

# 中國醫藥大學中國醫學研究所碩士論文

編號：GICMS-348

指導教授：蔡育勳 副教授

共同指導教授：蔡輔仁 教授

論文題目

環糊精包覆中藥牡丹皮之研究與應用

**The inclusion complexes of Moutan Cortex extract with  
cyclodextrin: preparation and application**

研究生：彭寬嘉

中華民國九十八年七月

## 目錄

第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	5
一、 實驗植物介紹.....	5
1. 植物介紹.....	5
2. 牡丹皮的中醫臨床應用.....	7
二、 黑色素形成機制.....	8
1. 黑色素的形成和位置.....	8
2. 紫外線及自由基對黑色素形成的影響.....	11
3. 酪胺酸酶緒論.....	11
三、 環糊精.....	15
1. 環糊精介紹.....	15
2. 環糊精結構.....	15
3. 環糊精特性.....	17
4. 環糊精應用.....	17
5. 環糊精物理及化學性質影響在中藥製劑上的應用.....	18
6. 環糊精的釋放控制機制.....	20
7. HP- $\beta$ -環糊精概述.....	21
第三章 實驗材料與方法.....	23

一、	實驗材料、藥品與儀器設備.....	24
1.	中藥材料之來源.....	24
2.	藥品.....	24
3.	儀器設備.....	25
二、	實驗方法.....	26
1.	牡丹皮粗萃物之製備與分析.....	26
1.1	牡丹皮粗萃膠製備.....	26
1.2	牡丹皮粗萃物之分析.....	27
2.	環糊精包合物的製備.....	27
2.1	含牡丹皮粗萃物之環糊精奈米包覆藥物的製備.....	27
2.2	含丹皮酚環糊精奈米包覆藥物的製備.....	29
3.	清除自由基能力.....	30
3.1	DPPH 測試樣品溶液配製.....	30
3.2	對照組與實驗組樣品溶液配製.....	30
3.3	清除 $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基之實驗方法.....	30
4.	中藥萃取物對酪胺酸酶的抑制能力評估.....	31
4.1	體外抑制酪胺酸酶活性試驗之測試樣品溶液配製.....	31
4.2	對照組與實驗組樣品溶液配製.....	31

4.3 體外抑制酪胺酸酶活性試驗之實驗方法.....	32
第四章 結果.....	33
一、牡丹皮粗萃物之製備與分析.....	33
1.1 牡丹皮粗萃膠.....	33
1.2 牡丹皮粗萃物之分析.....	33
1.3 丹皮酚乙醇溶液標準曲線.....	34
二、環糊精奈米包覆藥物實驗結果.....	35
2.1 粗萃牡丹皮奈米包覆藥物.....	35
2.2 丹皮酚奈米包覆藥物.....	36
2.3 奈米包覆藥物之水溶特性.....	37
三、奈米包覆藥物的鑑定.....	38
3.1 UV 分析鑑定奈米包覆藥物.....	38
3.2 NMR 分析鑑定奈米包覆藥物.....	39
四、藥物及奈米包覆藥物抗氧化能力.....	40
4.1 HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮對 $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基清除能力.....	40
4.2 奈米包覆藥物對 $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基清除能 力.....	41
4.3 藥物及奈米包覆藥物對 $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基	

清除能力之比較.....	42
五、中藥萃取物對美白的有效能力.....	43
5.1 HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力.....	43
5.2 奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力評估.....	44
5.3 藥物及奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力比較.....	45
5.4 粗萃及標準品的 HP-β-環糊精奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力比較.....	46
第五章 討論.....	47
第六章 結論.....	53
參考文獻.....	54

## 圖目錄

圖 2.1 牡丹皮(Moutan Cortex).....	5
圖 2.2 牡丹皮飲片.....	5
圖 2.3 丹皮酚(paeonol)之結構圖.....	7
圖 2.4 人體皮膚結構圖.....	9
圖 2.5 黑色素細胞位置與酪胺酸機轉.....	10
圖 2.6 黑色素形成路徑機轉.....	10
圖 2.7 不同型態之環糊精.....	15
圖 2.8 $\beta$ -環糊精結構圖.....	16
圖 2.9 環糊精奈米技術包覆示意圖.....	21
圖 4.1 牡丹皮粗萃膠.....	33
圖 4.2 牡丹皮粗萃膠之分析.....	34
圖 4.3 丹皮酚乙醇溶液標準曲線.....	35
圖 4.4 粗萃牡丹皮奈米包覆藥物.....	36
圖 4.5 丹皮酚奈米包覆藥物.....	36
圖 4.6 奈米包覆藥物之水溶特性.....	37
圖 4.7 UV 分析鑑定奈米包覆藥物.....	38
圖 4.8 NMR 分析鑑定奈米包覆藥物.....	39
圖 4.9 HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮對 $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -pricrylhydrazyl	

( DPPH ) 自由基清除能力.....	40
圖 4.10 奈米包覆藥物對 $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基清除能力.....	41
圖 4.11 藥物及奈米包覆藥物對 $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基清除能力之比較.....	42
圖 4.12 HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力.....	43
圖 4.13 奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力.....	44
圖 4.14 藥物及奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力比較.....	45
圖 4.15 粗萃及標準品的 HP- $\beta$ -環糊精奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力比較.....	46

## 表目錄

表 2.1 衛生署公布美白成分及濃度限制列表.....	14
表 2.2 各國環糊精應用許可情形.....	22
表 2.3 環糊精安全性一覽.....	22
表 3.1 實驗流程大綱.....	23
表 3.2 $\beta$ -環糊精包覆製程.....	28
表 3.3 HP- $\beta$ -環糊精包覆製程.....	29
表 3.4 丹皮酚 HP- $\beta$ -環糊精包覆製程.....	29
表 3.5 丹皮酚 $\beta$ -環糊精包覆製程.....	29





# 環糊精包覆中藥牡丹皮之研究與應用

彭寬嘉

指導教授：蔡育勳 副教授

共同指導教授：蔡輔仁 教授

中國醫藥大學中國醫學研究所

中藥牡丹皮在傳統中醫上具有清熱涼血、活血化瘀、降壓及抗菌美白功效。主要成分為丹皮酚，酚類化合物易揮發也因為親油性、不會水溶，易影響中藥成品穩定。因此尋找適當材料將丹皮酚轉換成不易揮發形式，材料須兼顧不破壞活性成分及不產生副產物。環糊精是澱粉水解後的寡糖分子，特殊的疏水環狀圓桶分子結構，包覆客分子於中間孔洞，形成主客一體複合物質，改變所包覆客體化合物之化學性質、物理性質及生物可利用性。本研究擬利用環糊精包覆技術，來提昇牡丹皮脂溶性成份對水的溶解度，達到奈米水性化之目的。以牡丹皮美白功效作測試，本研究分兩部分探討環糊精包覆的新型中藥製劑之影響。先行牡丹皮粗萃物及丹皮酚的美白測試，再進行牡丹皮粗萃物的環糊精包覆和包覆物分析鑑定及美白測試。本研究實驗證實牡丹皮粗萃包覆奈米藥物已成功製備，並獲得UV及NMR分析儀器鑑定證實其成份，並將粗萃包覆奈米藥物置入水中時，呈現透明水溶液態，證明粗萃包覆奈米藥物具有良好的水溶性。最後將兩組對照，從DPPH test及Tyrosinase inhibition test

中且在特定條件下，看到環糊精並未導致牡丹皮粗萃物活性消失。證實環糊精確實可將脂溶性成分包覆並轉換其化學性質，且不影響原本成分的活性與功效。

關鍵字：牡丹皮、丹皮酚、環糊精、黑色素、包覆作用。



## 第一章、前言

中藥牡丹皮性微寒，味苦、辛，歸心、肝及腎三經，在傳統中醫使用上具有清熱涼血、活血化瘀、降壓以及抗菌美白的功效，適用於發斑、驚痛、吐血、癰瘍，跌打損傷等症。在藥理研究上，發現牡丹皮對痢疾桿菌、傷寒桿菌等多種致病菌及致病性皮膚真菌以及流感病毒均有抑制作用，有抗炎、抗過敏作用。能抑制血小板聚集，有抗動脈粥狀樣硬化的作用；尚能顯著降低心輸出量，增加冠脈血流量，並有降低血壓的作用。牡丹皮對神經系統有鎮靜、鎮痛、解痙、解熱等作用。此外，還具有保肝、利尿、抗潰瘍、抗氧化、清除自由基以及抗早孕等作用。

因為牡丹皮在中醫理論上歸心、肝及腎三經，因此在過去中醫常會將其應用在使用抗菌、美白及祛斑上。在中醫門診中常見許多因青春痘、粉刺、黑斑或面色黯沉等問題為例，這些皮膚的問題，除了外在環境因素，中醫理論上認為多半與臟腑功能紊亂，氣血失調有關。中醫在治療上多半以調整體內氣血平衡，增加新陳代謝為主要目的。臨床上依體質大致可分為下列幾型：

- (1)氣虛型：面色無華，少氣懶言，嗜睡等。
- (2)血虛型：臉色蒼白或萎黃，唇色淡，頭暈目眩等。
- (3)肝鬱氣滯型：月經不調，情緒不穩，緊張易怒，煩躁失眠，便秘、痛經等。

(4)陰虛火旺型：經常熬夜失眠，顏面潮紅，容易長粉刺、青春痘等。

(5)實熱型：口乾、口苦、便秘、面紅煩熱等。

(6)濕熱型：皮膚濕疹，紅腫化膿，四肢倦怠，小便短赤，大便黏膩等。

不同體質有不同的調理方法，氣血虛弱型要補氣補血，肝鬱氣滯型要疏肝理氣，陰虛火旺型要滋陰降火，實熱型要清熱解毒，溼熱型要清熱利濕。在中醫理論中，皮膚問題常歸因於脾、肝與腎三經，因此中醫用藥多半以疏肝活血理氣為主。而牡丹皮歸於心、肝及腎三經，有清熱涼血，活血化瘀，清退虛熱的功能，可用於濕毒發斑，因此是一味常被中醫拿來配伍，佐以治療皮膚問題的中藥良方，近來文獻也常探討牡丹皮在皮膚問題中最常見的黑色素進行試驗研究，顯示牡丹皮具有值得關注的地方。

現今國際上對於新藥開發上，目光逐漸放在強調天然素材的中草藥開發。2008年發展科技中草藥產業國際研討會中指出，根據世界衛生組織統計，全世界約有40億人使用中草藥，且估計中草藥的開發在10年內將在世界上全面興起。中草藥之市場依IMS的報告在2005年為美金289億元，由2003至2007年每年平均成長12%，且至2007市場已達362億元<sup>[1]</sup>。中草藥為我國傳統醫學之用藥，經歷數千年而不衰，是非常重要的文化資源。臺灣應趁全世界的中草藥市場正大幅成長中，將中草藥科學化，切入全球醫藥市場。中草藥之開發與利用正符合時代潮流

之需要，同時發展傳統天然藥物之價值。

然而在中草藥發展上處處受到了限制，中草藥主要成分因為親油性、不會水溶，對紫外線、熱和大氣的氧化都很敏感，易影響中藥成品穩定。現今許多保養品及化妝品近來大多強調為天然素材，卻在保存及使用的困境上遭遇瓶頸，原因就出在中草藥親油性、不會水溶，不易與水性化妝品搭配使用。中草藥大多數成分中都具有揮發油，揮發油不僅容易揮發，更因親油性、不會水溶而無法廣泛應用。為了增加中藥科學化的有效利用及將中藥療效價值發揮最大效用，因此需要尋求生物材料的幫助，穩定中藥中常見容易受外在影響的因素。為解決傳統中藥製劑的困境，此時，在材料的選取上也必須兼顧不破壞活性成分及不產生副產物的前提下，環糊精提供了中藥製劑新的平台。環糊精是一種澱粉水解後的寡糖分子，其特殊的疏水環狀圓桶分子結構，可以利用此一特性，進行對各式各樣化合物的包覆結合。現階段 $\beta$ -環糊精的研究是較多也密切，因為其特性和結構，可望讓包覆效果達到最佳狀態。

環糊精包覆客分子置於中間圓桶孔洞，形成主客一體的複合物質，藉此改變所包覆的客體化合物之化學性質、物理性質及生物可利用性。環糊精目前在食品、化妝保養品、生物醫藥甚至奈米塗料、化學分析及分子鑑別中有相當廣泛的應用。在現今講求科學化、多角度廣泛應用的中草藥市場，環糊精可以提供相當大的幫助。環糊精在中藥應用上，可

以防止揮發性成分的揮發，提高中藥製劑的穩定性以及改善有效成分的溶解度、使液體藥物粉末化，改善製劑重量，更可以調節藥物的釋放速度。而環糊精最重要的功用就是在於可提供親油性的藥物成分轉變為水溶性。

本研究擬利用環糊精包覆技術，來提昇中藥牡丹皮脂溶性成份對水的溶解度，達到奈米水性化之目的。並以中藥牡丹皮所具有的抗氧化及美白功效部分，探討此 $\beta$ -環糊精包覆的新型中藥製劑對其功效之影響。本研究分兩部分做探討，分別進行牡丹皮粗萃物及純丹皮酚化合物的抗美白測試，再進行牡丹皮粗萃物及純丹皮酚化合物的環糊精包覆，並且進行包覆物分析鑑定及抗美白測試。最後再將兩組來進行合併對照，歸納並探討環糊精對中藥製劑是否可帶來相對創新發展，進而帶動中藥科學化新進展。

## 第二章、文獻探討

### 一、實驗植物介紹

#### 1. 植物介紹(圖 2.1)(圖 2.2)

##### 牡丹皮(Moutan Cortex)



圖 2.1 牡丹皮(Moutan Cortex)

圖 2.2 牡丹皮飲片

#### 1.1 別名：

丹皮、丹根、牡丹根皮、粉丹皮、花王、鼠姑、洛陽花、木芍藥。  
為毛茛科植物牡丹的根皮。於中國各地均有栽培，主產於安徽、山東、河北等省。秋季採挖。本品氣芳香，味微苦而澀；以條粗、皮厚、斷面色白、粉性足、香氣濃、結晶物多者為佳。生用或酒炙用。

#### 1.2 特徵：

牡丹是多年生落葉性小灌木，植物形態落葉灌木二回三出複葉，頂

生小葉長達 10cm，3 裂近中部，裂片上產 3 淺裂或不裂，側生小葉較小，斜卵形，不等 2 淺裂或不裂，上面綠色，下面有白粉，中脈有疏毛或近無毛。花單生枝頂，萼片 5；花瓣 5，或重瓣，白色、紅紫色或黃色，倒卵形，先端常 2 淺裂；雄蕊多數；花盤杯狀，紅紫色，包住心皮，在心皮成熟時裂開；心皮 5，密生柔和。骨朵果卵形，密生褐黃色毛。花期 5~7 月，果期 7~8 月。

### 1.3 性味功能：

性微寒，味苦、辛，歸心、肝、腎三經<sup>[2][3]</sup>。有清熱涼血，活血化癥，清退虛熱的功能<sup>[4]</sup>。用於濕毒發斑、吐血、夜熱早涼、無汗骨蒸、經閉痛經、癰腫瘡毒、跌撲傷痛等症。臨床應用一般需經淨制、切制後入藥。

### 1.4 藥理：

藥理研究顯示，牡丹皮乙醇萃取物有抗過敏作用，且牡丹皮酚有抗菌、鎮靜、鎮痛、降血壓、抗炎症、抑制胃液分泌以及具有抗發炎反應的功能<sup>[5-8]</sup>，並具清除自由基及降低黑色素形成功能<sup>[9-10]</sup>。

### 1.5 主要化學成分：

含丹皮酚(圖 2.3)、牡丹酚苷、牡丹酚原苷、牡丹酚新苷，並含芍藥苷、氧化芍藥苷、苯甲酰芍藥苷、沒食子酸、揮發油、植物甾醇、苯甲酸、蔗糖、葡萄糖等<sup>[11]</sup>。而牡丹皮中以丹皮酚為主要成分且佔大多數。



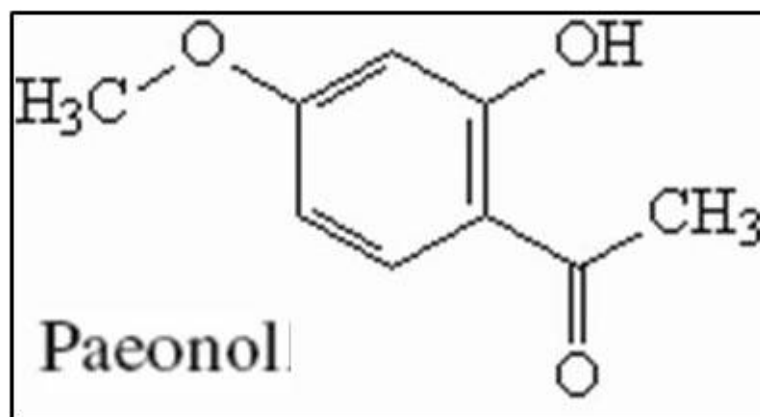


圖 2.3 丹皮酚(paeonol)之結構圖

## 2. 牡丹皮的中醫臨床應用

### 2.1 溫熱病熱入營血：

辛寒，入心肝血分，能清解營分、血分邪熱，又能辛散血中瘀滯，並有涼血而不留瘀，活血而不妄行的特點，故尤常用於溫熱病熱入血分，症見身熱夜甚、發斑發疹、吐血、衄血。可配伍其他清熱涼血、解毒、止血之品，如水牛角、生地黃、茜草根等藥同用，既可增強清泄血中邪熱之力，又可避免涼血止血藥寒凝留瘀之弊。

### 2.2 瘀血証：

本品辛行苦泄，具有活血化瘀之功，可廣泛用於月經不調，血瘀經閉，癥瘕積聚及跌打損傷等多種瘀血病証，又因其性偏寒，故對血瘀而有熱者尤為適宜。如用治月經不調而兼肝鬱化火者，常配伍活血調經之品。如《婦人良方》丹桅逍遙散，其與梔子、當歸、芍藥等同用。若用治跌打瘀血腫痛，可與其他活血療傷藥同用。本品清熱涼血之中，善於

散瘀消癰，故常用治火毒壅盛，血熱瘀滯之瘡癰腫痛等証。可與清熱解毒，消癰散結藥同用。亦可用治熱互結之腸癰初起，如《金匱要略》大黃牡丹皮湯，即以本品與大黃、桃仁同用。

### 2.3 虛熱証：

本品還能入肝腎二經清退虛熱。對溫熱病後期，餘邪未盡，陰液已傷，骨蒸無汗，夜熱早涼或低熱不退等症，常與補陰藥及退虛熱藥合用，如《溫病條辨》青蒿鱉甲湯，其與鱉甲、青蒿、知母等藥配伍使用；肝腎陰虧，五心煩熱，潮熱盜汗，可與地黃、知母等藥同用

### 2.5 牡丹皮的現代臨床局部應用

對痢疾桿菌、傷寒桿菌等多種致病菌及致病性皮膚真菌以及流感病毒均有抑制作用<sup>[12]</sup>。本品能抑制血小板聚集，有抗動脈粥樣硬化的作用；尚能顯著降低心輸出量，增加冠脈血流量，並有降低血壓的作用<sup>[13]</sup>。牡丹皮對神經系統有鎮靜、鎮痛、解痙、解熱等作用。此外，本品還具有保肝、利尿、抗潰瘍、抗氧化、清除自由基、抗炎、抗過敏作用以及抗早孕等作用。

### 2.6 丹皮酚與抗氧化美白

先前文獻提到丹皮酚是牡丹皮中最主要的酚類化合物，具有降低黑色素細胞合成黑色素的能力，且丹皮酚的抑制黑色素合成能力是隨著濃度增加而增加<sup>[14]</sup>。

## 二、黑色素形成機制

### 1. 黑色素的形成和位置

黑色素 (melanin) 在人體內由黑色素細胞 (melanocyte) 的黑色素小體 (melanosome) 不斷製造產生的，而黑色素細胞分布在眼睛、頭髮、大腦和皮膚等組織。在皮膚的黑色素細胞是位在表皮組織的基底層(圖 2.4)<sup>[15]</sup>。一個黑色素細胞周圍由 30~40 個角質細胞 (keratinocyte) 包圍，形成”表皮層黑色素單位”(epidermal melanin unit)<sup>[16]</sup>。雖然黑色素細胞在此層組織於皮膚上扮演著重要的功能。黑色素細胞會持續製造黑色素體，被製造的黑色素體，會經由黑色素細胞的樹狀軸突末端被分泌至周圍鄰近的角質細胞。黑色素體是位在黑色素細胞的細胞質內，是一種具有膜的球形或橢圓形的胞器<sup>[17]</sup>，可保護細胞對抗黑色素生成過程中釋放出的自由基 (free radical) 對細胞產生氧化性傷害<sup>[18]</sup>。

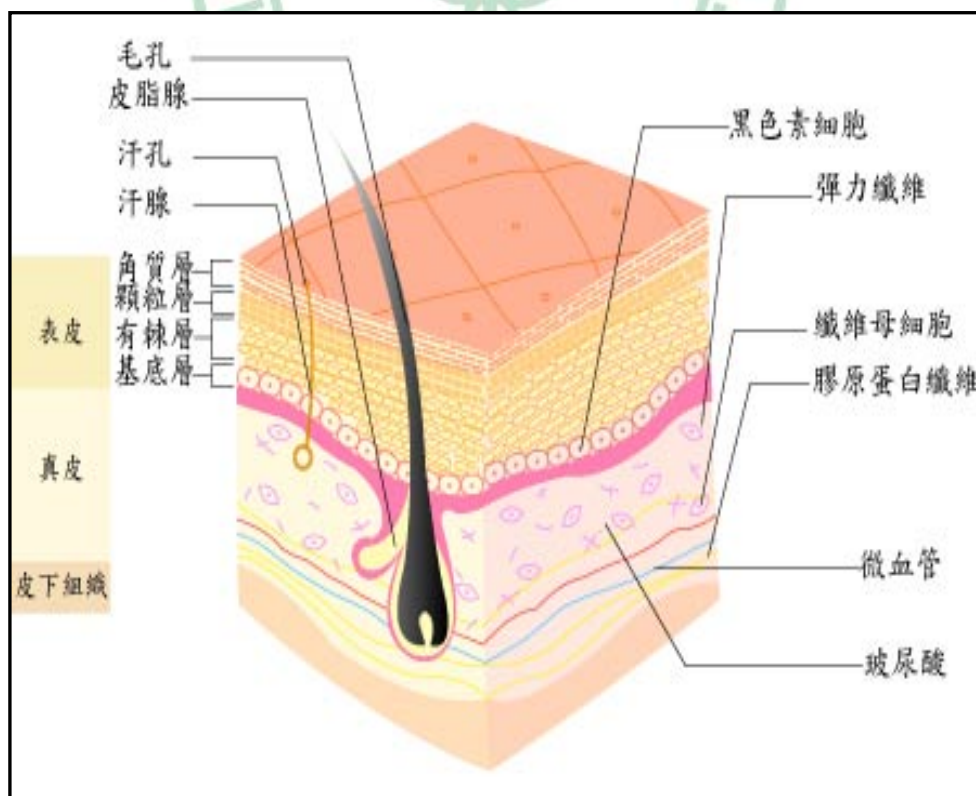


圖 2.4 人體皮膚結構圖

黑色素的形成是在酪胺酸 (tyrosine) 的存在下，在黑色素細胞中先經酪胺酸酶 (tyrosinase) 的催化，先轉變成為多巴(dopa)，多巴再轉變為多巴醌(dopaquinone)等一連串的氧化還原作用而形成(圖 2.5)。形成的黑色素有兩種，一種是棕黑色的 eumelanin，一種是黃棕色的 phaeomelanin<sup>[19]</sup>。而酪胺酸酶是一種含銅的酵素，為黑色素反應過程的唯一決定酵素(圖 2.6)<sup>[20]</sup>。

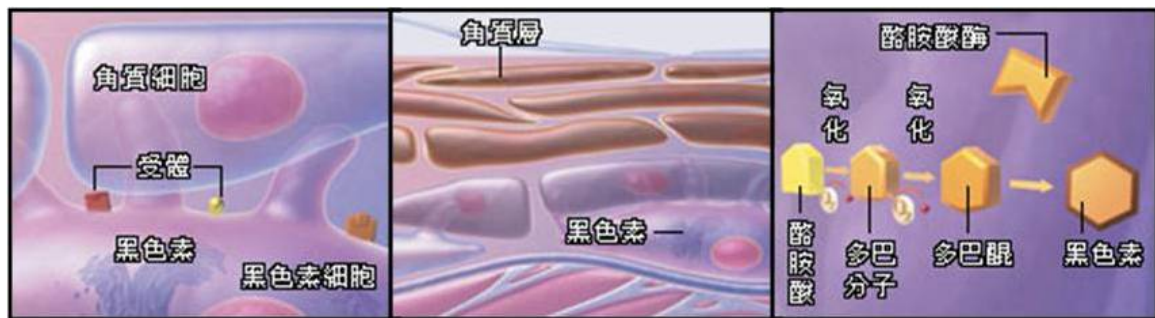


圖 2.5 黑色素細胞位置與酪胺酸機轉

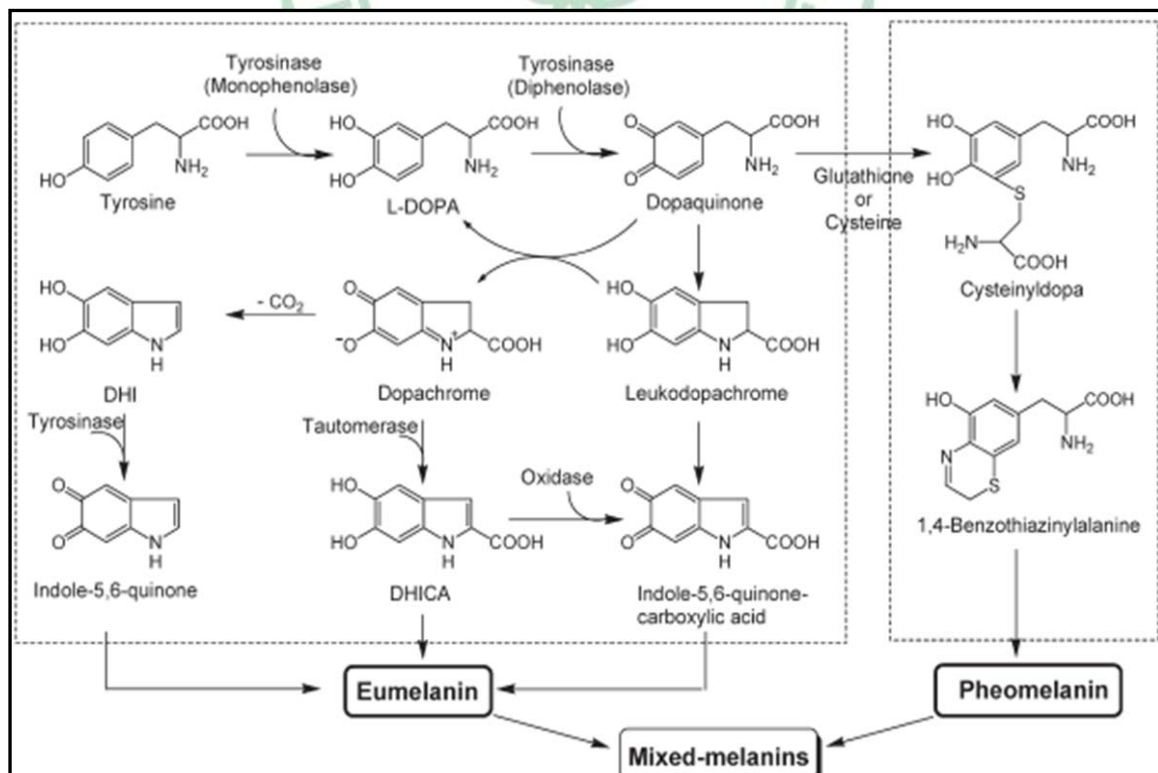


圖 2.6 黑色素形成路徑機轉

## 2. 紫外線及自由基對黑色素形成的影響

紫外線及黑色素刺激荷爾蒙會去促進黑色素生合成。當皮膚暴曬在紫外線中，產生少量的自由基，會去活化訊息傳遞而刺激酪胺酸酶的轉錄作用，則黑色素的合成增加。另外，也由於黑色素細胞受到刺激，活性增加，黑色小體增生且轉移至角質細胞的能力增加，因此皮膚呈現褐色。而這些增加的黑色素具有吸收紫外線、中和自由基的功能，這是身體對抗紫外線曝曬的一種保護作用<sup>[21]</sup>。

## 3. 酪胺酸酶緒論

酪胺酸酶是引起黑色素形成的關鍵酵素，從微生物、植物到動物都存在。酪胺酸酶還有銅離子，為黑色素細胞中的核糖體合成的氧化酵素，在經內質網修飾過後送到高基氏體儲存。當酪胺酸酶在高基氏體中開始與酪胺酸反應，就會生成黑色素從高基氏體釋出至黑色素細胞中，成為黑色素顆粒前驅物。目前認為酪胺酸酶是形成黑色素的關鍵，許多影響黑色素形成的因素都是直接或間接作用在酪胺酸酶上<sup>[22]</sup>。

酪胺酸以及酪胺酸酶是色素細胞形成色素最主要的兩項物質。酪胺酸經由含銅離子的酪胺酸酶作用後，進行一連串複雜反應形成黑色素<sup>[23][24]</sup>。黑色素是蛋白質的一種，可以過濾陽光和紫外線達到保護皮膚的功能。因此，已證實的影響酪胺酸酶的氧化作用因素，將在下述列舉簡短說明：

### 3.1 內分泌之影響

#### a. 色素激素 (MSH)

分成 $\alpha$ -及 $\beta$ -MSH兩種，存在於腦下垂體間葉。認為會促進黑色素細胞的運動，增強酪胺酸酶活性<sup>[25-28]</sup>。MSH若減少，酪胺酸酶活性亦相對減少。

## b. 褪黑激素

由松果腺及神經末梢所分泌的色素凝集素，褪黑激素可凝集酪胺酸，減低酪胺酸酶活性。

## 3.2 化學因素影響<sup>[29]</sup>

### a. 苯丙胺酸

苯丙胺酸在黑色素合成過程，不是抑制酪胺酸酶的作用，而是會與酪胺酸酶產生競爭作用，而影響內源性酪胺酸的吸收程度，而導致黑色素合成作用受到影響。

### b. 硫氫化物類

由於氫硫化物會強力結合銅離子，因酪胺酸酶具銅離子的特性，因此妨礙酪胺酸酶在黑色素形成中的作用，減少黑色素合成量。

### c. 金屬

黑色素顆粒中本身帶有銅及高濃度的鋅，鋅會抑制酪胺酸酶的羥化作用；而鎳與鈷則會促進酪胺酸酶的羥化作用。鉛以及汞則與銅離子競爭進而抑制酪胺酸酶的活性<sup>[30]</sup>。

### d. 還原劑

如維生素 C 與維生素 E 等，因為具有抗氧化特性，可以將多巴醌還原成多巴，抑制黑色素形成。或者將深色的氧化型黑色素還原成淡化型黑色素。

## 3.3. 物理因素影響

### a. 溫度

在先前實驗中發現，在試管中酪胺酸酶活性會隨著溫度升高而增加，溫度太低也會影響。所以人體曝露在高溫的部位黑色素也較深。

### b. pH 值

pH 值 7.0 對黑色素合成進行的過程最適當，因此 pH 值過高過低都

會影響酪胺酸酶活性。

#### c. 陽光及紫外線

先前實驗證實，當人體皮膚曝露在紫外線照射下，酪胺酸酶活性會增加，使得黑色素的合成隨著增加<sup>[31]</sup>。

#### d. 放射線

小劑量或中等劑量的 X 光放射線，會產生直接加深色素或炎症候色素直接加深；高劑量則會直接永久性破壞黑色素細胞。

### 3.4. 減少黑色素存在的機制及淡化黑色素常用藥物

目前在研究上已經討論歸納出要減少黑色素存在表皮的方法，而現今使用的治療成分的方法有下述幾點：

- a. 藉由防止黑色素細胞被刺激及抑制酪胺酸酶達到目的。
- b. 減少黑色素被釋放至表皮細胞
- c. 加速黑色素離開表皮各層
- d. 防止黑色素細胞被刺激、活化而製造黑色素

目前所採用的成分，對降低黑色素的形成及具有美白效果有效與否之依據，通常是以酪胺酸酶活性的阻斷作用大小，也就是阻滯率 % 來做為評比，也就是藉由防止黑色素細胞被刺激及抑制酪胺酸酶達到目的。而衛生署所公布的美白成分及濃度均有所限制，參照下列所序及附表(表 2.1)：

表 2.1 衛生署公布美白成分及濃度限制列表

Magnesium ascorbyl phosphate , MAP <sup>[32]</sup>	<p>限量：3%</p> <p>用途：美白</p>
Ascorbyl Glucoside <sup>[32]</sup>	<p>限量：2%</p> <p>用途：美白</p>
Sodium Ascorbyl Phosphate <sup>[32]</sup>	<p>限量：3%</p> <p>用途：美白</p>
Kojic acid <sup>[33]</sup>	<p>限量：2%</p> <p>用途：美白</p>
Arbutin	<p>限量：7%</p> <p>用途：美白</p> <p>其他規定：製品中所含不純物 (Hydroquinone)應在 20 ppm 以下</p>
Ellagic Acid	<p>限量：0.5%</p> <p>用途：美白</p>
Chamomile ET	<p>限量：0.5%</p> <p>用途：防止黑斑、雀斑</p>



### 三、環糊精

#### 1. 環糊精介紹

環糊精英文為 Cyclodextrin，其縮寫為 CD，Villiers 在 1891 年的時候最先發現，而 Schardinger 於 1903 年將其單獨分離出來的物質。

#### 2. 環糊精結構

環糊精是幾個葡萄糖分子以  $\alpha$ -1,4-糖苷鍵環接而成的圓柱狀分子結構，它的命名基於環中葡萄糖基的數量。如： $\alpha$ -環糊精有 6 個葡萄糖分子， $\beta$ -環糊精有 7 個葡萄糖分子， $\gamma$ -環糊精有 8 個葡萄糖分子（圖 2.7）。細菌是使用一種天然的酶（環糊精葡萄糖轉移酶簡稱 CGTase=Cyclodextrin-Glucosyl-Transferase）從澱粉分離出環糊精。CGTase 從兩端剪斷呈螺旋狀的澱粉後把它連接起來組成一個環狀，由於剪出來的澱粉長度不同，這樣就產生了三種不同的環狀糊精<sup>[34][35]</sup>。

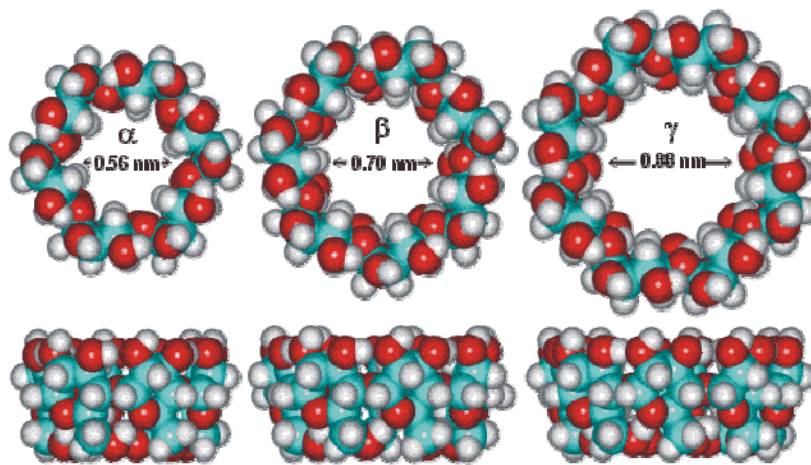


圖 2.7 不同型態之環糊精

環糊精分子結構是兩端都有開口的環狀空腔錐形體，空腔直徑係由所組成的葡萄糖數目所決定。由於葡萄糖單分子有極性氫氧基，在鏈結成環狀結構的同時，環糊精空腔內側為烴基與葡萄糖氧原子相互排列而成，形成非極性的內部環境，即是親脂性<sup>[36]</sup>。而在圓錐狀外部兩側開口位置上，C-2 及 C-3 為二級羥基位於錐形結構開口外緣處較大那方；C-6 則為一級羥基，位於錐形結構小孔徑開口外緣處，使得空腔周圍及圓錐結構的表面為極性，即親水性的(圖 2.8)。

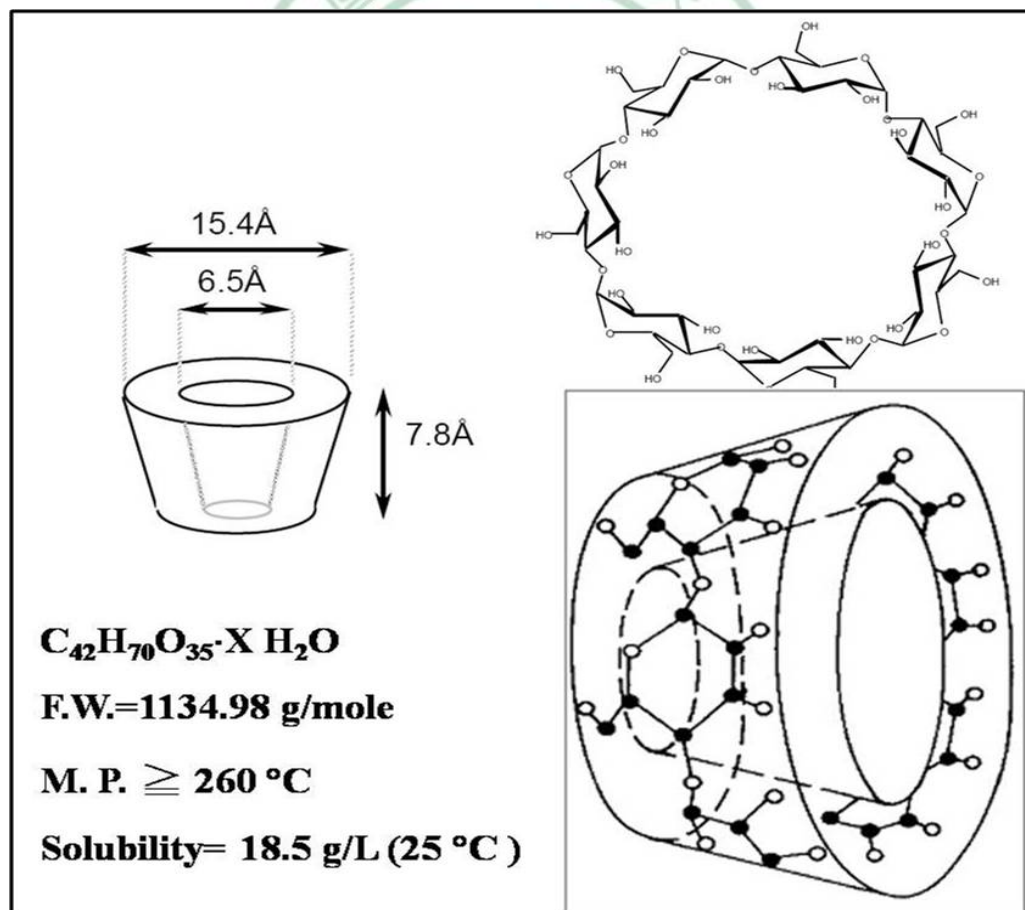


圖 2.8  $\beta$ -環糊精結構圖

### 3. 環糊精特性

由於環糊精表面為親水性，內側是親酯性的特色，環糊精的內孔可以與其他分子形成複合物，在一定的條件下也可以將它釋放出來。這種表現叫做主-客體複合化學，環糊精是主體，被包含的分子為客體<sup>[37]</sup>。客體可以是滿足兩個條件的任何分子，其一：是為較小的分子，以適應內孔圓柱狀的大小；其二：是為非極性分子，可以與內孔中親酯性的表面相互作用。因為分子之間一樣受到分子力的束縛，例如化妝品以及保養品中的活性物質（例如維生素 A）是酯溶性的或者叫做疏水性的，這就需要用合適的分子來包含，防止活性喪失或有利保存，而環糊精便是最適合的材料之一。

### 4. 環糊精應用

由於環糊精有著特殊的圓桶狀且具有外水內有的特殊分子結構，有著分子容器的功能，可以誘捕欲包覆的客體分子進入環糊精主體分子的孔洞中。加上因為客分子包覆到環糊精中後，環糊精將改變並修飾客分子的物理性質，此外，環糊精的結構組成係由天然葡萄糖環狀鏈結而成，是天然可分解不具毒性的材料，因此環糊精可以當作廣泛性的應用載體。目前在環糊精所應用的範圍以涵括在藥物載體<sup>[38][39]</sup>、化妝品<sup>[40]</sup>、化學工程<sup>[41]</sup>、食品工業<sup>[42]</sup>以及香料香精<sup>[43]</sup>製備上。

## 5. 環糊精的物理與化學性質影響在中藥製劑上的應用

### 5.1 改善有效成份的溶解度，提高製劑的溶出速率和生物可利用度

由於環糊精有著特殊的圓桶狀且具有外水內油的特殊分子結構，使疏水性的分子可以進入環糊精中。這對許多中藥成分裡難溶性的分子，提供水性化的途徑，增加藥物在水中的溶解度以及在製劑中的溶出速率，使得藥物可以容易通過細胞膜，進而提高生物利用度<sup>[44-46]</sup>。

### 5.2 防止揮發性成分的揮發，提高中藥製劑穩定性

由於大多數中藥有效成分都具有揮發性，以揮發油成分中為例，單萜、倍半萜以及其含氧衍生物占大多數。這些成分不僅易氧化，對光、氧都極易形氧化作用而變質影響效用，甚至進一步產生具有毒性的副產物。當以環糊精進行包覆後，藥物的有效成分會被包合在環糊精的圓柱孔洞中，環糊精保護藥物分子不穩定的部分，切斷藥物分子與周遭環境的接觸，有效防止揮發。同時，避免光、氧以及水解條件形成的影響，增加穩定性<sup>[47-49]</sup>。

### 5.3 降低藥物刺激性及毒副作用，掩蓋不良氣味

一般中藥比較不為社會大眾接受的原因不外乎具有特殊氣味，影響病患用藥的情緒及觀感，尤其以小孩及女性比較難忍受。而有些藥物具刺激性成分，若直接應用在人體上會造成不舒服甚至傷害。環糊精本身不具任何氣味，當藥物包覆在環糊精中將掩蓋不良氣味，降低藥物成分

直接的刺激身體，此一功用對於中藥製劑有很大幫助<sup>[50][51]</sup>。

#### 5.4 使液體藥物粉末化

由於中藥中重要的揮發油成分容易揮發，以環糊精包覆後可以將其粉末化，也變的容易與其他藥品製成所需要的劑型，克服了原本藥物劑型所存在的缺點，利用價值提高<sup>[52]</sup>。

#### 5.5 調節藥物釋放速率

許多藥物的揮發油在應用上因易揮發、化學作用而變質的原因，使得中藥製劑效果變的較差。當環糊精包覆這些揮發油後，便控制了這些揮發油成分的釋放與否。另外有些環糊精先經過化學官能基修飾後，可以發揮不同功效。例如將水溶性藥物包覆後，降低藥物對水的溶解度，延緩藥物在水中釋放的速度，增加水溶性藥物作用時間<sup>[53][54]</sup>。

#### 5.6 作為標靶藥物的載體

藥物在體內常常尚未到達作用區域便解離失去了活性，而環糊精包覆藥物後成為一個複合體。由於環糊精包合物在水中屬於動態平衡的條件，此一複合體的解離取決於包合物穩定常數之影響。因此環糊精藥物包合物可以提供藥物在標靶器官或組織部位試放的目的<sup>[55][56]</sup>。

#### 5.7 用於有效成分的分離與含量測定

環糊精在化學分析上常用來鑑定分離異構物、官能基以及鏡像異構物，也用於化學分子吸附力的分析。甚至一些微量級技術上，例如，毛

細管電泳、微量透析及微柱高效液相色譜分析上。而中藥要現代化、科學化，分離純化技術是關鍵所在<sup>[57][58]</sup>。

## 6. 環糊精的釋放控制機制

在環糊精包覆作用下形成穩定的複合體分子結構，並沒有共價鍵在包覆作用中生成或斷裂。而當環糊精處在水溶液中，水分子單純地附著在環糊精分子的外圍，表現了它們的水溶性，導致分子空間結構的微小變化，環糊精與活性物的接合力被削弱了，複合物成了不穩定的主-客體，活性物質便從環糊精中釋放出來<sup>[59]</sup>。在水溶液中環糊精與客分子結合成複合體，主要是原來已溶劑化的包覆物質與水分子的重新排列和移除的過程。氫鍵、釋放能量和電荷轉移都是複合物形成和穩定的驅動力。當複合物形成時所產生的熱能變化是因為偶級-偶級作用力所產生的能量，是極為小且穩定。因此，環糊精包覆過程的熱力學、客分子疏水部分進入環糊精疏水性的內部，跟客分子去水合作用有關，也與生成的氫鍵和釋放空腔內原有的水分子，內部張力所導致的變化現象有關。直到接觸水性物質之前，此一環糊精複合體的活性微囊受到相當程度保護，穩定了對光、熱和空氣氧化的影響條件<sup>[60-65]</sup>。控釋有很多的優點，它增加了產品的功效，特別是在環糊精提供對活性物的保護上面<sup>[66]</sup>。相類似的機制有微脂體，脂質體也是一種奈米的介質，然而將活性成份塞

入脂質體很昂貴，對油性很敏感，這對中草藥大多主要成分是揮發油而言效果並不好。而環糊精則提供了包覆油性物質條件，價格也較為低廉，因此，利用環糊精來進行中草藥開發是值得期待的新製程(圖 2.9)。

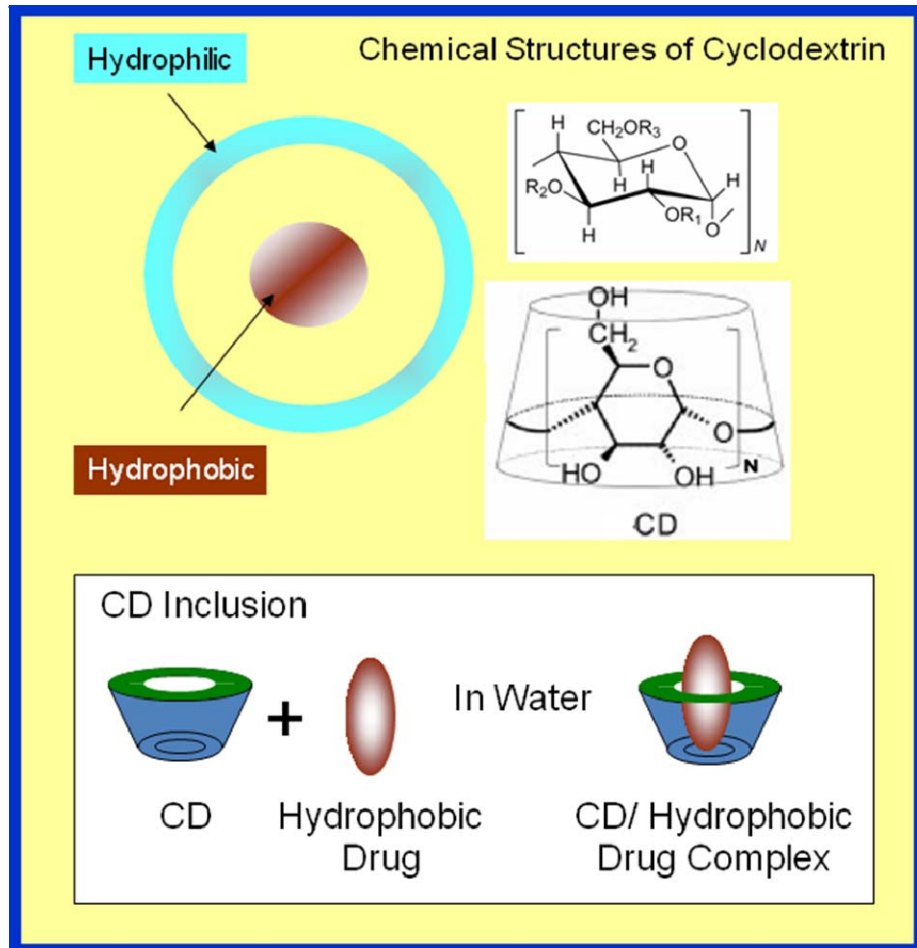


圖 2.9 環糊精奈米技術包覆示意圖

## 7. HP-β-環糊精概述

羥丙基倍他環糊精(Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin; HP-β-CD)是β-環糊精的一種羥烷基化衍生物。它是近幾年有關製備方法，毒理試驗，應用範圍研究的比較透徹的β-環糊精衍生物之一。HP-β-環糊精不但可以與β-環糊精一樣對許多化合物具有優良的包覆作用，提高被包覆

物質的穩定性，而且它還具有水溶性高和在生物體內提高被包覆藥物的釋放速度和生物利用度。因此，HP-β-環糊精具有一些特殊的優良特性，應用範圍更廣，在醫藥上最具有應用前途。HP-β-環糊精是在 β-環糊精的 C2、C3 和 C8 位的羥基被羥丙基取代生成的衍生物<sup>[67]</sup>。而目前以 β-環糊精應用較為廣泛，而在食品應用及安全性也經較多國家認可 (表 2.2)(表 2.3)<sup>[68][69]</sup>。我們使用 HP-β-環糊精來與 β-環糊精做一個對照，順便觀察水溶性較差的 β-環糊精與水溶性較好的 HP-β-環糊精是否有所差異。

表 2.2 各國環糊精應用許可情形

Table 7. Summary of Regulatory Status of Parent CDs<sup>67</sup>

Food Approval				Pharmacopeia Monographs		
	United States	Europe	Japan	USP/NF	Ph.Eur	JP
α-CD	In preparation	Planned	Yes	No	Yes	Yes
β-CD	GRAS	Food additive	Yes	Yes	Yes	Yes
γ-CD	GRAS	Pending	Yes	No	In Process	No

表 2.3 環糊精安全性一覽

Safety overview of selected cyclodextrins

Cyclodextrin	The pharmacokinetics in rats <sup>a</sup>			Acute toxicity, LD <sub>50</sub> rat (g/kg) <sup>b</sup>		Maximum dosage in marketed products (mg/day)	
	t <sub>1/2</sub> after iv injection (min)	Fraction excreted unchanged in urine	Oral absorption	IV	Oral	IV	Oral
αCD	25	~90%	2-3%	0.5-0.8	>10	1.3	
βCD	20	~90%	1-2%	1	19	Not for parenteral usage	170
HPβCD	20	~90%	≤3%	10	>2	16,000	8000
SBEβCD				>15	>10	6000-14,000	-
RMβCD	18	>95%	0.5-12%	1.5-2.1	>8	Not for parenteral usage	-
G <sub>2</sub> βCD	23				>5	No product	No product
γCD	20	90%	<0.02%	4	>8	No product	No product
HPγCD					>2		



### 第三章、實驗材料與方法

本研究主要分為(1)牡丹皮粗萃物之製備與分析(2)牡丹皮萃取物、純丹皮酚環糊精包合物的製備(3)牡丹皮萃取物、純丹皮酚及其環糊精包合物的抗氧化與抑制酪胺酸酶活性能力評估，大綱如下表所列(表 3.1)。各實驗所用之儀器設備、材料、試劑與實驗方法分述如下：

表 3.1 實驗流程大綱



## 一、實驗材料、藥品與儀器設備

### 1. 中藥材料之來源

本實驗所使用之牡丹皮皆購自彰化縣員林鎮弘益中醫診所，由黃美華中醫師鑑定並確認藥材無誤。

### 2. 藥品

#### 2.1 中藥材萃取物之製備

- 無水乙醇 購自 Panreac
- 牡丹皮 購自弘益中醫診所

#### 2.2 含中藥萃取物之 $\beta$ -環糊精包合物製備

- $\beta$ -環糊精 Beta-cyclodextrins ( $\beta$ -CD) 購自 ALDRICH
- 羥丙基  $\beta$ -環糊精 Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) 購自 ALDRICH
- 中藥萃取物
- 丹皮酚 Paeonol pure compound 購自 ALDRICH
- 無水乙醇 購自 Panreac

#### 2.3 中藥萃取物抗老化能力

清除自由基之效果

- $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) radical 購自 SIGMA

- 對苯二酚 Hydroquinone ( HQ ) 購自 SIGMA
- 無水乙醇 購自 Panreac

## 2.4 中藥萃取物對美白的有效能力評估

中藥萃取物體外抑制酪胺酸酵素活性的影響

- Tyrosinase 購自 SIGMA, T8566
- L-Tyrisine 購自 SIGMA, T3824
- Phosphate Buffer Saline ( PBS )

## 3. 儀器設備

- 分光光度計 (Chromtech UV-3100)
- ELISA 分光光度計 (Spectramay340 PC-384)
- 減壓濃縮機 (EYELA N-1)
- 電子天秤 (Denver instrument TB-214)
- 冷凍乾燥機 (EYELA FDU-1200)
- 水流抽氣機 (EYELA )
- 真空烘箱 (Instruments corp. VO-27)
- 循環冷卻機
- 超音波震盪器
- 4°C 冰箱

- -20°C 冷凍櫃
- 粉碎機
- 96 - well plate
- 八孔分注器
- 微量分注器
- 15 ml 與 50 ml 無菌離心管
- 燒杯
- 血清瓶
- 100 ml 定量瓶



## 二、實驗方法

### 1. 牡丹皮粗萃物之製備與分析

#### 1.1 牡丹皮粗萃膠之製備

將購買回來的牡丹皮分批放入粉碎機中打碎，將所有打碎之牡丹皮粉末收集到塑膠袋中攪拌均勻，放入密封罐中放置防潮箱中保存。

取牡丹皮粉 150 g 加入 1000 ml 以無水乙醇製備好的 95% 酒精溶劑中提取，置於室溫下 24 小時，以濾紙濾除雜質及其他不溶的部分，濾液再以減壓濃縮機除去乙醇後，將濃縮液放置冷凍乾燥機以 -50°C 進行烘乾，得到萃取膠後再置於防潮箱中備用。

## 1.2 牡丹皮粗萃物之分析

### a. 紫外光圖譜繪製及波長選擇

精密秤取標準品丹皮酚適量置於定量瓶中，加入經無水乙醇稀釋過後而得之 95% 乙醇作為溶劑，使其溶解並稀釋至刻度，搖勻，即得到丹皮酚的標準溶液。以 95% 乙醇當作空白，在 200 nm ~ 400 nm 波長範圍掃描，得到 274 nm 為最大吸收波長並訂定為測定波長。

### b. 丹皮酚乙醇溶液標準曲線制備、測定與繪製

取丹皮酚乙醇標準溶液至不同定量瓶中，以 95% 乙醇稀釋至刻度，配製成丹皮酚乙醇標準系列溶液。以 95% 乙醇為空白，於 274 nm 此波長測定吸光值可分別得到一系列均值。以吸光值為縱座標，溶液濃度為橫坐標，計算一元線性迴歸與相關係數並繪製成表，即得到範圍內良好線性關係。

### c. 牡丹皮濃縮液內丹皮酚含量測定

精密秤取牡丹皮粗萃膠 1 mg 精密稀釋 100 倍。依照標準曲線制備所述方法測定，並將所得到之結果帶入標準方程式，計算牡丹皮粗萃膠所含丹皮酚濃度。

## 2. 環糊精包合物的製備

### 2.1 含牡丹皮粗萃物之環糊精奈米包覆藥物的製備

採過飽和溶液法進行包合，秤環糊精適量於樣品瓶，加入適量二次純化水放入攪拌器，水浴加熱 70°C 約 2 小時待完全溶解。取出防潮箱中備用牡丹皮粗萃膠，取適量粗萃膠置於 50 ml 濃縮瓶中，加入 95% 乙醇至刻度後放入超音波震盪器中待完全溶解。以針筒取出回溶粗萃物乙醇溶液，先以 0.45  $\mu\text{m}$  針筒過濾器進行過濾後，再以 0.22  $\mu\text{m}$  針筒過濾器進行二次過濾收集待用。二次過濾後之牡丹皮濃縮液置入 50 ml 濃縮瓶中進行減壓濃縮，濃縮至適量後取出備用。 $\beta$ -環糊精、HP- $\beta$ -環糊精與牡丹皮濃縮液所含粗萃膠重量包合比例依下表(表 3.2) (表 3.3)，取適量牡丹皮濃縮液加入含  $\beta$ -環糊精水溶液之樣品瓶中，以 70°C、1000 r/min 攪拌約 6 小時，將樣品瓶置入放滿碎冰冰桶再送進 4°C 冰箱中冷藏過夜。隔日取出進行抽氣過濾，收集其沉澱物並送入冷凍乾燥箱以 -50°C 冷凍乾燥後，即得包合物。HP- $\beta$ -環糊精水溶液則以室溫下、1000 r/min 攪拌 overnight，隔日將樣品送入冷凍乾燥箱，以 -50°C 進行冷凍乾燥後，即得包合物。

表 3.2  $\beta$ -環糊精包覆製程

	$\beta$ -CD: Extract	H2O	EtOH	Inclusion Temp	Time	Dry Temp
$\beta$ -CD-1	3.5 g : 0.9 g	43.75ml	4 g	70°C	6 h	-50°C
$\beta$ -CD-2	3.5 g : 1.3 g	43.75ml	4 g	70°C	6 h	-50°C

表 3.3 HP-β-環糊精包覆製程

	HP-β-CD: Extract	EtOH	Inclusion Temp	Time	Dry Temp
HP-β-CD-1	4 g : 1.22 g	10 g	RT	overnight	-50°C

## 2.2 含丹皮酚之環糊精奈米包覆藥物的製備

取適量純丹皮酚置於樣品瓶中，加入 95% 乙醇待完全溶解。秤取環糊精適量至於樣品瓶內，加入適量二次純化水後放入攪拌器，水浴加熱至完全溶解後加入丹皮酚酒精溶液，β-環糊精、HP-β-環糊精與丹皮酚莫耳數包合比例依下表 (表 3.4) (表 3.5) 所列進行，包合後得到丹皮酚奈米包覆藥物。包合方法及乾燥方式與粗萃奈米包覆藥物相同。

表 3.4 丹皮酚 HP-β-環糊精包覆製程

	HP-β-CD: Paeonol	EtOH : H <sub>2</sub> O	Inclusion Temp	Time	Dry Temp
HP-β-CD-2	1.46 g : 0.166 g	3 g : 3 g	RT	overnight	-50°C

表 3.5 丹皮酚 β-環糊精包覆製程

	HP-β-CD: Paeonol	EtOH : H <sub>2</sub> O	Inclusion Temp	Time	Dry Temp
β-CD-3	1.135 g : 0.166 g	5 g : 3 g	70°C	6 h	-50°C

### 3. 清除自由基能力

#### 3.1 DPPH 測試樣品溶液配製：

先計算實驗中所需要用到的測試樣品量，再進行 DPPH 的樣品配製。取  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 2 mg 置於褐色瓶中，加入適量體積之 50% 乙醇溶液配置成 20  $\mu$ g/ml，置入超音波震盪器中震盪 30 秒，取出搖晃均勻並將 DPPH 試液放置冰桶上避光儲存。

#### 3.2 對照組與實驗組樣品溶液配製：

對苯二酚 (HQ) 是一種脂溶性的酚類化合物，在皮膚的美白方面，HQ 會抑制黑色素生合成的作用，是因為抑制了酪胺酸酶的活性及抑制黑色小體的形成或增加黑色小體的分解作用，而產生了美白的效果。但是因為具刺激性，高濃度 (5% ) 長期使用會引起皮膚炎以及色素沉澱，1987 年時已經被列入藥用品，一般化妝品不能使用。取 HQ 0.01 g 加入 95% 乙醇溶液，配置成 1 mg/ml。置入超音波震盪器中震盪 60 秒，取出搖晃均勻後，再配製成不同濃度樣品，將 HQ 試液靜置儲存。

實驗組待測樣品溶液配製：牡丹皮粗萃膠 Extract Paeonol。丹皮酚 Paeonol pure compound。粗萃奈米包覆藥物  $\beta$ -CD-1。 $\beta$ -CD-2。 $\beta$ -CD-3。HP- $\beta$ -CD-1。HP- $\beta$ -CD-2 樣品溶液配製方法同上。

#### 3.3 清除 $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基之實驗方法：

分別以 pipet 取配製好的各樣品溶液不同濃度 50  $\mu$ l，注入 96-well



plate 且進行三重複驗證。自冰桶中取出 DPPH 試液以 pipet 取 100  $\mu$ l 加入所有待測試液的 well 中，充分混合均勻，蓋上鋁箔紙放置抽屜中避光 30 分鐘，以 ELISA 分光光度計測定 517 nm 吸光值，並且以公式計算捕捉率。

$$\text{捕捉率 (\%)} = \left[ (Ac - AS) / Ac \right] \times 100\%$$

As：含有待測物之樣品在 517 nm 吸光值。

Ac：不含待測物之對照組在 517 nm 吸光值。

#### 4. 中藥萃取物對酪胺酸酶的抑制能力評估

##### 4.1 體外抑制酪胺酸酶活性試驗之測試樣品溶液配製：

先計算實驗中所需要用到的測試樣品量，再進行 Tyrosinase 和 Tyrosine 的樣品配製。

取 Tyrosinase 2 mg ( 5370 unit/mg) 置於褐色瓶中，加入 1 ml 之 0.1 M PBS 配成 10 U ，利用 vortex 搖晃均勻，並將 Tyrosinase 試液放置冰桶上避光儲存。

取 Tyrosine 0.018 mg 置於褐色瓶中，加入 100 ml 之 0.1 M PBS 配成 2.5 mM 試液，利用 vortex 搖晃均勻並將 Tyrosine 試液放置冰桶上避光儲存。

##### 4.2 對照組與實驗組樣品溶液配製：

取 HQ 0.06 g 加入 10% DMSO 溶液配置成 6 mg/ml，置入超音波震盪器中震盪 60 秒，取出搖晃均勻後，再配製成不同濃度樣品，將 HQ 試液靜置儲存。

實驗組待測樣品溶液配製：牡丹皮粗萃膠 Extract Paeonol。丹皮酚 Paeonol pure compound。粗萃奈米包覆藥物  $\beta$ -CD-1。 $\beta$ -CD-2。 $\beta$ -CD-3。HP- $\beta$ -CD-1。HP- $\beta$ -CD-2 樣品溶液配製方法同上。

因包覆藥物重量包括環糊精與藥物兩著的重量 因此在藥物劑量上利用下式去估算真正藥物重量：

藥物重量=秤取的包覆藥物重量 x [製備時藥物重量 / (製備時環糊精重量 + 製備時藥物重量)]

#### 4.3 體外抑制酪胺酸酶活性試驗之實驗方法

分別以 pipet 取配製好的各樣品溶液不同濃度 50  $\mu$ l 加入到 20  $\mu$ l 0.1 M PBS (pH 6.8) 中，注入 96-well plate，自冰桶中取出 Tyrosine 試液以 pipet 取 79  $\mu$ l 加入所有待測試液的 well 中，最後加入 1  $\mu$ l Tyrosinase 試液且進行三重複驗證。充分混合均勻，放置到 37°C incubator 中 30 分鐘，以 ELISA 分光光度計測定 475 nm 吸光值，並且以公式計算抑制率。

抑制率 (%) = [(Ac - AS) / Ac] X 100%

As：含有待測物之樣品在 475 nm 吸光值。

Ac：不含待測物之對照組在 475 nm 吸光值。

## 第四章、結果

### 一、牡丹皮粗萃物之製備與分析

#### 1.1 牡丹皮粗萃膠

牡丹皮粉 150 g 經 1000 ml 95% 酒精溶劑提取，置於室溫下 24 小時後，以濾紙濾除雜質及其他不溶的部分，濾液再以減壓濃縮機除去乙醇後，將濃縮液放置冷凍乾燥機以  $-50^{\circ}\text{C}$  進行凍乾，得到丹皮酚萃取膠 (圖 4.1)。



圖 4.1 牡丹皮粗萃膠。實驗結果得牡丹皮粗萃膠。

#### 1.2 牡丹皮粗萃膠之分析

標準品丹皮酚適量加入 95% 乙醇至定量瓶中，溶解並稀釋至刻度，搖勻得丹皮酚溶液。以 95% 乙醇作空白，在 200 nm ~ 400 nm 波長範圍掃描，實驗得到最大吸收波長為 274 nm (圖 4.2)，並訂定為測定波長。

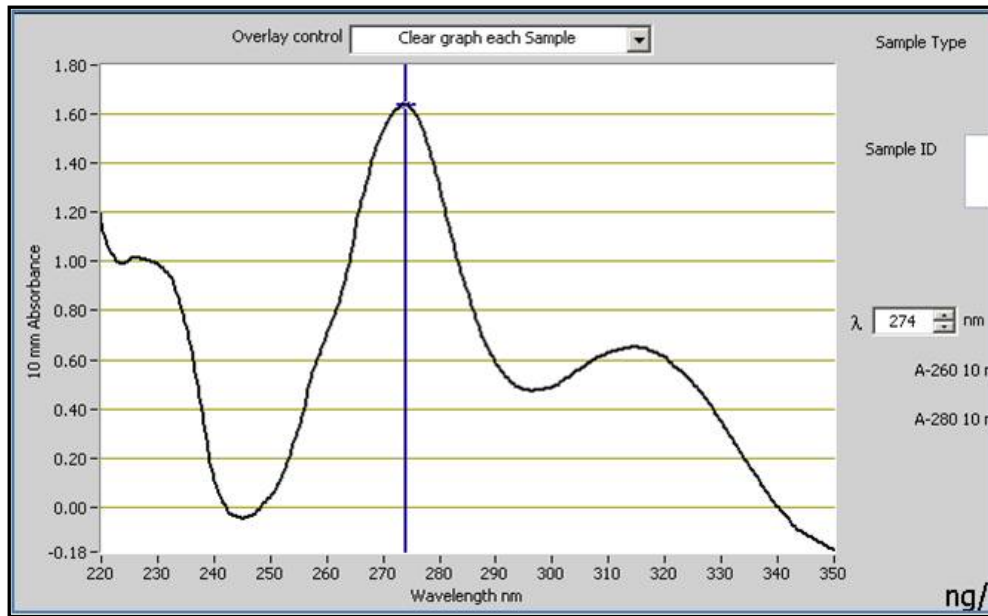


圖 4.2 牡丹皮粗萃膠之分析。標準丹皮酚溶液 1 mg/ml，實驗結果顯示，標準丹皮酚溶液於 274 nm 時，丹皮酚具有最大吸光值。

### 1.3 丹皮酚乙醇溶液標準曲線

取 2  $\mu\text{g/ml}$ 、4  $\mu\text{g/ml}$ 、6  $\mu\text{g/ml}$ 、8  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$  丹皮酚乙醇溶液。以 95 % 乙醇為空白，於 274 nm 此波長測定吸光值可分別得到 OD 值 0.222、0.379、0.568、0.75、0.928。以溶液濃度為橫座標，吸光值為縱坐標，計算一元線性迴歸與相關係數並繪製成表， $Y = 0.089x + 0.034$ 。由實驗結果(圖 4.3)丹皮酚在 2 ~ 10  $\mu\text{g/ml}$  範圍內具良好線性關係。秤取牡丹皮粗萃膠 1 mg 精密稀釋 100 倍，並測定在 274 nm 吸光值，得到結果為 0.288 帶入標準方程式，得到 1 mg 牡丹皮粗萃膠所含丹皮酚濃度 2.854  $\mu\text{g/ml}$ 。萃取膠總重約 8 g 含 paeonol 約 2.28 g。

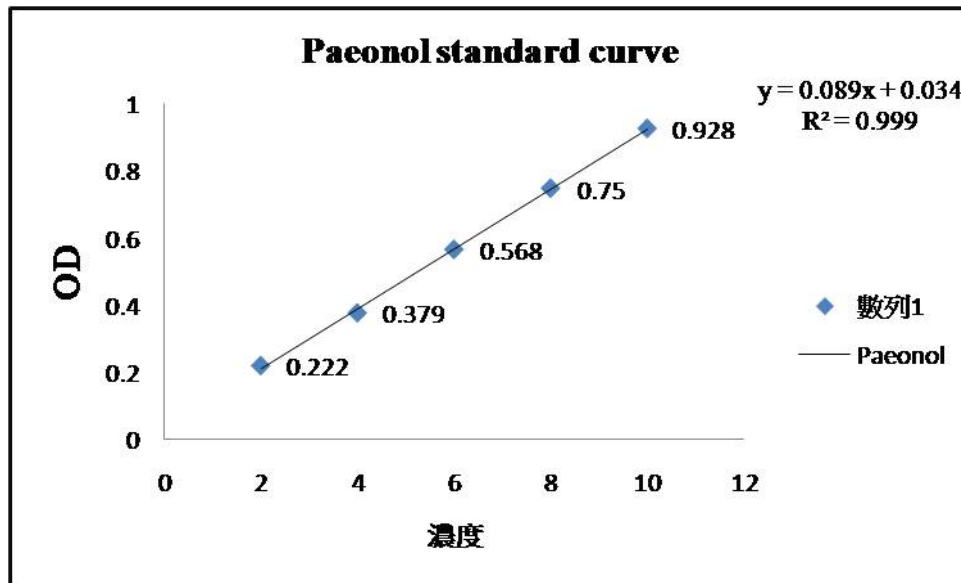


圖 4.3 丹皮酚乙醇溶液標準曲線。標準丹皮酚乙醇溶液顯示丹皮酚在 2 ~ 10  $\mu\text{g/ml}$  範圍內具良好線性關係。

## 二、環糊精奈米包覆藥物實驗結果

### 2.1 粗萃牡丹皮奈米包覆藥物

取適量牡丹皮粗萃膠置於 50 ml 濃縮瓶中，加入 95 % 乙醇待完全溶解。先以 0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$  針筒過濾器進行二次過濾，再進行減壓濃縮至適量後取出備用。採用水溶液法進行包合，秤取不同環糊精適量於樣品瓶，加入二次純化水後放入攪拌器，水浴加熱至完全溶解後加入丹皮酚濃縮液，乾燥後得到不同製程粗萃牡丹皮奈米包覆藥物(圖 4.4)。



圖 4.4 粗萃牡丹皮奈米包覆藥物。經凍乾後所得到之粗萃奈米包覆藥物，由左而右分別為  $\beta$ -CD-1、 $\beta$ -CD-2、HP- $\beta$ -CD-1。由於包覆組成不同，包覆物顏色帶有些許深淺不同的褐色及乾燥後份量有所差異。

## 2.2 丹皮酚奈米包覆藥物

取丹皮酚與 HP- $\beta$ -環糊精以莫耳數一比一於樣品瓶內，加入二次純化水與乙醇後攪拌，實驗包合後(圖 4.5)得到丹皮酚奈米包覆藥物。

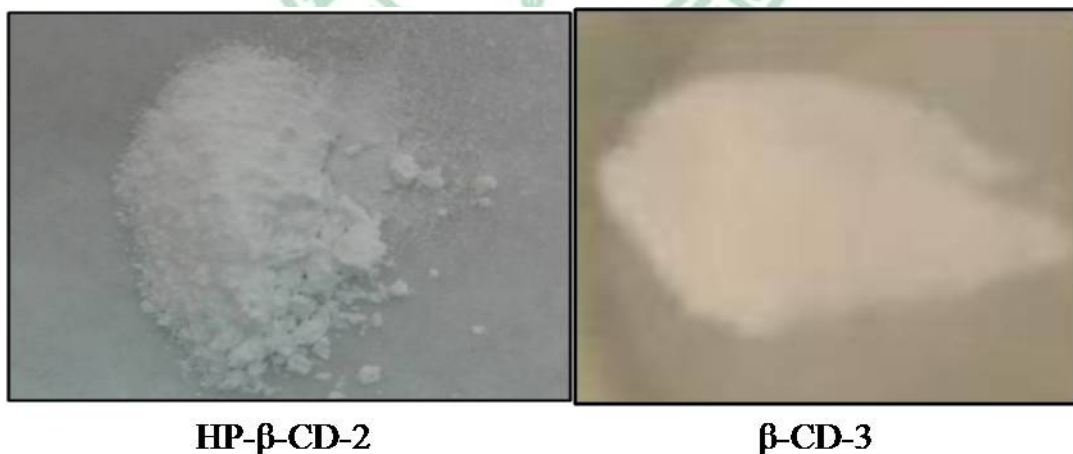


圖 4.5 丹皮酚奈米包覆藥物。丹皮酚奈米包覆藥物。經冷凍乾燥後的 HP- $\beta$ -CD-2 及  $\beta$ -CD-3，由於包覆物是標準品丹皮酚，包覆後產物顏色呈現白色，與粗萃奈米包覆藥物明顯不同。

### 2.3 奈米包覆藥物之水溶特性

分別將  $\beta$ -環糊精、粗萃奈米包覆藥物  $\beta$ -CD complex 以及牡丹皮粗萃膠各秤取 1 g 置於秤藥紙上，接著將此三份樣品分別放入不同樣品瓶中，各加入 10 ml DI water 並在 70 °C 下進行溶解。實驗結果顯示(圖 4.6)， $\beta$ -環糊精以及粗萃奈米包覆藥物  $\beta$ -CD complex，會完全溶在 DI water 中呈現透明水溶液態，而粗萃膠則是在水中呈現不溶混濁狀。由此可證明粗萃奈米包覆藥物  $\beta$ -CD complex 具有良好水溶性。

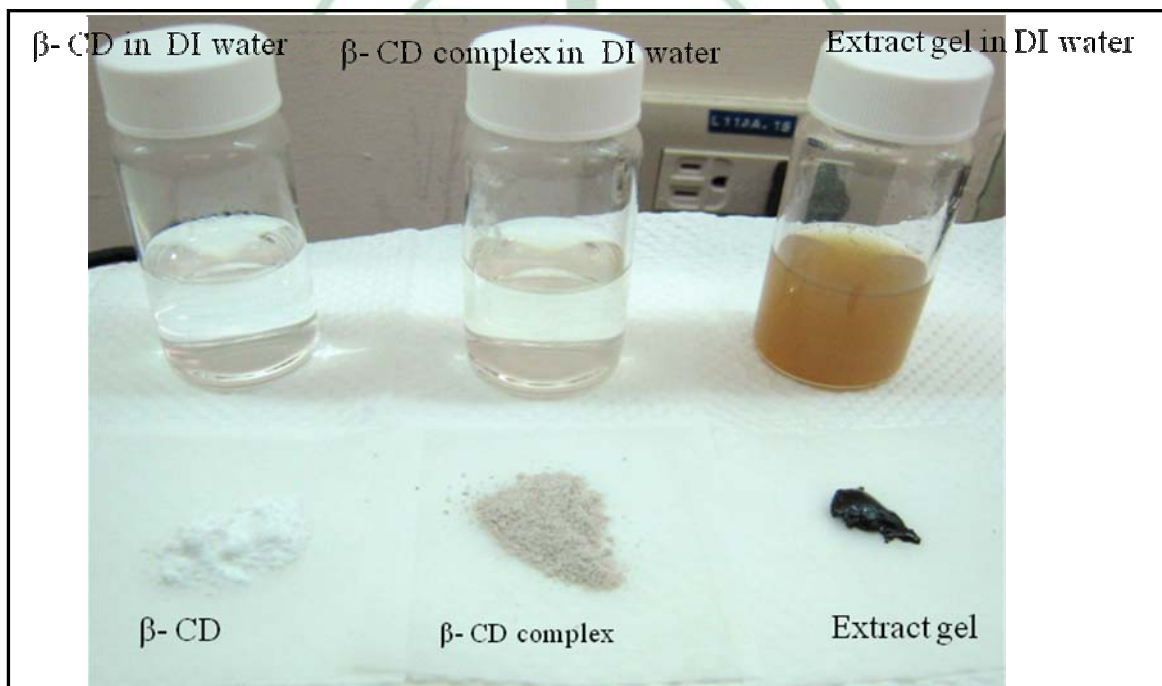


圖 4.6 奈米包覆藥物之水溶特性。由左而右分別為  $\beta$ -環糊精、粗萃奈米包覆藥物  $\beta$ -CD complex 以及牡丹皮粗萃膠。實驗結果顯示， $\beta$ -環糊精及粗萃奈米包覆藥物  $\beta$ -CD complex，會完全溶在 DI water 中呈現透明水溶液態，而粗萃膠則是在水中呈現不溶混濁狀。

### 三、奈米包覆藥物的鑑定

#### 3.1 UV 分析鑑定奈米包覆藥物

實驗結果(圖 4.7)從上到下由左而右，分別是丹皮酚及粗萃牡丹皮在 274 nm 有最大吸收波長。 $\beta$ -環糊精以及粗萃奈米包覆藥物  $\beta$ -CD complex 在 274 nm 最大吸收波長改變。因此，顯示在粗萃奈米包覆藥物  $\beta$ -CD complex 中，牡丹皮粗萃物已由  $\beta$ -環糊精所包覆，而使 274 nm 吸收波長改變。

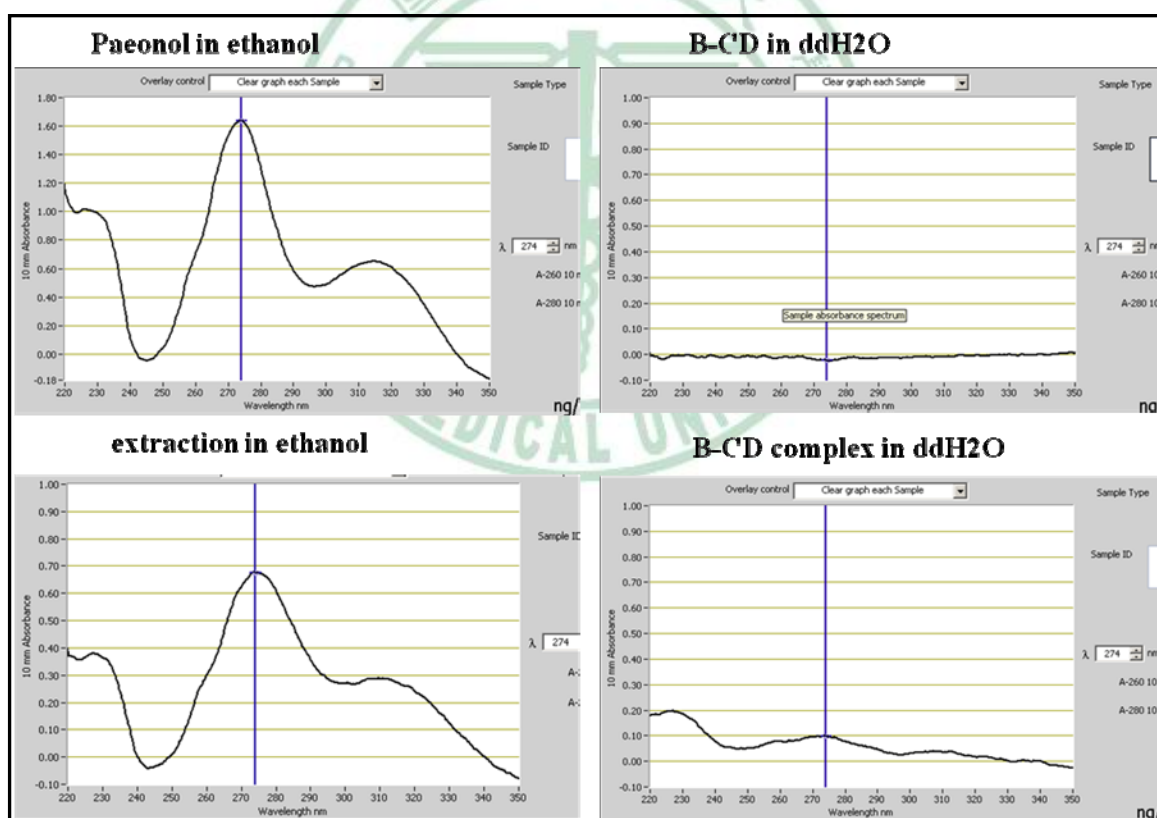


圖 4.7 UV 分析鑑定奈米包覆藥物。丹皮酚及粗萃牡丹皮 95% 乙醇溶液， $\beta$ -環糊精及粗萃奈米包覆藥物  $\beta$ -CD complex 水溶液，在 274 nm 波長下 UV 圖。



### 3.2 NMR 分析鑑定奈米包覆藥物

利用氫譜 NMR (Nuclear magnetic resonance) 可以測定粗萃奈米包覆藥物中氫的位置，各位置氫的比例，還有官能基附近氫之間的影響。利用判別環糊精結構內氫的變化，造成 NMR 光譜的化學位移 (chemical shift) 來判讀粗萃奈米包覆藥物中丹皮酚的包覆狀況。結果顯示，粗萃奈米包覆藥物的環內氫 H3、H5 波峰從  $\beta$ -環糊精原本 4.0 及 3.9，分別移動到 Pae/CD 的 3.94 及 3.8、 $\beta$ -CD-1 的 3.96 及 3.84、 $\beta$ -CD-2 的 3.94 及 3.82。實驗結果顯示(圖 4.8)， $\beta$ -環糊精已成功將粗萃牡丹皮包覆為包合物。

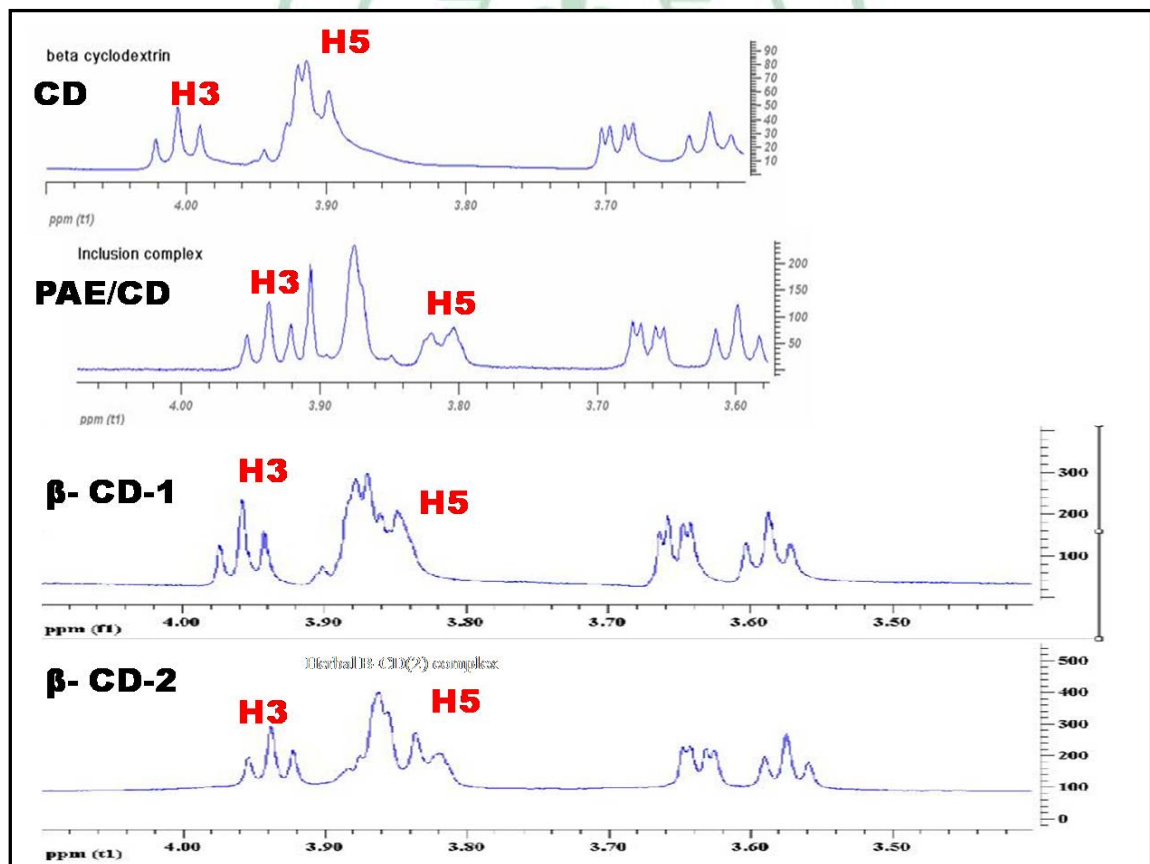


圖 4.8 NMR 分析鑑定奈米包覆藥物。

#### 四、藥物及奈米包覆藥物抗氧化能力

##### 4.1 HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮對 $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH )

##### 自由基清除能力

HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮不同濃度樣品各 50  $\mu$ l，經 DPPH 試液 100  $\mu$ l 避光 30 分鐘反應後，測定 517 nm 吸光值。HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮給藥濃度為 30  $\mu$ g/ml、100  $\mu$ g/ml、200  $\mu$ g/ml、300  $\mu$ g/ml、330  $\mu$ g/ml。

在 517nm 吸光值下顯示，HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮均具有清除自由基能力。HQ 與粗萃牡丹皮的清除自由基能力相當且比丹皮酚要好。結果顯示(圖 4.9)，HQ 與粗萃牡丹皮的抗氧化性能力相近；而丹皮酚的抗氧化性能力卻較差。

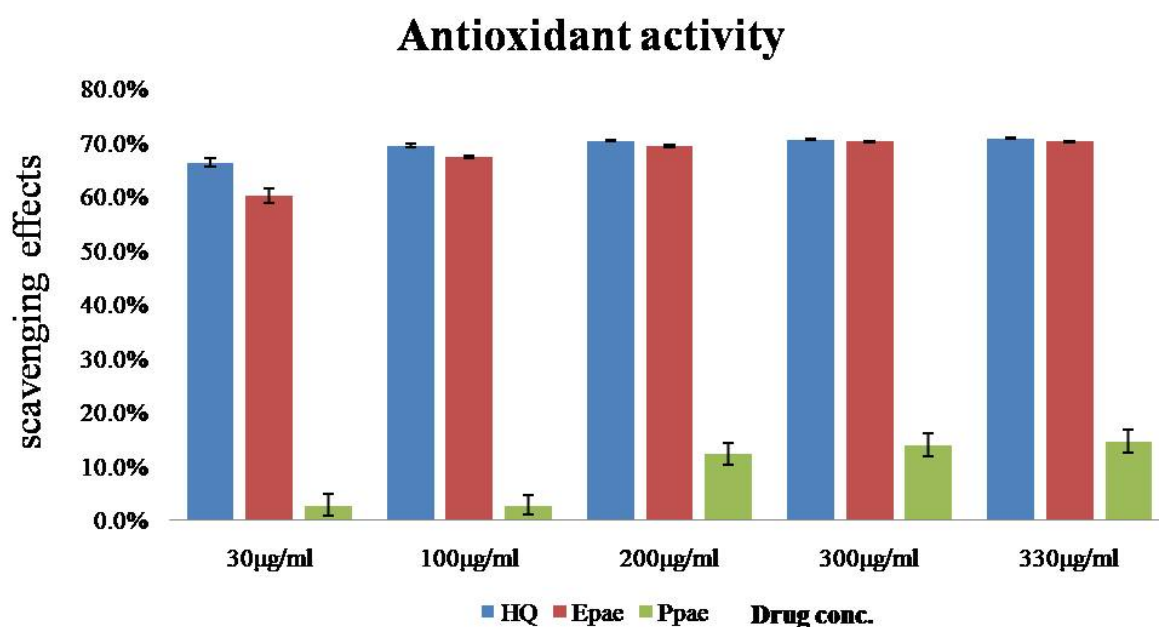


圖 4.9 HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮對  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基清除能力。

## 4.2 奈米包覆藥物對 $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基清除能力

不同包覆組成的奈米包覆藥物不同濃度樣品各 50  $\mu\text{l}$ ，經 DPPH 試液 100  $\mu\text{l}$  避光 30 分鐘反應後，測定 517 nm 吸光值。給藥濃度為 30  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$ 、200  $\mu\text{g/ml}$ 、300  $\mu\text{g/ml}$ 、330  $\mu\text{g/ml}$ 。實驗結果顯示(圖 4.10)，粗萃奈米包覆藥物 HP- $\beta$ -CD-1 略優於  $\beta$ -CD-2，但從給藥濃度 330  $\mu\text{g/ml}$  開始並無太大差異；兩者清除自由基能力都優於  $\beta$ -CD-1、 $\beta$ -CD-3 及 HP- $\beta$ -CD-2。

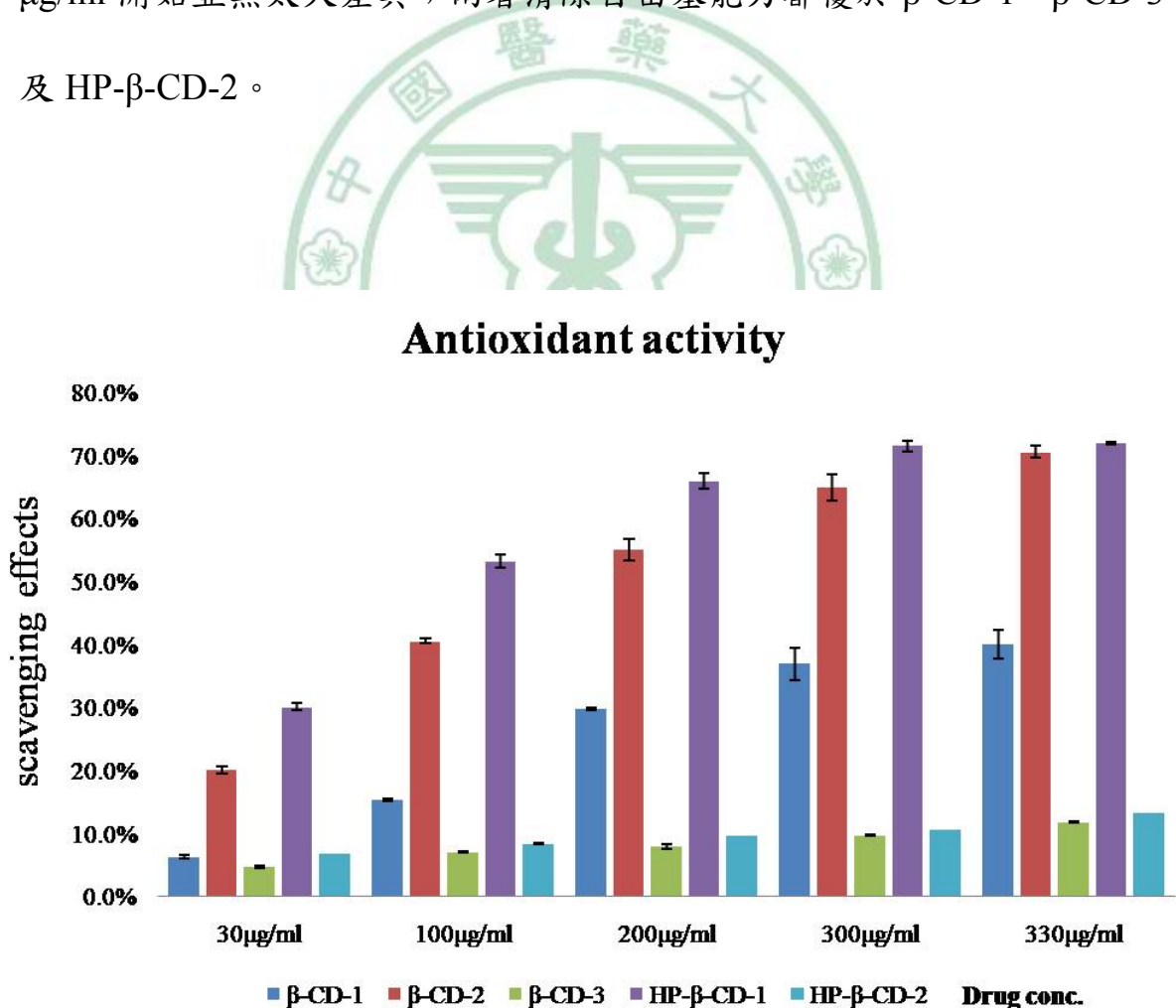


圖 4.10 奈米包覆藥物對  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基清除能力。

### 4.3 藥物及奈米包覆藥物對 $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基清除能力之比較

將藥物及不同包覆組成的奈米包覆藥物實驗結果做比較，看相同給藥濃度範圍內的各樣品清除自由基能力。實驗結果顯示(圖 4.11)，各樣品都在一開始 30  $\mu\text{g/ml}$  的給藥濃度就具清除自由基能力，HQ、粗萃牡丹皮起始即可達 50%清除率。奈米包覆藥物 HP- $\beta$ -CD-1 略優於  $\beta$ -CD-2，而奈米包覆藥物 HP- $\beta$ -CD-1、 $\beta$ -CD-2 及  $\beta$ -CD-1 清除自由基能力比 HP- $\beta$ -CD-2 好。

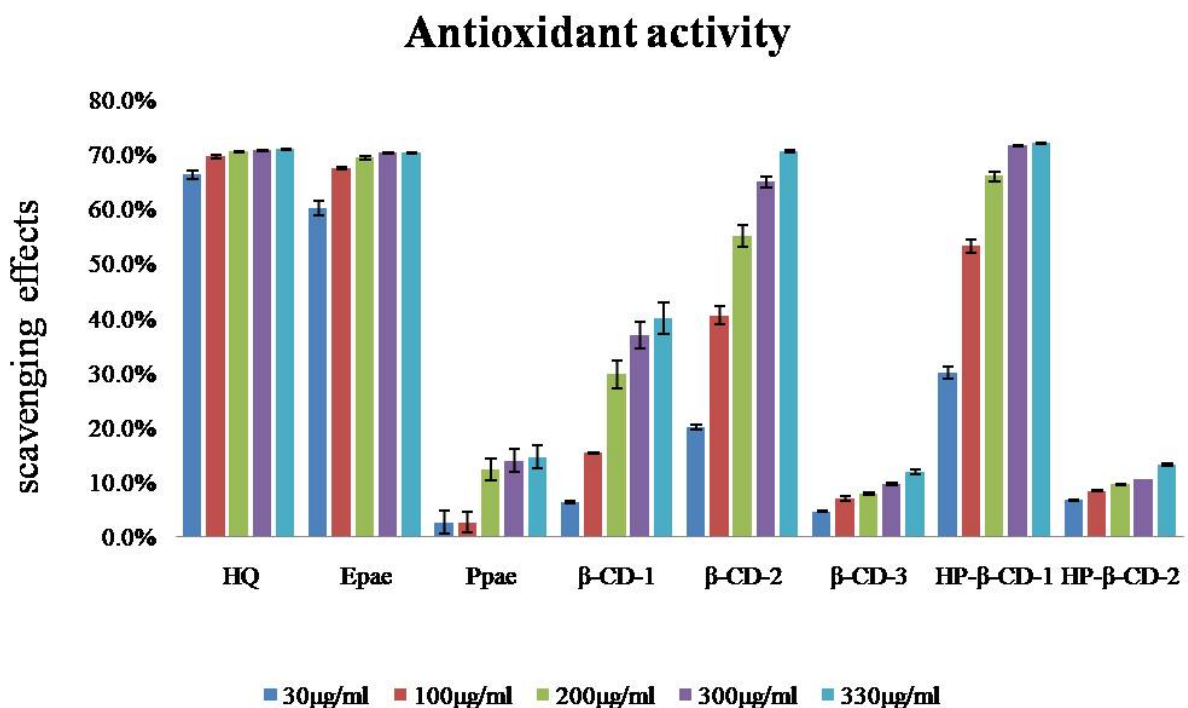


圖 4.11 藥物及奈米包覆藥物對  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl ( DPPH ) 自由基清除能力之比較。

## 五、中藥萃取物對美白的有效能力

### 5.1 HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力

HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮不同濃度樣品，各取 50  $\mu\text{l}$  加 20  $\mu\text{l}$  0.1M PBS，再加入 Tyrosine 試 79  $\mu\text{l}$ ，最後加入 1  $\mu\text{l}$  Tyrosinase 於 37  $^{\circ}\text{C}$  incubator 中 30 分，測定 475 nm 吸光值。HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮給藥濃度為 0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml。實驗結果顯示(圖 4.12)，在 475 nm 吸光值下，HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮均具有抑制酪胺酸酶能力。

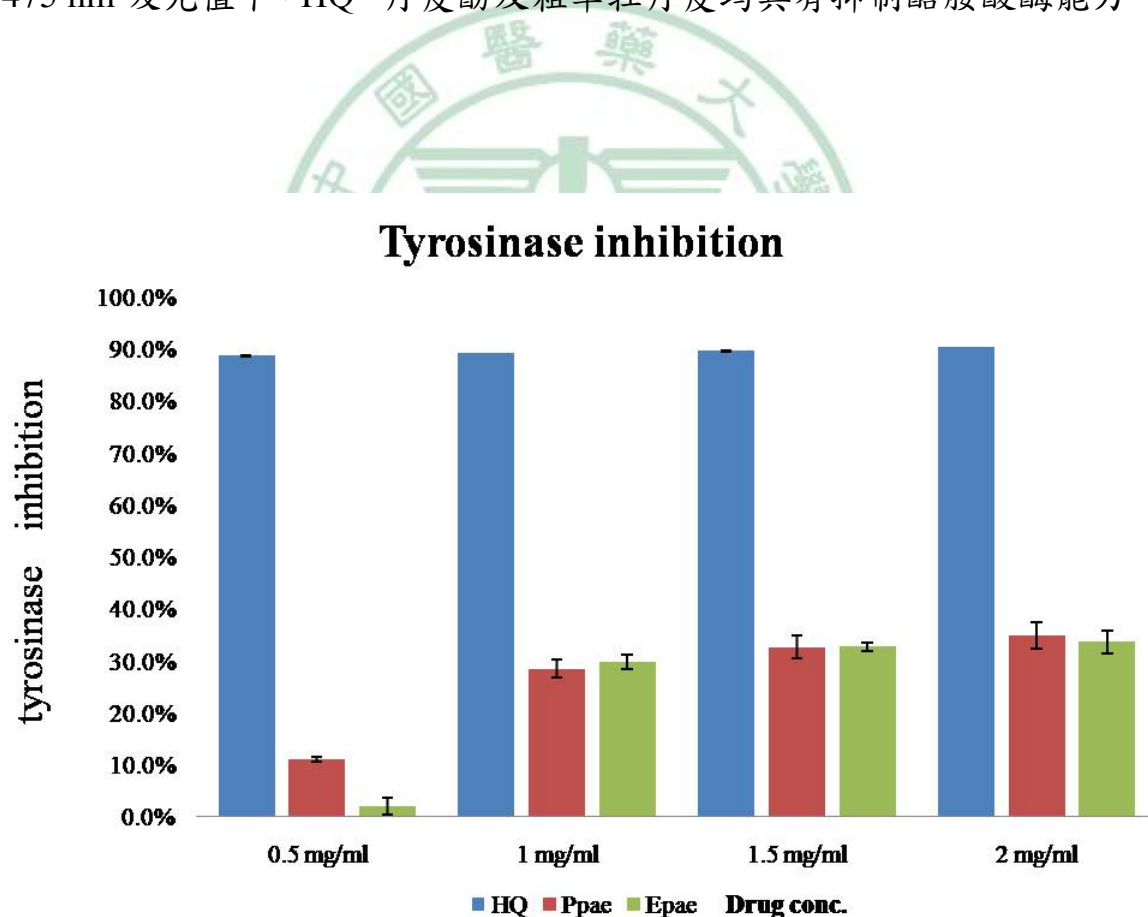


圖 4.12 HQ、丹皮酚及粗萃牡丹皮對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力。

## 5.2 奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力評估

不同包覆組成的奈米包覆藥物及  $\beta$ -環糊精，分取不同濃度樣品，各取 50  $\mu\text{l}$  加 20  $\mu\text{l}$  0.1M PBS，再加入 Tyrosine 試液 79  $\mu\text{l}$ ，最後加入 1  $\mu\text{l}$  Tyrosinase 於 37°C incubator 中 30 分，測定 475 nm 吸光值。給藥濃度為 0.5 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml。結果顯示(圖 4.13)，不同包覆組成的奈米包覆藥物均具有抑制酪胺酸酶能力，以 HP- $\beta$ -CD-2 最好，HP- $\beta$ -CD-1、 $\beta$ -CD-2 及  $\beta$ -CD-3 的效果比  $\beta$ -CD-1 好，而  $\beta$ -環糊精不具任何抑制能力。

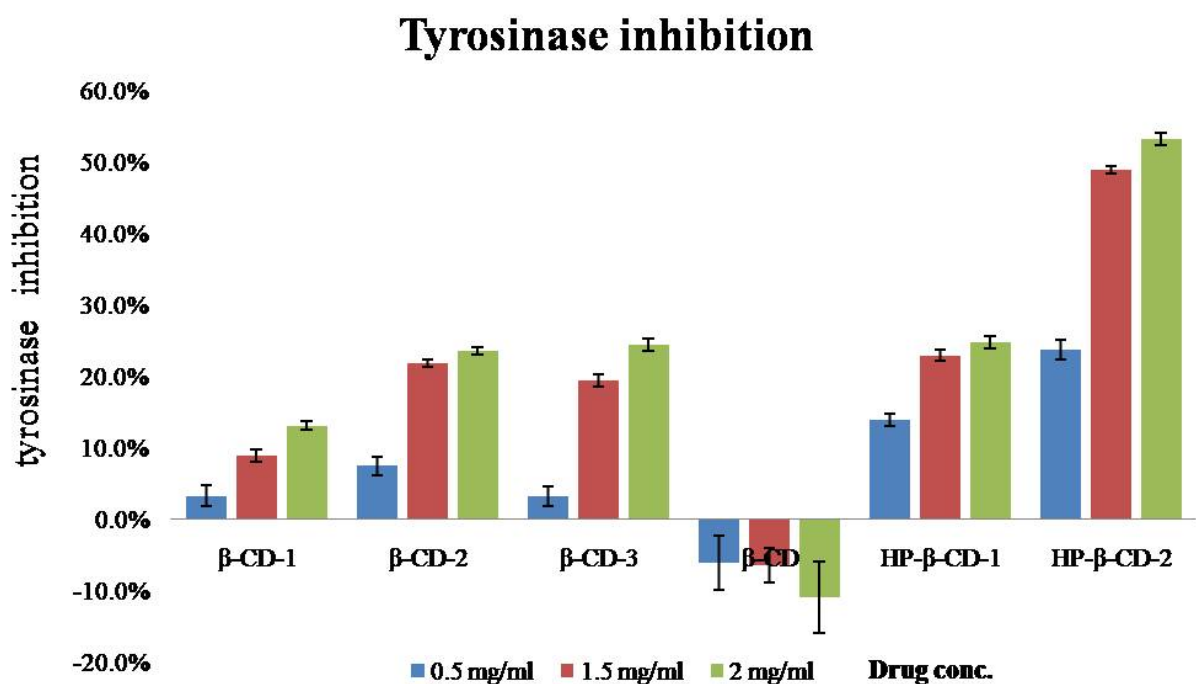


圖 4.13 奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力。

### 5.3 藥物及奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力比較

將上述藥物及不同包覆組成的奈米包覆藥物實驗結果做比較，看相同濃度範圍內的粗萃奈米包覆藥物的抑制酪胺酸酶能力。給藥濃度為 0.5 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml。實驗結果顯示(圖 4.14)，在吸收波長 475 nm 下，藥物及不同包覆組成的奈米包覆藥物均具有抑制酪胺酸酶能力。整體而言，HP- $\beta$ -CD-2 在給藥濃度達 1.5 mg/ml 時，抑制 tyrosinase 能力可達 50%。

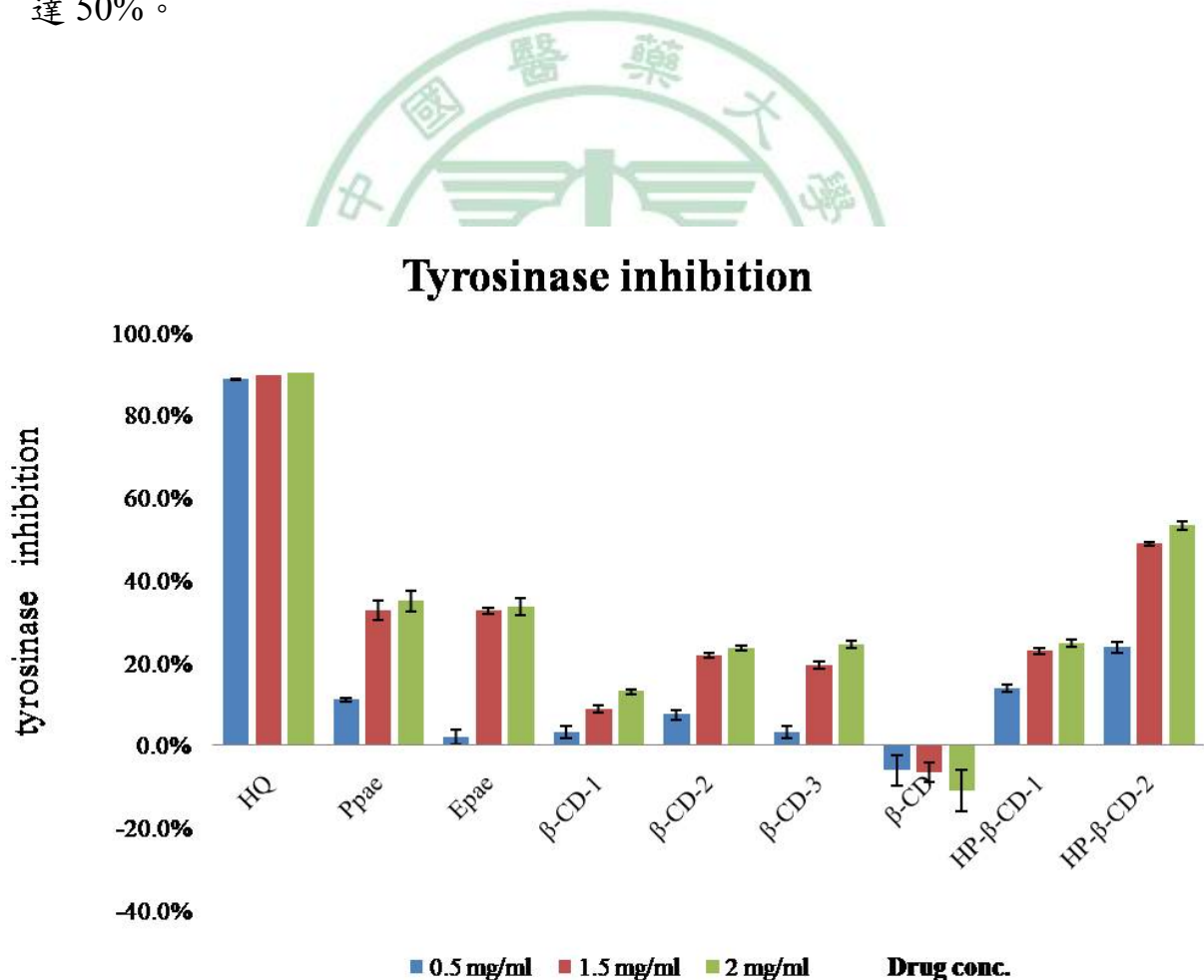


圖 4.14 藥物及奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力比較。

#### 5.4 粗萃及標準品的 HP- $\beta$ -環糊精奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力比較

粗萃及標準品的 HP- $\beta$ -環糊精奈米包覆藥物分別為 HP- $\beta$ -CD-1 及 HP- $\beta$ -CD-2，給藥濃度為 0.5 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml、4 mg/ml、6 mg/ml。結果顯示(圖 4.15)，HP- $\beta$ -CD-1 及 HP- $\beta$ -CD-2 均具有抑制酪胺酸酶能力，在 0.5~2 mg/ml 時，丹皮酚的 HP- $\beta$ -CD-2 表現比粗萃牡丹皮的 HP- $\beta$ -CD-1 好。而當給藥濃度達到較高的 3 mg/ml 時，實驗結果顯示(圖 4.16)，HP- $\beta$ -CD-1 及 HP- $\beta$ -CD-2 的抑制酪胺酸能力則沒有太大差異，且都可達抑制率 50%。

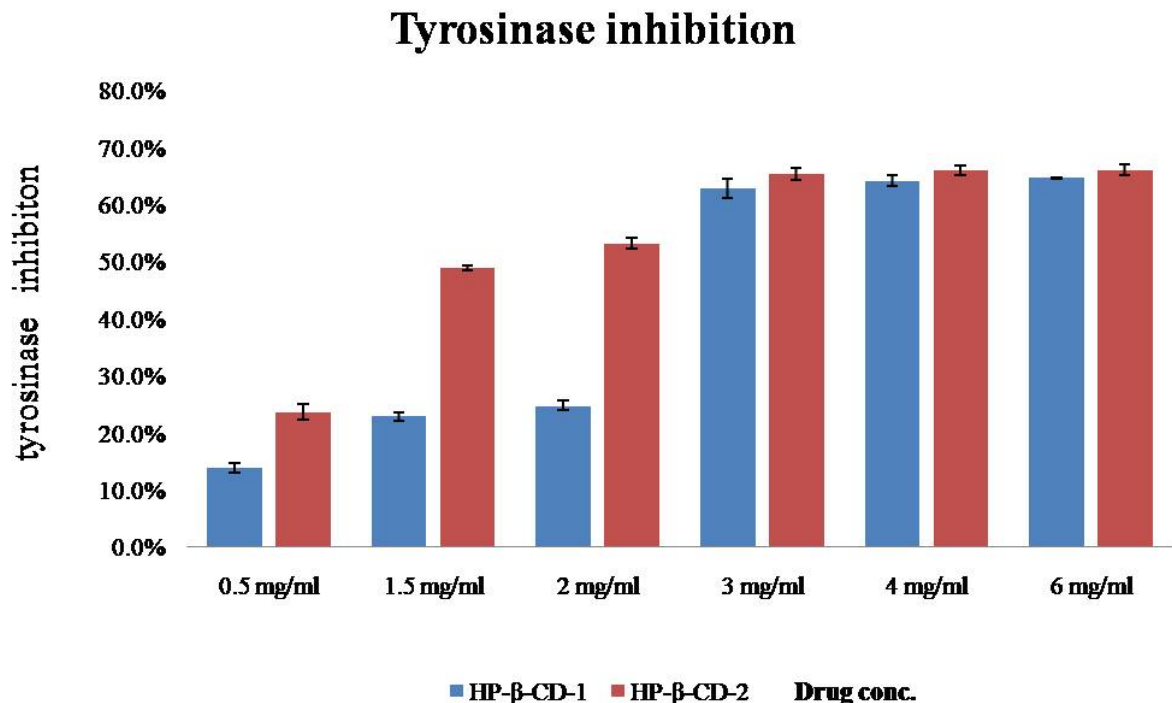


圖 4.15 粗萃及標準品的 HP- $\beta$ -環糊精奈米包覆藥物對 Tyrosinase inhibition 的美白有效能力比較。



## 第五章、討論

根據奈米包覆藥物的水溶性實驗結果顯示，本研究進行之粗萃奈米包覆藥物  $\beta$ -CD complex，可以溶解在純水中，並且呈現透明水溶液狀態；此一結果與  $\beta$ -環糊精可以溶解於水中，並呈現透明水溶液狀態相同；另外，看到牡丹皮粗萃膠置入純水中後，會呈現渾濁無法溶解的狀態，皆與本研究製備出之粗萃奈米包覆藥物及環糊精的水溶性相異。因此，本實驗證明了環糊精確實可將非水溶性的成分包覆成一複合體，並轉換特性成水溶性狀態提供應用。

由於丹皮酚在 274 nm 具有最大吸收波長，因此，利用 UV spectrometer 測試粗萃奈米包覆藥物。從實驗結果看到，環糊精在 274 nm 波長吸光值趨近於 0，而丹皮酚以及粗萃牡丹皮均在 274 nm 有最大吸光值；而粗萃奈米包覆藥物在 274 nm 吸收波長下，吸光值減少。由於吸光值的相異，是來自被包覆的分子其週遭環境與未包覆分子不同。因此，我們認為粗萃物確實已經包覆進入環糊精中，才会有在 274 nm 吸收波長下，丹皮酚、粗萃牡丹皮、環糊精及粗萃奈米包覆藥物吸光值差異性的產生。

為了更進一步確認粗萃奈米包覆藥物的包覆狀態，進行了 NMR 實驗。根據 NMR 實驗結果顯示，從 NMR 光譜圖中可以看到，在環糊精、丹皮酚奈米包覆藥物、不同包覆條件下產生的  $\beta$ -CD-1 及  $\beta$ -CD-2，在環

糊精環內相同位置上的氫，波峰會產生不同的化學位移。NMR 圖譜中，在環糊精環內的 H3 及 H5，分別位於 4 與 3.9 的位置上；在丹皮酚奈米包覆藥物圖譜上，環內氫的 H3 及 H5 的波峰已經移動到分別是 3.94 及 3.8 的位置上；最後看到不同包覆條件下產生的  $\beta$ -CD-1 及  $\beta$ -CD-2 粗萃奈米包覆藥物， $\beta$ -CD-1 其環內氫的 H3 及 H5 分別位移到 3.96 和 3.84， $\beta$ -CD-2 則是移動到了 3.94 與 3.82。當波峰移動的範圍越大表示包覆效果越好。由於粗萃物並非純物質，因此我們從不同包覆條件下產生的  $\beta$ -CD-1 及  $\beta$ -CD-2 其波峰所移動的位置看來，似乎添加較多的粗萃物所製備出的粗萃奈米包覆藥物，其波峰的化學位移比較接近丹皮酚奈米包覆藥物。因此，我們可以推測，當加入的粗萃物含量越高時，可以使環糊精對目標客分子的包覆率增加。另外，由進行粗萃奈米包覆藥物的實驗過程中，測試多種不同條件下的包覆作用得到一些資訊。在粗萃奈米包覆藥物製備過程中，包覆藥物過程中的溫度、時間、加入粗萃物(或環糊精)的量等，都是影響包覆率的變因。我們發現在粗萃奈米包覆藥物的製備中，由於牡丹皮粗萃物是混合物 無法有效控制其當量讓藥物有效的進行包覆，所以牡丹皮粗萃物和環糊精的重量比可能最為重要。

在抗氧化活性評估試驗中，我們可以發現 HQ 與粗萃牡丹皮的抗氧化性能力相近；而丹皮酚的抗氧化性能力卻較差。根據之前的論文提到牡丹皮中的丹皮酚具有抗氧化能力，從本實驗中看到丹皮酚確實是有抗

氧化力，但在粗萃物效果比丹皮酚好的結果看來，也許牡丹皮中抗氧化能力最好的不是丹皮酚，但在粗萃物抗氧化的效果和 HQ 不分軒輊的結果，也證明牡丹皮確實是很好的天然抗氧化藥材。而在環糊精奈米包覆藥物抗氧化性能的試驗裡，我們發現不同包覆組成的奈米包覆藥物均具有清除自由基能力。但奈米包覆藥物以 HP-β-CD-1 效果最好且略優於 β-CD-2，而此兩者效果遠優於其他奈米包覆藥物。推測是由於 HP-β-CD 具有 -OH 基，親水性優於 β-CD 所以效果較好，而 β-CD-2 清除自由基效果優於 β-CD-1 的原因，可能在於包覆製備時所加入的粗萃物含量較高，因此包覆程度較好也較多，而影響到清除自由基能力的差異。當我們將藥物組和奈米包覆藥物組的清除自由基能力合併來看時，可以發現不同組成份的包覆奈米藥物，其抗氧化活性不同，甚至 HP-β-CD-1 的清除自由基效果略高於 HQ。當 HP-β-CD-1 給藥濃度到了 200 μg/ml 而 β-CD-2 當給藥濃度到了 300 μg/ml 時，其清除自由基的能力也與 HQ、粗萃丹皮酚相差無幾。而同樣都是 HP-β-環糊精，因為包覆物的不同也使的清除自由基能力有所差異，包覆粗萃物的 HP-β-CD-1 抗氧化力就比包覆丹皮酚的 HP-β-CD-2 來的好上許多。這也與我們藥物組所作出來的結果相同。

在抑制酪胺酸酶活性評估試驗中，我們可以發現 HQ 的抑制酪胺酸酶活性能力可達 80% ，而粗萃物和丹皮酚的抑制酪胺酸酶活性能力與

HQ 相比則較差；而粗萃物和丹皮酚的在抑制酪胺酸酶活性相似，但是抗氧化性差異的不同上，可以看到粗萃物抗氧化性比丹皮酚高。根據之前的論文提到牡丹皮中的丹皮酚具有抑制酪胺酸酶活性能力，從本實驗中看到丹皮酚確實是有抑制酪胺酸酶活性能力。而在粗萃奈米包覆藥物抗氧化性能力的試驗裡，我們發現不同包覆組成的奈米包覆藥物均具有抑制酪胺酸酶活性能力。以包覆純丹皮酚的 HP- $\beta$ -CD-2 的抑制效果最好，而粗萃奈米包覆藥物 HP- $\beta$ -CD-1 效果略優於  $\beta$ -CD-2、 $\beta$ -CD-3，而此兩者效果遠優於  $\beta$ -CD-1。因此，推測由於 HP- $\beta$ -CD 具有-OH 基，親水性優於  $\beta$ -CD 所以效果較好。而  $\beta$ -CD-2 抑制酪胺酸酶活性效果優於  $\beta$ -CD-1，也與抗氧化試驗中我們看到的結果一樣。因此，我們從上述結果推論，包覆製備時所加入的粗萃物含量較高，會導致包覆程度較好也較多，而影響到藥物作用能力的差異。

在實驗進行中也發現溶劑不同會造成藥物溶解後狀態不同。DPPH test 用的溶劑是 50% 乙醇；Tyrosinase inhibition test 用的是 10% DMSO，HQ 在兩樣溶劑中的溶解度由外觀看來並無差異，但是丹皮酚及粗萃牡丹皮在兩樣不同溶劑下就有外觀上差異。丹皮酚與粗萃牡丹皮在 50% 乙醇中溶解度很好，不會有混濁狀態產生；而使用 10% DMSO 當作溶劑時，丹皮酚與粗萃牡丹皮均出現渾濁現象。在 Tyrosinase inhibition test 中，因為抑制目標為蛋白質無法使用乙醇當溶劑，會造成蛋白質降解。

嘗試過使用 50% DMSO，但實驗結果會與使用乙醇當溶劑一樣影響反應目標。因此，我們可以用來解釋為什麼在 Tyrosinase inhibition test 中，藥物組與奈米包覆藥物組的抑制率並無法太高；可以確定的是，在 Tyrosinase inhibition test 結果中，藥物組與奈米包覆藥物組抑制率隨著濃度增加而逐漸爬升，因此推測再繼續增加濃度會使抑制率增加。但由於藥物及  $\beta$ -環糊精的溶解度有限，繼續往高濃度進行會造成誤差而失去意義，因此  $\beta$ -環糊精實驗到這不再繼續探討下去。

另外，我們將由水溶性極佳的 HP- $\beta$ -環糊精所包覆之粗萃奈米包覆藥物 HP- $\beta$ -CD-1 及包覆丹皮酚的 HP- $\beta$ -CD-2 來做比較，看抑制酪胺酸酶的能力。發現包覆丹皮酚的 HP- $\beta$ -CD-2 在 1.5 mg/ml 則可達到 50% 的抑制率，比起 HP- $\beta$ -CD-2 來的效果好很多。而當 HP- $\beta$ -CD-1 及 HP- $\beta$ -CD-2 給藥濃度都達到 3 mg/ml 時，抑制酪胺酸酶的能力都可達到 60% 以上，且兩組藥物差異彼此減小至抑制能力相當。在這組實驗中看到的結果推測，丹皮酚由於為脂溶性成分在水溶液中溶解度有限，因此由當溶解度也有限的  $\beta$ -環糊精所包覆時，其抑制酪胺酸酶的能力就不顯著；反觀由溶解度極佳的 HP- $\beta$ -環糊精所包覆時，無論丹皮酚或粗萃物的抑制酪胺酸酶能力都隨濃度增加而增加。

由本研究實驗結果得到訊息，我們認為當在特定條件下時，環糊精並不會減低牡丹皮粗萃物活性，也不會導致粗萃物清除自由基及抑制

酪胺酸酶活性消失。當濃度足夠時，粗萃奈米包覆藥物也可能達到與原來藥物相仿的效用，證實環糊精確實可將脂溶性成分包覆並轉換其化學性質，且不影響原本成分的活性與功效。而 HP- $\beta$ -環糊精具有-OH 基，親水性優於  $\beta$ -環糊精，所以在實驗中看到的效果較好。從實驗中發現，牡丹皮粗萃物的抗氧化性優於丹皮酚；丹皮酚的抑制酪胺酸酶能力則略優於牡丹皮粗萃物，但不論粗萃物或丹皮酚經包覆後，達到一定濃度時抑制酪胺酸酶的能力會慢慢接近。 $\beta$ -環糊精具有經 FDA 認可及成本較低的優勢；HP- $\beta$ -環糊精則是親水性好且在室溫下即可製備，不受溫度限制的優點。本研究主要目的探討環糊精包覆中草藥後的應用，目前實驗結果證實此一包覆技術可行，而後續可以進行改善包覆技術且進行生物利用度的實驗，去加以佐證環糊精奈米包覆藥物在中草藥上帶來的製劑技術突破。

## 第六章、結論

本研究進行實驗證實牡丹皮粗萃包覆奈米藥物已成功製備，並獲得 UV 及 NMR 分析儀器鑑定證實其成份，並且將此粗萃包覆奈米藥物置入水中時，會呈現透明水溶液態，證明牡丹皮粗萃包覆奈米藥物具有良好的水溶性。而從 DPPH test 中得知牡丹皮粗萃物抗氧化活性比丹皮酚高，環糊精(CD)並不會導致粗萃物抗氧化活性消失，且不同組成份牡丹皮粗萃包覆奈米藥物，其抗氧化活性不同；而從 Tyrosinase inhibition test 中，也得知牡丹皮粗萃物抑制酪胺酸酶活性所需濃度較高，而使用的限制也較多。就正向而言，環糊精(CD)並不會導致粗萃物抑制酪胺酸酶活性消失，不同組成份粗萃包覆奈米藥物，其抑制酪胺酸酶活性不同。

從抗氧化活性測試及抗氧化美白測試中且在特定條件下，看到了環糊精並未導致牡丹皮粗萃物活性消失。而 HP- $\beta$ -環糊精具有-OH 基，水溶性比  $\beta$ -環糊精好且包覆後的效用也較佳。所做實驗都證實環糊精確實可將脂溶性成分包覆並轉換其化學性質，且不影響原本成分的活性與功效。而粗萃奈米包覆藥物過程中的溫度、時間、加入粗萃物(或環糊精)的量等，都是影響包覆率的變因。其中，牡丹皮粗萃物和環糊精的重量比最為重要。預期此水溶性奈米藥物，未來將可擴大脂溶性中藥應用層面。

## 參考文獻

1. 行政院農業委員會，發展科技中草藥產業國際研討會報告，台灣，2008.
2. 江蘇新醫學院，中藥大辭典，上海科學技術出版社，1999.
3. 中華人民共和國國家藥典委員會，中華人民共和國藥典一部，化學工業出版社，2005.
4. 原思通：醫用中藥飲片學。中華人民共和國人民衛生出版社，2001.
5. Wang X, Cheng C, Sun Q, Li F, Liu J, Zheng C. Isolation and purification of four flavonoid constituents from the flowers of *Paeonia suffruticosa* by high-speed counter-current chromatography. *Chromatogr A*. 2005 ;1075(1-2):127-31.
6. Matsuda H, Ohta T, Kawaguchi A, Yoshikawa M. Bioactive constituents of chinese natural medicines. VI. Moutan cortex. (2): structures and radical scavenging effects of suffruticosides A, B, C, D, and E and galloyl-oxypaeoniflorin. *Chem Pharm Bull* 2001; 49(1):69-72.
7. Yoshikawa M, Ohta T, Kawaguchi A, Matsuda H. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. V. Radical scavenging effect of Moutan Cortex. (1): Absolute stereostructures of two monoterpenes, paeonisuffrone and paeonisuffral. *Chem Pharm Bull*. 2000; 48(9):1327-31.
8. Lin HC, Ding HY, Wu YC. Two novel compounds from *Paeonia suffruticosa*. *J Nat Prod*. 1998; 61(3):343-6.
9. Yoshikawa M, Uchida E, Kawaguchi A, Kitagawa I, Yamahara J.



- Galloyl-oxypaeoniflorin, suffruticosides A, B, C, and D, five new antioxidative glycosides, and suffruticoside E, A paeonol glycoside, from Chinese moutan cortex. *Chem Pharm Bull.* 1992; 40: 2248–50.
10. Rho S, Chung HS, Kang M, Lee E, Cho C, Kim H, et al. Inhibition of production of reactive oxygen species and gene expression profile by treatment of ethanol extract of moutan cortex radices in oxidative stressed PC12 cells. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 661–6.
11. Chen G, Zhang L, Zhu Y. Determination of glycosides and sugars in Moutan Cortex by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 41: 129–34.
12. An RB, Kim HC, Lee SH, Jeong GS, Sohn DH, Park H, Kwon DY, Lee JH, Kim YC. A new monoterpene glycoside and antibacterial monoterpene glycosides from *Paeonia suffruticosa*. *Arch Pharm Res.* 2006; 29(10):815-20.
13. Ma Y, Liu J, Sun W. Effect of Moutan cortex on dynamics of blood stream in ischemic dog model. *Shanxi Medicine.* 1984; 13: 212–4.
14. Shi-Hai Xie, Zhi-Qiang Chen, Peng-Cheng Ma. Down-regulation of melanin synthesis and transfer by paeonol and its mechanisms. *Am J Chin Med.* 2007; 35(1):139–151.
15. 黃泰卿：中藥對酪胺酸酵素活性的影響，靜宜大學應用化學研究所碩士論文，台中，1995.
16. Bologna JL, Pawelek JM. Biology of hypopigmentation. *J Am Acad Dermatol.* 1988; 19: 217-255.
17. Riley PA, Cooney CJ, Johnson CI, Land EJ, Latter AM, Ransden CA. Melanogenesis-targeted anti-melanoma pro-drug development :

- effect of side-chain variations on the cytotoxicity of tyrosinase-generated ortho-quinones in a model screening system. *Eur J Cancer*. 1997; 33: 135-143.
- 18.Orlow SJ. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol*.1995; 105: 3-7.
- 19.Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Res*. 2000; 13: 103-109.
- 20.Hearing VJ, Jimenez M. Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem*. 1987; 19: 1141-1147.
- 21.Mountjoy KG. The human melanocyte stimulating hormone receptor has evolved to become “super-sensitive” to melanocortin peptides. *Cell Endocrinol*. 1994; 102: R7-R11.
- 22.Prota G. Melanins and Melanogenesis. *Cosmetic and Tolletries Magazine*. 1996; 111: 43-51.
- 23.Pawelek JM, Konor AM. The Biosynthesis of Mammalian Melanin. *American Scientist*. 1982; 70: 136-145.
- 24.Lerner AB, Fitzpatrick TB. Biochemistry of Melanin Formation. *Physiol.Rev*. 1950; 30: 91-126.
- 25.Fuller BB, Lunsford JB, Iman DS.  $\alpha$  -melanocyte-stimulating hormone regulation of tyrosinase in cloudman S-91 melanoma cell culture. *J bio Chem*. 1987; 262: 4024-4033.
- 26.Jimenez M, Kameyama K, Maloy WL, Tomita Y, Hearing VJ. Mammalian Tyrosinase : biosynthesis, processing, and modulation by

- melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 85(11): 3830-4.
27. Fuller BB, Viskochil DH. The role of RNA and protein synthesis in mediating the action of MSH on mouse melanoma cells. *Life Sci.* 1979; 24(26): 2405-15.
28. Wong G, Pawelek J. Melanocyte-stimulating hormone promotes activation of pre-existing tyrosinase molecules in Cloudman S91 melanoma cells. *Nature.* 1975; 19; 255(5510): 644-6.
29. Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F, García-Carmona F. Tyrosinase : a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1247(1): 1-11.
30. Jara JR, Solano F, Garcia-Borron JC, Aroca P, Lozano JA. Regulation of mammalian melanogenesis. II: The role of metal cations. *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1035(3): 276-85.
31. Romero C, Aberdam E, Larnier C, Ortonne JP. Retinoic acid as modulator of UVB-induced melanocyte differentiation. Involvement of the melanogenic enzymes expression. *J Cell Sci.* 1994; 107(Pt 4): 1095-103.
32. Manning JM, Meister A. Conversion of praline to collagen hydroxyproline. *Biochemistry.* 1966; 5: 1154-1165.
33. Maeda K, Fukuda M. Arbutin : mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *Pharmacol & Experimental Ther.* 1996; 276: 765-769.
34. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev* 1998; 98: 1743–53.

35. Dass CR, Jessup W. Apolipoproteins A-I, Cyclodextrins and liposomes as potential drugs for the reversal of atherosclerosis. *J Pharm Pharmacol.* 2000; 52: 731–61.
36. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: 1. Drug solubilisation and stabilization. *J Pharm Sci.* 1996; 85: 1017–25.
37. Muñoz-Botella S, Castillo B, Martín MA. Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. *Ars Pharm.* 1995; 36: 187–98.
38. Stella VJ, Rajewski RA. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm Res.* 1997; 14: 556–67.
39. Matsuda H, Arima H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999; 36: 81–99.
40. Buschmann HJ, Schollmeyer E. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *J Cosmet Sci.* 2002; 53: 185–91.
41. Koukietolo R, Desseaux V, Moreau Y, Marchis MG, Santimone M. Mechanism of porcine pancreatic alpha-amylase inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins. *Eur J Biochem.* 2001; 268: 841–8.
42. Mabuchi N, Ngoa M. Controlled release powdered flavour preparations and confectioneries containing preparations. *Japanese Patent JP.* 2001; 128: 638.
43. Hirose T, Yamamoto Y. Hinokitol containing cyclo-olefin polymer compositions and their molding with excellent antimicrobial and gas barrier properties. *Japanese Patent JP.* 2001; 55480.

44. 關家彥. 岩白菜素包結物的研製[J]. 中成藥. 1991; 13(1).
45. 文宗河, 李萍, 王建華. 丹皮酚- $\beta$ -環糊精包合物的製備研究[J]. 製劑技術. 2005; 14(4).
46. 吳佩穎, 徐蓮英, 陶建生. 難溶性藥物增溶方法研究進展[J]. 中成藥. 2005; 27(9).
47. 中國醫學科學院藥用植物資源開發研究所. 中藥志(第五冊). 北京: 人民衛生出版社. 1994.
48. 朱盛山. 藥物新劑型[M]. 北京: 化學工業出版社. 2003.
49. 趙忠孝等. 小兒肺炎沖劑中魚腥草揮發油 $\beta$ -環糊精包合工藝研究[J]. 陝西中醫. 2005; Vol.26 : No.5.
50. 史成和等. 引流熊膽- $\beta$ -環糊精包合物的研究[J]. 中國藥學雜誌. 1999; 34(1).
51. 奚念術, 顧學裘. 藥劑學[M]. 第2版. 北京: 人民衛生出版社. 1990.
52. 朱曉薇等. 天津藥學. 1997; 9(2): 38.
53. 張崇璞等. 環糊精及其包合物在藥劑學上的應用[J]. 藥學通報. 1987; 22(2).
54. 謝秀瓊. 現代中藥製劑新技術[M]. 北京: 化學工業出版社. 2004.
55. 聶淑芳, 潘衛三, 郭宏. 環糊精在靶向給藥系統中的應用[J]. 藥品評價. 2005; 2(1).
56. H Imata, K Kubota, K Hattori et al. The specificity of association

- 57.郭文生等. 利用主客體分子包結現象選擇分離蛇床子有效成分的方法[J]. 藥學學報. 1994; 29(11).
- 58.汪寶琪等. 秦皮甲素、乙素在兔體內的藥代動力學研究[J]. 瀋陽藥科大學學報. 1998; 15(1).
- 59.Schneiderman E, Stalcup AM. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J Chromatogr B*. 2000; 745: 83–102.
- 60.Fujishima N, Kusaka K, Umino T, Urushinata T, Terumi K. Flour based foods containing highly branched cyclodextrins. *Japanese Patent JP*. 2001; 136: 898.
- 61.Bhardwaj R, Dorr RT, Blanchard J. Approaches to reducing toxicity of parenteral anticancer drug formulations using cyclodextrins. *J Pharm Sci Technol*. 2000; 54: 233–9.
- 62.Holland L, Rizzi G, Malton P. Cosmetic compositions comprising cyclic oligosaccharides and fragrance. *PCT Int Appl WO*. 1999; 67: 716.
- 63.Lezcano M, Ai-Soufi W, Novo M, Rodriguez-Nunez E, Tato JV. Complexation of several benzimidazole-type fungicides with alpha and beta-cyclodextrins. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 108–12.
- 64.Dufosse L, Souchon I, Feron G, Latrasse A, Spinnler HE. In situ detoxification of the fermentation medium during gamma Dufosse L,

- Souchon I, Feron G, Latrasse A, Spinnler HE. In situ detoxification of the fermentation medium during gammadecalactone production with the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biotechnol Prog.* 1999; 15: 135–9.
65. Hedges RA. Industrial applications of cyclodextrins. *Chem Rev.* 1998; 98: 2035–44.
66. Schmid G. Cyclodextrin glucanotransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends Biotechnol.* 1989; 7: 244–8.
67. Muller BW, Brauns U. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin derivatives: influence of average degree of substitution on complexing ability and surface activity. *J Pharm Sci.* 1986; 75: 571-572.
68. Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech.* 2005; 6(2): E329-57.
69. Brewster ME and Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59: 645-666.

# **The inclusion complexes of Moutan Cortex extract with cyclodextrin: preparation and application**

**Kuan-Chia Peng**

**Major Professor: Yu-hsin Tsai**

**Co-advisor: Fuu-jen Tsai**

**Graduate Institute of Chinese Medical Science**

**China Medical University**

Moutan Cortex (Cortex moutan radices), a widely used traditional Chinese medicine for the treatment of various diseases. A variety of compounds in Moutan Cortex that Paeonol, a major phenolic component. A phenolic extract of Moutan Cortex has been reported to exhibit DPPH radical-scavenging activity. Cyclodextrins (CDs) are a family of cyclic oligosaccharides that are composed of  $\alpha$ -1,4-linked glucopyranose subunits. Cyclodextrins are most important. Because of their inclusion complex forming capability, the properties of the materials with which they complex can be modified significantly. The aim of this study was to prepare inclusion complexes of the paeonol that extraction of Moutan Cortex with CD in order to improve their water-solubility, and studied antioxidant activity and tyrosinase inhibition for drug and CD complex. CD complex analyzed by UV spectrometer and  $^1\text{H-NMR}$  (Nuclear magnetic resonance). Modified L-Tyrosine method was used to determine tyrosinase inhibition activity. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging method was used to determine the antioxidant activities ability.



Keyword : Moutan Cortex 、 paeonol 、 cyclodextrins 、 melanin 、 inclusion



## 謝辭

轉眼又是一階段的路途過去，完成了也許是幾年內最後一個學歷的人生歷練。兩年前跨進了自己陌生的學術領域求學，在跨進這一步時常思索著：「我想做研究嗎？」，畢竟對自身而言，研究從不是我個性與目標中的一環人生規劃。感謝蔡育勳老師這兩年來對我課業上的指導與訓練，更教給了我的人生歷練中提供我即將可能遭遇的意見與建言，教我學會了 real life，培養邏輯及表達的能力。感謝我的父母，彭金榮先生與張麗英女士，由於他們對我教育上的堅持及支持，讓我無後顧之憂完成到目前為止的學位；感謝我的兄弟死黨們，弟、阿慶、洲仔、威任、哇靠、勇論、馬臉、阿包、式奇、小幽、宜蓁、蚊子、筱筑、慧茹、萍嵐、湘綺、NiNi、薰云、柚子、小泡、郭子和玄毛，你們總是在我需要時聽我說話及給我建議；感謝忠榮學長、美華學姊、欽木學長、憶帆、凡妮、碧玉還有後來陪我度過碩二的怡慧、小尤及至穎，在學校裡及實驗上的問題總是給我許多幫忙；中醫所的同學們，高興能和你們一起度過這兩年的時光。最後感謝這兩年一直陪我走過的王小珺，妳的獨立讓我可以全心完成這個階段的人生歷練。

兩年可長可短，但最重要是能否影響自己人生規畫的路程，找出屬於自己的路。有無限感謝、千言萬語難以形容，謹以此論文獻給我的家人及所有關心我、幫助我的朋友們。