV 間，根據文獻以 40:1、80:3、40:3 薏仁油與 Tween 80 比例製備的粗乳液穩定性應該較佳，與圖七所示的穩定性試驗結果不符，進一步比較五個配方粗乳液與奈米乳液的粒徑與界面電位結果後發現當粒徑越小時，界面電位亦越



小，此結果呼應五個配方經高壓均質後的界面電位結果，當粗乳液進行高壓均質後，除了粒徑與粒徑分佈顯著變小，界面電位亦會降低，由此推測由於薏仁油乳液與奈米乳液所帶的負電由薏仁油提供，當粒徑降低時粒子內的薏仁油含量也隨之降低，故界面電位因此而降低，由表四與圖七所示雖然以 20:3、7:3 等薏仁油與 Tween 80 比例製備的乳液與五個配方高壓均質後的樣品因為粒徑降低而界面電位降低，但穩定性仍較佳，由此推測乳液與奈米乳液的穩定性受粒徑的影響大於界面電位的影響。

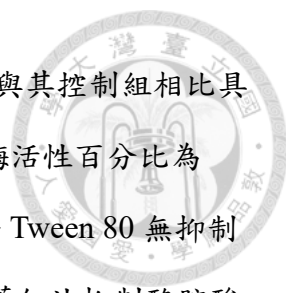
五個粗乳液配方以高壓均質機於 1,000 bar 壓力下高壓均質兩次後進行穩定性試驗分析，並測定期間樣品的粒徑與界面電位變化，以選擇能形成穩定的薏仁油乳液或奈米乳液之薏仁油與 Tween 80 比例，如表四與圖七 (B) 所示以 40:1 薏仁油與 Tween 80 比例並經高壓均質機製備的樣品在進行穩定性試驗後已有分層的現象，粒徑與界面電位也顯著性上升，判定此薏仁油與 Tween 80 比例無法形成穩定的乳液而去除，剩餘薏仁油與 Tween 80 比例：80:3、40:3、20:3、7:3 經高壓均質機製備的樣品在進行穩定性試驗後無分層的現象（圖七），並如表四與圖七 (G) 所示在實驗期間樣品粒徑皆無顯著的變化，界面電位部分僅有 80:3 與 20:3 的薏仁油與 Tween 80 比例有上升的現象，但由於界面電位對樣品的穩定性影響不大，故判定 80:3、40:3、20:3、7:3 薏仁油與 Tween 80 比例能形成穩定的乳液或奈米乳液，繼續作為後續細胞實驗之樣品母液使用。

3. 薏仁油乳液與奈米乳液對 B16F10 細胞內黑色素含量與酪胺酸酶活性影響

確定能形成穩定的乳液或奈米乳液之薏仁油與 Tween 80 比例後，將乳液或奈米乳液作為細胞實驗的樣品母液，由於樣品母液可溶於細胞

培養液，故確認為水包油型乳液或奈米乳液，以細胞培養液稀釋至目標濃度，接著處理 B16F10 兩天後，分析 B16F10 細胞內黑色素含量與酪胺酸酶活性。

取 20:3、40:3、80:3 薏仁油與 Tween 80 比例之薏仁油乳液母液，分別以細胞培養液稀釋至薏仁油最終濃度為 12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，此時三個不同薏仁油濃度之處理組的 Tween 80 濃度皆一致為 1.875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，此舉目的為固定 Tween 80 之濃度對於 B16F10 細胞存活率的影響而設計，而三個不同薏仁油濃度之處理組的控制組為 1.875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Tween 80，1.875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tween 80 與正控制組（50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kojic acid）的控制組則為未經任何樣品處理的 B16F10 細胞組別。由圖九 (A) 所示，每個組別對 B16F10 細胞而言皆無毒殺性，故所有組別皆可進一步處理 B16F10 細胞，分析其對細胞內黑色素含量與酪胺酸酶活性影響。每個組別對 B16F10 細胞內黑色素含量影響如圖九 (B) 所示，經 1.875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tween 80 處理的細胞內黑色素含量百分比與其控制組（未經樣品處理組，細胞內黑色素含量百分比為 100%）相比無顯著性差異，顯示 Tween 80 不具有抑制黑色素的功效，而經不同濃度薏仁油處理的細胞內黑色素含量百分比會隨著薏仁油濃度上升而下降，其中 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 薏仁油的細胞內黑色素含量百分比分別為 79.12% 與 70.52%，與其控制組（1.875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tween 80）相比具有顯著性差異，而正控制組—50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kojic acid 細胞內黑色素含量百分比為 64.82%，與 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 薏仁油相比無顯著性差異，由於 Tween 80 無抑制黑色素的結果，故推測在薏仁油乳液組別中為薏仁油抑制黑色素生成。每個組別對 B16F10 細胞內酪胺酸酶影響如圖九 (C) 所示，經 1.875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tween 80 處理的細胞內酪胺酸酶活性百分比與其控制組相比無顯著性差異，顯示 Tween 80 不具有抑制酪胺酸酶活性的功效，而經 12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 薏仁油處理的細胞內酪胺




酸酶活性百分比分別為 84.86%、88.31% 與 68.37%，與其控制組相比具有顯著性下降，而 50 $\mu\text{g/mL}$ Kojic acid 細胞內酪胺酸酶活性百分比為 67.84%，與 50 $\mu\text{g/mL}$ 薏仁油相比無顯著性差異，由於 Tween 80 無抑制酪胺酸酶活性的效果，故推測在薏仁油乳液組別中為薏仁油抑制酪胺酸酶活性。

雖然以 20:3、40:3、80:3 薏仁油與 Tween 80 比例之薏仁油乳液母液分別配製成不同的薏仁油濃度能控制每組 Tween 80 的濃度一致，但卻無法控制粒徑一致，為了確認乳液粒徑是否會影響薏仁油抑制 B16F10 細胞內黑色素含量的效果，7:3、20:3、40:3、80:3 薏仁油與 Tween 80 比例之薏仁油乳液母液皆稀釋至薏仁油最終濃度為 50 $\mu\text{g/mL}$ ，同時回添 Tween 80 stock solution 以控制四個不同粒徑處理組的 Tween 80 濃度皆為 21.4 $\mu\text{g/mL}$ 。由圖十 (A) 所示，每個組別對 B16F10 細胞而言皆無毒殺性，故所有組別皆可進一步處理 B16F10 細胞，分析其對細胞內黑色素含量影響。每個組別對 B16F10 細胞內黑色素含量影響如圖十 (B) 所示，經 21.4 $\mu\text{g/mL}$ Tween 80 處理的細胞內黑色素含量百分比與其控制組（未經樣品處理組）相比無顯著性差異，顯示 Tween 80 不具有抑制黑色素的功效，而經相同濃度薏仁油但不同乳液粒徑的四個樣品（粒徑如表四所示）處理的細胞內黑色素含量百分比與其控制組（21.4 $\mu\text{g/mL}$ Tween 80）相比皆具有顯著性差異，但四個不同乳液粒徑的樣品之間無顯著性差異，顯示乳液粒徑在細胞實驗中對薏仁油抑制 B16F10 細胞內黑色素含量的效果影響不大。

二、動物實驗

1. Tween 80 對斑馬魚存活率影響

於先前 Tween 80 對 B16F10 細胞存活率影響的實驗中結果顯示某些濃度之 Tween 80 對 B16F10 細胞有毒殺性，故在進行斑馬魚動物實驗

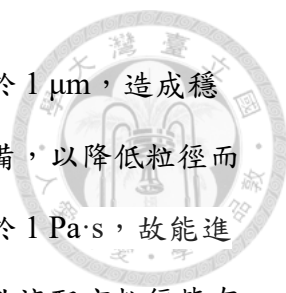


前，預先分析以不同濃度 Tween 80 處理斑馬魚後的存活率，以確認對斑馬魚無毒性的 Tween 80 濃度。由圖十一所示，當 Tween 80 的濃度為 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，已有斑馬魚死亡的現象（卵呈現白蛋），存活率下降為 82%，顯示 Tween 80 自 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 開始對於斑馬魚有毒性，故在後續斑馬魚動物實驗中 Tween 80 的濃度皆控制在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，並以此濃度為基準製備動物實驗的乳液與奈米乳液母液 (Stock solution)。Ali *et al.* (Ali *et al.*, 2011) 文獻利用斑馬魚胚胎模式針對 60 個化合物進行毒性分析，其中包含 Tween 80，根據死亡率結果計算每個化合物之半數致死濃度 (Lethal Concentration 50%, LC₅₀) 並與齧齒動物之 LC₅₀ 進行相關性分析，斑馬魚胚胎自 24 hpf (Hour post-fertilization) 開始以各個化合物處理，並於 120 hpf (96 hour) 時結束試驗並計算斑馬魚死亡率，結果顯示 Tween 80 之 LC₅₀ 為 $323.4 \pm 10.1 \text{ mg/L}$ ，此外全部化合物之斑馬魚胚胎 LC₅₀ 與齧齒動物 LC₅₀ 之皮爾遜積矩相關係數 (Pearson product-moment correlation coefficient) 為 0.7832，顯示兩者間具有高度的相關性，然而 Ali *et al.* 發現某些化合物對於斑馬魚胚胎而言毒性較強，Tween 80 即是其中之一，其在齧齒動物之 LC₅₀ 為 25021 mg/L (Halle, 2002)，故 Tween 80 對於斑馬魚有毒性之濃度不能完全推算至齧齒動物。

2. 動物實驗乳液與奈米乳液之配方評估與物性分析


於先前細胞實驗乳液與奈米乳液配方評估與物性分析實驗中結果顯示當薏仁油與 Tween 80 的比例約為 10:1 時，經均質乳化機與高壓均質機處理後的樣品在進行穩定性試驗後無分層的現象，故在製備動物實驗乳液與奈米乳液之配方時，以 10:1 與 7:3 的薏仁油與 Tween 80 比例進行製備，並以穩定性試驗確認其穩定性。

兩個配方先以均質乳化機製備成粗乳液，由圖十二 (A) 所示以兩個配方製備的薏仁油粗乳液，於室溫下放置 1 天後即有分層的現象，分



析兩個粗乳液配方的粒徑後，如表六所示其粒徑皆大於 $1\ \mu\text{m}$ ，造成穩定性不佳，故兩個粗乳液配方進一步以高壓均質機製備，以降低粒徑而提高穩定性。由表六所示兩個粗乳液配方的黏度皆小於 $1\ \text{Pa}\cdot\text{s}$ ，故能進入高壓均質機進行高壓均質，而經高壓均質後兩個粗乳液配方粒徑皆有顯著的下降，其中 10:1 的薏仁油與 Tween 80 比例配方粒徑為 $243.80\ \text{nm}$ ，為一般乳液等級，而 7:3 的薏仁油與 Tween 80 比例配方粒徑為 $97.03\ \text{nm}$ ，達到奈米乳液的標準，此結果與細胞實驗的乳液與奈米乳液配方結果一致，也再次顯示薏仁油與 Tween 80 的比例對於奈米乳液粒徑影響顯著 (Fernandez *et al.*, 2004)。由圖十三所示兩個粗乳液配方經高壓均質後粒徑分佈的寬度明顯降低，大粒子占的量明顯減少，粒子呈高度單一分佈，間接增加樣品的穩定度，故從圖十二 (B) 與 (C) 所示，兩個粗乳液配方經高壓均質後樣品皆未有分層的現象，結果與細胞實驗的乳液與奈米乳液配方結果一致。

兩個配方高壓均質前後的界面電位 (Zeta potential) 表示在表六，結果與細胞實驗的乳液與奈米乳液配方結果一致，無論在高壓均質前或後，其界面電位皆帶負電且以薏仁油與 Tween 80 比例為 10:1 製備的樣品界面電位皆大於以薏仁油與 Tween 80 比例為 7:3 製備的樣品界面電位，另外無論是以 10:1 或 7:3 的薏仁油與 Tween 80 比例製備的粗乳液再經高壓均質處理後界面電位亦皆降低，顯示樣品會因為粒徑降低，粒子內薏仁油含量也隨之降低而使界面電位降低。此外，若以界面電位判定樣品的穩定性，界面電位落在 -40 到 $-60\ \text{mV}$ 間的兩個薏仁油粗乳液應優於界面電位落在 -30 到 $-40\ \text{mV}$ 間的兩個薏仁油細乳液 (粗乳液經高壓均質後的樣品，Fine emulsion)，然而與圖十二所示的穩定性試驗結果不符，再次顯示乳液與奈米乳液的穩定性受粒徑的影響大於界面電位的影響。



兩個粗乳液配方以高壓均質機處理後進行穩定性試驗分析，並測定期間樣品的粒徑與界面電位變化，以再次確定 10:1 與 7:3 的薏仁油與 Tween 80 比例是否會形成穩定的薏仁油乳液或奈米乳液，如表六與圖十二 (B) 與 (C) 所示兩個配方經高壓均質機處理後的樣品再進行穩定性試驗後無分層的現象，並如表六與圖十二 (D) 所示在實驗期間樣品粒徑皆無顯著的變化，界面電位部分僅有 10:1 的薏仁油與 Tween 80 比例有上升的現象，但由於界面電位對樣品的穩定性影響不大，故確定 10:1 與 7:3 薏仁油與 Tween 80 比例能形成穩定的乳液或奈米乳液，繼續作為後續動物實驗之樣品母液使用。

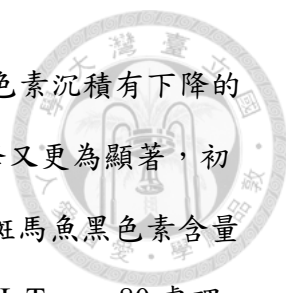
3. 經薏仁油乳液與奈米乳液處理的斑馬魚胚胎型態與其黑色素含量及酪胺酸酶活性

確定能形成穩定的乳液或奈米乳液之薏仁油與 Tween 80 比例後，將乳液或奈米乳液作為動物實驗的樣品母液，由於樣品母液可溶於動物培養液，故確認為水包油型乳液或奈米乳液，以動物培養液稀釋至目標濃度後，於斑馬魚胚胎 7 hpf 時開始處理 48 小時 (55 hpf)，以解剖顯微鏡拍攝斑馬魚魚體，分析斑馬魚黑色素含量與酪胺酸酶活性。

根據 Tween 80 在斑馬魚存活率試驗中的結果其在斑馬魚培養液中的最終濃度為 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時對斑馬魚才無毒殺性，故兩個配方的薏仁油乳液與奈米乳液母液以斑馬魚培養液稀釋後的薏仁油濃度有最高限制，10:1 薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油乳液母液為 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 而 7:3 薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油乳液母液為 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在預實驗時，取 7:3 薏仁油與 Tween 80 比例之薏仁油奈米乳液母液，以斑馬魚培養液稀釋至薏仁油最終濃度為 125、250、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，並回添 Tween 80 stock solution 以控制不同處理組的 Tween 80 濃度皆為 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，樣品處理完畢後分析斑馬魚黑色素含量後發現 125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 薏仁油不具有抑


制斑馬魚黑色素含量的效果（數據未顯示），但 500 $\mu\text{g/mL}$ 已為 7:3 薏仁油與 Tween 80 比例薏仁油奈米乳液母液的最高薏仁油濃度，故改以 10:1 薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油乳液母液進行實驗。

取 10:1 薏仁油與 Tween 80 比例之薏仁油乳液母液，以斑馬魚培養液稀釋至薏仁油最終濃度為 500、1000、2000 $\mu\text{g/mL}$ ，並回添 Tween 80 stock solution 以控制不同處理組的 Tween 80 濃度皆為 200 $\mu\text{g/mL}$ ，三個不同薏仁油濃度處理組的控制組為 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 Tween 80，200 $\mu\text{g/mL}$ Tween 80 與正控制組—0.2 mM PTU 的控制組為未經任何樣品處理的組別，PTU 為酪胺酸酶抑制劑，通常用來抑制斑馬魚色素產生，可作為正控制組 (Peterson *et al.*, 2000)。文獻指出可從斑馬魚型態是否畸形判斷化合物是否具有毒性 (Zon and Peterson, 2005)，Choi *et al.* (Choi *et al.*, 2007) 文獻以斑馬魚胚胎模式分析 YT16i（小分子化合物，在黑色素瘤細胞實驗中具有抑制黑色素含量的潛力）抑制黑色素含量的效果，斑馬魚胚胎自 9 hpf 開始以各個化合物處理，並於 72 hpf (63 hour) 時結束試驗，結果顯示 200 μM 與 600 μM 的 YT16i 皆能淡化斑馬魚的黑色素，但以 600 μM YT16i 處理的斑馬魚在型態上有卵黃膨大、頭部變小、魚體軀幹與尾部彎曲等畸形現象，顯示 YT16i 對斑馬魚而言具有毒性。每個組別的斑馬魚型態如圖十四所示所有組別對斑馬魚而言不具毒性，在黑色素沉積方面由圖十四 (A) 與 (C)，所示經正控制組 PTU 處理之斑馬魚與未經任何處理之斑馬魚相比其黑色素沉積大幅下降，斑馬魚魚體呈現透明，顯示此斑馬魚動物模式在探討化合物對黑色素沉積是否有抑制效果時是可行的，而由圖十四 (A) 與 (B) 所示經 200 $\mu\text{g/mL}$ Tween 80 處理的斑馬魚與未經任何處理的斑馬魚相比其黑色素沉積未有下降的現象，初步推測 Tween 80 不具有抑制黑色素的功效，另外如圖十四 (B)、(D)、(E) 與 (F) 所示經 500、1,000、2,000 $\mu\text{g/mL}$ 薏仁油處理的斑



馬魚與經 200 $\mu\text{g/mL}$ Tween 80 處理的斑馬魚相比其黑色素沉積有下降的趨勢，其中 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 薏仁油組別黑色素沉積的下降又更為顯著，初步推測薏仁油能抑制黑色素生成。進一步分析每組對斑馬魚黑色素含量與酪胺酸酶活性影響，如圖十五 (A) 所示經 200 $\mu\text{g/mL}$ Tween 80 處理的斑馬魚黑色素含量百分比與未經樣品處理組相比無顯著性差異，顯示 Tween 80 不具有抑制黑色素的功效，而經不同濃度薏仁油處理的斑馬魚黑色素含量百分比與 200 $\mu\text{g/mL}$ Tween 80 處理組相比具有顯著性差異，其中 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 薏仁油的斑馬魚黑色素抑制率更高達 46.54%，由於 Tween 80 無抑制黑色素的結果，故推測在薏仁油乳液組別中為薏仁油抑制黑色素生成。此外如圖十五 (B) 所示經 200 $\mu\text{g/mL}$ Tween 80 處理的斑馬魚酪胺酸酶活性百分比與未經樣品處理組相比無顯著性差異，顯示 Tween 80 不具有抑制酪胺酸酶活性的功效，而經不同濃度薏仁油處理的斑馬魚酪胺酸酶活性百分比與 200 $\mu\text{g/mL}$ Tween 80 處理組相比具有顯著性差異，但不同濃度薏仁油處理組之間不具有顯著差異，僅有下降的趨勢，顯示當薏仁油達到某個濃度時對酪胺酸酶活性的抑制即達到極限，而造成黑色素含量持續下降的原因可能不是抑制酪胺酸酶的活性而是其他途徑，如還原黑色素合成過程中的中間產物。


在預實驗時發現當薏仁油乳液母液粒徑較大，即使其薏仁油最終濃度為最高，抑制黑色素含量的效果仍較薏仁油乳液母液粒徑小的差（數據未顯示），故推測薏仁油乳液的粒徑會影響薏仁油抑制斑馬魚黑色素含量的效果。為了確認乳液粒徑是否會影響薏仁油抑制斑馬魚黑色素含量的效果，7:3、10:1、40:1 薏仁油與 Tween 80 比例之薏仁油奈米乳液或乳液母液皆稀釋至薏仁油最終濃度為 500 $\mu\text{g/mL}$ ，其中三個母液的粒徑為 97.03、243.80、665.50 nm 而 40:1 薏仁油與 Tween 80 比例之薏仁油乳液母液較不穩定，故當其粒徑發生顯著性變化時即重新配製，同時



回添 Tween 80 stock solution 以控制三個不同粒徑處理組的 Tween 80 濃度皆為 200 µg/mL。每個組別的斑馬魚型態如圖十六所示所有組別對斑馬魚而言不具毒性，在黑色素沉積方面如圖十六 (B)、(D)、(E) 與 (F) 所示經 7:3 與 10:1 薏仁油與 Tween 80 比例之薏仁油奈米乳液與乳液母液處理的斑馬魚與經 200 µg/mL Tween 80 處理的斑馬魚相比其黑色素沉積有下降的趨勢，但 40:1 薏仁油與 Tween 80 比例之薏仁油乳液母液處理的斑馬魚其黑色素沉積未有明顯下降的現象，初步推測相同濃度薏仁油但不同粒徑大小會影響抑制黑色素生成的效果。進一步分析每組對斑馬魚黑色素含量影響，如圖十七所示經 200 µg/mL Tween 80 處理的斑馬魚黑色素含量百分比與未經樣品處理組相比無顯著性差異，顯示 Tween 80 不具有抑制黑色素的功效，而經相同濃度薏仁油但不同粒徑大小母液處理的斑馬魚黑色素含量百分比與 200 µg/mL Tween 80 處理組相比僅有 7:3 與 10:1 薏仁油與 Tween 80 比例的組別有顯著性下降但兩者無顯著差異，但 40:1 薏仁油與 Tween 80 比例的組別則無顯著性差異，顯示在相同濃度薏仁油下，乳液粒徑較大的薏仁油無淡化黑色素的效果，而粒徑變小則薏仁油抑制黑色素的功能開始展現，但當乳液粒徑小到一定程度時，即使粒徑繼續變小，對薏仁油淡化黑色素效果的影響也不大。在細胞實驗中，乳液粒徑對薏仁油抑制 B16F10 細胞內黑色素含量的效果影響不大，但文獻指出斑馬魚胚胎在 48 hpf 前具有卵殼 (Chorion) (Kimmel *et al.*, 1995) 而其膜的穿孔通道直徑為 0.5-0.7 µm，為化合物擴散的阻礙 (Henn and Braunbeck, 2011; Lee *et al.*, 2007)，故推測乳液粒徑對薏仁油抑制斑馬魚黑色素含量的效果可能與其擴散至斑馬魚胚胎內的能力有關。

三、經皮給藥劑型製備、物性分析、經皮吸收試驗

1. 薏仁油乳液與奈米乳液之配方評估與物性分析



利用 B16F10 細胞模式與斑馬魚動物模式確定薏仁油具有抑制生成的功效後，進行經皮給藥劑型的配方評估與製備。由於以不同的薏仁油、水、Tween 80 比例配製會形成不同型態的樣品，為了初步確認能形成穩定乳液的薏仁油、Tween 80、水比例，進行薏仁油、Tween 80、去離子水的擬三相圖 (Pseudo-ternary phase diagram) 建構。在建構擬三相圖時，製備的樣品型態分為三種：穩定乳液、不穩定乳液與乳霜，如圖十八所示不同薏仁油、Tween 80、水比例的樣品經均質乳化機處理後放置 1 小時，樣品若分層，為不穩定的乳液；樣品若倒置 5 分鐘未流動，為乳霜；樣品若不分層且具有流動性，為穩定的乳液。如圖十九所示紅色區域為穩定性不佳的乳液，此區域會隨著薏仁油與 Tween 80 比值越高而擴大，而黃色區域為穩定性佳的乳液，此區域則會隨著薏仁油與 Tween 80 比值越低而擴大，顯示當 Tween 80 濃度相對較高時，較能形成穩定的乳液，與文獻結果相符 (Chen and Tao, 2005; Fernandez *et al.*, 2004)，另外藍色區域為乳霜，當薏仁油、Tween 80、水在某些比例下製備的樣品黏度極高，造成樣品不具有流動性，由於經均質乳化機處理後的樣品後續須再以高壓均質機處理，樣品需具流動性，故淘汰形成乳霜的薏仁油、Tween 80、水比例。


文獻指出油脂與乳化劑的比例對於奈米乳液之粒徑影響顯著 (Fernandez *et al.*, 2004)，故根據擬三相圖的結果，先將水分含量固定為 60%，改變薏仁油與 Tween 80 的重量比為 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 後，以均質乳化機與高壓均質機製備樣品並進行粒徑分析，以選出粒徑小於 100 nm 且乳化劑最少的薏仁油與 Tween 80 比例為最適配方。由於粗乳液進入高壓均質機時，需具有流動性及黏度不能超過 1 Pa·s 等限制，故九個配方的粗乳液進行黏度測定以去除黏度高於 1 Pa·s 的薏仁油與 Tween 80 比例，如圖二十所示在水分含量皆為



60%下僅有以 9:1、8:2、7:3、6:4 的薏仁油與 Tween 80 比例製備的粗乳液黏度低於 1 Pa·s 而繼續以高壓均質機製備。

樣品進行高壓均質前，先分析高壓均質時的最適條件。高壓均質的原理為利用高壓幫浦將液體加壓至特定壓力並利用高壓管路將液體輸送至均質閥，均質閥內具有截面積縮減設計，使高壓液體轉換成高速液體並在均質閥中產生衝擊力、剪切力及空穴效應（其中以剪切力與空穴效應影響顯著），將乳液液滴破碎成更小的液滴以形成穩定的乳液

(Phipps, 1971; Schultz *et al.*, 2004)，而三種作用力的機制為：衝擊力是使流體與粉體撞擊或粉體之間因分流時產生的高頻振動而使粉體彼此震動碰撞，利用衝擊能量將粉體破碎；剪切力是利用流體剪切效應剪斷顆粒 (Phipps, 1971)；空穴效應為因均質閥入口截面積變化，流體流向急速改變產生縮流截面，縮流截面與孔壁間出現循環區域，在此區域的液體由於流速增加導致壓力達飽和蒸汽壓下，使液體中的微小空氣泡增大，之後壓力到達一定值時氣泡潰滅，能量釋放產生強大的衝擊波，而在氣泡形成與破壞的反覆作用下形成空穴現象（周等，2008；傅等，2009），而高壓均質除了改變樣品的粒徑，樣品的流變性、界面電位、導電性等物理性質也發生改變 (Che *et al.*, 2009)。利用高壓均質製備奈米乳液時，影響粒徑大小的因子許多，其中以高壓均質的壓力與次數影響顯著 (Qian and McClements, 2011)，故進行高壓均質最適壓力與次數分析。如圖二十一所示無論是以 500、1,000 或 1,500 bar 壓力進行高壓均質，粗乳液樣品只要處理 1 次粒徑即大幅下降，而在以 500 bar 壓力下進行高壓均質時，由於壓力較小，處理次數需達 5 次左右粒徑才可達到最小，而在相同處理次數下，以 500 bar 壓力進行高壓均質的樣品粒徑皆大於 1,000 bar 與 1,500 bar。以 1,000 bar 與 1,500 bar 壓力進行高壓均質後發現僅有以 1,000 bar 處理 1 次的樣品粒徑與其它處理的樣品粒徑有顯著差



異，顯示當粗乳液以 1,000 bar 處理 2 次以上後其粒徑與以 1,500 bar 處理 1 次以上的粒徑無差異，考量高壓均質機在壓力較高下耗能較多又 1,500 bar 已接近儀器的極限值，以 1,000 bar 高壓均質 2 次做為高壓均質的最適條件。

將固定水分含量 60%，以 9:1、8:2、7:3、6:4 的薏仁油與 Tween 80 比例製備的粗乳液繼續以高壓均質機於 1,000 bar 下處理 2 次後，四個配方的細乳液 (Fine emulsion) 進行粒徑與界面電位分析。如表七所示經高壓均質處理後四個粗乳液配方粒徑皆有顯著的下降，而無論是高壓均質前或後，其粒徑皆會隨著薏仁油與 Tween 80 比值越低而下降，而界面電位也是無論是高壓均質前或後，會隨著薏仁油與 Tween 80 比值越低而有下降趨勢，與細胞和動物實驗的乳液與奈米乳液配方結果一致，界面電位會因為粒徑降低，粒子內薏仁油含量隨之降低而降低。四個粗乳液配方經高壓均質後粒徑分佈由圖二十二所示其寬度明顯降低，大粒子占的量明顯減少，粒子呈高度單一分佈，整體粒徑分佈往粒徑小移動，結果與細胞和動物實驗的乳液與奈米乳液配方結果一致。當薏仁油與 Tween 80 比例達 7:3 時，製備的細乳液粒徑即達 100 nm 以下，達奈米乳液的標準，故後續在製備經皮給藥劑型時，以 7:3 的薏仁油與 Tween 80 比例進行製備。

選出最適薏仁油與 Tween 80 比例後，進一步選擇最適水分含量，根據擬三項圖的結果（圖 十九）當薏仁油與 Tween 80 比例為 7:3 時，能形成穩定粗乳液的水分含量為 35%到 60%，故固定薏仁油與 Tween 80 比例為 7:3，改變水分含量為 40%、50%、60%後，以均質乳化機與高壓均質機製備樣品並進行物理性質分析，以選出最適水分含量。由於粗乳液進入高壓均質機時，需具有流動性及黏度不能超過 1 Pa·s 等限制，故三個配方的粗乳液進行黏度測定，如圖二十三所示在薏仁油與




Tween 80 比例皆為 7:3 下僅有以 60%水分含量製備的粗乳液黏度低於 1 Pa·s，故後續在製備經皮給藥劑型時，粗乳液與奈米乳液的最適配方為：水：薏仁油：Tween 80=60:28:12 (%)。

2. 薏仁油奈米乳液凝膠之配方評估與掃描電子顯微鏡觀察

由於奈米乳液多為低黏度的經皮給藥劑型，不適合直接使用在皮膚上 (Gasco *et al.*, 1991)，故多會加入增稠劑 (聚合物) 來修飾奈米乳液的流變性質以解決應用問題 (柯，2007)。而文獻指出乳液凝膠因具有黏膜黏附性，可延長藥物與皮膚接觸的時間，增加藥物皮膚滲透率 (Alexander *et al.*, 2011)，但乳液凝膠內的大顆粒仍較難被皮膚吸收，故擬製備奈米乳液凝膠以降低凝膠內的粒子粒徑。

製備奈米乳液凝膠時，需選擇凝膠劑，本次實驗選擇的凝膠劑為 Pluronic® F-127。Pluronic® F-127 (F127) 為非離子型高分子界面活性劑，是在丙烯醇 (Propylene glycol) 中加入環氧丙烷 (Propylene oxide) 進行加成反應，形成中間疏水性的聚環氧丙烷區段 (poly(propylene oxide), PPO block) 後，再加入環氧乙烷 (Ethylene oxide) 形成兩端親水性的聚環氧乙烷區段 (poly(ethylene oxide), PEO block)，因具生物可分解性、低毒性、在生物體內不會長期累積與對皮膚刺激性低等特性而常用於生醫上。除了具有乳化的特性，同時在高濃度時也具有熱可逆凝膠化 (Thermoreversible gelation) 的能力，其凝膠機制如附圖十四所示為當溫度上升時，F127 分子的疏水性 PPO block 會脫水使 F127 分子聚集形成微胞 (Micelles)，這些球形的微胞結構內部是脫水的 PPO block，外部則是水合的 PEO block，當微胞濃度足夠時樣品即會凝膠，故 F127 的濃度也會影響奈米乳液凝膠成形與否。文獻指出 F127 濃度須達 15% 以上其凝膠劑型成形效果較明顯 (Antunes *et al.*, 2011)，為了確定能形成奈米乳液凝膠的 F127 濃度，以薏仁油奈米乳液 (水：薏仁油：Tween 80=




60:28:12 (%) 為基底，配製不同濃度 F127 的樣品後，於 4°C 攪拌 24 小時並於室溫下凝膠，最後將樣品瓶斜放 5 分鐘若未流動，即形成奈米乳液凝膠，如圖二十四所示當 F127 濃度為 18% 時即可形成奈米乳液凝膠，故後續取 F127 濃度為 18%、20%、22% 的奈米乳液凝膠進行經皮吸收試驗以選擇最適的 F127 濃度以配製薏仁油奈米乳液凝膠。Nie *et al.* (Nie *et al.*, 2011) 將脂質體 (Liposome) 與 F127 混合以製備 Liposomal gel 時，F127 的濃度大約也是 18% 成膠。

製備的奈米乳液凝膠進一步以場發射掃描式電子顯微鏡觀察以確認凝膠內的液滴粒徑有達到奈米等級，如圖二十五所示奈米乳液凝膠內的液滴粒徑確實有達到 100 nm 以下，顯示成功製備出奈米乳液凝膠。

3. 薏仁油奈米乳液凝膠之流變性

F127 在高濃度時具有熱可逆凝膠化的特性，不同的 F127 濃度會有不同的溶液—膠體轉換溫度 (sol-gel transition temperature, $T_{\text{sol} \rightarrow \text{gel}}$)，當低於此溫度時 F127 水溶液為溶液態，當高於此溫度時 F127 水溶液為半固態的凝膠態，而 F127 在低溫時經常為溶液態，高溫時為凝膠態，故可將藥物於低溫時溶於其中，應用至人體時再因為人體體溫而轉變為凝膠態，可保護藥物避免被破壞，亦可維持藥物的長效性。為了確定以不同濃度 F127 配製的奈米乳液凝膠之凝膠溫度，以動態流變儀 (Dynamic rheometer) 進行測定，探頭使用 Parallel plate geometry 以測定不同濃度 F127 的奈米乳液凝膠於不同溫度下時的 G' 、 G'' 與 $\tan \delta$ 。如附圖十五所示，當給予物體應力時，物體會因其彈性性質回饋一作用力即為 G' ，又稱彈性模數 (Storage modulus)，可用以量化固體樣表現或對永久變形的抗性，而因物體的黏性性質而消失的部分力即為 G'' ，又稱黏性模數 (Loss modulus)，可用以量化液體樣表現或對流動的抗性。 $\tan \delta$ 為黏性模數和彈性模數的比例 (G''/G')，可用於量化物體彈性的程度，當其數



值低於 1 時代表物體更有彈力，高於 1 時代表物體更有黏性，等於 1 時代表物體的彈力與黏性相當，為兩相轉換的交界點，故以動態流變儀測定不同濃度 F127 奈米乳液凝膠其 $\text{Tan } \delta = 1$ 時的溫度以得知凝膠溫度。結果如圖二十六所示，當奈米乳液凝膠的 F127 濃度為 18、20、22% 時，凝膠溫度分別為 30.6 ± 0.3 、 25.5 ± 0.6 、 $20.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ，凝膠溫度會隨著 F127 濃度上升而下降，與文獻結果相符 (Dumortier *et al.*, 2006)，推測當 F127 濃度越高，疏水性 PPO block 越多，故在溫度較低時即有足夠的疏水性作用力 (Hydrophobic interaction) 使 F127 分子聚集形成微胞而凝膠。進一步比較相同濃度 F127 的奈米乳液凝膠與水凝膠 (Hydrogel) 的凝膠溫度，如圖二十六 (D) 所示當 F127 濃度為 18% 與 20% 時，加入奈米乳液會使得凝膠溫度上升，顯示在低濃度 F127 時奈米乳液會干擾 PPO block 間的疏水性作用力，推測由於 F127 亦是界面活性劑，其形成的微胞內部的親油性 PPO 亦可溶解疏水性物質，故當奈米乳液濃度相對高時，部分奈米乳液液滴可能被包覆在微胞中而影響其內部的疏水性作用力，使凝膠溫度提高。此外，根據圖二十六所示也發現三個 F127 濃度的奈米乳液凝膠無論是在加熱或是冷卻的過程中，當溫度介在 $40\text{-}50^\circ\text{C}$ 間時，樣品的 G' 值皆達到最高，顯示此時奈米乳液凝膠的彈性與膠體強度 (Gel strength) 達到最高，文獻指出蛋白質之間的疏水性作用力在高溫時穩定，其中 $60\text{-}70^\circ\text{C}$ 時疏水性作用力最強，故推測奈米乳液凝膠內部的疏水性作用力在 $40\text{-}50^\circ\text{C}$ 時最強，使得其彈性值達到最高。當溫度繼續升高至熔化溫度 (Melting temperature) 時膠體會熔化 (Melting)，當奈米乳液凝膠的 F127 濃度為 18、20、22% 時，熔化溫度分別為 54.9 ± 0.0 、 62.6 ± 0.8 、 $71.8 \pm 0.6^\circ\text{C}$ ，熔化溫度會隨著 F127 濃度上升而上升，由於 F127 濃度越高，PPO block 間的疏水性作用力越強，需要較高的溫度才可使膠體熔化。三個 F127 濃度的奈米乳

液凝膠在熔化後，只需降低溫度即可再次凝膠，證實 F127 的熱可逆凝膠化性質。

塗敷性能又稱擴延性 (Spreadability) 為經皮給藥劑型如凝膠、乳液的重要流變性質，可施予樣品連續性剪切應力 (Shear stress sweep) 並測定 G' 值的變化以判定樣品的剛性 (Rigidity)。如圖二十七所表示，奈米乳液凝膠的 G' 值會隨著 F127 濃度的上升而上升，而其屈服應力 (Yield stress) 也會隨之上升，顯示當 F127 濃度較高時，奈米乳液凝膠的剛性與強度 (Strength) 也會提高。屈服是材料在拉伸或壓縮過程中，當應力達到一定值時，應力有微小的增加但應變卻急遽增長的現象，而使材料發生屈服時的應力即是材料的屈服應力。文獻指出以 F127 製備的膠體其生物黏附力 (Bioadhesive force) 會隨著膠體強度上升而上升 (Dumortier *et al.*, 2006)。


4. 薏仁油乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠之黏度與穩定性分析

根據 Stoke's law (Hunter, 2001) 當乳液液滴粒徑越大，連續相黏度越低，乳液凝結 (Creaming) 的速度越快、穩定性越低，故為了提高乳液的穩定性，大多會降低粒徑或增加連續相黏度以增加穩定性，而增加連續相黏度大部分利用凝膠法，是指透過界面活性劑的交聯作用或分散在水相中的聚合單體分子將內水相或外水相凝膠化的過程。

$$\text{Stoke's law: } V_{\text{stokes}} = -2gr^2 \times (\rho_2 - \rho_1) / 9\eta_1$$

V_{stokes} : 乳液凝結 (Creaming) 速度； r : 乳液液滴半徑； g : 重力加速度； ρ_2 & ρ_1 : 兩相的密度； η_1 : 連續相的黏度。

薏仁油乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠之穩定性分析如圖二十八所示，可看出薏仁油乳液經穩定性試驗後，由於其粒徑相對較大（如表七所示），穩定性差，故已有明顯的分層，而經高壓均質技術處理的薏仁油奈米乳液因粒徑大幅下降（如表七所示），粒子呈高度單一分佈（如

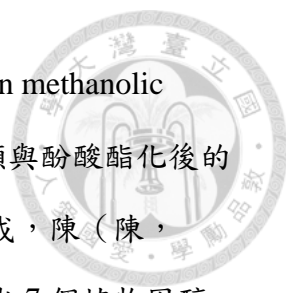


圖二十二 (C) 所示) 而提高穩定性，故經穩定性試驗後，薏仁油奈米乳液仍未見分層現象。薏仁油奈米乳液凝膠除了利用 F127 增加連續相的黏度 (如表八所示)，也利用 F127 構築網絡結構而將液滴固定於連續相中，避免液滴聚合形成大液滴而分層，可增加穩定性，故經穩定性試驗後，薏仁油奈米乳液凝膠仍未見分層現象。

由於經皮給藥劑型的黏度對於藥物的經皮吸收率也有影響，故進行薏仁油乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠於 37°C 時的黏度測定。如表八所示，薏仁油奈米乳液的黏度高於薏仁油乳液，造成此現象的原因為在相同體積下，當粒徑變小時粒子的相對數目增加，造成粒子間的作用力增加而增加流體流動的抗性，黏度即增加。另外奈米乳液凝膠的確會因為 F127 的加入而黏度上升，而且會隨著 F127 濃度上升而上升。

5. 薏仁油乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠之經皮吸收率


根據上述的實驗結果，已利用 B16F10 細胞模式與斑馬魚動物模式確定薏仁油具有抑制黑色素生成與酪胺酸酶活性的功效，故進一步製備乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠等經皮給藥劑型並比較其經皮吸收率。在進行經皮吸收試驗前，需要有一個目標成分才可分析接收液或實驗用皮中此目標成分的含量，才得以比較不同經皮給藥劑型的經皮穿透率。然而，雖然已確定薏仁油具有抑制黑色素生成與酪胺酸酶活性的功效，目前尚未得知其功效性成分。由於薏仁油目前僅有鑑定脂肪酸種類的研究，內含的植物化學成分研究甚少，又由於本次實驗薏仁油為自薏苡麩皮取得，薏仁油中可能也含有麩皮內的植物化學成分，故進一步針對薏苡麩皮中的植物化學成分進行文獻搜尋，以推測薏仁油中可能有的植物化學成分。根據文獻薏苡麩皮中的植物化學成分大致分為酚酸類、酚酸酯類、酚醛類、類黃酮、三萜類、固醇類、內醯胺及內酯類、木酚素和其他等 9 大類 (劉，2010)，而李 (李，2008) 指出在薏仁麩皮甲醇萃



取物乙酸乙酯區分層 (Ethyl acetate fraction of adlay bran methanolic extract, ABM-Ea) 中，低極性之次區分層主要是固醇類與酚酸酯化後的物質，而中高極性之次區分層主要是由酚類化合物組成，陳 (陳，2009) 則自薏仁麩皮乙醇萃取物正己烷區分層中分離出 7 個植物固醇 (phytosterol)、3 個單酸甘油酯 (monoglyceride)、7 個脂肪酸與其酯化物 (free fatty acid & ester)、1 個醯胺 (amide)、1 個醇類 (alcohol)、1 烯類 (alkene)、7 個醛類 (aldehyde)、5 個其他類化合物 (others)，根據上述文獻回顧薏仁油中亦可能含有這些植物化學成分。在眾多植物化學成分中，多酚類物質在酪胺酸酶抑制劑中佔最多，故進一步測定薏仁油中的總多酚類化合物，而結果顯示薏仁油中的確具有多酚類物質 (數據未顯示)，故選擇多酚類物質為經皮吸收試驗中的目標成分。

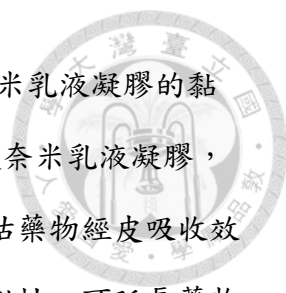
在評估藥物的經皮吸收效果實驗中，以體外通透試驗 (*In vitro* permeation) 最被廣為使用，為利用不同動物的皮膚組織進行測定，以藥物在擴散槽 (Franz diffusion cell) 兩側的分配濃度來評估該製劑穿透皮膚的能力。一般使用於體外皮膚穿透試驗的動物有鼠皮、豬皮與人體皮膚等，由於人體皮膚取得不易，故多以動物皮膚取代。文獻指出不同的動物皮膚會影響藥物的穿透 (Godin and Touitou, 2007)，其中豬皮的穿透吸收率較鼠皮接近人體，約是人體的 0.8 倍，故選擇豬皮進行後續經皮吸收試驗中的實驗用皮。

首先比較三個 F127 濃度的奈米乳液凝膠之經皮吸收率，如圖二十九 (A) 顯示三個 F127 濃度的奈米乳液凝膠之經皮吸收率未隨著 F127 濃度的改變而有變化，考量添加過多界面活性劑仍有對皮膚產生刺激的疑慮，故選擇 18% F127 的薏仁油奈米乳液凝膠，進一步與薏仁油、薏仁油乳液、薏仁油奈米乳液比較經皮吸收率。結果如圖二十九 (B) 顯示在四個經皮給藥劑型的經皮吸收率中以薏仁油最差，薏仁油奈米乳液



最佳，薏仁油乳液與薏仁油奈米乳液凝膠次之且差異不大，其中薏仁油奈米乳液凝膠的經皮吸收率大約是薏仁油奈米乳液的 0.75 倍，顯示薏仁油奈米乳液能有效提高功效性成分的經皮吸收率。薏仁油奈米乳液內液滴的奈米大小，在經皮藥物製劑中有利於在皮膚表層形成閉鎖效應 (Occlusive effect)，提高角質層保水量，寬廣化物質的親水性通道，提升藥物的經皮吸收率 (Visscher, 2009)。此外，奈米乳液的表面積較大故可使活性成分迅速滲透過皮膚表面 (Sonneville-Aubrun *et al.*, 2004)，而皮膚中角質層細胞間隙大小約 100 nm 左右，故奈米乳液獨特的粒徑大小有利於經皮吸收的途徑 (孫，2006)。

在體外皮膚穿透試驗中，薏仁油奈米乳液凝膠之經皮吸收率未較薏仁油乳液佳，此現象在部分文獻中亦有出現。Antunes *et al.* (Antunes *et al.*, 2011) 將粒徑 215 nm 的非離子體 (Niosome) 溶液與 F127 水溶液混合，以配製含 15% 與 18% F127 的非離子體凝膠 (Vesicle-F127) 並以體外皮膚穿透試驗 (實驗用皮為兔耳皮膚) 比較非離子體與 15%、18% F127 非離子體凝膠的經皮吸收率，結果顯示三者的藥物經皮吸收率為非離子體 > 15% F127 非離子體凝膠 > 18% F127 非離子體凝膠，藥物在穿透非離子體凝膠時需先通過非離子體的雙層屏障，再穿透膠體的網狀結構，而本篇作者推測當 F127 濃度越高時，會使膠體網狀結構更強，黏度更高，使得藥物通透較慢，適合用在長時間的釋放。Nie *et al.* (Nie *et al.*, 2011) 將脂質體 (Liposome) 溶液與 F127 水溶液混合，以配製含 18% F127 的脂質體凝膠 (Liposomal gel) 並以體外皮膚穿透試驗 (實驗用皮為透析膜) 比較脂質體與 18% F127 脂質體凝膠的經皮吸收率，結果顯示脂質體的藥物經皮吸收率高於 18% F127 脂質體凝膠，綜合上述文獻與實驗結果推測以 F127 製備的奈米乳液凝膠由於黏度較高而延緩薏仁油功效性成分的釋放，或許較適用於長時間的釋放。另外由於



F127 需要在較高濃度時才可使奈米乳液凝膠，造成奈米乳液凝膠的黏度過高，未來或許可探討如何在低濃度 F127 下即可使奈米乳液凝膠，以解決奈米乳液凝膠黏度過高的問題。此外，針對評估藥物經皮吸收效果的實驗進行討論，文獻指出乳液凝膠因具有黏膜黏附性，可延長藥物與皮膚接觸的時間，增加藥物皮膚滲透率 (Alexander *et al.*, 2011)，然而在體外通透試驗中因為經皮給藥劑型一直在供藥端並停留在動物皮膚上，故無法凸顯出奈米乳液凝膠此優點，同時雖然體外通透試驗由於容易而最被廣為使用，但仍較難反映出經皮給藥劑型在真實人體皮膚上的狀況，如奈米乳液雖然經皮吸收率佳，但可能會因為其流變性而不易留在皮膚上，故未來或許可以體內給藥試驗 (*In vivo administration*) (投藥後以直接採血法、膠帶剝離法 (Tape stripping) 等方法採樣，再計算藥物的通透程度)，比較不同經皮給藥劑型的經皮吸收率。

表 三、Tween®系列的 IUPAC 名稱、HLB 值與結構

Table 3. IUPAC name, HLB values and chemical structure of Tween® series

	IUPAC name	HLB values	Chemical structure
Tween 20	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate	16.7	<p style="text-align: center;">$w+x+y+z=20$</p>
Tween 40	Polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate	15.6	<p style="text-align: center;">$w+x+y+z=20$</p>
(Amran <i>et al.</i> , 2016)			
Tween 60	Polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate	14.9	<p style="text-align: center;">$w+x+y+z=20$</p>
Tween 80	Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate	15	<p style="text-align: center;">$w+x+y+z=20$</p>

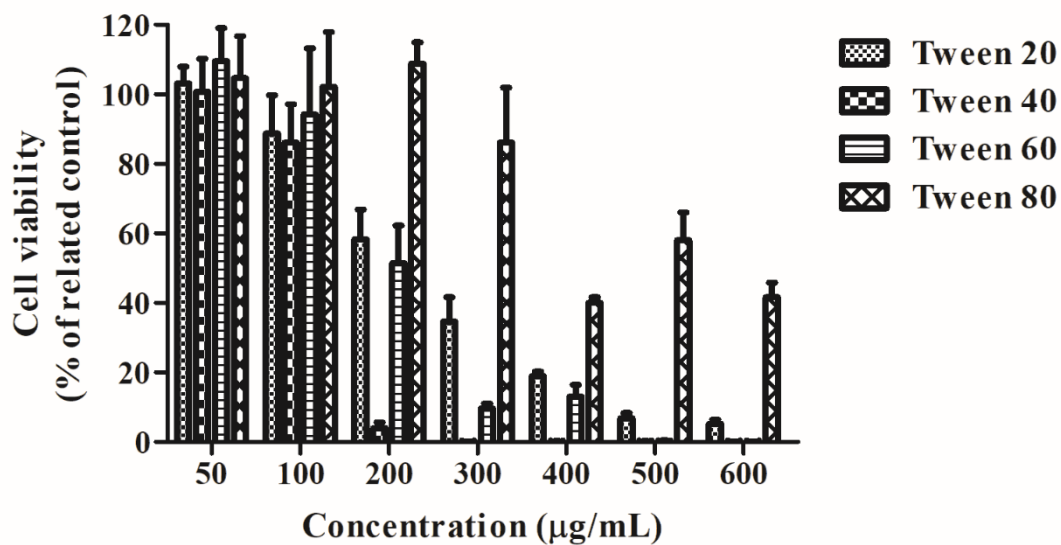
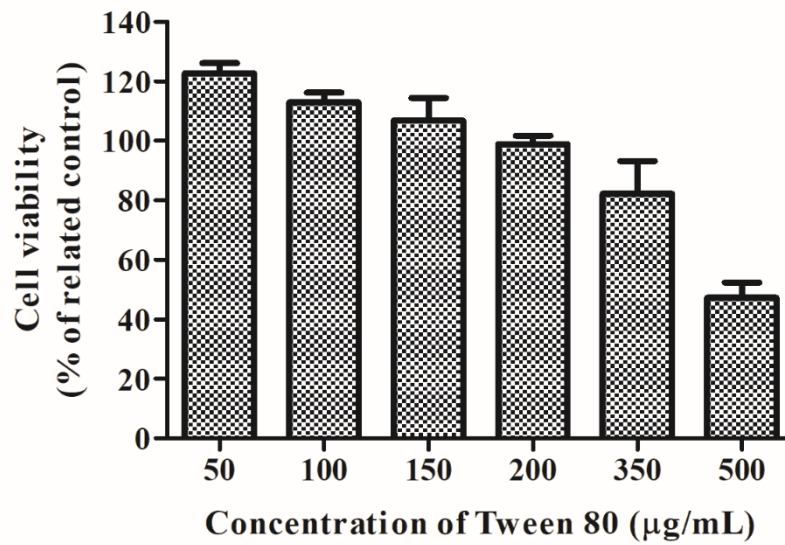


圖 五、四種乳化劑 (Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80) 以不同劑量處理 B16F10 細胞兩天後的細胞存活率

結果以每組的平均值±標準差表示 (n = 6)。每組樣品的細胞存活率以相對應控制組的百分比表示，每個樣品組的控制組如表一所示。

Figure 5. The cell viability of B16F10 cell after treated with different doses of four emulsifiers (Tween 20.Tween 40.Tween 60.Tween 80) for 2 days

The results are expressed as mean ± SD of each group (n = 6). The cell viability of each sample is expressed as the percentage of the related control group, and the control group for each sample is shown in Table 1.

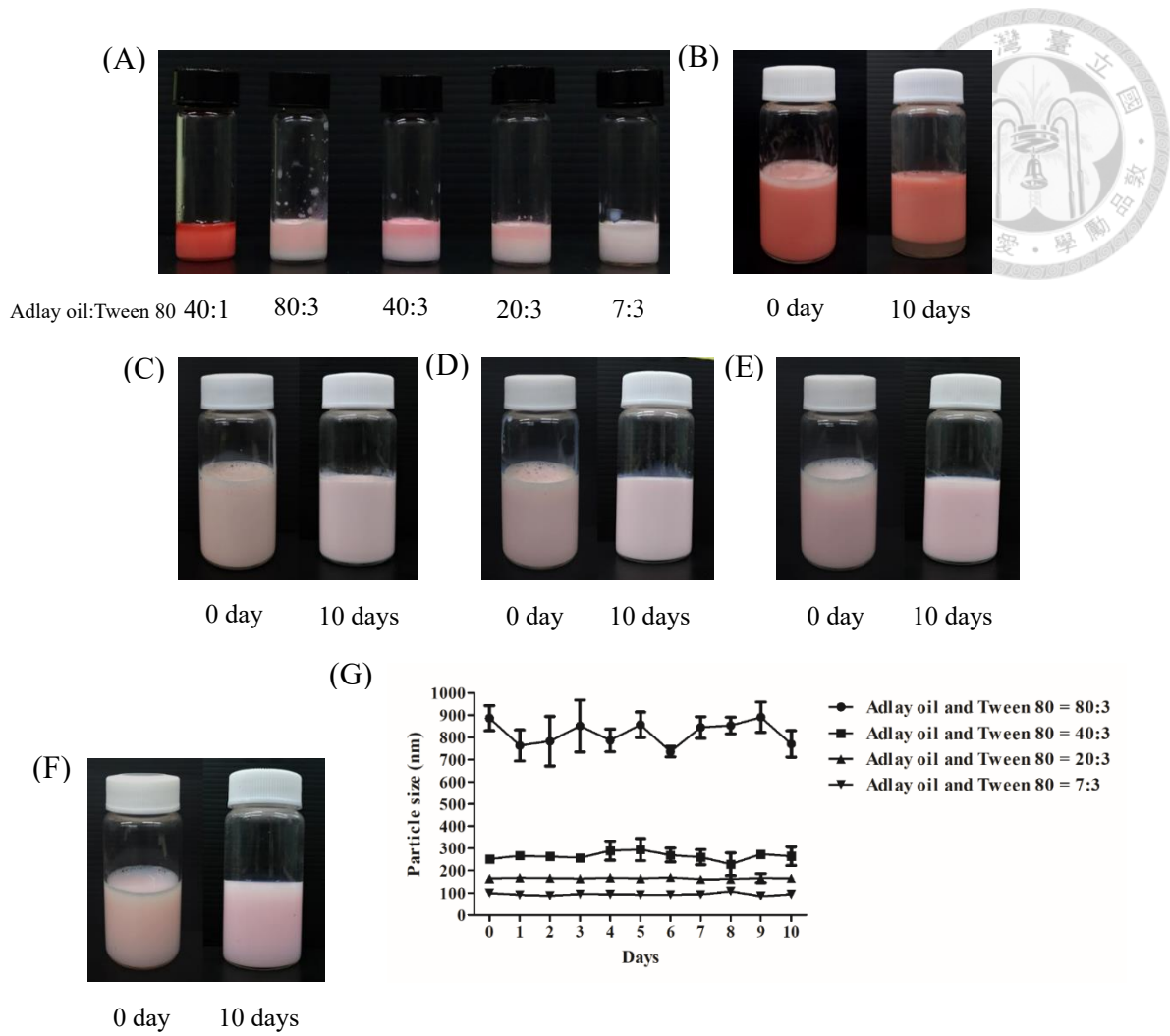


圖六、Tween 80 以不同劑量處理 B16F10 兩天後的細胞存活率

結果以每組的平均值±標準差表示 (n = 6)。每組樣品的細胞存活率以相對應控制組的百分比表示，每個樣品組的控制組如表一所示。

Figure 6. The cell viability of B16F10 after treated with different doses of Tween 80 for 2 days

The results are expressed as mean ± SD of each group (n = 6). The cell viability of each sample is expressed as the percentage of the related control group, and the control group for each sample is shown in Table 1.



圖七、細胞實驗用的薏仁油乳液與奈米乳液之穩定性分析 (A) 儲放一天的不同薏仁油與 Tween 80 比例粗乳液 (B) 薏仁油：Tween 80=40:1 的細乳液 (C) 薏仁油：Tween 80=80:3 的細乳液 (D) 薏仁油：Tween 80=40:3 的細乳液 (E) 薏仁油：Tween 80=20:3 的細乳液 (F) 薏仁油：Tween 80=7:3 的細乳液 (G) 不同薏仁油與 Tween 80 比例的細乳液在穩定性試驗中的粒徑變化 (n = 3)

Figure 7. The accelerated storage stability analysis of adlay oil emulsion and nanoemulsion for cell experiment (A) Different adlay oil and Tween 80 ratio of coarse emulsion stored 1 day (B) Fine emulsion (Adlay oil:Tween 80 = 40:1) (C) Fine emulsion (Adlay oil:Tween 80 = 80:3) (D) Fine emulsion (Adlay oil:Tween 80 = 40:3) (E) Fine emulsion (Adlay oil:Tween 80 = 20:3) (F) Fine emulsion (Adlay oil:Tween 80 = 7:3) (G) Particle size change of fine emulsion with different adlay oil and Tween 80 ratio in accelerated storage test (n = 3)



表 四、細胞實驗中不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液、細乳液與經穩定性試驗後細乳液的物理性質

Table 4. Physical properties of all adlay oil coarse emulsion, fine emulsion and fine emulsion after accelerated storage test in cell experiments

Ratio of Adlay oil and Tween 80	Property	Before homogenization	After homogenization	Fine emulsion stored 10 days
40:1	D (nm)	2124.00 ± 41.94 ^b	655.33 ± 120.67 ^c	2863.33 ± 436.15 ^a
	ζ (mV)	-50.70 ± 0.44 ^a	-43.10 ± 2.25 ^b	-48.27 ± 2.56 ^a
	μ (Pa·s)	0.36 ± 0.01	0.46 ± 0.01	-
80:3	D (nm)	2445.00 ± 114.42 ^a	887.00 ± 56.51 ^b	770.67 ± 59.62 ^b
	ζ (mV)	-45.67 ± 0.58 ^a	-39.70 ± 0.62 ^c	-42.10 ± 0.56 ^b
	μ (Pa·s)	0.289 ± 0.01	0.34 ± 0.01	-
40:3	D (nm)	1569.67 ± 122.69 ^a	252.17 ± 16.80 ^b	264.60 ± 42.73 ^b
	ζ (mV)	-47.67 ± 0.85 ^a	-41.50 ± 0.46 ^b	-40.30 ± 0.70 ^b
	μ (Pa·s)	0.11 ± 0.00	0.19 ± 0.00	-
20:3	D (nm)	1307.33 ± 283.66 ^a	164.60 ± 4.35 ^b	165.00 ± 7.28 ^b
	ζ (mV)	-37.40 ± 1.35 ^b	-34.57 ± 1.14 ^c	-41.00 ± 0.26 ^a
	μ (Pa·s)	0.08 ± 0.00	0.11 ± 0.01	-
7:3	D (nm)	566.33 ± 71.59 ^a	99.47 ± 8.23 ^b	94.13 ± 0.81 ^b
	ζ (mV)	-39.57 ± 0.25 ^a	-36.87 ± 1.72 ^{ab}	-36.03 ± 2.10 ^b
	μ (Pa·s)	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.00	-

實驗結果以平均值±標準差表示 (n = 3)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分析，其中字母表示同一列的實驗結果在統計上具有顯著差異 ($p < 0.05$)。D 代表粒徑，ζ 為界面電位，μ 為剪切速率為 100 s⁻¹ 時的黏度。

The results are expressed as mean ± SD of each group (n = 3). Statistical significance was analyzed by one way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters indicate a statistically significant difference in the same row ($p < 0.05$). D is particle size, ζ is zeta-potential, and μ is viscosity at 100 s⁻¹ of shear rate.

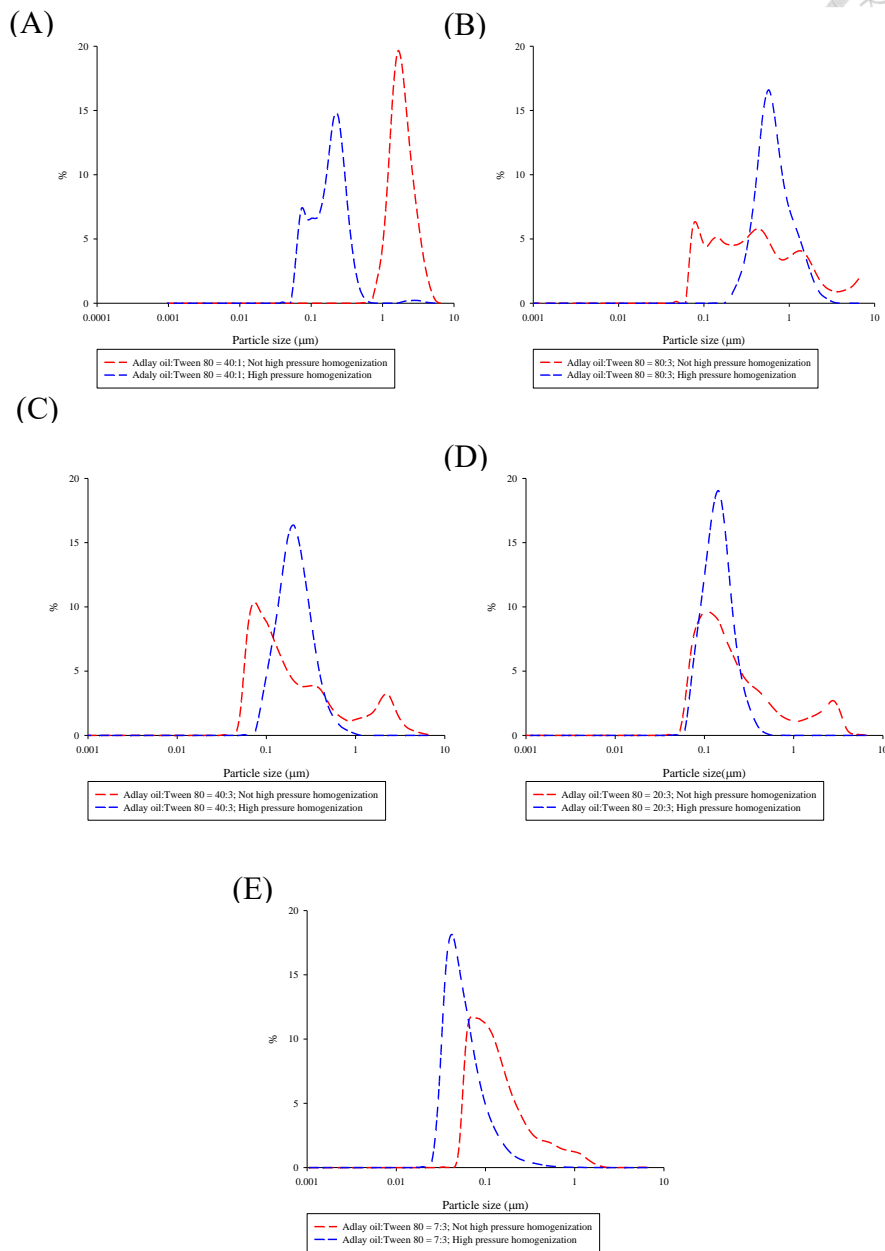


圖 八、細胞實驗中不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液、細乳液之粒徑分佈 (A) 薏仁油：Tween 80=40:1 (B) 薏仁油：Tween 80=80:3 (C) 薏仁油：Tween 80=40:3 (D) 薏仁油：Tween 80=20:3 (E) 薏仁油：Tween 80=7:3。圖中紅線為粗乳液，藍線為細乳液。

Figure 8. Particle size distribution of adlay oil coarse emulsion and fine emulsion with different adlay oil and Tween 80 ratio in cell experiment (A) Adlay oil:Tween 80 = 40:1 (B) Adlay oil:Tween 80 = 80:3 (C) Adlay oil:Tween 80 = 40:3 (D) Adlay oil:Tween 80 = 20:3 (E) Adlay oil:Tween 80 = 7:3。Red line in figure is coarse emulsion and blue line is fine emulsion.

表 五、界面電位與膠體穩定性的關係

Table 5. The relationship between zeta-potential and colloidal stability

Zeta potential (mV)	Stability behavior of the colloid
From 0 to ± 5	Rapid coagulation or flocculation
From ± 10 to ± 30	Incipient instability
From ± 30 to ± 40	Moderate stability
From ± 40 to ± 60	Good stability
More than ± 61	Excellent stability



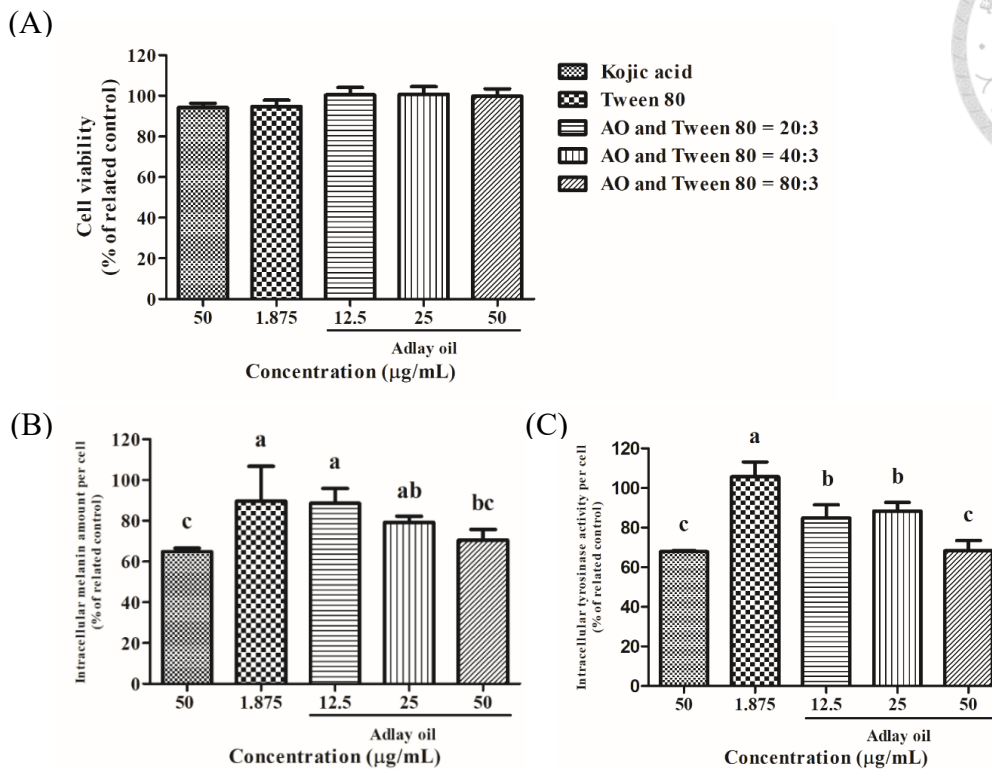


圖 九、Tween 80、麴酸與不同濃度薏仁油對 B16F10 細胞內黑色素生成與酪胺酸酶活性的影響 (A) 細胞存活率 (B) 細胞內黑色素含量 (C) 細胞內酪胺酸酶活性。實驗結果以平均值±標準差表示 (n=4)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分析，其中字母表示實驗結果在統計上具有顯著差異 ($p < 0.05$)。20:3、40:3、80:3 薏仁油與 Tween 80 比例細乳液的粒徑大小分別為 164.60、252.17、887.00 nm。AO：薏仁油。

Figure 9. Effects of Tween 80, kojic acid and different concentration of adlay oil on melanogenesis and tyrosinase activity in B16F10 cells (A) Cell viability (B) Intracellular melanin (C) Intracellular tyrosinase activity. The results are expressed as mean \pm SD of each group (n = 4). Statistical significance was analyzed by one way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$). Particle size of 20:3, 40:3, and 80:3 of adlay oil and Tween 80 ratio is 164.60, 252.17, and 887.00 nm, respectively. AO: adlay oil.

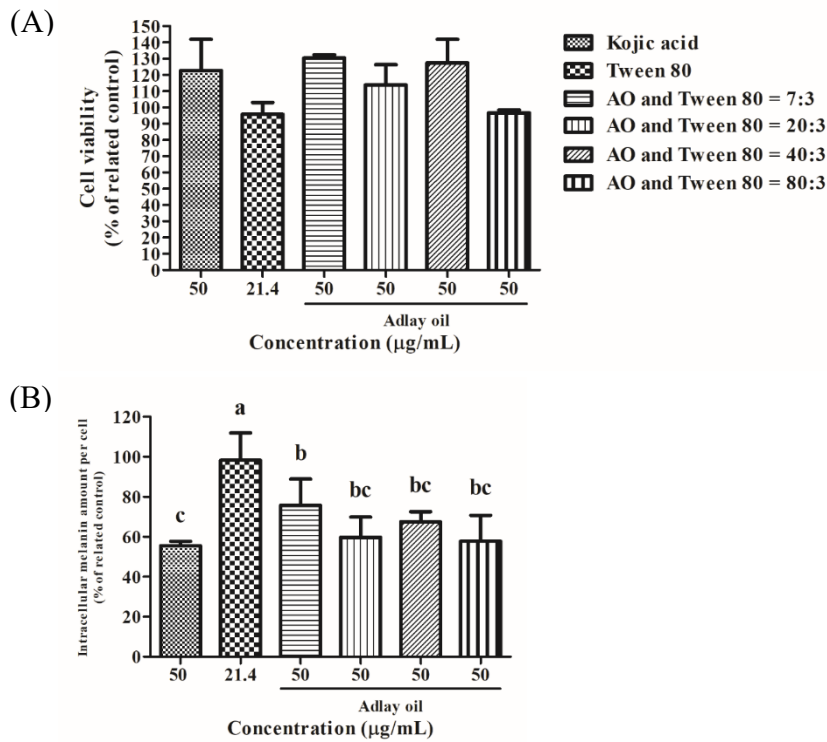


圖 十、Tween 80、麴酸與相同濃度薏仁油但不同粒徑細乳液對 B16F10 細胞內黑色素生成的影響 (A) 細胞存活率 (B) 細胞內黑色素含量。實驗結果以平均值±標準差表示 (n = 3)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分析，其中字母表示實驗結果在統計上具有顯著差異 ($p < 0.05$)。7:3、20:3、40:3、80:3 薏仁油與 Tween 80 比例細乳液的粒徑大小分別為 99.47、164.60、252.17、887.00 nm。AO：薏仁油。

Figure 10. Effects of Tween 80, kojic acid and different particle size of fine emulsion with the same concentration of adlay oil on melanogenesis in B16F10 cells (A) Cell viability (B) Intracellular melanin. The results are expressed as mean \pm SD of each group (n = 3). Statistical significance was analyzed by one way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$). Particle size of 20:3, 40:3, and 80:3 of adlay oil and Tween 80 ratio is 99.47, 164.60, 252.17, and 887.00 nm, respectively. AO: adlay oil.

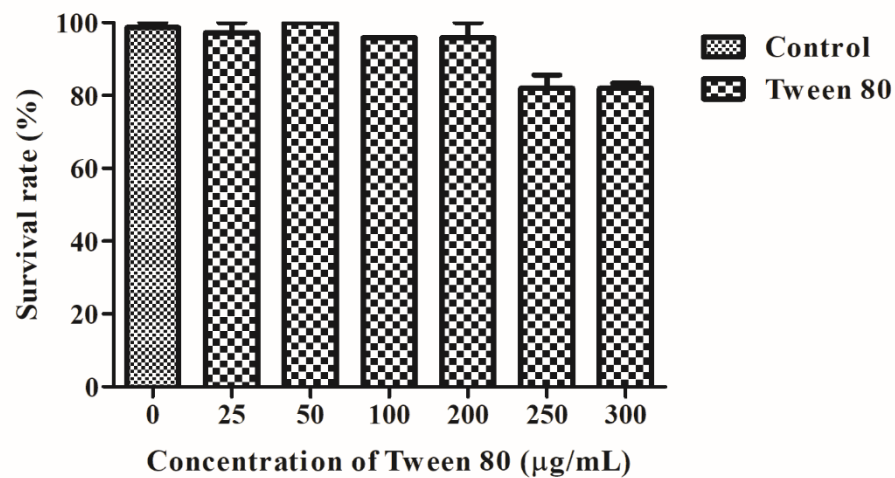
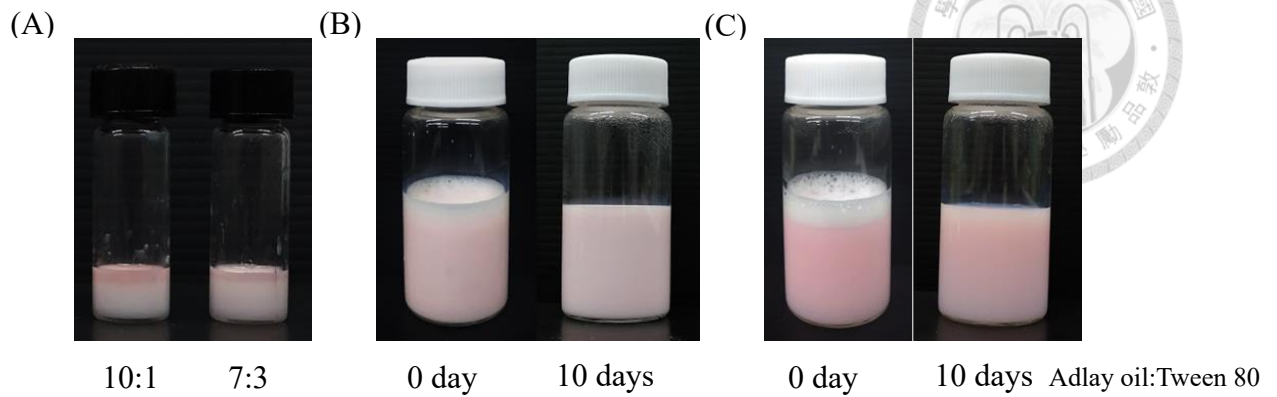


圖 十一、以不同濃度 Tween 80 處理後斑馬魚的存活率

每個 Tween 80 濃度處理組使用 24 個胚胎作為一重複 (n = 1)，實驗結果以平均值 ± 標準差表示 (n = 3)。

Figure 11. The survival rate of zebrafish after treatment with different concentration of Tween 80.

We used 24 embryos for each concentration of Tween 80 as a repeat (n = 1), and the results are expressed as mean ± SD of each group (n = 3).



(D)

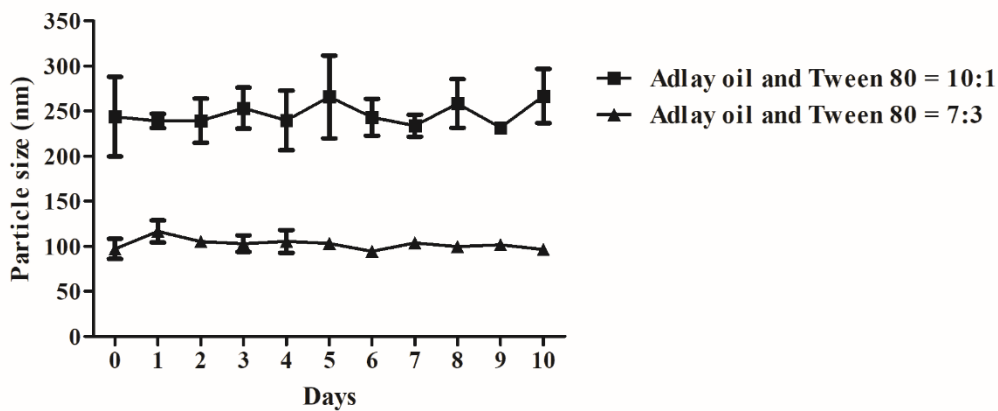


圖 十二、動物實驗用的薏仁油乳液與奈米乳液之穩定性分析 (A) 儲放一天的不同薏仁油與 Tween 80 比例粗乳液 (B) 薏仁油：Tween 80=10:1 的細乳液 (C) 薏仁油：Tween 80=7:3 的細乳液 (D) 不同薏仁油與 Tween 80 比例的細乳液在穩定性試驗中的粒徑變化 (n = 3)

Figure 12. The accelerated storage stability analysis of adlay oil emulsion and nanoemulsion for cell experiment (A) Different adlay oil and Tween 80 ratio of coarse emulsion stored 1 day (B) Fine emulsion (Adlay oil:Tween 80 = 10:1) (C) Fine emulsion (Adlay oil:Tween 80 = 7:3) (D) Particle size change of fine emulsion with different adlay oil and Tween 80 ratio in accelerated storage test (n = 3)



表六、動物實驗中不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液、細乳液與穩定性試驗後細乳液的物理性質

Table 6. Physical properties of all adlay oil coarse emulsion, fine emulsion and fine emulsion after accelerated storage test in animal experiments

Ratio of Adlay oil and Tween 80	Property	Before homogenization	After homogenization	Fine emulsion stored 10 days
10:1	D (nm)	1109.67 ± 284.85 ^a	243.80 ± 44.21 ^b	266.73 ± 30.03 ^b
	ζ (mV)	-47.63 ± 0.97 ^a	-40.53 ± 0.59 ^c	-43.67 ± 0.68 ^b
	μ (Pa·s)	0.065 ± 0.002	0.083 ± 0.005	-
7:3	D (nm)	1036.00 ± 150.89 ^a	97.03 ± 11.25 ^b	96.53 ± 4.31 ^b
	ζ (mV)	-40.63 ± 1.80 ^a	-27.47 ± 1.80 ^b	-30.43 ± 2.01 ^b
	μ (Pa·s)	0.074 ± 0.004	0.080 ± 0.002	-

實驗結果以平均值±標準差表示 (n = 3)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分析，其中字母表示同一列的實驗結果在統計上具有顯著差異 ($p < 0.05$)。D 代表粒徑，ζ 為界面電位，μ 為剪切速率為 100 s⁻¹ 時的黏度。

The results are expressed as mean ± SD of each group (n = 3). Statistical significance was analyzed by one way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters indicate a statistically significant difference in the same row ($p < 0.05$). D is particle size, ζ is zeta-potential, and μ is viscosity at 100 s⁻¹ of shear rate.

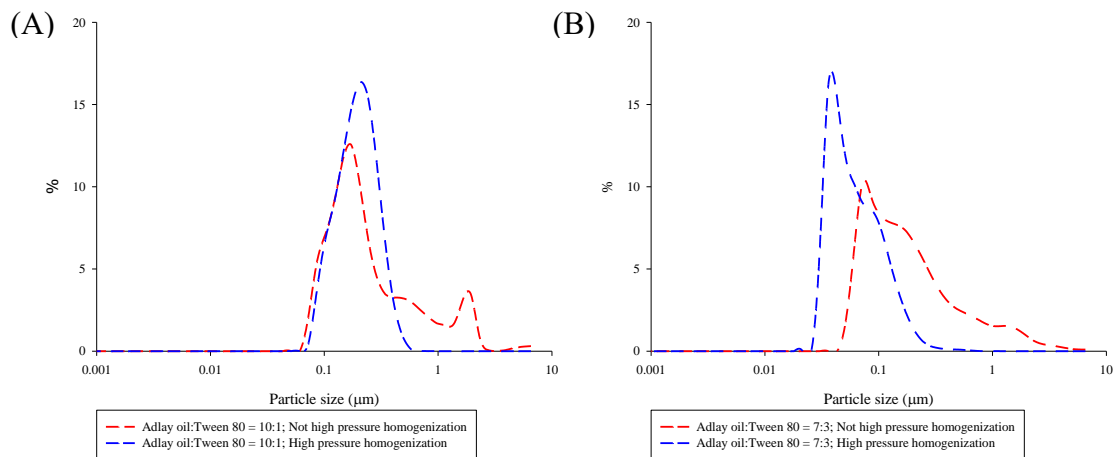


圖 十三、動物實驗中不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液、細乳液之粒徑分佈 (A) 薏仁油：Tween 80=10:1 (B) 薏仁油：Tween 80=7:3。圖中紅線為粗乳液，藍線為細乳液。

Figure 13. Particle size distribution of adlay oil coarse emulsion and fine emulsion with different adlay oil and Tween 80 ratio in animal experiments (A) Adlay oil:Tween 80 = 10:1 (B) Adlay oil:Tween 80 = 7:3. Red line in figure is coarse emulsion and blue line is fine emulsion.

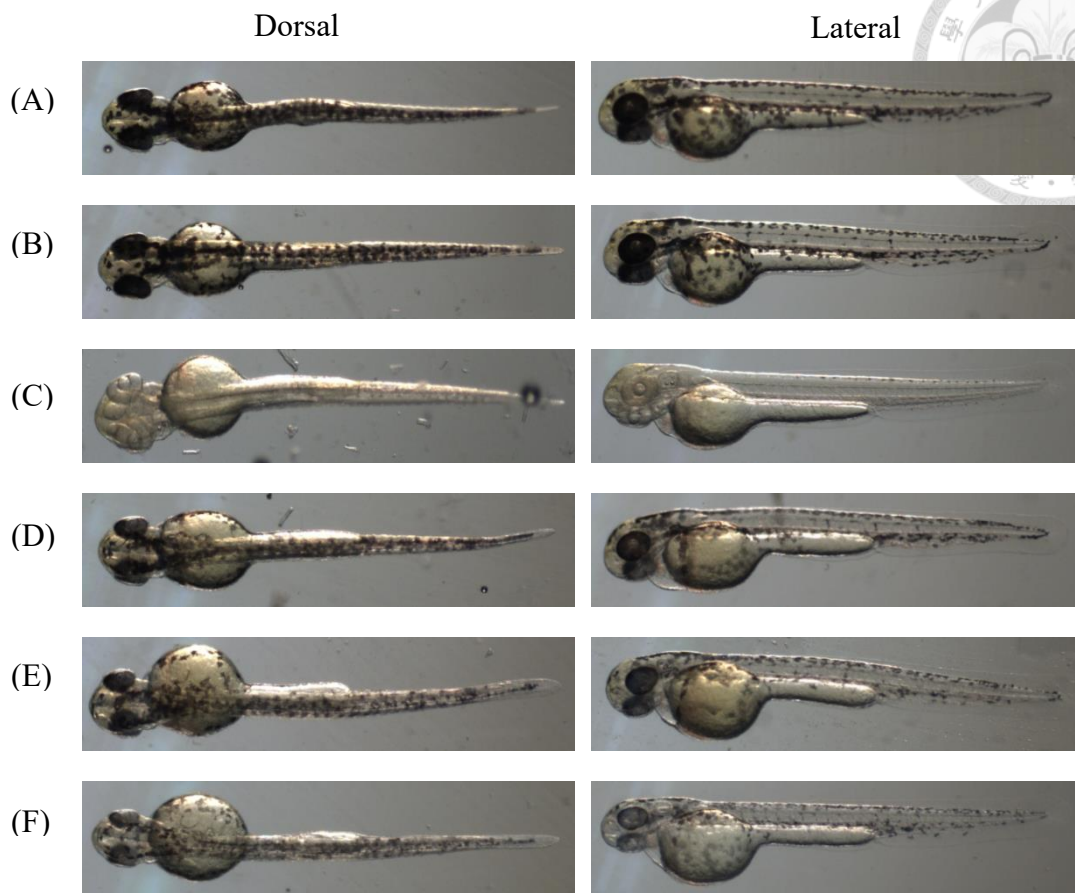


圖 十四、Tween 80、PTU 與相同粒徑細乳液但不同濃度薏仁油對斑馬魚黑色素生成影響 (A) 未經任何樣品處理的控制組 (B) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tween 80 (C) 0.2 mM PTU (D) 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 薏仁油 (E) 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 薏仁油 (F) 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 薏仁油。
(D)、(E)、(F) 的薏仁油細乳液粒徑為 243.80 nm。

Figure 14. Effects of Tween 80, PTU and the same particle size of fine emulsion with different concentration of adlay oil on melanogenesis in zebrafish embryos (A) Untreatment group (B) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tween 80 (C) 0.2 mM PTU (D) 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ adlay oil (E) 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ adlay oil (F) 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ adlay oil. Particle size of 10:1 of adlay oil and Tween 80 ratio is 243.80 nm.

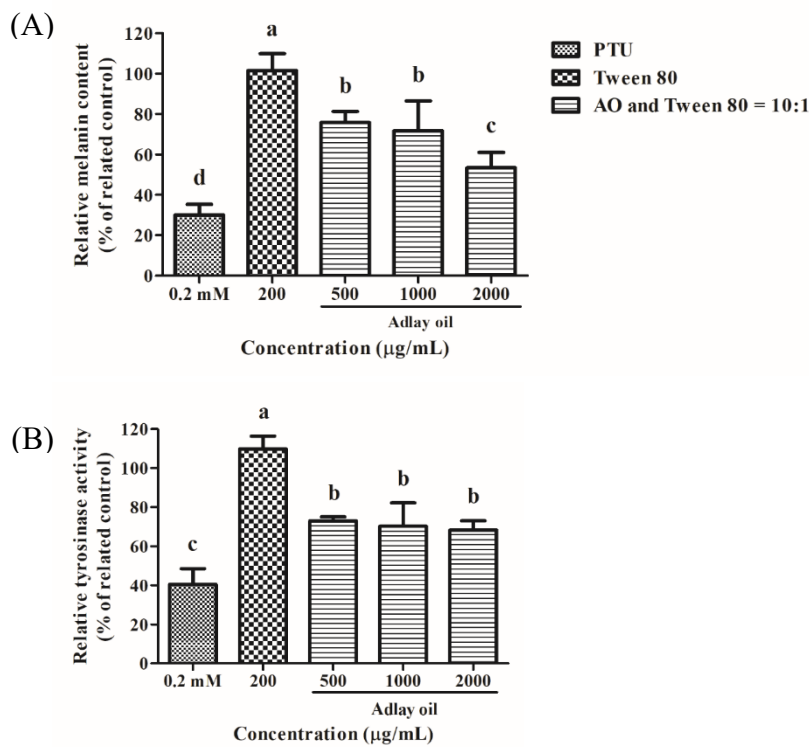


圖 十五、Tween 80、PTU 與相同粒徑細乳液但不同濃度薏仁油對斑馬魚黑色素生成與酪胺酸酶活性的影響 (A) 細胞存活率 (B) 黑色素含量 (C) 酪胺酸酶活性。實驗結果以平均值±標準差表示 (n = 3)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分析，其中字母表示實驗結果在統計上具有顯著差異 ($p < 0.05$)。10:1 薏仁油與 Tween 80 比例細乳液的粒徑大小為 243.80 nm。AO：薏仁油。

Figure 15. Effects of Tween 80, PTU and the same particle size of fine emulsion with different concentration of adlay oil on melanogenesis and tyrosinase activity in zebrafish embryos (A) Cell viability (B) Melanin content (C) Tyrosinase activity. The results are expressed as mean \pm SD of each group (n = 3). Statistical significance was analyzed by one way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$). Particle size of 10:1 of adlay oil and Tween 80 ratio is 243.80 nm. AO: adlay oil.

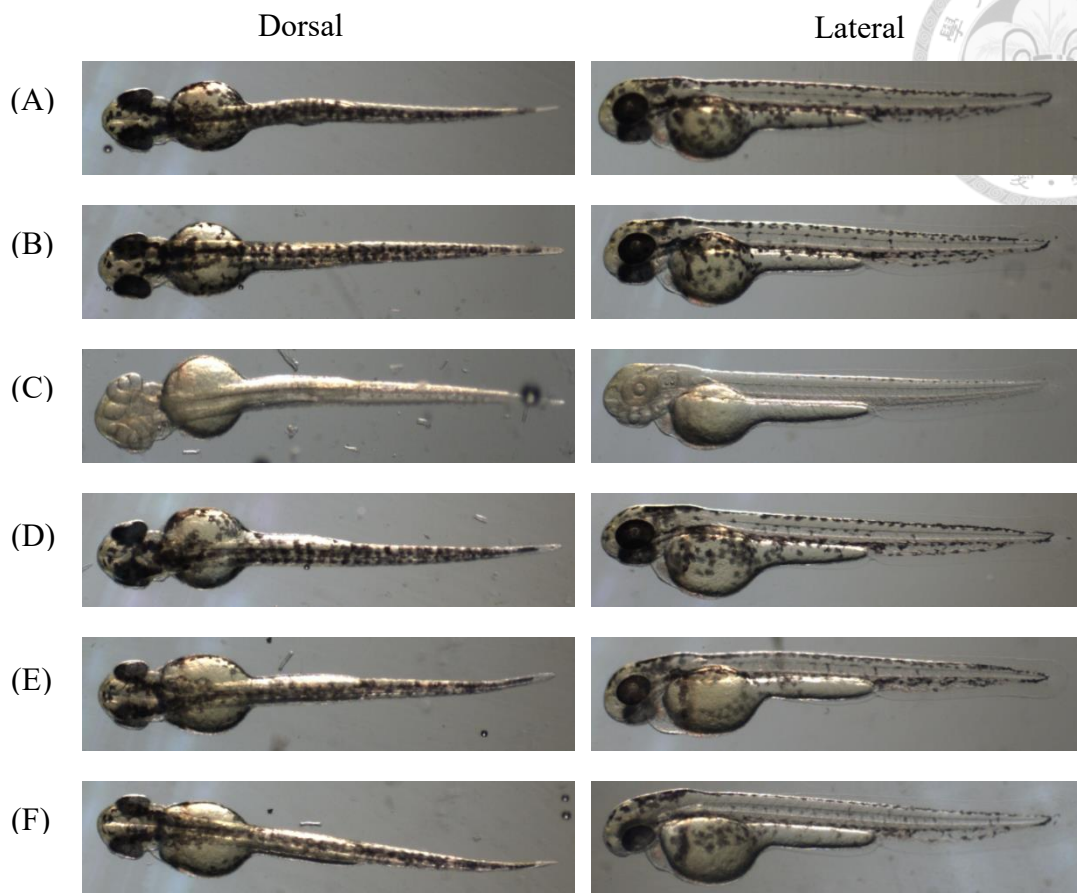


圖 十六、Tween 80、PTU 與不同粒徑細乳液但相同濃度薏仁油對斑馬魚黑色素生成的影響 (A) 未經任何樣品處理的控制組 (B) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tween 80 (C) 0.2 mM PTU (D) 665.50 nm 薏仁油細乳液 (E) 243.80 nm 薏仁油細乳液 (F) 97.03 nm 薏仁油細乳液。(D)、(E)、(F) 的薏仁油濃度為 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Figure 16. Effects of Tween 80, PTU and different particle size of fine emulsion with the same concentration of adlay oil on melanogenesis in zebrafish embryos (A) Untreatment group (B) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tween 80 (C) 0.2 mM PTU (D) 665.50 nm adlay oil fine emulsion (E) 243.80 nm adlay oil fine emulsion (F) 97.03 nm adlay oil fine emulsion. All concentration of adlay oil is 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

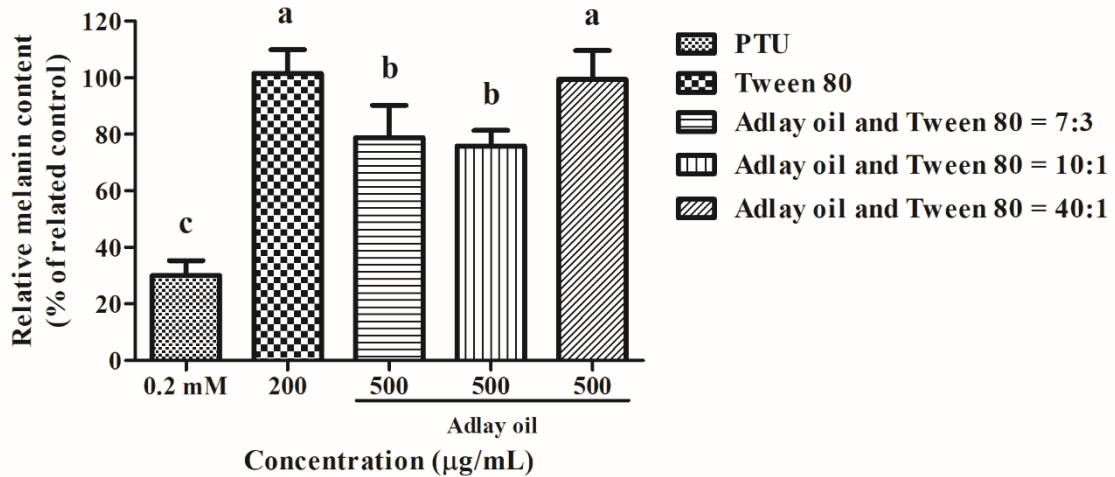
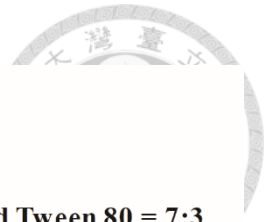


圖 十七、Tween 80、PTU 與不同粒徑細乳液但相同濃度薏仁油對斑馬魚黑色素生成的影響 (A) 細胞存活率 (B) 黑色素含量。實驗結果以平均值±標準差表示 (n = 3)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分析，其中字母表示實驗結果在統計上具有顯著差異 ($p < 0.05$)。7:3、10:1、40:1 薏仁油與 Tween 80 比例細乳液的粒徑大小分別為 97.03、243.80、665.50 nm。AO：薏仁油。

Figure 17. Effects of Tween 80, PTU and different particle size of fine emulsion with the same concentration of adlay oil on melanogenesis in zebrafish embryos (A) Cell viability (B) Melanin content. The results are expressed as mean \pm SD of each group (n = 3). Statistical significance was analyzed by one way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$). Particle size of 7:3, 10:1, and 40:1 of adlay oil and Tween 80 ratio is 97.03, 243.80, and 665.50 nm, respectively. AO: adlay oil.



(A)



(B)



(C)



圖 十八、不同水、薏仁油、Tween 80 比例製備樣品型態 (A) 乳霜 (B) 穩定乳液 (C) 不穩定乳液。樣品經 Oil red O 染色。

Figure 18. Three types prepared by different water, adlay oil and Tween 80 ratio (A) Cream (B) Stable emulsion (C) Unstable emulsion. Samples were stained by Oil red O.

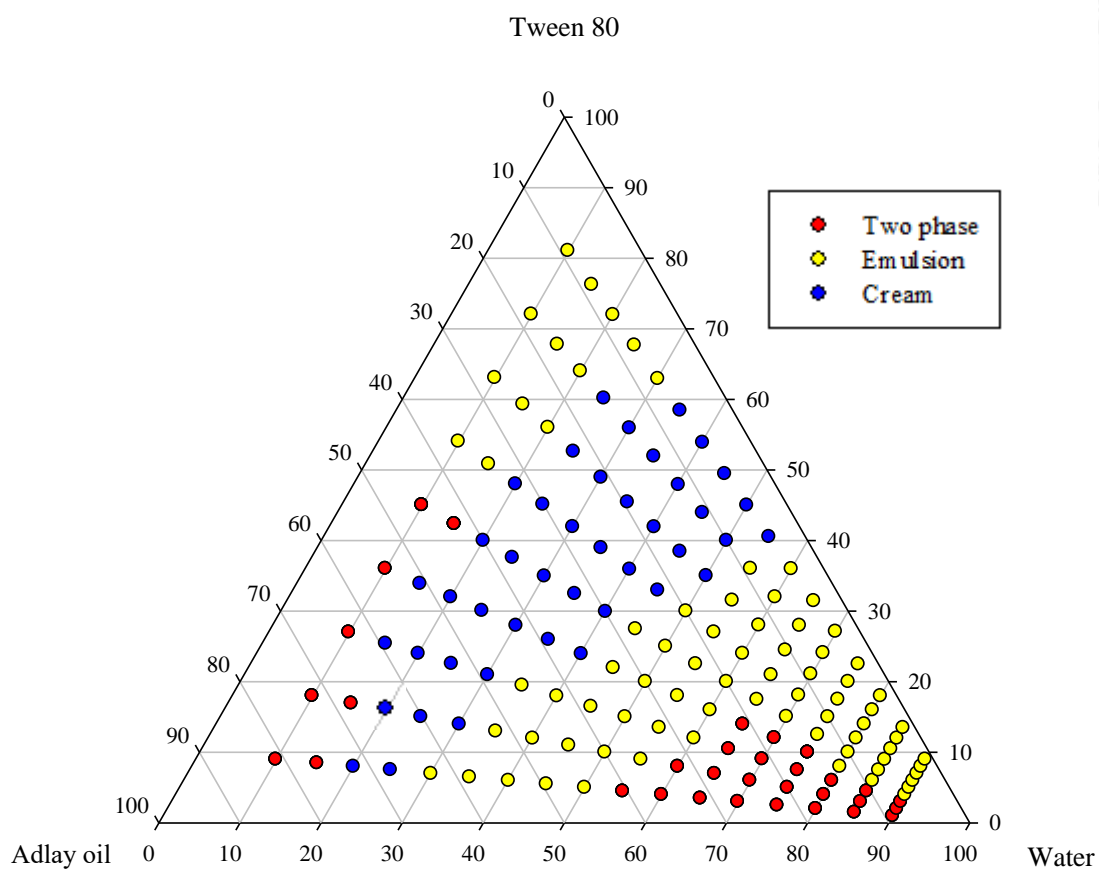


圖 十九、薏仁油、Tween 80、水的擬三相圖

Figure 19. Pseudo ternary phase diagrams of adlay oil, Tween 80, and water

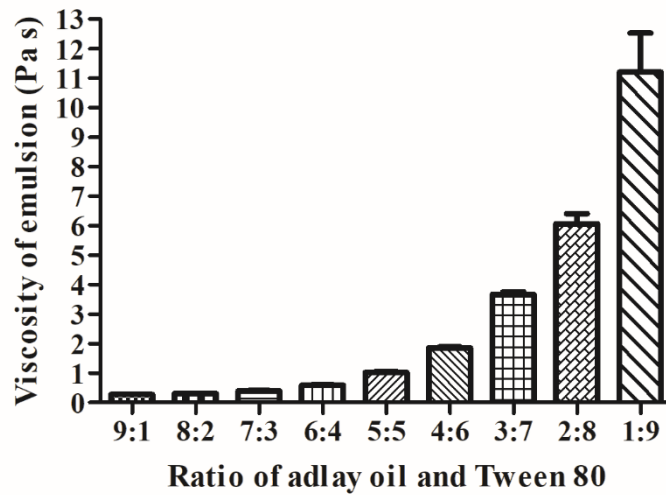


圖 二十、不同薏仁油與 Tween 80 比例的粗乳液之黏度 (剪切速率 100 s^{-1})

全部配方的水分含量固定為 60%。實驗結果以平均值 \pm 標準差表示 ($n = 3$)。

Figure 20. Viscosity of coarse emulsion with different adlay oil and Tween 80 ratio (100 s^{-1} shear rate)

The water content of all formulation is 60%. The results are expressed as mean \pm SD of each group ($n = 3$).

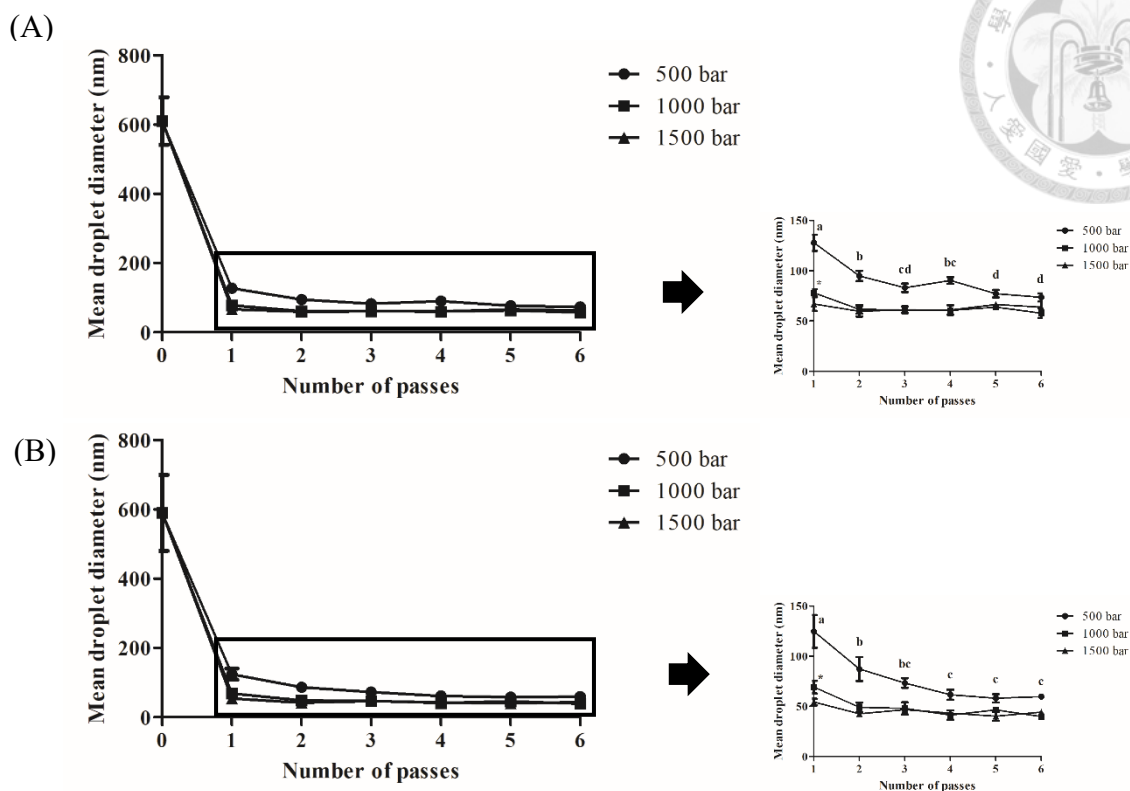


圖 二十一、薏仁油粗乳液在不同壓力與均質次數下的粒徑變化 (A) 薏仁油：

Tween 80=7:3 (B) 薏仁油：Tween 80=6:4

實驗結果以平均值±標準差表示 (n=3)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分析，其中字母表示實驗結果在統計上具有顯著差異 (p<0.05)。

Figure 21. Effect of pressure and number of passes on the mean droplet diameter produced adlay oil coarse (A) Adlay oil:Tween 80 = 7:3 (B) Adlay oil:Tween 80 = 6:4

The results are expressed as mean ± SD of each group (n = 3). Statistical significance was analyzed by one way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters indicate a statistically significant difference (p < 0.05).



表 七、不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液與細乳液的物理性質

Table 7. Physical properties of adlay oil coarse emulsion and fine emulsion with different adlay oil and Tween 80 ratio

Ration of Adlay oil and Tween 80	Property	Before homogenization	After homogenization
9:1	D (nm)	1345.50 ± 246.85 ^a	214.35 ± 14.01 ^a
	ζ (mV)	-48.37 ± 0.76 ^a	-34.23 ± 1.17 ^a
	μ (Pa·s)	0.28 ± 0.01 ^d	-
8:2	D (nm)	951.00 ± 27.25 ^b	197.13 ± 14.12 ^b
	ζ (mV)	-44.20 ± 1.13 ^b	-36.30 ± 1.22 ^a
	μ (Pa·s)	0.30 ± 0.01 ^c	-
7:3	D (nm)	610.50 ± 68.81 ^c	73.70 ± 9.03 ^c
	ζ (mV)	-46.30 ± 1.71 ^{ab}	-33.00 ± 2.82 ^a
	μ (Pa·s)	0.39 ± 0.01 ^b	-
6:4	D (nm)	590.00 ± 109.51 ^c	46.00 ± 2.25 ^d
	ζ (mV)	-40.30 ± 0.79 ^c	-25.80 ± 0.90 ^b
	μ (Pa·s)	0.59 ± 0.02 ^a	-

實驗結果以平均值±標準差表示 (n = 3)，並以 one way ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行統計分析，其中字母表示同一欄的實驗結果在統計上具有顯著差異 ($p < 0.05$)。D 代表粒徑，ζ 為界面電位，μ 為剪切速率為 100 s⁻¹ 時的黏度。

The results are expressed as mean ± SD of each group (n = 3). Statistical significance was analyzed by one way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters indicate a statistically significant difference in the same column ($p < 0.05$). D is particle size, ζ is zeta-potential, and μ is viscosity at 100 s⁻¹ of shear rate.

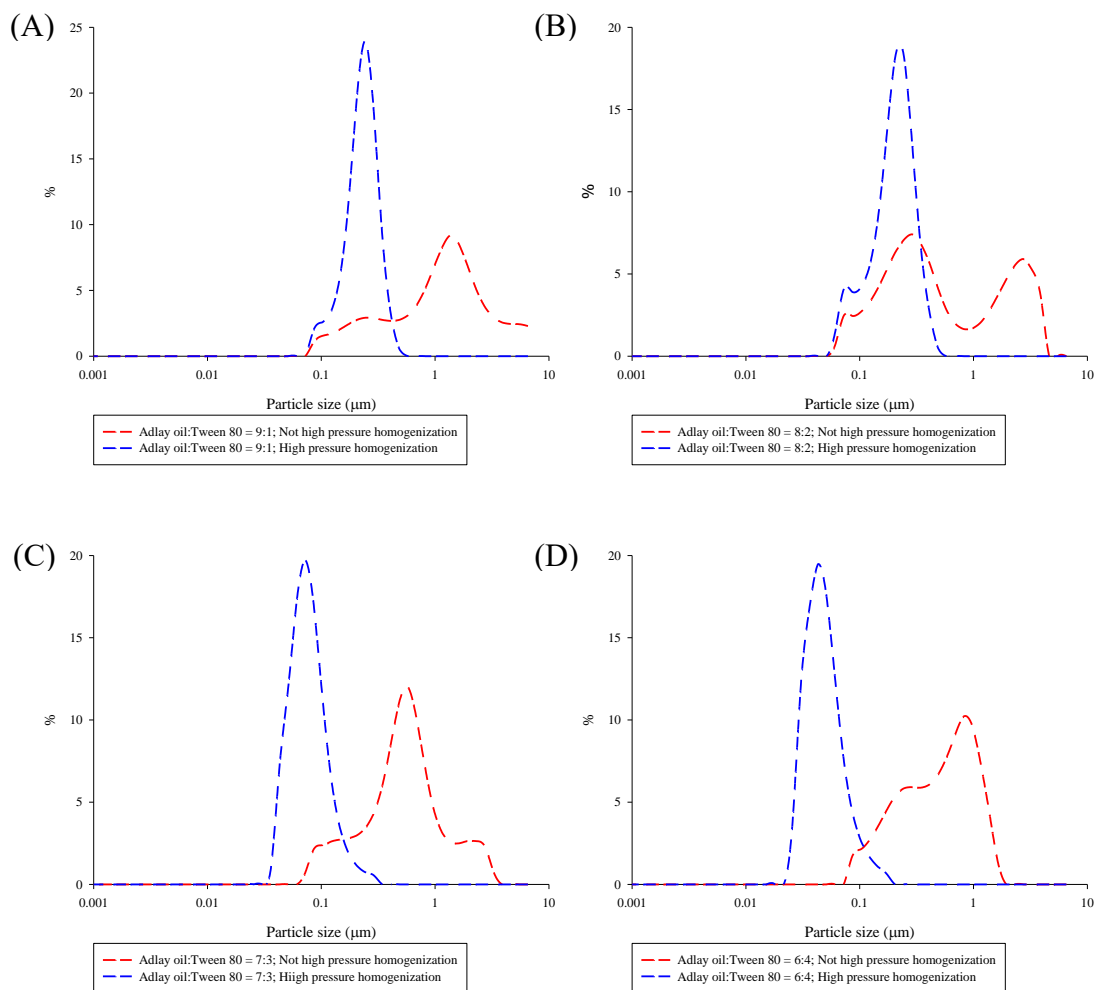


圖 二十二、不同薏仁油與 Tween 80 比例的薏仁油粗乳液、細乳液之粒徑分佈
 (A) 薏仁油：Tween 80=9:1 (B) 薏仁油：Tween 80=8:2 (C) 薏仁油：Tween 80=7:3 (D) 薏仁油：Tween 80=6:4。圖中紅線為粗乳液，藍線為細乳液。

Figure 22. Particle size distribution of adlay oil coarse emulsion and fine emulsion with different adlay oil and Tween 80 ratio (A) Adlay oil:Tween 80 = 9:1 (B) Adlay oil:Tween 80 = 8:2 (C) Adlay oil:Tween 80 = 7:3 (D) Adlay oil:Tween 80 = 6:4. Red line in figure is coarse emulsion and blue line is fine emulsion.

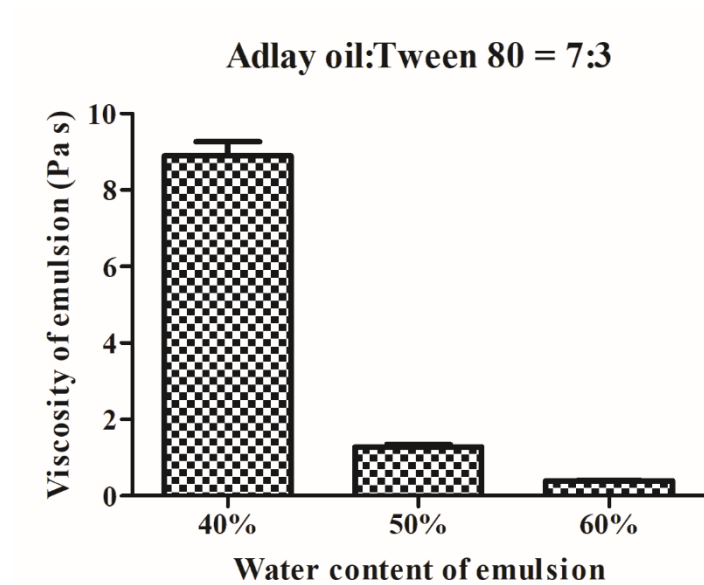


圖 二十三、不同水分含量的粗乳液之黏度 (剪切速率 100 s^{-1})

全部配方的薏仁油與 Tween 80 比例為 7:3。實驗結果以平均值 \pm 標準差表示 (n = 3)。

Figure 23. Viscosity of coarse emulsion with different water content (100 s^{-1} shear rate)

The adaly oil and Tween 80 ratio of all formulation is 7:3. The results are expressed as mean \pm SD of each group (n = 3).

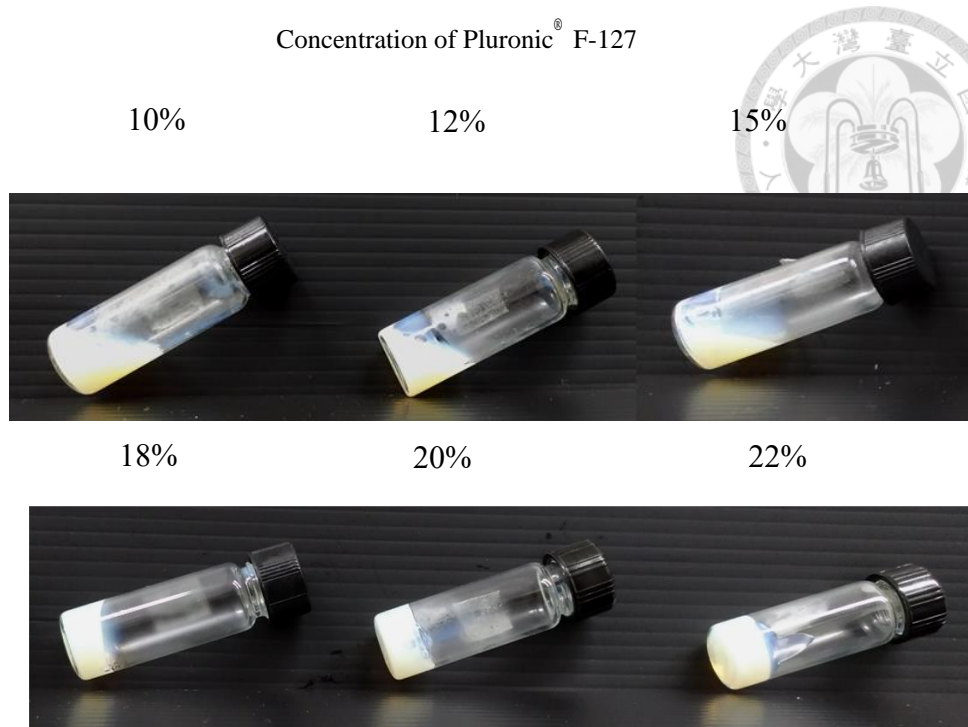


圖 二十四、含不同 F127 濃度的樣品凝膠情況

Figure 24. Sample with different concentration of F127

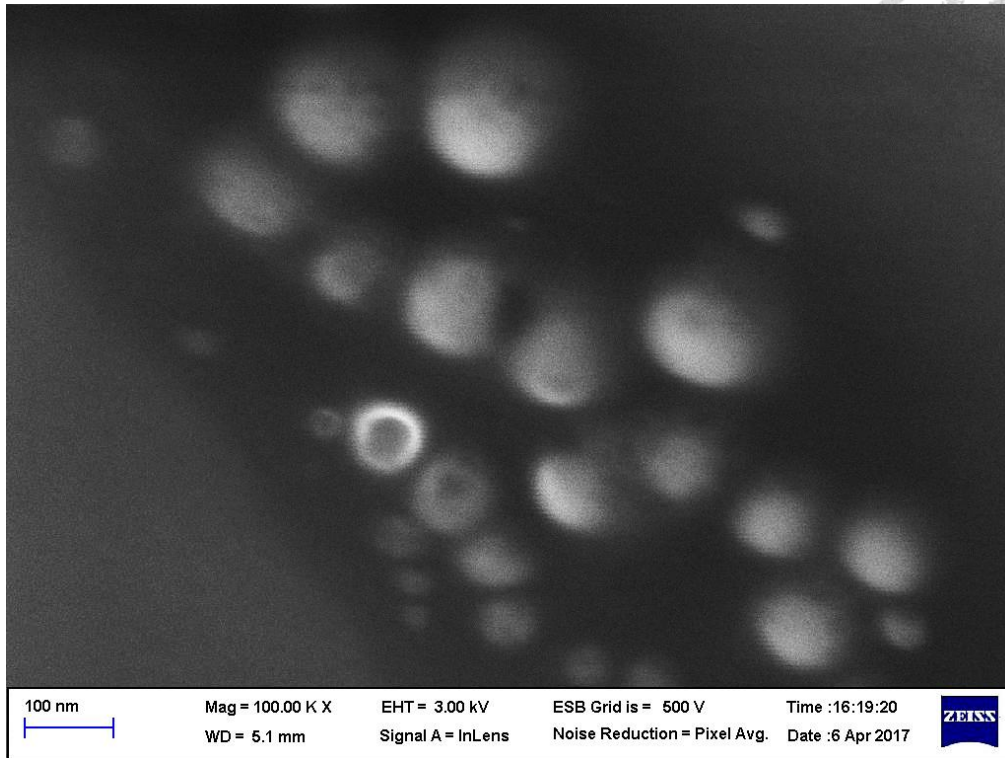


圖 二十五、以場發射掃描式電子顯微鏡觀察薏仁油奈米乳液凝膠內粒子的粒徑
Figure 25. Observation of particle size of droplets in adlay oil nanoemulsion gel by
Field emission scanning electron microscope

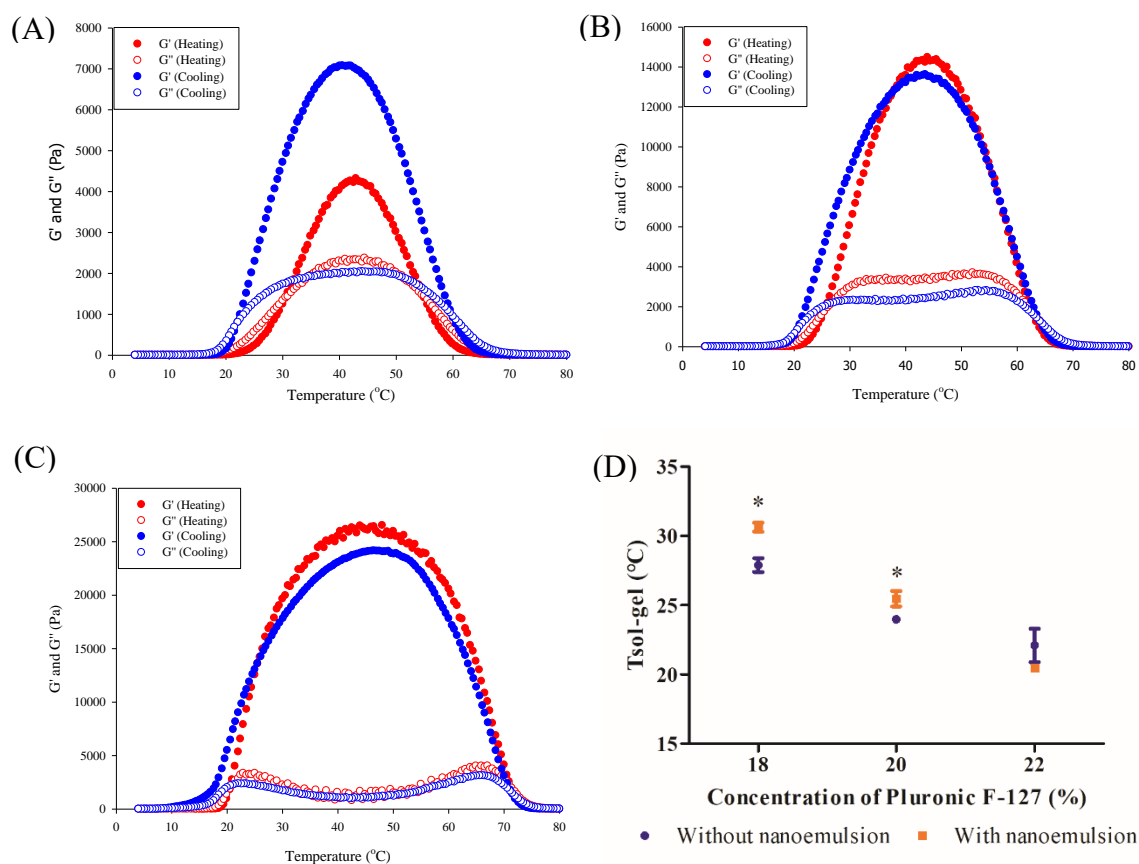


圖 二十六、不同 F127 濃度下薏仁油奈米乳液凝膠的凝膠溫度 (A) 18% F127 (B) 20% F127 (C) 22% (D) 不同濃度 F127 的水凝膠與薏仁油奈米乳液凝膠之凝膠溫度

Figure 26. Gelation temperature of adlay oil nanoemulsion gel with different F127 concentration (A) 18% F127 (B) 20% F127 (C) 22% F127 (D) Gelation temperature of hydrogel and adlay oil nanoemulsion gel with different F127 concentration

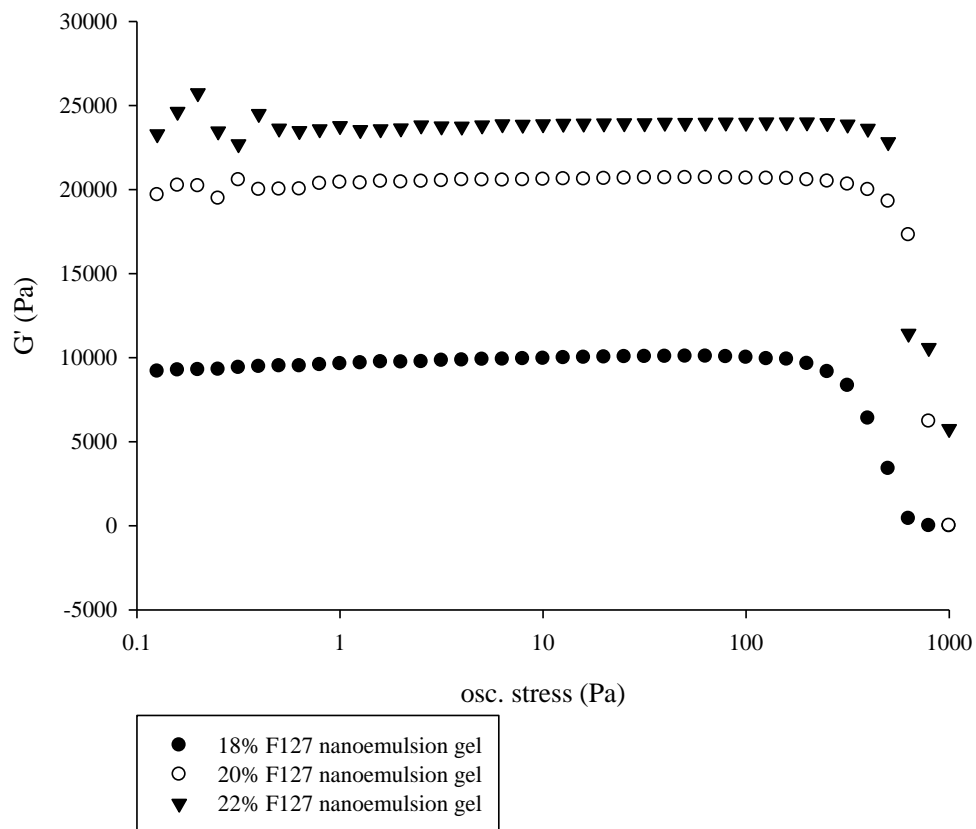
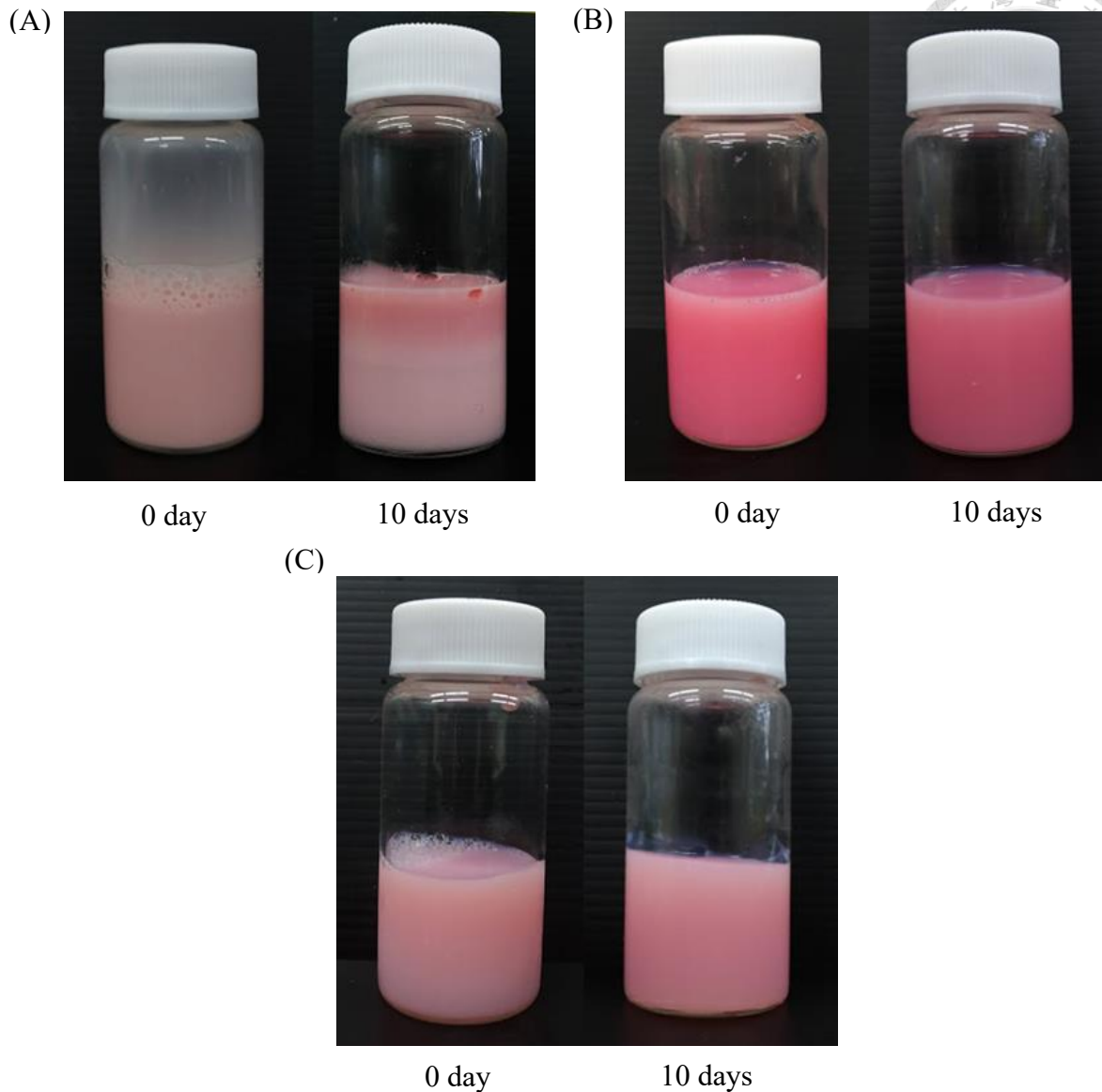


圖 二十七、不同濃度 F127 的薏仁油奈米乳液凝膠之應力掃描曲線

Figure 27. Stress sweep curves of adlay oil nanoemulsion gel with different F127 concentration




圖二十八、薏仁油乳液、奈米乳液與奈米乳液凝膠之穩定性分析 (A) 乳液 (B) 奈米乳液 (C) 奈米乳液凝膠。乳液與奈米乳液的水、薏仁油、Tween 80 比例為 60:28:12%，而奈米乳液凝膠含 18% F127。

Figure 28. The accelerated storage stability analysis of adlay oil emulsion, nanoemulsion and nanoemulsion gel (A) Emulsion (B) Nanoemulsion (C) Nanoemulsion gel. The water, adlay oil and Tween 80 of emulsion and nanoemulsion was 60:28:12%, and nanoemulsion gel was containing 18% F127.

表 八、不同經皮給藥劑型在 37°C 時的黏度 (剪切速率 100 s⁻¹)

Table 8. Viscosity of different transdermal forms at 37°C (100 s⁻¹ shear rate)



	AOE	AONE	AONEG (18% F127)	AONEG (20% F127)	AONEG (22% F127)
Viscosity (Pa·s)	0.35 ± 0.01	0.63 ± 0.07	9.48 ± 0.30	12.27 ± 0.22	14.30 ± 0.21

實驗結果以平均值±標準差表示 (n = 3)。

AOE：薏仁油乳液，AONE：薏仁油奈米乳液，AONEG：薏仁油奈米乳液凝膠。

The results are expressed as mean ± SD of each group (n = 3).

AOE: Adlay oil emulsion, AONE: Adlay oil nanoemulsion, and AONEG: Adlay oil nanoemulsion gel

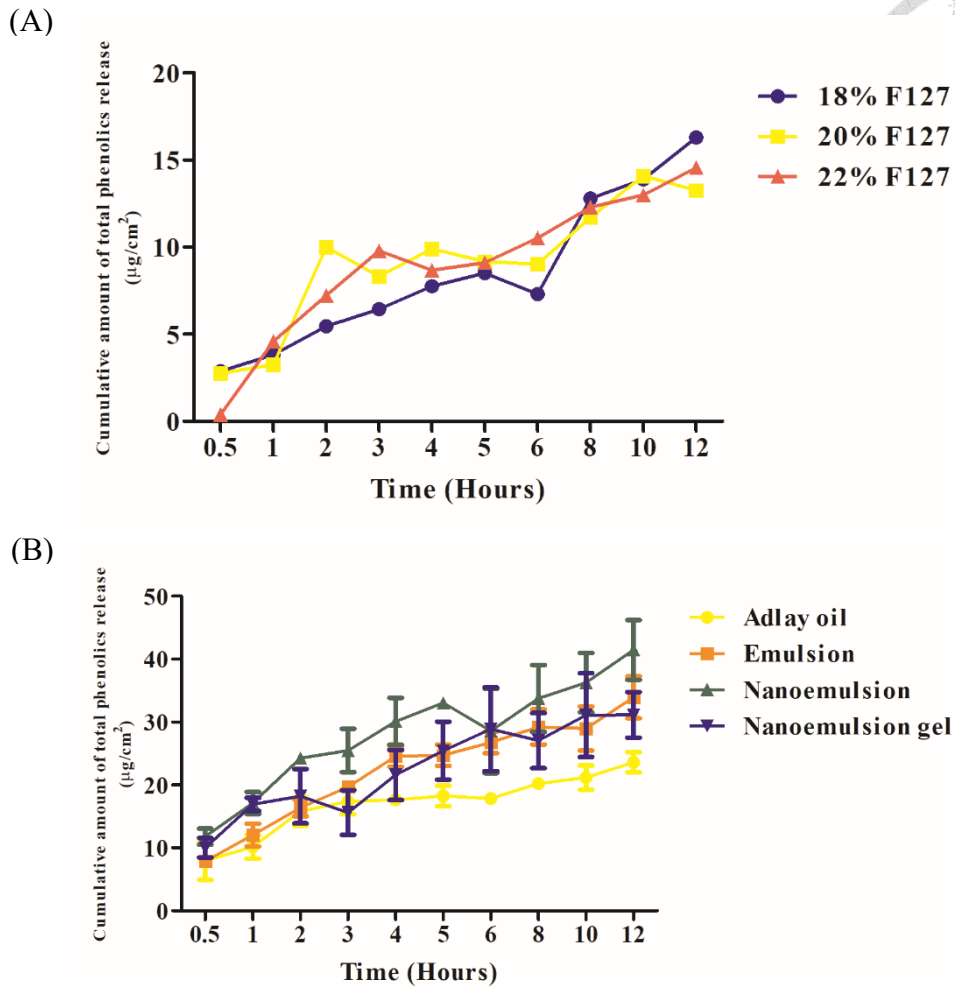


圖 二十九、不同經皮給藥劑型的經皮吸收率 (A) 不同 F127 濃度薏仁油奈米乳液凝膠的經皮吸收率 (B) 不同經皮給藥劑的經皮吸收率。實驗結果以平均值±標準差表示 (n = 3)。

Figure 29. Percutaneous absorption rate of different transdermal forms (A)

Percutaneous absorption rate of different concentration of F127 (B) Percutaneous absorption rate of different transdermal forms. The results are expressed as mean \pm SD of each group (n = 3).

第六章 結論



薏仁油在過往的研究中已證實具有降血糖、降血脂與抗腫瘤生成的保健功效，然而在抑制黑色素生成方面，僅有證實與薏仁油極性相似的超臨界二氧化碳流體萃取薏苡籽實而得的萃取物具有抑制細胞內酪胺酸酶活性，減少 B16F10 細胞黑色素含量的功效，並無探討薏仁油是否具有抑制黑色素生成功效的相關研究，故本篇論文為第一篇探討薏仁油是否具有抑制黑色素生成功效的研究。本篇研究除了採用於抑制黑色素生成研究中常見的 B16F10 細胞進行體外試驗外，更採用近年來新型的動物模式—斑馬魚以探討薏仁油在體內試驗中是否也具有抑制黑色素生成的功效，在 B16F10 細胞實驗中，薏仁油具有抑制 B16F10 細胞內黑色素與酪胺酸酶活性的功效，當薏仁油濃度為 50 $\mu\text{g/mL}$ 時，其對 B16F10 細胞內黑色素與酪胺酸酶活性抑制率分別為 29.5%與 31.6%，而在斑馬魚動物實驗中，薏仁油亦可抑制斑馬魚黑色素與酪胺酸酶活性的功效，當薏仁油濃度為 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 時，其對斑馬魚黑色素與酪胺酸酶活性抑制率分別為 46.5% 與 31.7%，證實薏仁油具有抑制黑色素生成的功效。

為了克服薏仁油不溶於培養液中而無法進行細胞與斑馬魚動物實驗，本研究製備出穩定的水包油型薏仁油乳液與奈米乳液，以利薏仁油能溶於培養液中，並進行細胞與動物實驗以確認薏仁油是否具有抑制黑色素生成的功效。確認薏仁油具抑制黑色素生成的功效後，繼續以水包油型薏仁油乳液為基礎製備四種經皮給藥劑型：薏仁油、乳液、奈米乳液、奈米乳液凝膠，並在經皮吸收試驗中，以奈米乳液之經皮吸收率為最佳，然對於低極性的薏仁油而言，水包油型之薏仁油乳液與乳液凝膠未必為較佳的經皮給藥劑型。

本篇研究證實薏仁油無論在體外或體內試驗中，皆具有抑制黑色素生成的功效，而薏仁油是薏苡麩皮中的副產物，可以根據薏仁油的保健功效發展產品，進行再利用，以達到不浪費與增加副產物附加價值等目的。本篇研究為了克服薏仁

油不溶於培養液中而無法進行細胞與斑馬魚動物實驗，需製備水包油型薏仁油乳液與奈米乳液，然對於低極性的薏仁油而言，非為較佳的經皮給藥劑型，在證實薏仁油具有抑制黑色素生成功效後，後續研究可針對薏仁油的性質，發展出對於薏仁油而言的最佳經皮給藥劑型，以利後續的產品應用。



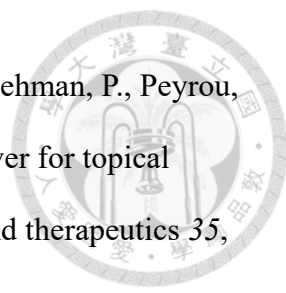
第七章 參考文獻




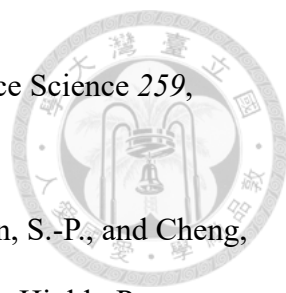
1. 黃士禮、江文章 (1999)。易椅籽實各部位之組成分及其丙酮萃取液之抗突變作用。食品科學，26，121-130。
2. 黃博偉 (2003)。不同糙薏仁成分對糖尿病大白鼠醣代謝及脂質代謝的影響。國立臺灣大學食品科技研究所博士論文。
3. 孫宛如 (2006)。奈米乳液的開發與特性探討。長庚大學生化與生醫工程研究所碩士論文。
4. 柯怡如 (2007)。製備蝦紅素微乳液及其乳霜化妝品之探討。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文。
5. 周東，王習魁，張裕中 (2008)。高壓均質過程可視化分析與探討。機械製造，46(1)，56-59。
6. 李明怡 (2008)。薏仁麩皮中防癌及抗發炎活性成分之分離與鑑定。國立臺灣大學食品科技研究所博士論文。
7. 傅振，偉權，許滄粟 (2009)。噴嘴內空穴現象對柴油機噴霧特性的影響。農機化研究，31(3)，63-68。
8. 張汀沂、黃蕙君、張聰民 (2009)。反轉醇美白特性之研究。弘光學報，57，130-142。
9. 張維家 (2009)。Bacterioruberin 和鞣花酸代謝物 urolithin A、urolithin B 抑制 B16F0 黑色素形成之研究。國立臺灣大學農業化學系研究所碩士論文。
10. 陳欣喬 (2009)。薏仁麩皮乙醇萃取物正己烷區分層之成分分析與純化鑑定。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。
11. 劉家余 (2010)。薏仁麩皮萃取物乙酸乙酯區分層之抗發炎效果。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。
12. 張文倫 (2012)。肉桂精油對酪胺酸酶活性與黑色素生成之影響。靜宜大學化

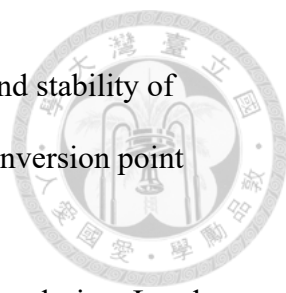
粧品科學系研究所碩士論文。

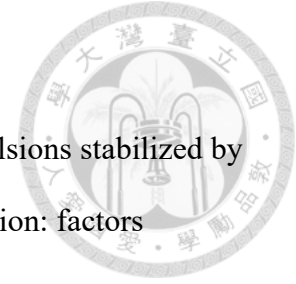
13. 劉力綾 (2014)。萊姆薄荷及綠薄荷精油之抗菌、抗氧化及抑制小鼠黑色素腫瘤細胞 B16F10 生成黑色素之性質探討。靜宜大學化粧品科學系研究所碩士論文。
14. 張慈芸 (2014)。赤桉花精油抗氧化能力及美白活性之研究。弘光科技大學化粧品科技研究所。
15. 楊筑晴 (2015)。咖啡油為基底製備奈米微乳化液及其對抑制皮膚癌細胞與紫外線 A 誘導皮膚傷害之影響。天主教輔仁大學食品科學系碩士論文。
16. 張瀨文 (2015)。以體外及體內模式探討薏仁麩皮萃提取物減緩第二型糖尿病的效用及其作用機制。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。
17. Alexander, A., Khichariya, A., Gupta, S., Patel, R.J., Giri, T.K., and Tripathi, D.K. (2013). Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel. *Journal of controlled release* 171, 122-132.
18. Alexander, A., Tripathi, D., Verma, T., Maurya, J., and Patel, S. (2011). Mechanism responsible for mucoadhesion of mucoadhesive drug delivery system: a review.
19. Ali, S., Van Mil, H.G., and Richardson, M.K. (2011). Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. *PloS one* 6, e21076.
20. Amran, A., Harfianto, R., Dewi, W., Beri, D., and Putra, A. (2016). Solubility dynamic of methyl yellow and carbon black in microemulsions and lamellar liquid crystal of water, non ionic surfactants and cyclohexane system. Paper presented at: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (IOP Publishing).
21. Antunes, F.E., Gentile, L., Rossi, C.O., Tavano, L., and Ranieri, G.A. (2011). Gels of Pluronic F127 and nonionic surfactants from rheological characterization to controlled drug permeation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 87, 42-48.

- 
22. Baynes, R., Riviere, J., Franz, T., MONTEIRO-RIVIERE, N., Lehman, P., Peyrou, M., and TOUTAIN, P.L. (2012). Challenges obtaining a biowaiver for topical veterinary dosage forms. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 35, 103-114.
23. Bekard, I.B., Asimakis, P., Bertolini, J., and Dunstan, D.E. (2011). The effects of shear flow on protein structure and function. *Biopolymers* 95, 733-745.
24. Briganti, S., Camera, E., and Picardo, M. (2003). Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell & Melanoma Research* 16, 101-110.
25. Chang, T.-S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International journal of molecular sciences* 10, 2440-2475.
26. Che, L.-M., Wang, L.-J., Li, D., Bhandari, B., Özkan, N., Chen, X.D., and Mao, Z.-H. (2009). Starch pastes thinning during high-pressure homogenization. *Carbohydrate polymers* 75, 32-38.
27. Chen, G., and Tao, D. (2005). An experimental study of stability of oil–water emulsion. *Fuel processing technology* 86, 499-508.
28. Chen, J., Dickinson, E., Langton, M., and Hermansson, A.-M. (2000). Mechanical properties and microstructure of heat-set whey protein emulsion gels: effect of emulsifiers. *LWT-Food Science and Technology* 33, 299-307.
29. Choi, T.Y., Kim, J.H., Ko, D.H., Kim, C.H., Hwang, J.S., Ahn, S., Kim, S.Y., Kim, C.D., Lee, J.H., and Yoon, T.J. (2007). Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell & Melanoma Research* 20, 120-127.
30. Devada, P., Jain, A., Vyas, N., and Jain, S. (2011). Development of antifungal emulsion based gel for topical fungal infection. *Int J Pharm Res Dev* 3, 18-25.

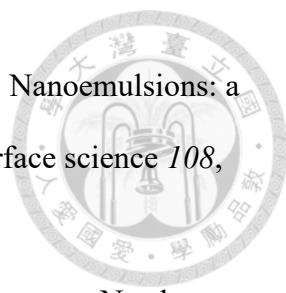
- 
31. Dumortier, G., Grossiord, J.L., Agnely, F., and Chaumeil, J.C. (2006). A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical research* 23, 2709-2728.
32. El Maghraby, G.M., Barry, B.W., and Williams, A.C. (2008). Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *European journal of pharmaceutical sciences* 34, 203-222.
33. Fernandez, P., André, V., Rieger, J., and Kühnle, A. (2004). Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 251, 53-58.
34. Gasco, M., Gallarate, M., and Pattarino, F. (1991). In vitro permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. *International journal of pharmaceutics* 69, 193-196.
35. Godin, B., and Touitou, E. (2007). Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced drug delivery reviews* 59, 1152-1161.
36. Halle, W. (2002). The Registry of Cytotoxicity: toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD50) and to reduce testing in animals. *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 31, 89-198.
37. Hamzeloo-Moghadam, M., Taiebi, N., Mosaddegh, M., Eslami Tehrani, B., and Esmaeili, S. (2014). The effect of some cosolvents and surfactants on viability of cancerous cell lines. *Research Journal of Pharmacognosy* 1, 41-45.
38. Henn, K., and Braunbeck, T. (2011). Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 153, 91-98.
39. Hsu, J.-P., and Nacu, A. (2003). Behavior of soybean oil-in-water emulsion

- 
- stabilized by nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science* *259*, 374-381.
40. Hsu, K.-D., Chen, H.-J., Wang, C.-S., Lum, C.-C., Wu, S.-P., Lin, S.-P., and Cheng, K.-C. (2016). Extract of *Ganoderma formosanum* Mycelium as a Highly Potent Tyrosinase Inhibitor. *Scientific reports* *6*, 32854.
41. Huang, H.-C., Hsieh, W.-Y., Niu, Y.-L., and Chang, T.-M. (2014). Inhibitory effects of adlay extract on melanin production and cellular oxygen stress in B16F10 melanoma cells. *International journal of molecular sciences* *15*, 16665-16679.
42. Hunter, R.J. (2001). *Foundations of colloid science* (Oxford University Press).
43. Joshi, B., Singh, G., Rana, A., Saini, S., and Singla, V. (2011). Emulgel: a comprehensive review on the recent advances in topical drug delivery. *Int Res J Pharm* *2*, 66-70.
44. Khaled, M., Larribere, L., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J.-P., Ballotti, R., and Bertolotto, C. (2002). Glycogen synthase kinase 3 β is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 33690-33697.
45. Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics* *203*, 253-310.
46. Kristmundsdóttir, T., Aradóttir, H.A., Ingólfssdóttir, K., and Ögmundsdóttir, H.M. (2002). Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* *54*, 1447-1452.
47. Lee, K.J., Nallathamby, P.D., Browning, L.M., Osgood, C.J., and Xu, X.-H.N. (2007). In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS nano* *1*, 133-143.

- 
48. Liu, W., Sun, D., Li, C., Liu, Q., and Xu, J. (2006). Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. *Journal of colloid and interface science* 303, 557-563.
49. Michael, E.A. (2002). *Pharmaceutics: The science of dosage form design*. London, UK: Churchill Livingstone, 197-210.
50. Mohamed, M.I. (2004). Optimization of chlorphenesin emulgel formulation. *The AAPS journal* 6, 81-87.
51. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63.
52. Nie, S., Hsiao, W.W., Pan, W., and Yang, Z. (2011). Thermoreversible Pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *International journal of nanomedicine* 6, 151.
53. Ortonne, J.P. (2002). Photoprotective properties of skin melanin. *British Journal of Dermatology* 146, 7-10.
54. Peterson, R.T., Link, B.A., Dowling, J.E., and Schreiber, S.L. (2000). Small molecule developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 12965-12969.
55. Phipps, L. (1971). Mechanism of oil droplet fragmentation in high pressure homogenizers. *Nature* 233, 617-619.
56. Prausnitz, M.R., and Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nature biotechnology* 26, 1261-1268.
57. Prieto, C., and Calvo, L. (2013). Performance of the biocompatible surfactant Tween 80, for the formation of microemulsions suitable for new pharmaceutical



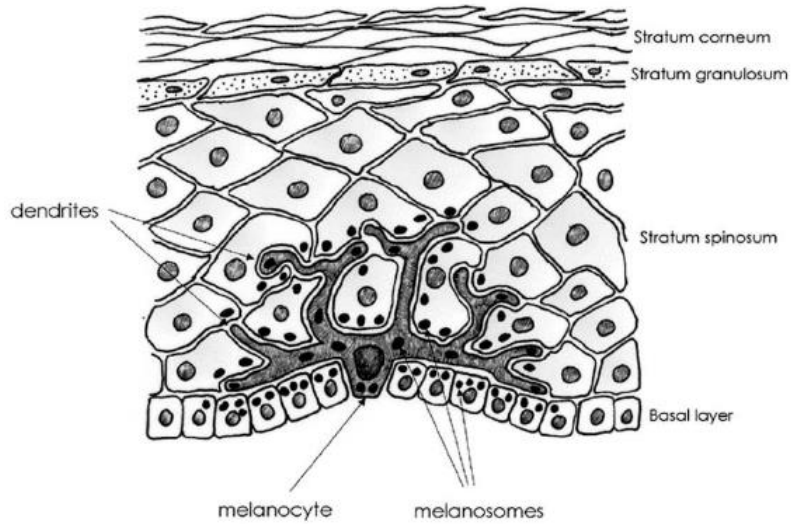
- processing. *Journal of Applied Chemistry* 2013.
58. Qian, C., and McClements, D.J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids* 25, 1000-1008.
 59. Rees, J.L. (2004). The genetics of sun sensitivity in humans. *The American Journal of Human Genetics* 75, 739-751.
 60. Restu, W.K., Sampora, Y., Meliana, Y., and Haryono, A. (2015). Effect of Accelerated Stability Test on Characteristics of Emulsion Systems with Chitosan as a Stabilizer. *Procedia Chemistry* 16, 171-176.
 61. Sagiri, S.S., Behera, B., Sudheep, T., and Pal, K. (2012). Effect of composition on the properties of tween-80–span-80-based organogels. *Designed Monomers and Polymers* 15, 253-273.
 62. Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., and Ulrich, J. (2004). High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chemical Engineering & Technology* 27, 361-368.
 63. Shi, A.-m., Li, D., Wang, L.-j., Li, B.-z., and Adhikari, B. (2011). Preparation of starch-based nanoparticles through high-pressure homogenization and miniemulsion cross-linking: Influence of various process parameters on particle size and stability. *Carbohydrate Polymers* 83, 1604-1610.
 64. Singleton, V., and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
 65. Smrity, S.Z., Saifuddin, A., and Sultana, S. (2016). Stability Analysis of Formulated Emulsion Containing Black Cumin (*Nigella sativa*) Oil. *American Journal of Biomedical and Life Sciences* 4, 49-53.

- 
66. Sonneville-Aubrun, O., Simonnet, J.-T., and L'allore, F. (2004). Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Advances in colloid and interface science* *108*, 145-149.
67. Visscher, M.O. (2009). Update on the use of topical agents in neonates. *Newborn and Infant Nursing Reviews* *9*, 31-47.
68. Volz, P., Boreham, A., Wolf, A., Kim, T.-Y., Balke, J., Frombach, J., Hadam, S., Afraz, Z., Rancan, F., and Blume-Peytavi, U. (2015). Application of single molecule fluorescence microscopy to characterize the penetration of a large amphiphilic molecule in the stratum corneum of human skin. *International journal of molecular sciences* *16*, 6960-6977.
69. Wasmeier, C., Hume, A.N., Bolasco, G., and Seabra, M.C. (2008). Melanosomes at a glance. *J Cell Sci* *121*, 3995-3999.
70. Xi, J., Chang, Q., Chan, C.K., Meng, Z.Y., Wang, G.N., Sun, J.B., Wang, Y.T., Tong, H.H., and Zheng, Y. (2009). Formulation development and bioavailability evaluation of a self-nanoemulsified drug delivery system of oleanolic acid. *AAPS PharmSciTech* *10*, 172-182.
71. Yu, F., Gao, J., Zeng, Y., and Liu, C.X. (2011). Effects of adlay seed oil on blood lipids and antioxidant capacity in hyperlipidemic rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* *91*, 1843-1848.
72. Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., and Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International* *41*, 61-68.
73. Zignani, M., Tabatabay, C., and Gurny, R. (1995). Topical semi-solid drug delivery: kinetics and tolerance of ophthalmic hydrogels. *Advanced drug delivery reviews* *16*, 51-60.

74. Zon, L.I., and Peterson, R.T. (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish.
Nature reviews Drug discovery 4, 35-44.

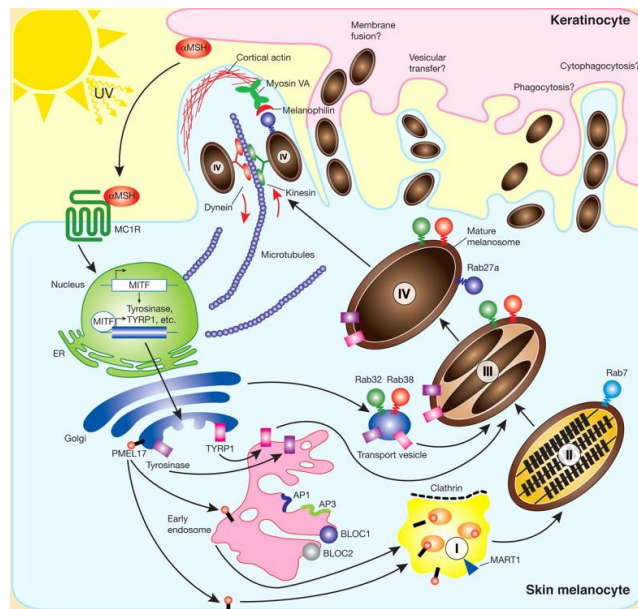


第八章 附圖與附表



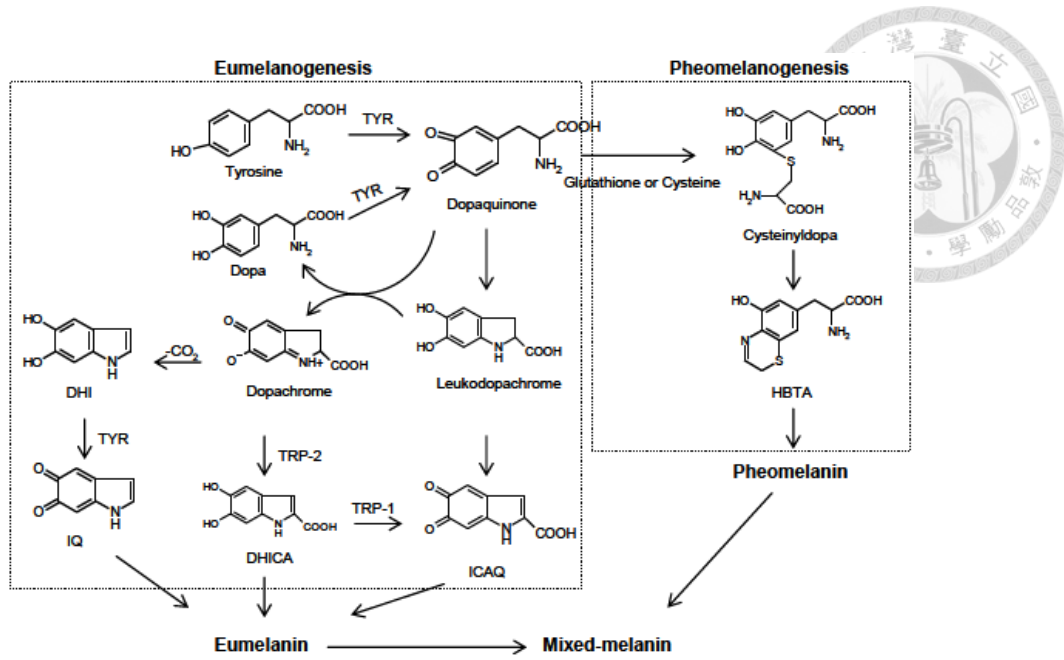
附圖 一、人類表皮層

Appendix figure 1. A schematic of human epidermis (Rees, 2004)



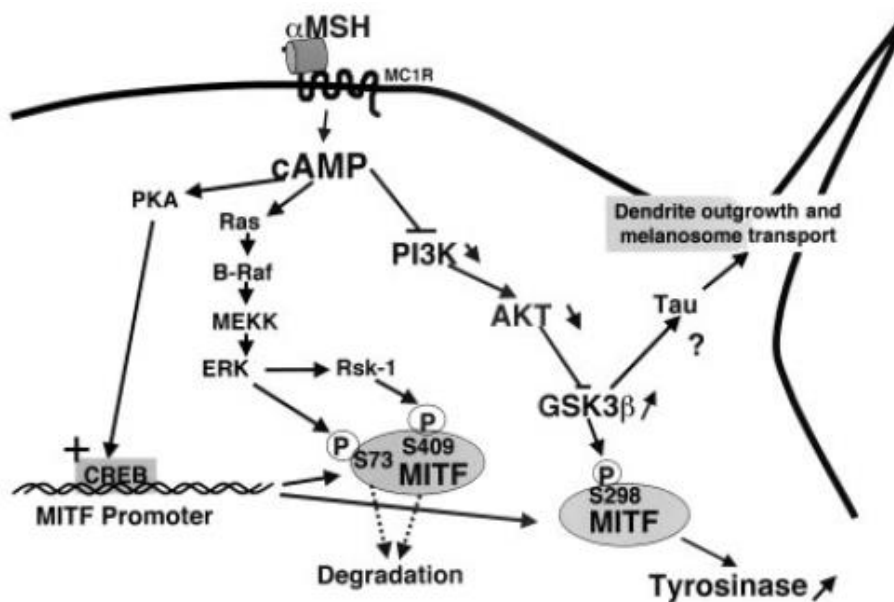
附圖 二、黑色素體與核內體的關係

Appendix figure 2. The relationship between melanosomes and endosomes (Wasmeier *et al.*, 2008)



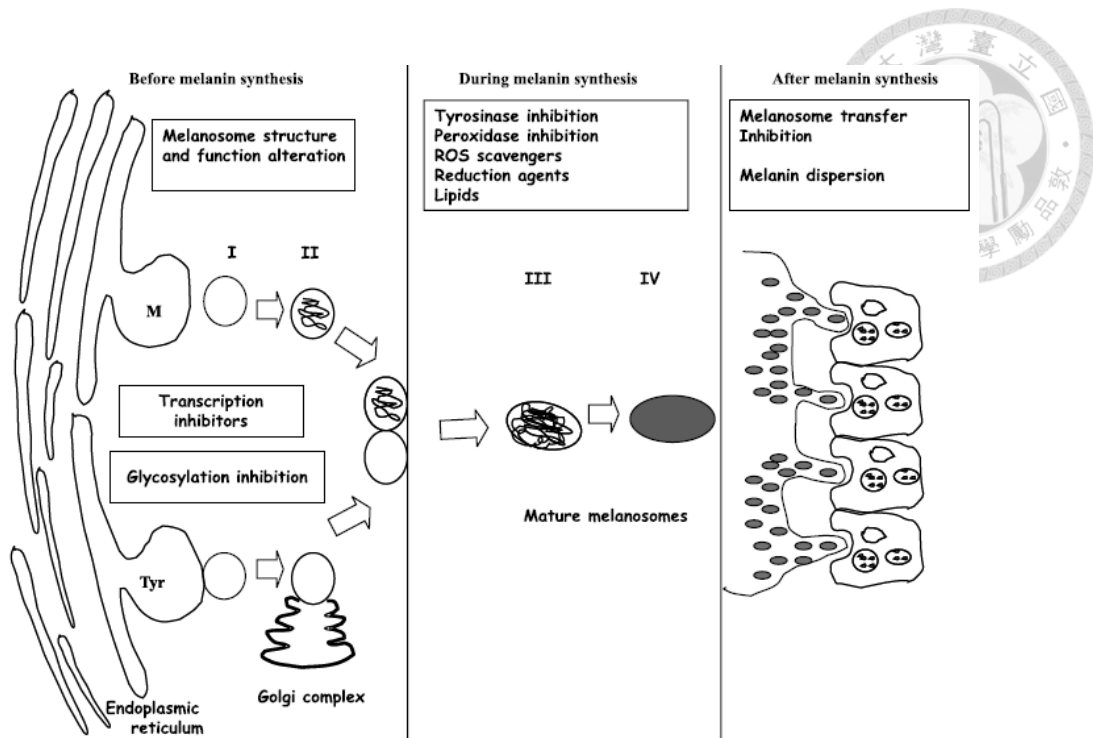
附圖 三、黑色素生合成示意圖

Appendix figure 3. Biosynthetic pathway of melanin (Chang, 2009)



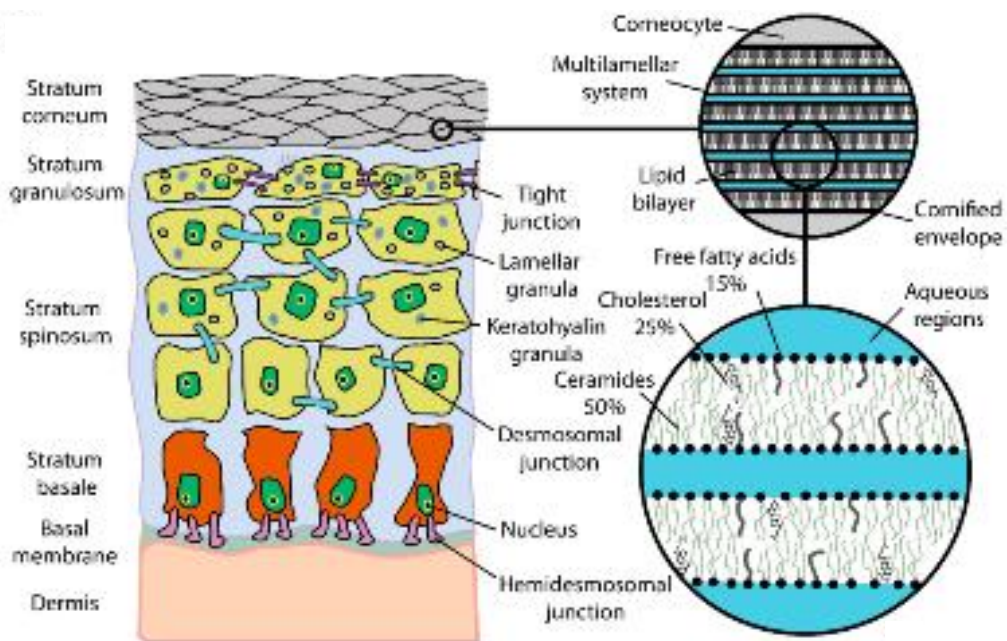
附圖 四、cAMP 誘導黑色素生合成的訊號傳遞路徑

Appendix figure 4. Model of signaling pathways involved in cAMP-induced melanogenesis (Khaled *et al.*, 2002)



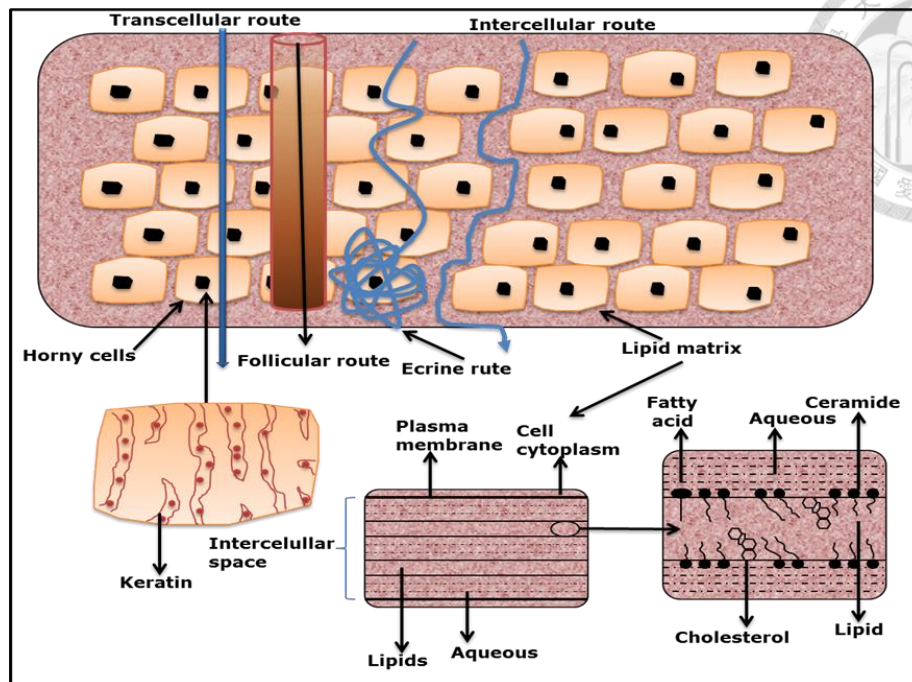
附圖 五、抑制黑色素生成路徑的方法歸納

Appendix figure 5. Schematic illustration of the possible approaches to interfere with melanogenesis pathway (Briganti *et al.*, 2003)



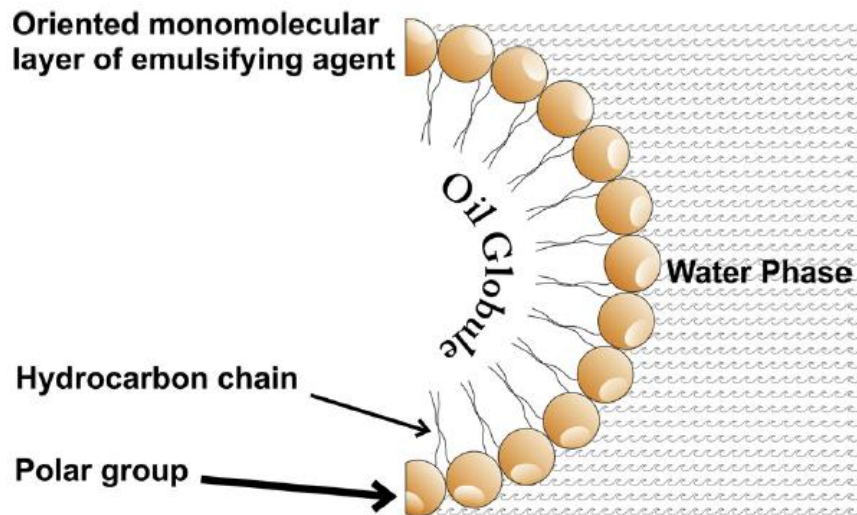
附圖 六、人類皮膚

Appendix figure 6. Schematic of skin (Volz *et al.*, 2015)



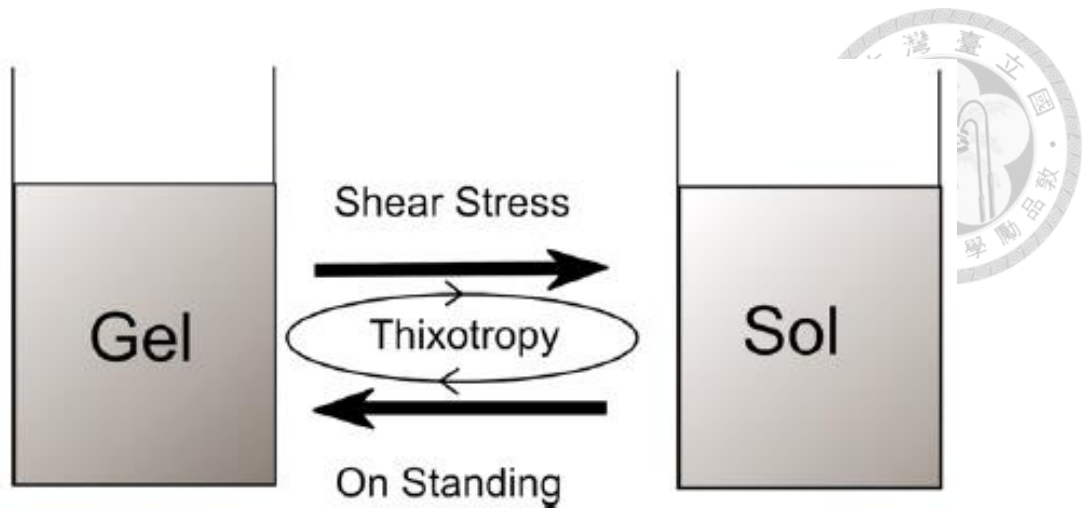
附圖 七、藥物滲透皮膚的路徑示意圖

Appendix figure 7. Schematic representation of penetration routes of drugs throughout the skin (Prausnitz and Langer, 2008)



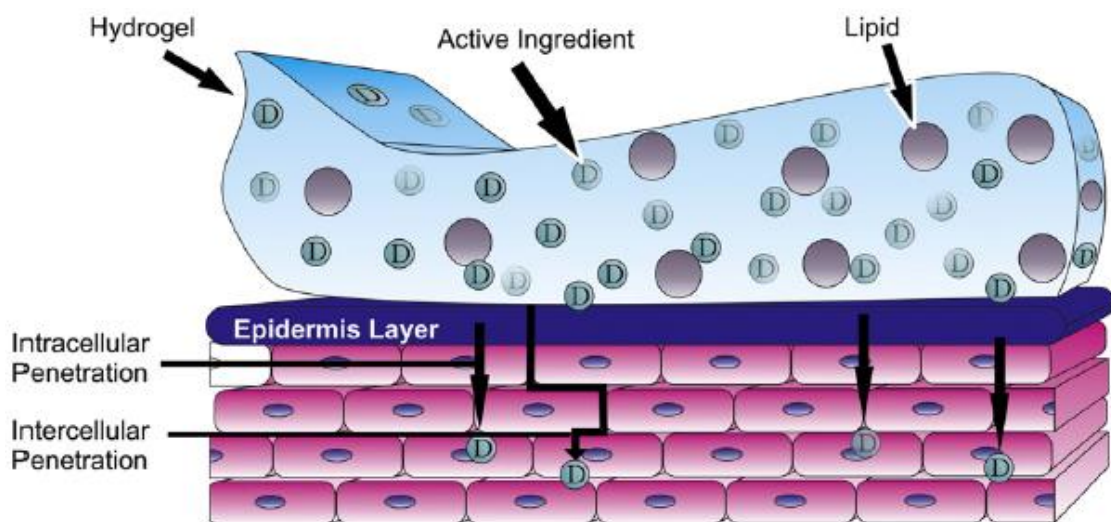
附圖 八、利用乳化劑增強穩定性

Appendix figure 8. Enhancement of stabilization of dispersed globules with emulsifying agent (Alexander *et al.*, 2013)



附圖 九、膠體的搖變性

Appendix figure 9. Thixotropic behavior of gel (Alexander *et al.*, 2013)



附圖 十、乳液凝膠滲透皮膚的示意圖

Appendix figure 10. Schematic presentation of Emulgel penetration through skin

(Alexander *et al.*, 2013)

附表一、薏苡籽實及其不同部位之一般成分組成

Appendix table 1. Proximate compositions of whole grain adlay and its different parts *

Material	Moisture	Crude protein	Crude fat	Ash	N.F.E **
Whole grain adlay	7.2 ± 0.4	17.3 ± 0.2	6.4 ± 0.3	6.3 ± 0.0	70.1 ± 0.4
Adlay hull	5.2 ± 0.1	8.0 ± 0.3	2.0 ± 0.4	11.7 ± 0.1	78.3 ± 0.5
Adlay testa	7.2 ± 0.1	11.9 ± 0.3	2.9 ± 0.2	7.2 ± 0.3	78.0 ± 0.3
Dehulled adlay	9.1 ± 0.4	21.3 ± 0.2	8.3 ± 0.3	2.1 ± 0.1	68.3 ± 0.2
Adlay bran	10.0 ± 0.2	18.5 ± 0.2	24.4 ± 0.1	7.0 ± 0.0	50.1 ± 0.1
Polished adlay	10.6 ± 0.4	21.9 ± 0.2	2.9 ± 0.2	1.9 ± 0.1	72.9 ± 0.3

*單位：wt%。每個數據表示為四重複的平均值±標準差。

** N.F.E (無氮浸出物) = 100 - (水分 + 粗蛋白 + 粗脂 + 灰分)

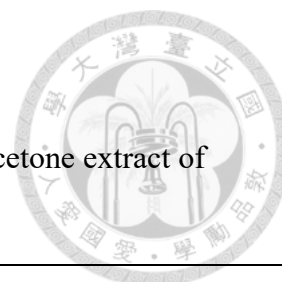
* Unit: wt%. Each datum is expressed as mean ± SD of four replications.

** N.F.E (nitrogen free extract) = 100 - (moisture + crude protein + crude fat + ash)

(黃和江，1999)

附表 二、薏苡籽實不同部位之丙酮萃取物中脂肪酸組成和含量

Appendix table 2. Composition and contents of fatty acid from the acetone extract of different parts of adlay seed *

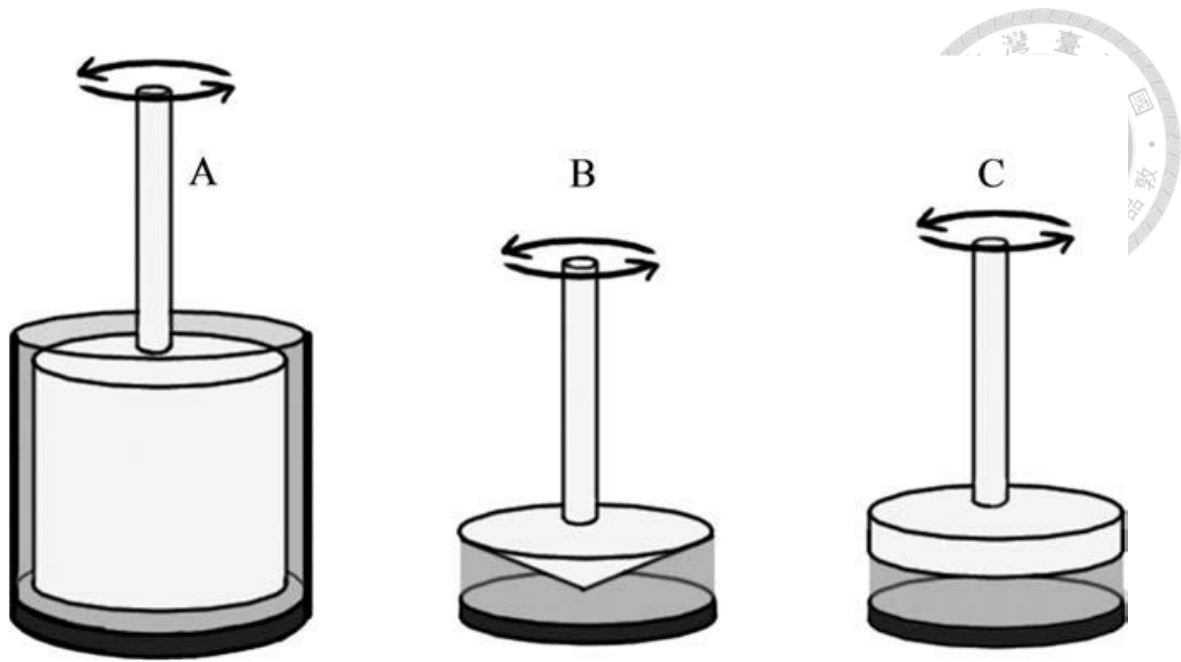


F.A.	Adlay hull	Adaly testa	Dehulled adlay	Adlay bran	Polished adlay
C _{14:0}	0.03 (0.04)	0.02 (0.03)	0.04 (0.04)	0.02 (0.02)	0.04 (0.04)
C _{16:0}	13.39 (16.74)	11.74 (15.75)	13.89 (15.03)	13.58 (14.78)	15.35 (16.16)
C _{16:1}	0.35 (0.44)	0.33 (0.44)	0.26 (0.28)	0.28 (0.31)	0.28 (0.30)
C _{18:0}	1.42 (1.78)	1.12 (1.62)	1.68 (1.82)	1.66 (1.81)	1.63 (1.72)
C _{18:1}	37.45 (46.79)	31.99 (42.90)	43.71 (47.34)	44.10 (47.97)	43.54 (45.75)
C _{18:2}	25.55 (31.93)	27.38 (36.71)	31.48 (34.08)	30.48 (33.28)	34.45 (34.27)
C _{18:3}	0.43 (0.53)	0.37 (0.50)	0.38 (0.41)	0.45 (0.49)	0.43 (0.45)
C _{20:0}	0.43 (0.53)	0.40 (0.54)	0.31 (0.34)	0.38 (0.42)	0.37 (0.39)
C _{20:1}	0.34 (0.42)	0.30 (0.41)	0.28 (0.30)	0.39 (0.43)	0.35 (0.37)
C _{22:0}	0.27 (0.34)	0.35 (0.47)	0.18 (0.19)	0.19 (0.21)	0.29 (0.31)
C _{24:0}	0.44 (0.55)	0.45 (0.60)	0.13 (0.15)	0.38 (0.42)	0.22 (0.24)
Unknown	1.88 (2.35)	2.10 (2.82)	0.80 (0.86)	0.94 (1.03)	1.02 (1.08)
Total	80.01 (100)	74.57 (100)	92.38 (100)	91.93 (100)	94.98 (100)

*單位：wt%

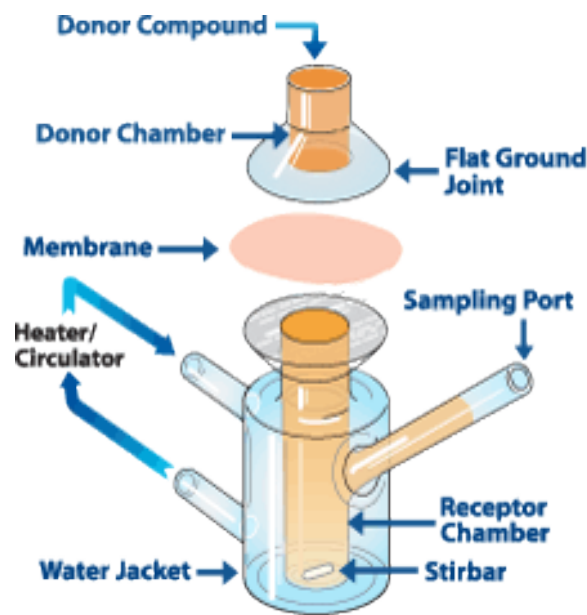
* Unit: wt %

(黃和江, 1999)



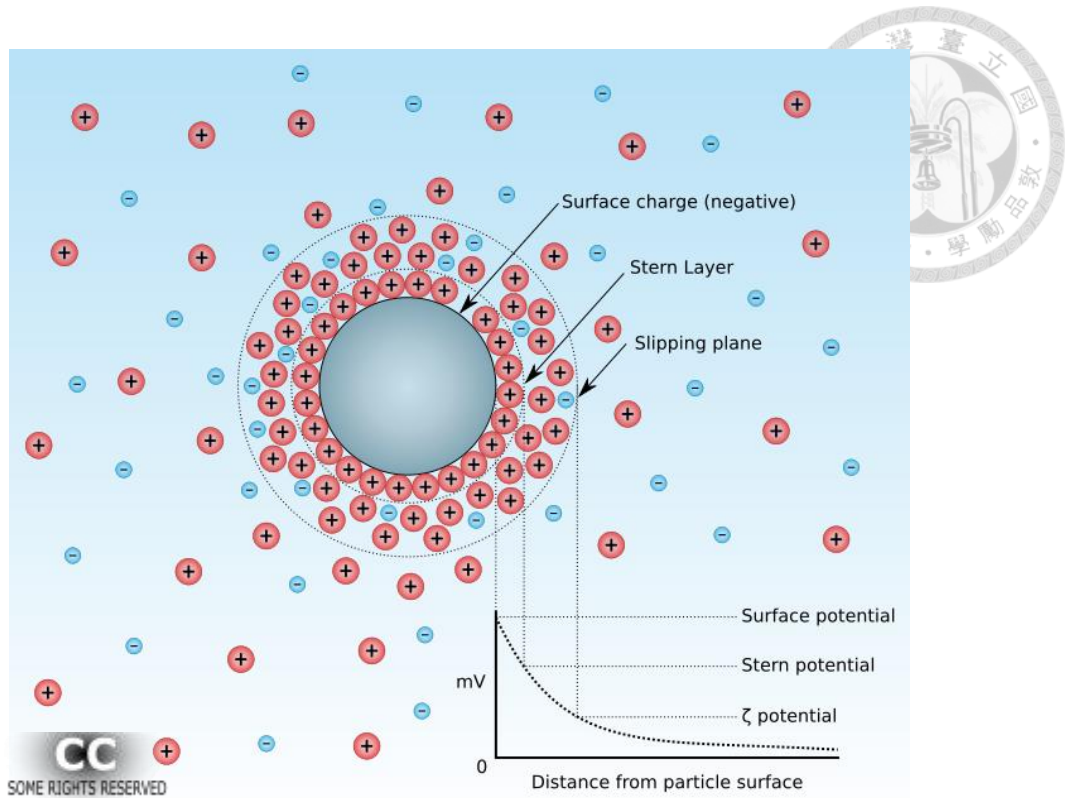
附圖 十一、流變儀中常見的探頭 (A) concentric cylinder (B) cone and plate (C) parallel plate

Appendix figure 12. Schematics of the common rotational flow devices (A) concentric cylinder (B) cone and plate (C) parallel plate rheometers (Bekard *et al.*, 2011)

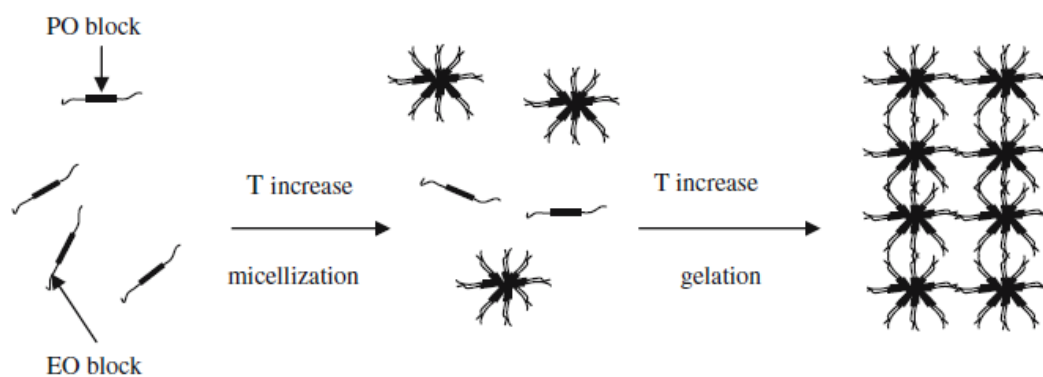


附圖 十二、Franz diffusion cell 裝置示意圖

Appendix figure 12. Schematic presentation of Franz diffusion cell (Baynes *et al.*, 2012)

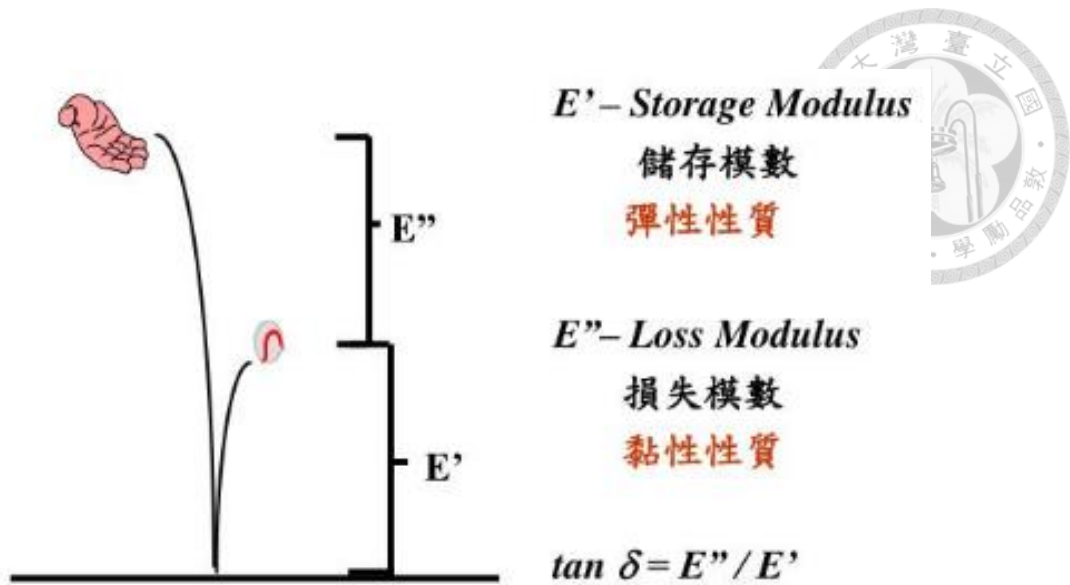


附圖 十三、粒子懸浮在連續相中時，與帶電表面不同距離的離子濃度與電位差
 Appendix figure 13. Diagram showing the ionic concentration and potential difference as a function of distance from the charged surface of a particle suspended in a dispersion medium



附圖 十四、Pluronic[®] F-127 為的凝膠機制

Appendix figure 14. Schematic representation of the association mechanism of Pluronic[®] F-127 in water (Dumortier *et al.*, 2006)



附圖 十五、 G' 與 G'' 示意圖

Appendix figure 15. Schematic representation of G' and G''

(<http://www.slideserve.com/ivy/dsc-tga-dma>)