



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I396552B1

(45) 公告日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 21 日

(21) 申請案號：098140277

(22) 申請日：中華民國 98 (2009) 年 11 月 26 日

(51) Int. Cl. : *A61K8/04* (2006.01) *A61K8/37* (2006.01)
 A61K8/86 (2006.01) *A61Q1/00* (2006.01)

(71) 申請人：國立臺灣大學 (中華民國) NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY (TW)
 臺北市大安區羅斯福路 4 段 1 號

(72) 發明人：蔣丙煌 CHIANG, BEEN HUANG (TW)；李柏憲 LI, PO HSIEN (TW)

(74) 代理人：李保祿

(56) 參考文獻：

WO 2009/067734A1

審查人員：傅玉妃

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：11 共 0 頁

(54) 名稱

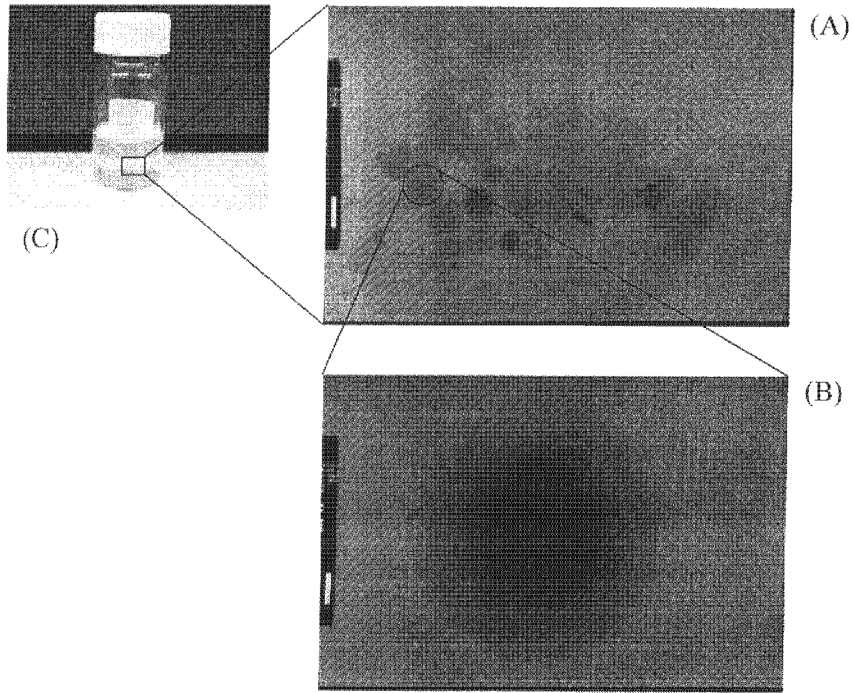
具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體及其製備方法

ENHANCING TRANSDERMAL PENETRATION NANOEMULSION AND METHOD FOR
 PREPARING THE SAME

(57) 摘要

一種具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體，包括：一 2~9wt% 混合界面活性劑，該混合界面活性劑是由山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)與聚氧乙烯 10 油醚(Brij97)兩種界面活性劑組成，該混合界面活性劑的 HLB 值為 11~12；一共同界面活性劑，該共同界面活性劑為乙二醇，其比例為 1wt%；一分散相，該分散相為 5~15wt% 萜烯類(terpene)物質，該分散相與該混合界面活性劑的比例(So ratio)為 0.4~0.6；以及一連續相，該連續相為去離子水，其比例為 80~92wt%。

A enhancing transdermal penetration nanoemulsion, comprising: a 2~9% mixed surfactant, consisting of sorbitan trioleate (Span 85) and polyoxyethylene (10) oleyl ether (Brij97), wherein said mixed surfactant having a HLB value of 11~12; a co-surfactant, which is 1 wt% ethanol; a dispersed phase, which is 5~15 wt% terpene; wherein the ratio of said dispersed phase to said mixed surfactant (So ratio) is 0.4~0.6; and a continuous phase, which is 80~92 wt% deionized water.



圖八

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：98140211

※ 申請日：98 11 26

※IPC 分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

A61K 8/64 (2006.01)
 A61K 8/37 (2006.01)
 A61K 8/86 (2006.01)
 A61Q 1/0 (2006.01)

具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體及其製備方法/
 ENHANCING TRANSDERMAL PENETRATION NANOEMULSION
 AND METHOD FOR PREPARING THE SAME

二、中文發明摘要：

一種具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體，包括：一 2~9 wt% 混合界面活性劑，該混合界面活性劑是由山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)與聚氧乙稀 10 油醚(Brij97)兩種界面活性劑組成，該混合界面活性劑的 HLB 值為 11~12；一共同界面活性劑，該共同界面活性劑為乙二醇，其比例為 1 wt%；一分散相，該分散相為 5~15 wt% 萜烯類(terpene)物質，該分散相與該混合界面活性劑的比例(So ratio)為 0.4~0.6；以及一連續相，該連續相為去離子水，其比例為 80~92 wt%。

三、英文發明摘要：

A enhancing transdermal penetration nanoemulsion, comprising: a 2~9% mixed surfactant, consisting of sorbitan trioleate (Span 85) and polyoxyethylene (10) oleyl ether (Brij97), wherein said mixed surfactant having a HLB value of 11~12; a co-surfactant, which is 1 wt% ethanol; a dispersed phase, which is 5~15 wt% terpene; wherein the ratio of said dispersed phase to said mixed surfactant (So ratio) is 0.4~0.6; and a continuous phase, which is 80~92 wt% deionized water.

四、指定代表圖：

- (一)本案指定代表圖為：第(八)圖。
- (二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：
無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體及其製備方法，特別是指一種以奈米乳化型載體方式來包覆 d-limonene，藉由奈米乳化型載體來加強 d-limonene 促進皮膚穿透效果的載體。

【先前技術】

奈米乳化型載體(Nanoemulsions)又稱迷你乳化(Mini-emulsions)、超微細乳化(Ultrafine emulsions)及次微米乳化(Submicrometer emulsions)，為一透明或半透明的乳化系統，載體外層為界面活性劑所形成之薄膜，薄膜上親脂性端(Lipophilic tail)面向分散相或油層中，而親水性端(Hydrophilic head)則面向連續相或水層中，構成穩定的包覆結構(Solans et al., 2005)。其系統內大部分的乳化載體平均粒徑介於 20-200 nm 之間。奈米乳化型系統屬於動力學安定性系統(Kinetically stable state)，可達長期之安定性，所以奈米乳化型系統又稱為接近熱力學安定(Approaching thermodynamic stability)的系統(Tadros et al., 2004)。奈米乳化型載體具有下列特性：

1. 奈米乳化型載體粒徑非常小，粒子的布朗運動(Brownian motion)可以充足的克服重力之影響，有效降低載體在貯存期間發生乳析(Creaming)、沉降(Sedimentation)、凝聚(Coalescence)等乳化相不安定性的情形 (Tadros et al., 2004)。
2. 奈米乳化型載體粒徑小可以防止乳化物液滴產生凝聚

(Flocculation)，保持乳化系統的分散狀態，避免分層(Separation)的情形發生 (Liu et al., 2006)。

3. 奈米乳化型載體小粒徑液滴不會變形、液滴表面凝絮機會也降低，因此可以阻止乳化液滴凝聚(Coalescence)現象的發生。此外界面活性劑薄膜之厚度除會影響液滴之半徑外，也可防止液滴間液態薄膜變薄或混亂之情形產生(Sajjadi, 2006)。
4. 奈米乳化型載體的粒徑小，可以有效率地經由皮膚傳遞活性成分，此乳化系統的大表面積也可允許活性成分迅速滲透 (Sonneville-Aubrun et al., 2004)。
5. 奈米乳化型載體為透明之乳化系統，可提供較美的外觀，且不油膩，可提供消費者較愉悅的皮膚感覺(Sonneville-Aubrun et al., 2004)。
6. 進行奈米乳化時，只需要 3~10%界面活性劑濃度，但進行微米乳化 (Microemulsion)卻需要約 20%或更高濃度之界面活性劑(Solans et al., 2005)；因此奈米乳化型載體之製備僅需要較低濃度的界面活性劑即可完成(Imai et al., 2006)。
7. 奈米乳化型載體可以均勻的分布在物質上，因其低表面張力，可以提升濕潤(Wetting)、鋪展(Spreading)及滲透(Penetration)能力 (Caldeira-Araújo et al., 2007)。
8. 奈米乳化型載體可以用來當作保養品、化粧品或香水產品的香料傳遞系統，可以避免使用酒精或其它溶劑來當作傳遞系統，減少對皮膚之傷害 (Lv et al., 2006)。
9. 奈米乳化可作為微脂粒(Liposomes)和膠囊(Vesicles)的代用(Gutiérrez

et al., 2008)。

由於奈米乳化型載體的粒子小、表面積大，可在皮膚表面達到均勻分散的效果，因此奈米乳化型載體可當作經皮膚吸收藥物的傳遞劑型。

右旋檸檬烯(d-limonene)為柑橘類水果果皮精油中的主要成分，其為單環萜烯(cyclic terpene)化合物，此化合物具有化學預防與抗腫瘤效果；另外，d-limonene 為常使用的促皮膚穿透化學物質(Percutaneous chemical enhancer)，其可改變皮膚角質層中脂質與角質蛋白的結構，而使傳遞物質快速通過表皮進入體內，但 d-limonene 在一般條件下不安定，易氧化而失去其促進穿透皮膚的能力，且其在一般 pH 值下幾乎不可溶於水，因此很難被人體所吸收。目前 d-limonene 的使用上常將其分散在酒精或其它溶劑中，此方法會對皮膚會產生不好之影響，因此設計或使用一合適的配方來保護 d-limonene 並保持或增加 d-limonene 的皮膚傳遞效果是需要的。

由此可見，上述習用 d-limonene 劑型仍有諸多缺失，實非一良善之設計者，而亟待加以改良。

本案發明人鑑於上述習用 d-limonene 劑型所衍生的各項缺點，以及使用奈米乳化型載體的優點，乃亟思加以改良創新，並經多年苦心孤詣潛心研究後，終於成功研發完成本件具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體及其製備方法。

【發明內容】

本發明之目的即在於提供一種具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型

載體，係以奈米乳化型載體方式來包覆 d-limonene，藉由奈米乳化型載體來加強 d-limonene 促進皮膚穿透效果。

本發明之次一目的係在於提供一種製備具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體的方法，係以超音波來達到奈米乳化的效果。

在乳化系統中，使用混合兩種以上的界面活性劑，可以提供系統較好的安定性，且以一高親水性-親脂性平衡值(Hydrophilic-lipophilic balance value, HLB值)界面活性劑搭配一低HLB值界面活性劑，可較單獨使用一種界面活性劑有較佳的乳液安定性 (Boyd et al., 1972)。在乳化型載體形成過程中，乳化配方的設計和混合界面活性劑的選擇與組合為重要的因素，其會影響到粒子凝聚時(Droplet coalescence)分散相去吸附界面活性劑的速度與親和性，且此配方下界面活性劑所形成的界面膜張力與穩定性會顯著性的影響乳化粒子的大小與安定性。

因此，本發明人利用Griffin (1954)所提出的HLB理論及實務式，計算出所要進行混合界面活性劑組合之HLB值及重量百分比，公式如下：

$$HLB_{AB} = \frac{(H_A \times W_A) + (H_B \times W_B)}{(W_A + W_B)}$$

式中 W_A 為界面活性劑A之重量百分比， W_B 為界面活性劑B之重量百分比， H_A 為界面活性劑A之HLB值， H_B 為界面活性劑B之HLB值， HLB_{AB} 為A、B界面活性劑混合後之HLB值。其中 W_A 及 W_B 之重量百分比總和為100%，其比例可視需求調配，以達到混合後之 HLB_{AB} 值介於11~12之間。

本發明所提供之具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體，即以HLB值來配置混合界面活性劑間的比例；於一較佳實施例中，該混合

界面活性劑即由山梨糖醇酐三油酸酯(sorbitan trioleate, Span 85)與聚氧乙烯10油醚(Polyoxyethylene (10) oleyl ether, Brij97)兩種界面活性劑組成；其中，該山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)的HLB值為1.8，該聚氧乙烯10油醚(Brij97)的HLB值為12.4，而該混合界面活性劑的親水性-親脂性平衡值(Hydrophilic-lipophilic balance, HLB)為11~12。

此外，在熱力學中，相平衡為決定系統穩定性重要的依據，在乳化系統中 *So ratio* (界面活性劑相對於油相之重量百分比：界面活性劑重量/添加油相重量)是最常用來表示分散相與界面活性劑間比例的參數之一，由 *So ratio* 可以明顯的看出界面活性劑使用的濃度與欲得到的乳化粒子之分布。當 *So ratio* 太低時也就是所添加的混合界面活性劑濃度太低時，界面上吸附的乳化劑分子數目較少，吸附在油水界面上的順序排列會較鬆散使 d-limonene 與水分子之間無法構成堅固的界面膜，界面膜強度弱，所產生的粒子平均粒徑會較大，且易發生分層之現象。當 *So ratio* 較高時也就是所添加的較高劑量的混合界面活性劑時，不僅可以使界面活性劑分子緊密排列在分散相(油層)與水分子界面上，並可以使界面膜強度加大，而將分散相(油層)充分地分開，避免分散相(油層)分子間又因互相碰撞而凝聚在一起(Khoe & Yaghoobian, 2009)。但當 *So ratio* 過高或添加的混合界面活性劑過多時，未與分散相或連續相結合的界面活性劑將發生沉澱或游離在乳化液中而去碰撞乳化粒子，當碰撞機率上升將會導致整各系統發生不穩定的現象，而導致凝聚的產生，因此在適當的 *So ratio* 下，可以形成較穩定的乳化型載體粒子。

本發明所提供之具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體配方，即以 *So ratio* 參數來配置分散相與混合界面活性劑間的比例；於一較佳實施例中，分散相 d-limonene 與 Span 85 與 Brij 97 的混合界面活性劑的 *So ratio* 為 0.4~0.6。

可達成上述發明目的之具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體，包括有：

一 2~9wt%混合界面活性劑，該混合界面活性劑是由山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)與聚氧乙烯 10 油醚(Brij97)兩種界面活性劑組成，該混合界面活性劑的 HLB 值為 11~12；

一共同界面活性劑，該共同界面活性劑為乙二醇(ethylene glycol)，其比例為 1 wt%；

一分散相，該分散相為 5~15 wt%萜烯類(terpene)物質，於一較佳實施例中，該萜烯類物質為右旋檸檬烯(d-limonene)，該分散相與該混合界面活性劑的比例(*So ratio*)為 0.4~0.6；以及

一連續相，該連續相為去離子水，其比例為 80~92 wt%。

本發明進一步提供一種製備上述之具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體的方法，包括下列步驟：

步驟一：混合分散相萜烯類物質、山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)與聚氧乙烯 10 油醚(Brij97)組成之混合界面活性劑、連續相，以及共同界面活性劑乙二醇所組成之乳化液；

步驟二：利用高速均質乳化機(Polytron)將該乳化液均質得到呈現乳白色的粗乳化液；以及

步驟三：將上述粗乳化液利用超音波震盪器進行超音波乳化，以得到奈米乳化型載體。

於一較佳實施例中，該山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)與聚氧乙烯 10 油醚(Brij97)組成之混合界面活性劑的親水性-親脂性平衡值(HLB)為 11~12；該共同界面活性劑乙二醇(ethylene glycol)的比例為 1 wt%；該萜烯類物質為右旋檸檬烯；該分散相與該混合界面活性劑的比例(So ratio)為 0.4~0.6；該連續相為去離子水，其比例為 80~92 wt%；該步驟二中均質時間為 90~180 秒，較佳者為 120 秒；該步驟三中超音波乳化功率為 16~24 瓦，較佳者為 18 瓦，乳化時間為 90~180 秒，較佳者為 120 秒。

【實施方式】

實施例一 奈米乳化型載體的製備

本實施例即利用 d-limonene/水模式系統來探討最佳之奈米乳化型載體的製備條件。在本實施例中，本案發明人組合不同比例與種類之非離子型界面活性劑(Non-ionic surfactants)，以 d-limonene 作為分散相，水作為連續相的乳化模式系統，並以超音波來進行乳化，以找出最適的配方與乳化條件以形成特定粒徑大小的奈米乳化型載體。

一、材料與方法

(一) 試藥

右旋檸檬烯(d-limonene)：4-isopropenyl-1-methylcyclohexane, $\rho=840$ kg/m³, RI=1.487 (Merck)。

界面活性劑 Span 20：山梨醇酐十二酸酯(sorbitan monolaurate, $C_{18}H_{34}O_6$)，HLB 值為 8.6 (Sigma Aldrich)。

界面活性劑 Span 85：山梨糖醇酐三油酸酯(sorbitan trioleate, $C_{60}H_{108}O_8$)，HLB 值為 1.8 (Sigma Aldrich)。

界面活性劑 Tween 20：聚氧乙烯山梨醇酐單月桂酸酯 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate)，HLB 值為 16.7 (Merck)。

界面活性劑 Tween 85：聚氧乙烯失水山梨醇三油酸酯 (polyoxyethylene sorbitan Trioleate)，HLB 值為 11.0 (Merck)。

界面活性劑 Brij 30：聚氧乙烯月桂醚(polyethylene glycol dodecyl ether)，HLB 值為 9.7 (Sigma Aldrich)。

界面活性劑 Brij 97：聚氧乙烯 10 油醚(Polyoxyethylene (10) oleyl ether)，HLB 值為 12.4 (Sigma Aldrich)。

共同界面活性劑 (co-surfactant)：乙二醇 (ethylene glycol, $HOCH_2CH_2OH$) (Sigma Aldrich)。

將上敘六種界面活性劑依照 HLB 值兩兩組合為 Span 20 + Tween 20、Brij 30 + Brij 97、Span 85 + Tween 85、Brij 97 + Span 85、Span 85 + Brij 97 的混合界面活性劑。

(二) 方法

1. 粗乳化液(Coarse emulsion)之製備

奈米乳化型載體製備方法係利用兩階段式乳化方法；第一階段為配置右旋檸檬烯(d-limonene)、混合界面活性劑、去離子水，以及共同

界面活性劑乙二醇(Ethylene glycol)所組成之乳化液；接著，第二階段再利用高速均質乳化機(Polytron, PT-MR 3000, Kinematica ag, Littau Switerland)將乳化液均質得到呈現乳白色的粗乳化液，均質時間為2分鐘。

粗乳化液中右旋檸檬烯(d-limonene)的濃度分別為5 wt%、10 wt%以及15 wt%。

混合界面活性劑間的比例依照 HLB 值來進行改變，利用 Griffin (1954)所提出的 HLB 值理論及實務式，計算出所要進行混合界面活性劑組合之 HLB 值及重量百分比，公式如下：

$$HLB_{AB} = \frac{(H_A \times W_A) + (H_B \times W_B)}{(W_A + W_B)}$$

式中 W_A 為界面活性劑A之重量百分比， W_B 為界面活性劑B之重量百分比， H_A 為界面活性劑A之HLB值， H_B 為界面活性劑B之HLB值， HLB_{AB} 為A、B界面活性劑混合後之HLB值。混合界面活性劑添加濃度依照右旋檸檬烯(d-limonene)的比例以 *So ratio* (界面活性劑相對於油相之重量百分比：界面活性劑重量/添加油相重量)來表示。

共同界面活性劑乙二醇濃度在每一樣品中則固定為1 wt%。

2. 奈米乳化型載體之製備

將上述粗乳化液利用超音波震盪器20 kHz sonicator 3000 (Misonix incorporated, Farmingdale, New York, USA)以直徑20 mm的探針進行超音波乳化，在乳化時先將探針(Microtip horn)放入粗乳化液液面下方1公分處，接著再利用超音波震盪器設備本身的軟體來控制乳化功率

(Applied power: 6 - 51 W) 和乳化時間 (30 - 300 sec)，設備軟體程式設定為：

起始脈衝時間(Initial pulse time)：20秒；

起始輸出級數(Initial output level)：5；

溫度監控(Temperature monitoring)：開啟(Yes)；

溫度控制(Temperature control)：開啟(Yes)；

溫度上限(Max temperature)：45°C。

在超音波乳化過程中，起始粗乳化液的溫度與最終乳化液的溫度不超過20°C，所有試驗皆為三重複。每一製備完成之樣品皆馬上測定其粒徑大小，並觀察與測定放置一天後樣品之外觀與粒徑變化。樣品外觀觀察方式為樣品是否為透明(Transparent)、半透明(Translucent)、乳白色(Milk white)、分層(Phase separation)、凝聚(Coalescence)表示。

3. 載體粒徑測定

將製備後的奈米乳化型載體以奈米粒徑分析儀 Nanotrak 150 (Microtrac, Inc. Montgomeryville, PA)利用動態光散射原理進行載體粒徑測定。為避免多重光散射效應(Multiple scattering effects)，所有樣品在量測前皆利用去離子水稀釋十倍。動態光散射(Dynamic Light Scattering, DLS)是利用不同時間與不同角度所測得的散射強度或電壓訊號變化，再將其所量測到的散射訊號進行自相關處理(Autocorrelation)訊號處理。利用分析儀找出奈米粒徑載體最適的光散射濃度與條件並偵測粒子大小分佈，軟體程式中設定d-limonene的折射率(Refractive

index: RI)為1.487，乳化粒子大小以三次測定的平均粒徑(Mean diameter)表示，平均粒徑(MN)以下列公式計算。

$$MN = S \frac{(V_i d_i^2)}{(V_i d_i^3)}$$

4. 統計分析

不同HLB值下樣品粒徑使用統計分析軟體進行變異數分析(ANOVA, analysis of variance)，樣品均值間以鄧肯氏多重範圍檢驗(Duncan's multiple range test)分析差異，顯著差異以 $p < 0.05$ 比較其差異顯著性，結果以平均值表示。

二、結果

(一) 奈米乳化型載體之配方

1. 混合界面活性劑的選擇

如表一所示，利用Span 20與Tween 20所組合而成的混合界面活性劑在d-limonene濃度分別為5、10、15 wt%時可以得到呈現乳白色的乳化液，在HLB值範圍介於9-16時，5 wt% d-limonene濃度下會形成介於1252-1937 nm之乳化粒子，10 wt% d-limonene濃度下會形成介於539-1196 nm之乳化粒子，15 wt% d-limonene濃度下會形成介於536-1049 nm之乳化粒子；此一混合界面活性劑所得到得乳化粒子大小分佈屬於微米乳化或次微米乳化的範圍，而不屬於奈米範圍，因此該界面活性劑組合並無法得到奈米乳化型載體。

如表二所示，利用 Brij 30與Brij 97所組合的混合界面活性劑，在

HLB值範圍介於9-12時，5 wt% d-limonene濃度下會形成介於273-448 nm之乳化粒子，10 wt% d-limonene濃度下會形成介於219-377 nm之乳化粒子，15 wt% d-limonene濃度下會形成介於319-342 nm之乳化粒子；此混合界面活性劑可以得到較小的乳化粒子，但經過一天的靜置時間下，會形成上層淡乳黃色，下層乳白色之不安定分層現象。

如表三所示，利用Span 85與Tween 85所組合的混合界面活性劑，在HLB值範圍介於2-15時，5 wt% d-limonene濃度下會形成介於2013-2741 nm之乳化粒子，10 wt% d-limonene濃度下會形成介於2022-2460 nm之乳化粒子，15 wt% d-limonene濃度下會形成介於2188-2499 nm之乳化粒子；但經過一天的靜置時間後，會產生乳化液混濁的現象，為乳化液中出現懸浮物質或多餘的界面活性劑干擾乳化相之平衡而產生堆疊情形，凝聚(Coalescence)為乳化系統中最常發生的現象，乳化屬於熱力學上不穩定的狀態，因此當系統發生不穩定的現象或干擾因素的加入例如溫度改變、多餘的界面活性劑等，將導致乳化系統產生凝聚的現象。

如表四所示，利用Span 85與Brij 97所組合的混合界面活性劑，在HLB值範圍介於2-12時，5 wt% d-limonene濃度下會形成介於144-386 nm之乳化粒子，10 wt% d-limonene濃度下會形成介於23-332 nm之乳化粒子，15 wt% d-limonene濃度下會形成介於217-405 nm之乳化粒子；在三種d-limonene濃度下乳化載體粒子粒徑皆會隨著HLB值的增加而下降，且經過一天的靜置時間後，此趨勢還是存在。在10 wt% d-limonene濃度下，HLB值為2時，乳化液呈現乳白色(Milk white)，此時粒徑大小

為332nm，當HLB值增加至12時，乳化載體粒子粒徑小於50 nm，此時乳化液會呈現透明(Transparent)的外觀；而從其他的HLB值的樣品來觀察，當乳化粒子粒徑介於100-300 nm之間，乳化液會呈現半透明(Translucent)外觀，適當的HLB可以維持油相與水相之平衡，也可以安定與降低乳化載體在形成過程中新生成子之粒子(Tadros et al., 2004)。

Span 85與Brij 97碳鏈鍵上皆各有18個碳數(含不飽和鍵)，但是Brij 97分子上帶有10個環氧乙烯鏈，會較Span 85更具有吸水性，且此兩界面活性劑碳數相同當形成，混合界面活性劑時會將碳氫鍵靠向d-limonene的界面，所以即使Span85分子上帶有sorbitan ring，但其寬度上不致於阻礙兩者之碳氫鍵彼此靠再一起，反而有餘鄰近的碳氫鍵之凡得瓦爾吸引力，使得 Span 85與 Brij 97混合界面活性劑可以在d-limonene/水界面形成安定的界面膜，來抵抗分散相的聚合；再藉由超音波所提供空穴作用將d-limonene分散成更小的分進入連續相中；進入連續相的d-limonene小分子再迅速被Span 85與Brij 97混合界面膜所包覆住，因此形成較小且要穩定的奈米乳化型米載體。

如表五所示，利用 Tween 20與Brij 97所組合的混合界面活性劑，在HLB值範圍介於13-16時，5 wt% d-limonene濃度下會形成介於379-485 nm之乳化粒子，10 wt% d-limonene濃度下會形成介於473-492 nm之乳化粒子，15 wt% d-limonene濃度下會形成介於493-575 nm之乳化粒子；在三種d-limonene濃度下皆可以形成乳白色的乳化液，其粒子也介於微米/次微米的範圍內，此兩種界面活性劑皆具親水性，當結合時兩者的碳氫鍵會緊密排列形成良好的親水性膜，且兩種界面活性劑

皆有側鏈都可以去吸附d-limonene，因此可以形成乳化粒子；但是該混合界面活性劑親水性基團的吸引力大於其親脂性基團的吸引力，在長時間的貯存下，將會導致發生凝聚的現象，尤其是小粒子在不穩定的乳化相中，此情形發生的機率會更是顯著(Lobo & Svereika, 2003)。因此該混合界面活性劑的組合不適合用來製備奈米乳化型載體。

本實施例結果可以證實在奈米乳化載體形成過程中界面活性劑組合的比例與濃度對於載體的形成扮演著重要的角色。

利用Span 85與Brij 97混合界面活性劑可以成功地將d-limonene/水模式系統形成奈米乳化型載體，且得到外觀為澄清透明的乳化液，以及穩定的奈米載體粒子。當在10 wt% d-limonene濃度時，Span 85 + Brij 97的混合界面活性劑HLB值為12時，奈米乳化型載體的粒徑分布如圖一所示，載體粒徑分布介於10 nm-70 nm之間，且粒子通過率(Passing)達70%，表示在此乳化液中，奈米乳化型載體的粒子均一性是相當高的，其多分散性(Polydispersed)低。因此本發明所提供的奈米乳化型載體係以Span 85與Brij 97作為混合界面活性劑。

表一 Span 20和Tween 20在不同HLB值與不同d-limonene濃度下乳化載體之平均粒徑與溶液外觀之變化(共同界面活性劑乙二醇濃度為1 wt%)

HLB _{A+B} *	5 wt% d-limonene, So ratio = 0.4			10 wt% d-limonene, So ratio = 0.4			15 wt% d-limonene, So ratio = 0.6		
	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀
9	1937 ^a ±155	2488 ^a ±127	乳白色	955 ^{ab} ±58	755 ^d ±44	乳白色	1049 ^a ±378	1135 ^a ±93	乳白色
10	1654 ^{ab±} 294	1875 ^b ±117	乳白色	886 ^c ±74	878 ^c ±75	乳白色	918 ^{ab} ±102	932 ^b ±91	乳白色
11	1651 ^{ab} ±358	1743 ^{bc} ±358	乳白色	746 ^d ±39	895 ^c ±66	乳白色	862 ^b ±95	906 ^b ±88	乳白色
12	1440 ^b ±121	1993 ^{ab} ±419	乳白色	539 ^e ±42	781 ^d ±84	乳白色	754 ^{bc} ±70	1126 ^a ±75	乳白色
13	1371 ^{bc} ±190	1357 ^c ±253	乳白色	919 ^{bc} ±19	1019 ^b ±91	乳白色	894 ^{ab} ±106	948 ^b ±49	乳白色
14	1450 ^{ab} ±423	1423 ^c ±149	乳白色	1158 ^a ±253	1257 ^b ±118	乳白色	536 ^c ±47	896 ^c ±72	乳白色
15	1252 ^c ±357	1567 ^c ±324	乳白色	924 ^b ±79	1437 ^a ±142	乳白色	541 ^c ±73	961 ^b ±50	乳白色
16	1885 ^a ±311	2014 ^{ab} ±217	乳白色	1196 ^a ±124	1189 ^b ±149	乳白色	781 ^b ±38	937 ^b ±39	乳白色

* HLB_{A+B} 代表HLB_{Span 20+Tween 20}

a-d 同一欄中具有不同字母者代表在統計上具有顯著差異($p < 0.05$)

表二 Brij 30和Brij 97在不同HLB值與不同d-limonene濃度下乳化載體之平均粒徑與溶液外觀之變化(共同界面活性劑乙二醇濃度為1 wt%)

HLB _{A+B} *	5 wt% d-limonene, So ratio = 0.4			10 wt% d-limonene, So ratio = 0.4			15 wt% d-limonene, So ratio = 0.6		
	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀
9	257 ^b ±29	-	分層	377 ^a ±79	-	分層	342 ^a ±47	-	分層
10	448 ^a ±83	-	分層	279 ^b ±43	-	分層	326 ^a ±52	-	分層
11	379 ^a ±28	-	分層	235 ^b ±68	-	分層	322 ^a ±28	-	分層
12	273 ^b ±32	-	分層	219 ^b ±24	-	分層	319 ^a ±14	-	分層

* HLB_{A+B} 代表HLB_{Brij 90+Brij 97}

a-b 同一欄中具有不同字母者代表在統計上具有顯著差異($p < 0.05$)

表三 Span 85和Tween 85在不同HLB值與不同d-limonene濃度下乳化載體之平均粒徑與溶液外觀之變化(共同界面活性

劑乙二醇濃度為1 wt%)

HLB _{A+B} *	5 wt% d-limonene, So ratio = 0.4			10 wt% d-limonene, So ratio = 0.4			15 wt% d-limonene, So ratio = 0.6		
	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀
2	2741 ^a ±161	-	凝聚	2409 ^b ±195	-	凝聚	2499 ^a ±195	-	凝聚
3	2534 ^b ±140	-	凝聚	2337 ^b ±133	-	凝聚	2222 ^b ±133	-	凝聚
4	2357 ^c ±151	-	凝聚	2278 ^c ±85	-	凝聚	2551 ^c ±85	-	凝聚
5	2269 ^c ±103	-	凝聚	2215 ^c ±134	-	凝聚	2426 ^c ±134	-	凝聚
6	2214 ^c ±68	-	凝聚	2193 ^c ±88	-	凝聚	2215 ^c ±88	-	凝聚
7	2201 ^c ±148	-	凝聚	2136 ^c ±143	-	凝聚	2335 ^c ±143	-	凝聚
8	2095 ^d ±141	-	凝聚	2088 ^d ±139	-	凝聚	2199 ^d ±139	-	凝聚
9	2079 ^d ±112	-	凝聚	2096 ^d ±114	-	凝聚	2251 ^d ±114	-	凝聚
10	2032 ^d ±196	-	凝聚	2022 ^d ±110	-	凝聚	2188 ^d ±110	-	凝聚
11	2013 ^d ±168	-	凝聚	2460 ^e ±226	-	凝聚	2197 ^a ±226	-	凝聚
12	2354 ^c ±184	-	凝聚	2350 ^b ±150	-	凝聚	2211 ^b ±150	-	凝聚
13	2420 ^b ±137	-	凝聚	2251 ^c ±139	-	凝聚	2259 ^c ±139	-	凝聚
14	2224 ^c ±124	-	凝聚	2225 ^c ±170	-	凝聚	2370 ^c ±170	-	凝聚
15	2182 ^c ±217	-	凝聚	2218 ^c ±240	-	凝聚	2343 ^c ±240	-	凝聚

* HLB_{A+B} 代表HLB_{Span 85+Tween 85}

a-d 同一欄中具有不同字母者代表在統計上具有顯著差異(p<0.05)

表四 Span 85和Brij 97在不同HLB值與不同d-limonene濃度下乳化載體之平均粒徑與溶液外觀之變化(共同界面活性劑乙二醇濃度為1 wt%)

HLB _{A+B} *	5 wt% d-limonene, So ratio = 0.4			10 wt% d-limonene, So ratio = 0.4			15 wt% d-limonene, So ratio = 0.6		
	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀
2	378 ^a ±65	394 ^a ±46	乳白色	332 ^a ±27	344 ^a ±48	乳白色	405 ^a ±51	454 ^a ±4	乳白色
3	386 ^a ±54	412 ^b ±53	乳白色	335 ^a ±22	349 ^a ±41	乳白色	393 ^a ±40	407 ^a ±28	乳白色
4	345 ^a ±34	374 ^b ±29	乳白色	287 ^b ±14	301 ^b ±28	乳白色	403 ^a ±34	411 ^a ±71	乳白色
5	326 ^a ±47	346 ^a ±37	乳白色	226 ^c ±14	247 ^c ±54	半透明	367 ^b ±30	380 ^a ±39	乳白色
6	285 ^a ±39	314 ^b ±48	乳白色	207 ^c ±17	219 ^c ±26	半透明	355 ^b ±32	379 ^a ±38	乳白色
7	267 ^a ±32	276 ^c ±55	乳白色	175 ^d ±13	196 ^d ±12	半透明	347 ^b ±53	365 ^b ±27	乳白色
8	259 ^b ±17	268 ^b ±39	乳白色	149 ^e ±14	163 ^e ±25	半透明	334 ^{bc} ±38	357 ^b ±26	乳白色
9	232 ^c ±54	256 ^b ±42	乳白色	102 ^f ±27	132 ^f ±19	半透明	286 ^c ±32	296 ^{bc} ±33	乳白色
10	183 ^d ±38	211 ^c ±19	半透明	73 ^g ±15	84 ^g ±19	半透明	284 ^c ±41	301 ^{bc} ±15	乳白色
11	174 ^d ±29	194 ^c ±23	半透明	54 ^h ±8	63 ^h ±13	半透明	244 ^d ±25	256 ^c ±29	半透明
12	144 ^e ±14	156 ^d ±16	半透明	23 ⁱ ±4	37 ⁱ ±4	透明	217 ^e ±38	227 ^d ±31	半透明

* HLB_{A+B} 代表HLB_{Span 85+Brij 97}

^{a-d} 同一欄中具有不同字母者代表在統計上具有顯著差異($p < 0.05$)

表五 Brij 97和Tween 20在不同HLB值與不同d-limonene濃度下乳化載體之平均粒徑與溶液外觀之變化(共同界面活性劑

乙二醇濃度為1 wt%)

HLB _{A+B} *	5 wt% d-limonene, So ratio = 0.4			10 wt% d-limonene, So ratio = 0.4			15 wt% d-limonene, So ratio = 0.6		
	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀	平均粒徑	靜置1天後 平均粒徑	靜置1天後 溶液外觀
13	379 ^b ±49	418 ^b ±33	乳白色	486 ^a ±49	502 ^a ±45	乳白色	513 ^b ±56	527 ^b ±33	乳白色
14	396 ^{ab} ±58	427 ^b ±67	乳白色	467 ^a ±65	489 ^a ±71	乳白色	554 ^b ±49	573 ^b ±21	乳白色
15	428 ^a ±67	433 ^b ±74	乳白色	473 ^a ±76	497 ^a ±62	乳白色	575 ^a ±38	586 ^a ±42	乳白色
16	485 ^a ±85	512 ^a ±85	乳白色	492 ^a ±37	504 ^a ±35	乳白色	493 ^b ±42	511 ^b ±45	乳白色

* HLB_{A+B} 代表HLB_{Brij 97+Tween 20}

^{a-d} 同一欄中具有不同字母者代表在統計上具有顯著差異(p<0.05)

2. 分散相與混合界面活性劑的比例(*So ratio*)

在不同 d-limonene 濃度與 *So ratio* 下，當 Span 85 + Brij 97 的混合界面活性劑在 HLB 值為 12 時，其載體粒徑分布如圖二所示；當 5 wt% d-limonene 濃度下 *So ratio* 為 0.4 時，當 10 wt% d-limonene 濃度下 *So ratio* 為 0.4 時，以及當 15 wt% d-limonene 濃度下 *So ratio* 為 0.6 時，載體粒徑均在 50 nm 以下，且這三種 d-limonene 濃度下樣品的 *So ratio* 增加時，載體粒徑不會更進一步降低。

(二) 超音波乳化之條件

本發明係以超音波作為奈米乳化型載體粒子分散的剪切力來源，超音波的功率對於乳化型載體粒子大小的影響如圖三所示，當超音波功率在 18 W 時會有最低的粒子粒徑，增加功率數並無法有效的降低乳化粒子粒徑；這是因為超音波功率數過高會造成乳化系統溫度上升而干擾界面活性劑去捕捉分散相與連續相，且易造成分散相蒸發，連續相水分子解離，而影響整個乳化相的平衡，甚至導致過度加工 (Over-processing) 的現象發生。

在本發明超音波乳化過程中，整個乳化系統的溫度係利用溫度感應器來監控，使整個乳化系統溫度不超過 45°C，避免溫度升高來干擾相的平衡；此外，不同乳化時間對乳化粒子粒徑之影響如圖四所示，在 120 秒的乳化時間內可以得到小於 200 nm 的乳化粒子，增加乳化時間並不會明顯的降低粒子大小；這是因為超音波乳化時間越長，系統的溫度就會越高，當乳化系統處於高溫時會造成界面活性劑的降解與

破壞乳化粒子的生成。

實施例二 奈米乳化型載體安定性的分析

當奈米乳化型載體在低界面活性劑濃度下貯存時，容易產生凝聚 (Coalescence) 和絮集 (Flocculation) 的現象，而這些現象皆可利用靜電場的安定性 (Electrostatic stabilization) 來降低或排除 (Capek, 2004)。而靜電場安定性常利用電泳動性質 (Electrophoretic properties) 來探討，因此本發明利用電泳動性質來分析 d-limonene 奈米乳化型載體在不同 *So ratio* 與 pH 值下的性質，以避免乳化系統發生凝聚與絮集的情形。

乳化型載體表面帶電情形會影響到載體的安定性，在一個乳化分散系統中，當懸浮粒子表面正負電荷越分散，也代表 Zeta 電位越小，懸浮粒子越容易產生凝聚或絮集的現象，而當懸浮粒子表面正負電荷越集中，也代表 Zeta 電位越大，懸浮粒子產生凝聚或絮集的現象就會降低。因此本實施例以 Zeta 電位分析載體粒子表面的帶電情形，以分析奈米乳化型載體的電泳動性質。

由於奧斯瓦老化 (Ostwald ripening) 被認為是奈米乳化系統中最主要的不安定因素 (Capek et al., 2004; Tadros et al., 2004; Izquierdo et al., 2005)；此外，乳化型載體的安定性也會受貯藏溫度、貯藏時間所影響 (Chanamai et al., 1998)，因此本實施例係以奧斯瓦老化來分析 d-limonene 奈米乳化型載體的電泳動性質，並同時分析在不同貯藏溫度與時間下載體粒子粒徑之變化，並以奧斯瓦老化速率來分析溫度對 d-limonene 奈米乳化型載體的影響與不安定情形。

一、材料與方法

(一) 試藥

右旋檸檬烯(d-limonene) : 4-isopropenyl-1-methylcyclohexane, $\rho=840$ kg/m³, RI=1.487 (Merck)。

界面活性劑 Span 85 : 山梨糖醇酐三油酸酯(sorbitan trioleate, C₆₀H₁₀₈O₈), HLB 值為 1.8 (Sigma Aldrich)。

界面活性劑 Brij 97 : 聚氧乙烯 10 油醚(Polyoxyethylene (10) oleyl ether), HLB 值為 12.4 (Sigma Aldrich)。

共同界面活性劑 (co-surfactant) : 乙二醇 (ethylene glycol, HOCH₂CH₂OH) (Sigma Aldrich)。

利用 Span 85 與 Brij 97 所組成的混合界面活性劑，乳化液配方為 5 wt%、10 wt%、15 wt% d-limonene 濃度下，HLB 值為 12，*So ratio* 為 0.2~1.2，1 wt% 乙二醇，利用超音波方法製備成奈米乳化型載體。

(二) 方法

1. 粗乳化液(Coarse emulsion)之製備

奈米乳化型載體製備方法係利用兩階段式乳化方法；第一階段為配置右旋檸檬烯(d-limonene)、混合界面活性劑、去離子水，以及共同界面活性劑乙二醇(Ethylene glycol)所組成之乳化液；接著，第二階段再利用高速均質乳化機(Polytron, PT-MR 3000, Kinematica ag, Littau Switerland)將乳化液均質得到呈現乳白色的粗乳化液，均質時間為 2 分鐘。

2. 奈米乳化型載體之製備

將上述粗乳化液利用超音波震盪器20 kHz sonicator 3000 (Misonix incorporated, Farmingdale, New York, USA)以直徑20 mm的探針進行超音波乳化，在乳化時先將探針(Microtip horn)放入粗乳化液液面下方1公分處，接著再利用超音波震盪器設備本身的軟體來控制乳化功率18W和乳化時間120秒，設備軟體程式設定為：

起始脈衝時間(Initial pulse time)：20秒；

起始輸出級數(Initial output level)：5；

溫度監控(Temperature monitoring)：開啟(Yes)；

溫度控制(Temperature control)：開啟(Yes)；

溫度上限(Max temperature)：45°C。

在超音波乳化過程中，起始粗乳化液的溫度與最終乳化液的溫度不超過20°C，所有試驗皆為三重複。

3. 載體粒徑測定

同實施例一。

4. 時間與溫度安定性

測定d-limonene奈米乳化型載體在90天內，分別貯存於4°C、25°C以及50°C下載體粒徑的變化，載體粒徑用Nanotracs 150監測。將製備完成的樣品放入樣品瓶中密封，分別放入4°C冰箱與25°C和50°C的培養箱中保存。

5. 電泳動性質(Electrophoretic properties)

奈米乳化型載體的電泳動性質利用Zetasizer nano system (Malvern instrument Ltd. United Kingdom)來測定，以Smoluchowski's方程式計算得到的Zeta電位(ζ potential)來表示載體粒子電泳動性質，Smoluchowski's方程式如下：

$$\zeta = \frac{4\eta\pi}{e} \frac{v}{U/L}$$

其中 η 和 e 為去離子水的黏度與介電常數， v 為載體粒子在電場中電泳動速度， U 為電場兩端的伏特數， L 為電場兩端之距離。載體粒子在不同pH值下Zeta電位變化利用自動滴定儀(Autotitrator, Malvern instrument Ltd., United Kingdom)來控制，以0.01 M NaOH和0.01 M HCl來微量滴定pH值，此實驗在25°C下操作，每一樣品進行五重複。

6. 奧斯瓦老化(Ostwald ripening)速率

奧斯瓦老化(Ostwald ripening)速率根據LSW theory所測定，老化速率(ω)定義為乳化粒子體積(Cube of droplet radius)增加之速率，此理論為預測乳化粒子在乳化相中粒子體積(r_c^3)與時間(t)之線性關係，此線性關係所得到的斜率則為乳化粒子的熟成速率(ω)，根據LSW theory可以得到下列的方程式：

$$\omega = \frac{dr_c^3}{dt} = \frac{8}{9} \frac{C_{(8)}\gamma V_m D}{\rho RT}$$

方程式中 r_c^3 為粒子體積、 $C_{(8)}$ 為整體的溶解度、 γ 為界面張力、 V_m 為分散相的莫耳體積、 D 為分散相在連續相中的擴散係數、 ρ 為分散相

的密度、 R 為氣體常數、 T 為絕對溫度。利用此方程式來分析計算奈米乳化型載體在 4°C 、 25°C 、 50°C 下奧斯瓦老化的速率。

二、結果

(一) 時間與溫度安定性

奈米乳化型載體在不同貯藏時間與溫度下粒徑變化如圖五所示，在 4°C 、 25°C 、 50°C 三種溫度條件下的樣品為新鮮製備完成的乳化樣品，載體粒徑約在 25 nm (0天)，再分別將樣品放入該貯藏溫度下來觀測，在49天內的貯藏時間下，隨著貯藏時間的增加，三種溫度下的乳化型載體粒徑會隨之增加，在 4°C 下會由原本的 25 nm 增加至約 100 nm ，在 25°C 下會由原本的 25 nm 增加至約 60 nm ，而在 50°C 下會由原本的 25 nm 增加至約 75 nm ，而在貯藏時間49天過後，貯藏溫度 4°C 與 25°C 下的樣品其載體粒徑增長速率會變緩，但在 50°C 下載體粒徑還是會隨之增加。

在O/W乳化系統中，新生成的乳化粒子會在超音波的乳化過程中得到過多的能量，而過多的能量會干擾系統的平衡，因此需要時間使系統達到熱動力學的平衡(Abismail et al., 1999)。在本實施例中，貯藏在 4°C 與 25°C 下的乳化型樣品都需要49天來達到系統在熱動力學上的安定性，且我們也可以接受其分別由 4°C 下粒子由 41.1 nm (7天)增加至 99.1 (49天)和 25°C 下粒子由 30.2 nm (7天)增加至 58.8 nm (49天)，然而當樣品貯藏在 50°C 下，分散在連續相中的粒子會從系統溫度中得到較多的能量，當粒子吸收過多的能量因此增加粒子的動能，此時便產生熱

動力學上的不平衡，造成提高粒子間碰撞之機會與造成粒子的持續增加。

(二) 奈米乳化型載體的電泳動性質

在不同的分散相與混合界面活性劑比例(*So ratio*)下，載體粒子的Zeta電位如圖六所示，在*So ratio*為0.2~1.2下，載體粒子表面Zeta電位並無明顯的變化，Zeta電位約在-20 mV ~ -23 mV之間；由此可知，在添加不同濃度的混合界面活性劑下，並不會明顯的改變載體粒子電位，且載體粒子表面電位呈現負電荷。

在d-limonene濃度分別為5 wt%、10 wt%、15 wt%以及不同pH值環境之下，奈米乳化型載體的Zeta電位變化如圖七所示；當載體溶液pH值約為6.4~6.7之下，三種d-limonene濃度的載體粒子的Zeta電位約在-10 mV ~ -20 mV之間；當pH值改變時，載體粒子表面的Zeta電位會明顯的改變，當pH約在4.0時，這三種d-limonene濃度下的載體粒子表面Zeta電位接近0，而當pH值小於4.0時，載體粒子表面的Zeta電位會呈現正值，隨著添加0.01 M NaOH的量增加，當pH值為12.0時，載體粒子表面的Zeta電位會逐漸降低至-30 mV。

由本實施例結果可知，藉由改變pH值可以增加d-limonene奈米乳化型載體的安定性；在pH值為8~11時，載體粒子表面Zeta電位約大於|-30| mV，可以得到較佳的安定性。奈米乳化型載體在長時間的貯藏過程中凝聚與絮集皆會干擾載體的安定性，因此藉由改變載體粒子表面的電位，可以幫助增加奈米載體粒子的安定性。

(三) 奈米乳化型載體的奧斯瓦老化(Ostwald ripening)速率

在不同溫度下d-limonene奈米乳化型載體的奧斯瓦老化速率如表六所示；由此結果可知，奧斯瓦老化速率會因貯藏溫度的上升而下降，在4°C、25°C、50°C環境下，載體的奧斯瓦老化速率分別為1.44、0.39、0.29；此奧斯瓦老化速率與其他乳化文獻中所提及的老化速率相比會較低(Taylor, 2003; Izquierdo et al., 2005; Liu et al., 2006)，可以證實本發明所提供的奈米乳化型載體可以有效的抵抗奧斯瓦老化。

表六 在不同溫度下 d-limonene 奈米乳化型載體的奧斯瓦老化速率

溫度(°C)	初始粒徑(r_0)(nm)	奧斯瓦老化速率 $[\omega(\text{m}^3\text{s}^{-1}\times 10^{29})]$
4	46.7	1.44
25	30.2	0.39
50	41.1	0.29
Taylor(2003)	--	5.6
Izquierdo(2005)	63	2
Liu (2006)	95	7.10

實施例三 奈米乳化型載體包覆與釋放效果的分析

本實施例係以奈米乳化型載體對d-limonene進行包覆，分析經包覆後的d-limonene在不同貯藏環境下的包覆率、安定性以及釋放效果。並以Avrami's equation來分析本發明所提供之奈米乳化型載體的釋放速率常數，以了解d-limonene經包覆後的釋放性。

一、材料與方法

(一) 試藥

右旋檸檬烯(d-limonene): 4-isopropenyl-1-methylcyclohexane, $\rho=840$ kg/m³, RI=1.487 (Merck)。

界面活性劑 Span 85 : 山梨糖醇酐三油酸酯(sorbitan trioleate, C₆₀H₁₀₈O₈), HLB 值為 1.8 (Sigma Aldrich)。

界面活性劑 Brij 97 : 聚氧乙烯 10 油醚(Polyoxyethylene (10) oleyl ether), HLB 值為 12.4 (Sigma Aldrich)。

共同界面活性劑 (co-surfactant) : 乙二醇 (ethylene glycol, HOCH₂CH₂OH) (Sigma Aldrich)。

利用 Span 85 與 Brij 97 所組成的混合界面活性劑，乳化液配方為 10 wt% d-limonene 濃度下，HLB 值為 2~12，*So ratio* 為 0.4，1 wt% 乙二醇，利用超音波方法製備成奈米乳化型載體。

(二) 方法

1. 粗乳化液(Coarse emulsion)之製備

同實施例二。

2. 奈米乳化型載體之製備

同實施例二。

3. 載體粒徑測定

同實施例一。

4. 穿透式電子顯微鏡(Transmission electron microscopic)觀察

奈米乳化型載體型態利用穿透式電子顯微鏡(Transmission electron

microscope, TEM)來觀察，將樣品50 μL 滴入鍍有碳膜的200-mesh銅製TEM樣品載台(200-mesh formwar-coated copper TEM sample holders, EM sciences, Hatfield, PA, USA)，以反向鏢子夾取載台滴入樣品使其自然晾乾或以濾紙剪取適當大小去吸取過多的液體，製備完成之樣品載台在室溫下以50 μL 1.5%的磷鎢酸(phosphotungstic acid)進行負染色10分鐘，過多的液體一樣以濾紙吸取，最後將樣品載台以TEM (JEOL JSM-1200EX II, Peabody, MA, USA)以20 μL 孔徑在67 kV下觀察樣品。

5. d-limonene在貯存期間含量之測定

取1 mL乳化樣品加入20 mL去離子水與10 mL正己烷，在室溫下震盪1分鐘使其均勻混合，將裝有樣品的玻璃管蓋上瓶蓋後放入45°C水浴下加熱30分鐘，之後取出冷卻10分鐘，冷卻後的樣品以離心機在4000 rpm、4°C下離心20分鐘，離心後樣品取上層液以分光光度計(UV-Vis Spectrometer, Thermo Spectronic, England)在252 nm下測定在乳化載體中d-limonene含量，標準曲線製作方式為將不同濃度的d-limonene加入10 mL的正己烷，測其分別在252 nm下的表現；所有樣品皆為三重覆。

6. d-limonene奈米包覆率之測定

取1 mL乳化樣品加入20 mL去離子水與10 mL正己烷，在室溫下震盪1分鐘使其均勻混合，將裝有樣品的玻璃管蓋上瓶蓋後放入45°C水浴下加熱30分鐘，之後取出冷卻10分鐘，冷卻後的樣品以離心機在4000 rpm、4°C下離心20分鐘，離心後樣品取上層液，取上層液1 μL 利用氣相層析儀Varian 3300 Gas Chromatograph (Varian, Sunnyvale CA, USA)

來分析，分析條件如下：

火焰離子檢測器(Flame ionizing detector)：

氫氣流速(H₂ flow)為40 mL/min

空氣流速(Air flow)為250 mL/min

氮氣流速(N₂ flow)為30 mL/min

分離管柱Stabilwax (Carbowax PEG, 60 m × 0.32 mm, 1μm)：

分流率(Split ratio)：80:1

起始管柱溫度(Initial column temperature)為50°C

最終管柱溫度(Final column temperature)為200°C

管柱升溫條件：

起始溫度50°C停留2分鐘

以10°C/min速度加熱至130°C

以5°C/min速度加熱至150°C

最後以30°C/min速度加熱至200°C

於200°C停留3分鐘

包覆率(Encapsulation ratio)計算方式為：

$$\text{包覆率 (\%)} = \frac{\text{d-limonene在載體中的含量}}{\text{原本d-limonene的添加量}}$$

所有樣品皆為三重覆。

7. d-limonene釋放速率

被包覆的d-limonene在乳化型載體中的時間釋放速率以Avrami's

equation來探討，公式如下：

$$R = \exp[-(kt)^n]$$

公式中 R 為d-limonene在乳化型載體中的含量、 t 為貯藏時間、 k 為釋放速率常數、 n 為釋放機制的表現常數。

8. 統計分析

不同HLB值下樣品的d-limonene包圍率均值差異分析，使用統計分析軟體進行變異數分析(ANOVA, analysis of variance)，樣品均值間以鄧肯氏多重範圍檢驗(Duncan's multiple range test)分析差異，顯著差異以 $p < 0.05$ 比較其差異顯著性，結果以平均值表示。

二、結果

(一) 奈米乳化型載體的包圍效果

利用穿透式電子顯微鏡(TEM)可以觀察到d-limonene奈米乳化型載體呈現圓球狀，如圖八(A)所示，放大倍率圖如圖八(B)所示，其中心陰影部位為被包圍的分散相d-limonene。

利用Span 85與Brij 97所組成的混合界面活性劑在不同HLB值下對於d-limonene的奈米包圍率如表七所示；當HLB值為2時，粒子大小為332 nm，對於d-limonene的包圍率為71.67%；當HLB值為12時，粒子大小為23 nm，此時d-limonene的包圍率為92.33%；由此表的結果可得知，當HLB值由2增加至12，奈米包圍的粒子大小會由332 nm降至23 nm，而d-limonene的包圍率也會隨之上升；因此，利用奈米乳化型載體包圍d-limonene可以得到較高的d-limonene含量；在此實施例中，本案發明

人利用相同的配方製備出微乳化載體(Microemulsion)，其載體粒子大小為2741 nm，d-limonene的包覆率為61.33%；由此可知，本發明提供之奈米乳化型載體系統會較微乳化型載體系統具有較高的分散相包覆率。

表七 在不同HLB值下奈米乳化型載體對d-limonene的包覆率

乳化形式	So ratio	HLB值	粒徑大小(nm)	包覆率(%)
奈米	0.4	2	332 ^a ±27.3	71.67 ^d ±5.86
奈米	0.4	3	335 ^a ±22.1	71.33 ^d ±3.01
奈米	0.4	4	287 ^b ±14.2	80.67 ^c ±3.06
奈米	0.4	5	226 ^c ±13.5	81.12 ^{bc} ±4.36
奈米	0.4	6	207 ^c ±7.3	83.33 ^b ±6.00
奈米	0.4	7	175 ^d ±2.6	81.33 ^{bc} ±4.51
奈米	0.4	8	149 ^e ±3.1	82.33 ^b ±3.21
奈米	0.4	9	102 ^f ±2.1	83.67 ^b ±5.86
奈米	0.4	10	73 ^g ±1.3	87.15 ^{ab} ±2.00
奈米	0.4	11	54 ^h ±0.7	91.67 ^a ±2.52
奈米	0.4	12	23 ⁱ ±0.9	92.33 ^a ±2.08
微米	0.4	12	274 ¹ ±327	61.33 ^e ±6.66

^{a-1} 同一欄中具有不同字母者代表在統計上具有顯著差異($p < 0.05$)

(二) 奈米乳化型載體的釋放效果

奈米乳化型載體在不同貯藏溫度與貯藏時間下d-limonene含量變化如圖九所示，在三種貯藏溫度下，d-limonene含量皆會下降，尤其是

第7到第14天時d-limonene含量下降最快，可能此時乳化系統並未達到平衡狀態，因此d-limonene會藉由粒子碰撞或融合過程而散失。在50°C貯藏溫度下，d-limonene在每個時間點下乳化型載體中的含量最少，可能是溫度升高導致d-limonene在載體內的擴散速度增加，而使其釋放速率上升，因此在載體貯藏過程中溫度的提升會加速d-limonene的釋放。

在4°C、25°C、50°C三種貯藏溫度下，d-limonene乳化型載體的釋放機制的表現常數(n值)分別為0.31 (4°C)、0.42 (25°C)與0.55 (50°C)；由此可知d-limonene在奈米乳化型載體中的釋放速率會受到載體所限制；而釋放速率常數k如表八所示，在不同溫度與時間下k值皆不同；由平均值可知，d-limonene的釋放速率常數會受到溫度所影響，溫度上升釋放速率常數會上升。

表八 在不同貯藏溫度與時間下Avrami's equation的d-limonene釋放速率常數k之變化

貯藏天數	k(4°C)	k(25°C)	k(50°C)
0	6.24	6.25	6.25
7	2.67	3.80	9.31
14	2.97	4.60	7.10
21	3.95	4.76	7.29
28	5.89	4.06	6.22
35	5.36	4.30	5.55
42	2.05	4.30	5.56
49	6.71	4.05	5.23
56	5.48	3.88	5.01
63	5.37	4.4	7.53

貯藏天數	$k(4^{\circ}\text{C})$	$k(25^{\circ}\text{C})$	$k(50^{\circ}\text{C})$
70	4.88	4.38	6.21
77	4.47	3.98	5.64
84	5.80	4.34	5.17
91	6.39	4.00	5.70
平均值 \pm SD	4.02 \pm 1.32	5.11 \pm 0.61	6.07 \pm 1.18

實施例四 奈米乳化型載體皮膚吸收效果的分析

一、材料與方法

(一) 試藥

右旋檸檬烯(d-limonene)：4-isopropenyl-1-methylcyclohexane, $\rho=840$ kg/m³, RI=1.487 (Merck)。

界面活性劑 Span 85：山梨糖醇酐三油酸酯(sorbitan trioleate, C₆₀H₁₀₈O₈)，HLB 值為 1.8 (Sigma Aldrich)。

界面活性劑 Brij 97：聚氧乙烯 10 油醚(Polyoxyethylene (10) oleyl ether)，HLB 值為 12.4 (Sigma Aldrich)。

共同界面活性劑 (co-surfactant)：乙二醇 (ethylene glycol, HOCH₂CH₂OH) (Sigma Aldrich)。

正己烷(n-hexane)：C₆H₁₄，分子量 86.2，熔點 95°C (HPLC 等級，Sigma Aldrich)。

利用 Span 85 與 Brij 97 所組成的混合界面活性劑，乳化液配方為 10 wt% d-limonene 濃度下，HLB 值為 2~12，So ratio 為 0.4，1 wt% 乙二醇，利用超音波方法製備成奈米乳化型載體。

(二) 方法

1. 粗乳化液(Coarse emulsion)之製備

同實施例二。

2. 奈米乳化型載體之製備

同實施例二。

3. 皮膚體外吸收實驗

a. 實驗裝置

以法蘭茲擴散器(Franz diffusion cell) (transdermal diffusion cell drive console, Logan Instruments Corp. New Orleans, U.S.A.)作為皮膚體外吸收實驗裝置。

b. 實驗動物

取雄性 Sprague-Dawley 大鼠為研究對象，購自樂斯科公司(台灣)，大鼠購入時約為五週齡，體重約 125 克，飼養於台灣大學食品科技研究所五樓動物房中，生活週期維持 12 小時光照(12-hour light cycle)從早上 7 時至下午 7 時，室溫維持 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 50~70%，並給予動物充足飼料及飲水，當飼養達八週齡，大鼠體重達 280 克左右，取其腹部皮膚。

c. 皮膚採集

大鼠飼養達八週後進行犧牲，將大鼠以二氧化碳(CO_2)安樂死後，取下其腹部皮膚，將多餘的脂肪組織剪掉，表皮塗上脫毛膏(Depilatory

agent)，十分鐘後將脫毛膏以去離水洗去，再將腹部皮膚浸泡在生理食鹽水中 10 分鐘，拭乾，貯存於 -80°C 下備用。

d. 皮膚吸收實驗

將大鼠腹部皮膚剪取適當大小放在法蘭茲擴散器中，有效吸收面積為 1.77cm^2 ，受藥端放置 1 mL 含有 10% d-limonene 且具有不同 HLB 值的奈米乳化型載體；接收端則為 20 mL 正己烷，轉速設定在 600 rpm，系統溫度以恆溫水浴維持於 37°C ，取點時間分別為 30、60、90、120、150、180、210、240、270、300、360 分鐘，定時以針筒從接收端取出 1 mL 溶液，並補回同等體積 1 mL 之正己烷。使用未被包覆的 10% d-limonene 以及以微米乳化型載體包埋的 10% d-limonene 作為對照組。

e. d-limonene 含量測定

取 1 μL 接收端樣品利用氣相層析儀 Varian 3300 Gas Chromatograph (Varian, Sunnyvale CA, USA) 來分析，分析條件如下：

火焰離子檢測器(Flame ionizing detector)：

氫氣流速(H_2 flow)為 40 mL/min

空氣流速(Air flow)為 250 mL/min

氮氣流速(N_2 flow)為 30 mL/min

分離管柱 Stabilwax (Carbowax PEG, 60 m \times 0.32 mm, 1 μm)：

分流率(Split ratio)：80:1

起始管柱溫度(Initial column temperature)為 50°C

最終管柱溫度(Final column temperature)為 200°C

管柱升溫條件：

起始溫度50°C停留2分鐘

以10°C/min速度加熱至130°C

以5°C/min速度加熱至150°C

最後以30°C/min速度加熱至200°C

於200°C停留3分鐘

皮膚吸收的樣品濃度以每單位面積吸收多少 d-limonene 的累積濃度($\mu\text{L}/\text{cm}^2$)來表示。

f. 皮膚中d-limonene濃度之測定

將經六小時吸收實驗後之皮膚取下，以生理食鹽水清洗皮膚表面多餘的樣品，拭乾，秤重並記錄後，以鋁箔紙包裹，迅速以液態氮急速冷凍，冷凍後剪碎以組織均質機於冰浴下加入磷酸鉀緩衝液(potassium phosphate buffer)將其磨碎，均質液加入 10 ml 正己烷，以 $10,000 \times g$ 於 4°C 下離心 30 分鐘，取上層液 1 μL 利用氣相層析儀分析 d-limonene 含量。

4. 統計分析

不同HLB值下樣品的d-limonene包覆率均值差異分析，使用統計分析軟體進行變異數分析(ANOVA, analysis of variance)，樣品均值間以鄧肯氏多重範圍檢驗(Duncan's multiple range test)分析差異，顯著差異以 $p < 0.05$ 比較其差異顯著性，結果以平均值表示。

二、結果

d-limonene 奈米乳化型載體在不同時間點下皮膚的吸收累積濃度

如表九所示，不同HLB值下載體的粒徑大小皆不相同，由統計分析結果可以顯示，粒徑越小皮膚所吸收的濃度會越高，當HLB值在10、11與12時，載體粒子大小分別為73、54與23 nm，會較其他粒徑下的載體有較高的吸收累積濃度，未經乳化的d-limonene會呈現出較差的吸收效果，且微米乳化型載體的吸收效果也較奈米乳化型載體來的低。

當假設載體 100%被皮膚所吸收，原本樣品濃度為10% d-limonene 除以有效吸收面積 1.77 cm^2 可以得到吸收濃度為 $56.50 \text{ }\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 的累積濃度，在HLB值為12，吸收時間360分鐘下的d-limonene累積濃度為 $42.09 \text{ }\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ，除以100%下的理想吸收累積濃度，可以推知當乳化型載體在HLB值為12時，6小時內的吸收濃度可以達到74.49%。

表九 奈米乳化型載體經皮膚吸收後d-limonene之累積濃度

載體	皮膚吸收時間(分鐘)											
	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
HLB2	2.26±0.80 ^{Kc}	3.11±0.40 ^{Kd}	5.37±0.39 ^{Jf}	7.63±1.20 ^{lc}	10.73±1.60 ^{He}	12.99±0.79 ^{Ge}	15.82±0.79 ^{Fe}	17.80±0.39 ^{Ef}	19.77±0.79 ^{Df}	21.47±0.79 ^{Cf}	23.45±0.40 ^{Be}	27.12±0.08 ^{Ah}
HLB3	0.85±0.40 ^{Kf}	1.98±0.40 ^{lc}	3.11±1.20 ^{lg}	4.24±0.40 ^{Hf}	6.21±0.80 ^{Gf}	9.89±0.40 ^{Ff}	12.43±1.20 ^{Ef}	15.54±1.60 ^{Dg}	18.08±1.02 ^{Cd}	20.06±0.80 ^{Cg}	22.60±0.79 ^{Be}	24.86±0.39 ^{Ai}
HLB4	1.98±0.40 ^{lc}	3.67±0.40 ^{Kd}	5.65±0.79 ^{Jf}	8.19±0.39 ^{lc}	10.17±0.86 ^{He}	12.71±0.40 ^{Ge}	15.54±0.40 ^{Fe}	18.36±0.40 ^{Ef}	20.62±0.39 ^{Df}	22.60±0.79 ^{Cf}	25.99±0.80 ^{Bd}	29.38±0.08 ^{Ag}
HLB5	3.67±0.39 ^{Jd}	6.56±0.39 ^{lc}	8.47±0.79 ^{He}	11.02±1.19 ^{Gd}	12.71±0.39 ^{Gd}	14.41±0.39 ^{Fd}	16.95±0.79 ^{Ee}	18.93±0.39 ^{Df}	21.19±0.39 ^{Cf}	22.88±0.39 ^{Cf}	25.42±0.79 ^{Bd}	29.66±1.19 ^{Ag}
HLB6	4.52±0.79 ^{Kd}	5.93±1.19 ^{lc}	8.47±0.79 ^{lc}	11.30±0.79 ^{Hd}	13.28±0.39 ^{Gd}	14.97±0.39 ^{Fd}	18.36±0.39 ^{Ed}	21.47±0.79 ^{Dc}	24.01±1.19 ^{Cc}	26.84±1.19 ^{Cc}	29.10±1.19 ^{Bc}	32.20±0.79 ^{Af}
HLB7	7.06±1.19 ^{lc}	8.76±1.19 ^{lb}	11.29±0.79 ^{Hd}	14.12±0.79 ^{Gc}	17.77±3.26 ^{Fc}	19.92±1.19 ^{Fc}	22.31±1.19 ^{Ec}	24.86±0.79 ^{Ed}	27.97±0.39 ^{Dd}	30.79±1.19 ^{Cd}	33.05±1.17 ^{Bb}	35.88±0.37 ^{Ad}
HLB8	7.34±3.26 ^{He}	10.17±0.79 ^{Hb}	13.56±0.79 ^{Gc}	17.51±1.60 ^{Fb}	19.49±2.00 ^{Fb}	21.19±1.19 ^{Fb}	24.01±1.19 ^{Eb}	25.99±0.79 ^{Ed}	27.96±0.39 ^{Dd}	32.49±0.39 ^{Cc}	35.31±0.39 ^{Bb}	37.29±0.79 ^{Ac}
HLB9	8.47±1.60 ^{lc}	11.86±1.60 ^{Kb}	13.84±0.39 ^{lc}	15.82±0.79 ^{lc}	17.80±0.39 ^{Hc}	20.90±1.60 ^{Gbc}	24.29±0.79 ^{Fb}	27.11±0.79 ^{Ec}	29.38±0.79 ^{Dc}	31.92±0.39 ^{Cd}	34.18±0.39 ^{Bb}	37.57±0.39 ^{Ac}
HLB10	9.32±0.39 ^{lc}	11.58±0.39 ^{Hb}	13.84±1.19 ^{Hbc}	17.23±1.19 ^{Gb}	20.06±1.19 ^{Fbb}	22.88±2.40 ^{Fbb}	24.86±1.99 ^{Efb}	27.97±1.19 ^{Ec}	31.36±0.79 ^{Dc}	33.90±0.79 ^{Cc}	35.59±0.79 ^{Bb}	38.14±0.39 ^{Ac}
HLB11	11.30±0.79 ^{Hb}	12.71±0.39 ^{Gb}	15.82±0.79 ^{Fb}	18.64±1.59 ^{Eab}	22.30±1.59 ^{Da}	24.86±1.59 ^{Da}	29.09±1.19 ^{Ca}	30.51±0.79 ^{Cb}	33.89±0.79 ^{Bb}	35.59±0.79 ^{Bb}	38.14±1.19 ^{Aa}	40.11±0.79 ^{Ab}
HLB12	13.56±0.79 ^{La}	15.52±0.79 ^{Ka}	17.23±0.39 ^{Ja}	20.34±0.79 ^{Ja}	23.16±1.59 ^{Hba}	26.84±1.19 ^{Ga}	29.38±0.79 ^{Fa}	33.05±0.39 ^{Ea}	35.88±0.39 ^{Da}	38.42±0.79 ^{Ca}	40.40±0.39 ^{Ba}	42.09±0.39 ^{Aa}
10% L*	0.56±0.00 ^{Gf}	0.56±0.00 ^{Gf}	1.13±0.00 ^{Fh}	1.13±0.00 ^{Fg}	1.98±0.39 ^{Fg}	3.39±0.79 ^{Eg}	4.24±1.19 ^{Eg}	6.50±2.79 ^{Dh}	8.76±1.19 ^{Cg}	9.89±0.39 ^{Cf}	11.29±0.79 ^{Bg}	13.28±0.39 ^{Ag}
微米	0.56±0.00 ^{Jf}	1.98±0.39 ^{lc}	2.54±0.39 ^{lg}	4.52±0.79 ^{Hf}	6.49±1.99 ^{Gf}	8.47±1.59 ^{Ff}	12.15±1.99 ^{Ef}	14.69±2.40 ^{Dg}	17.51±1.60 ^{Cf}	18.93±0.39 ^{Ch}	20.62±0.39 ^{Bf}	22.60±0.79 ^{Af}

* 10%L：未乳化10% d-limonene

^{aj} 同一欄中具有不同字母者代表在統計上具有顯著差異(p<0.05)

^{A-J} 同一列中具有不同字母者代表在統計上具有顯著差異(p<0.05)

如圖十所示，載體粒子大小會影響皮膚吸收的速度，皮膚的累積吸收濃度由快到慢分別為：HLB 11 (54 nm) > HLB 8 (149 nm) > HLB 5 (226 nm) > HLB 3 (335 nm) > 微米乳化 (2471 nm) > 10% d-limonene。

經過6小時的皮膚吸收實驗後，分析皮膚中殘留的d-limonene含量，結果如圖十一所示，由皮膚中的d-limonene含量可以了解奈米乳化型載體是否能通過皮膚，且並不會在皮膚中殘留；由實驗結果可以得知，10% d-limonene在皮膚中的殘留量最多，其次為微米乳化型載體，最後才是在各HLB值下的奈米乳化型載體，可以得知奈米乳化型載體可以幫助d-limonene快速通過皮膚；因此，使用本發明所提供的d-limonene奈米乳化型載體作為藥物經皮膚吸收系統的穿透促進載體是合適的。

本發明所提供之具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體、及其製備方法，與前述引證案及其他習用技術相互比較時，更具有下列之優點：

1. 本發明所提供之奈米乳化型載體的粒徑為奈米級，在常溫(25°C)下安定性佳，儲藏超過3個月，該載體粒徑仍維持在奈米級。
2. 本發明所提供之奈米乳化型載體對分散相的包覆率可高達90%以上。
3. 本發明所提供之奈米乳化型載體對皮膚的吸收功效良好，且可幫助分散相快速通過皮膚，而不會在皮膚中殘留，因此很適合作為藥物經皮膚吸收系統的穿透促進載體。

上列詳細說明係針對本發明之一可行實施例之具體說明，惟該實施例並非用以限制本發明之專利範圍，凡未脫離本發明技藝精神所為之等效實施或變更，均應包含於本案之專利範圍中。

綜上所述，本案不但在空間型態上確屬創新，並能較習用物品增進上述多項功效，應已充分符合新穎性及進步性之法定發明專利要件，爰依法提出申請，懇請 貴局核准本件發明專利申請案，以勵發明，至感德便。

【圖式簡單說明】

圖一為 Span 85 與 Brij 97 在 HLB 值為 12 以及 10 wt% d-limonene 濃度下，奈米乳化型載體之粒徑分布。

圖二為不同的分散相與界面活性劑的比例(*So ratio*)對 d-limonene 奈米乳化型載體平均粒徑之影響。

圖三為超音波乳化功率對 d-limonene 奈米乳化型載體平均粒徑之影響。

圖四為乳化時間對 d-limonene 奈米乳化型載體平均粒徑大小之影響。

圖五為儲藏時間與溫度對 d-limonene 奈米乳化型載體粒徑大小之變化。

圖六為分散相與界面活性劑的比例(*So ratio*)對 d-limonene 奈米乳化型載體 Zeta 電位之影響。

圖七為不同 pH 值下 5 wt%、10 wt%、15 wt% d-limonene 奈米乳化型載體 Zeta 電位之變化。

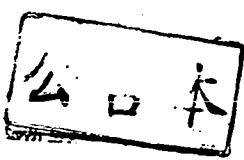
圖八(A)至(C)為奈米乳化型載體 d-limonene 奈米包覆之穿透式電子顯微鏡圖；圖八(A)之比例尺為 50 nm，圖八(B)之比例尺為 13 nm；圖八(C)奈米乳化型載體溶液外觀。

圖九為不同儲藏溫度與時間下奈米乳化型載體 d-limonene 含量之變化。

圖十為不同粒徑大小之奈米乳化型載體經皮膚不同時間吸收後之 d-limonene 累積濃度。

圖十一為奈米乳化型載體經皮膚吸收後組織中 d-limonene 之濃度。

【主要元件符號說明】



七、申請專利範圍：

1. 一種具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體，包括：

— 2~9 wt%混合界面活性劑，該混合界面活性劑是由山梨糖醇酐三油酸酯(sorbitan trioleate, Span 85)與聚氧乙烯 10 油醚(Polyoxyethylene (10) oleyl ether, Brij97)兩種界面活性劑組成，該混合界面活性劑的親水性-親脂性平衡值(Hydrophilic-lipophilic balance, HLB)為 11~12；

— 共同界面活性劑，該共同界面活性劑為乙二醇(ethylene glycol)，其比例為 1 wt%；

— 分散相，該分散相為 5~15 wt%右旋檸檬烯(d-limonene)，該分散相與混合界面活性劑的比例(*So ratio*)為 0.4~0.6；以及

— 連續相，該連續相為水，其比例為 80~92 wt%；

其中該乳化型載體於 pH 值為 8-11 具有較佳之安定性。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體，

其中該混合界面活性劑的親水性-親脂性平衡值(HLB)公式如下：

$$HLB_{Span85-Brij97} = \frac{(H_{Span85} \times W_{Span85}) + (H_{Brij97} \times W_{Brij97})}{(W_{Span85} + W_{Brij97})}$$

其中 W_{Span85} 為界面活性劑山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)之重量百分比， W_{Brij97} 為界面活性劑聚氧乙烯10油醚(Brij97)之重量百分比， H_{Span85} 為界面活性劑山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)之HLB值， H_{Brij97} 為界面活性劑聚氧乙烯10油醚(Brij97)之HLB值， $HLB_{Span85-Brij97}$ 為山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)與聚氧乙烯10油醚(Brij97)界面活性劑混合後之HLB值。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述之具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體，

其中該山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)的 HLB 值為 1.8。

4. 如申請專利範圍第 2 項所述之具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體，其中該聚氧乙烯 10 油醚(Brij97)的 HLB 值為 12.4。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體，其中該分散相與該界面活性劑的比例(So ratio)為界面活性劑相對於油相之重量百分比：界面活性劑重量/添加油相重量。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之具促進皮膚穿透效果的奈米乳化型載體，其中該連續相為去離子水。
7. 一種製備如申請專利範圍第 1 項所述之奈米乳化型載體的方法，包括下列步驟：
步驟一：混合 5~15 wt%分散相萜烯類物質、山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)與聚氧乙烯 10 油醚(Brij97)組成之 2~9 wt%混合界面活性劑、80~92 wt%連續相，以及 1 wt%共同界面活性劑乙二醇所組成之乳化液；
步驟二：利用高速均質乳化機(Polytron)將該乳化液均質得到呈現乳白色的粗乳化液；以及
步驟三：將上述粗乳化液利用超音波震盪器進行超音波乳化，以得到奈米乳化型載體。
8. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)與聚氧乙烯 10 油醚(Brij97)組成之混合界面活性劑的親水性-親脂性平衡值(HLB)為 11~12。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之方法，其中該混合界面活性劑的親水性-親脂性平衡值(HLB)公式如下：

$$HLB_{Span85-Brij97} = \frac{(H_{Span85} \times W_{Span85}) + (H_{Brij97} \times W_{Brij97})}{(W_{Span85} + W_{Brij97})}$$

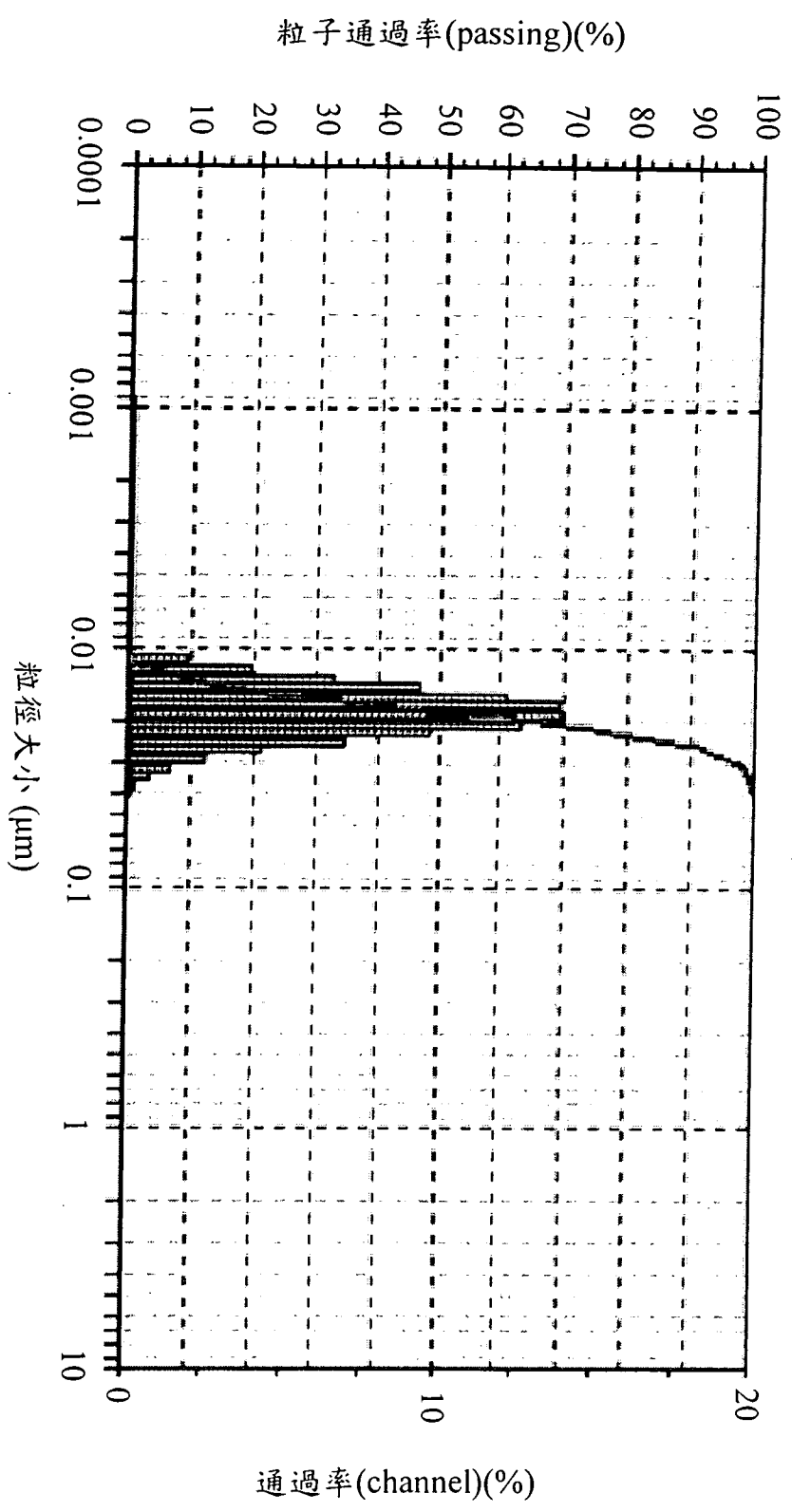
其中 W_{Span85} 為界面活性劑山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)之重量百分比， W_{Brij97} 為界面活性劑聚氧乙烯10油醚(Brij97)之重量百分比， H_{Span85} 為界面活性劑山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)之HLB值， H_{Brij97} 為界面活性劑聚氧乙烯10油醚(Brij97)之HLB值， $HLB_{Span85-Brij97}$ 為山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)與聚氧乙烯10油醚(Brij97)界面活性劑混合後之HLB值。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之方法，其中該山梨糖醇酐三油酸酯(Span 85)的 HLB 值為 1.8。
11. 如申請專利範圍第 9 項所述之方法，其中該聚氧乙烯 10 油醚(Brij97)的 HLB 值為 12.4。
12. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該共同界面活性劑乙二醇(ethylene glycol)的比例為 1 wt%。
13. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該萜烯類物質為右旋檸檬烯。
14. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該分散相與混合界面活性劑的比例(*So ratio*)為 0.4~0.6。
15. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該連續相為去離子水，其比例為 80~92 wt%。
16. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該步驟二中均質時間為 90~180 秒。
17. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該步驟三中超音波乳化時間為 90~180 秒。

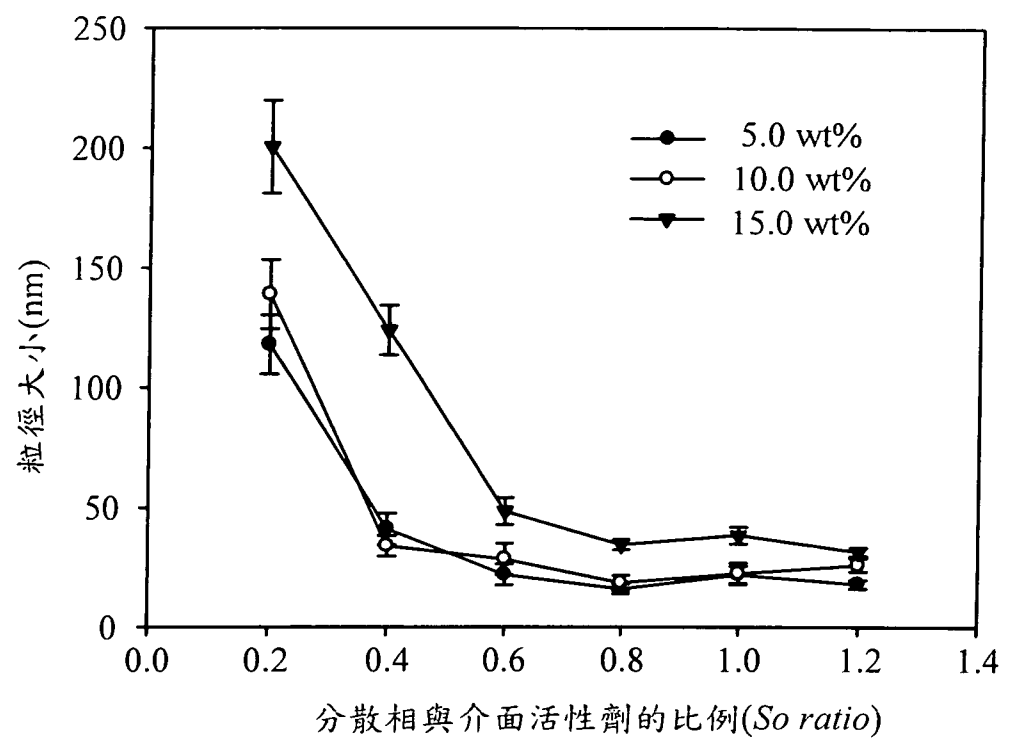
18. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該步驟三中超音波乳化功率為
16~24 瓦。

公告本

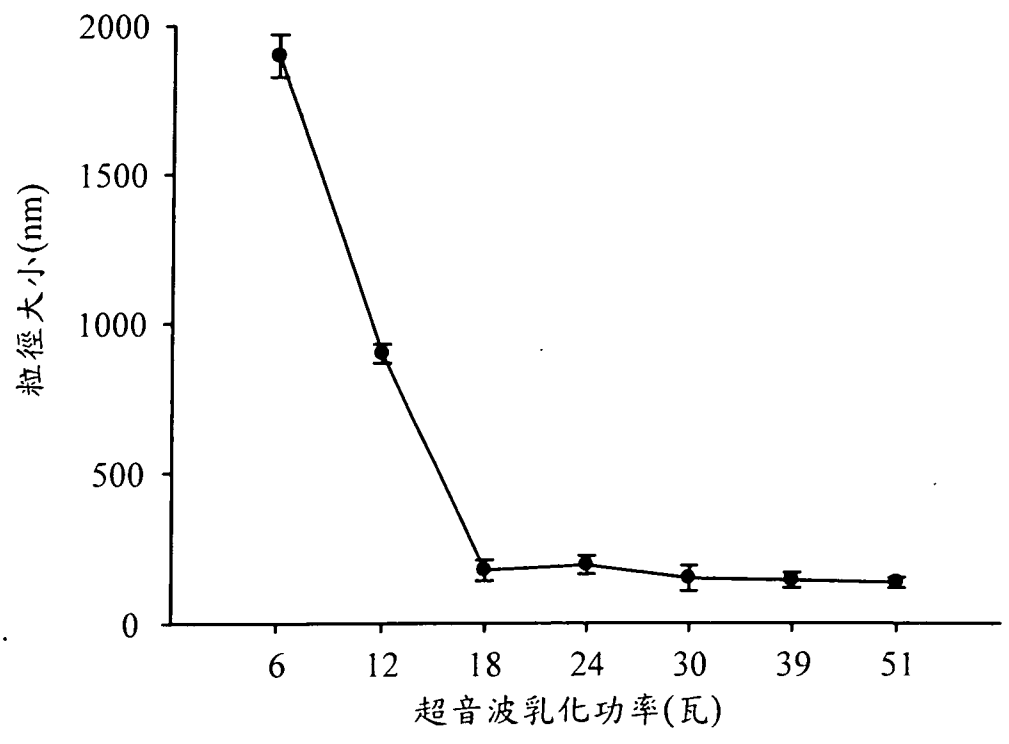
八、圖式：



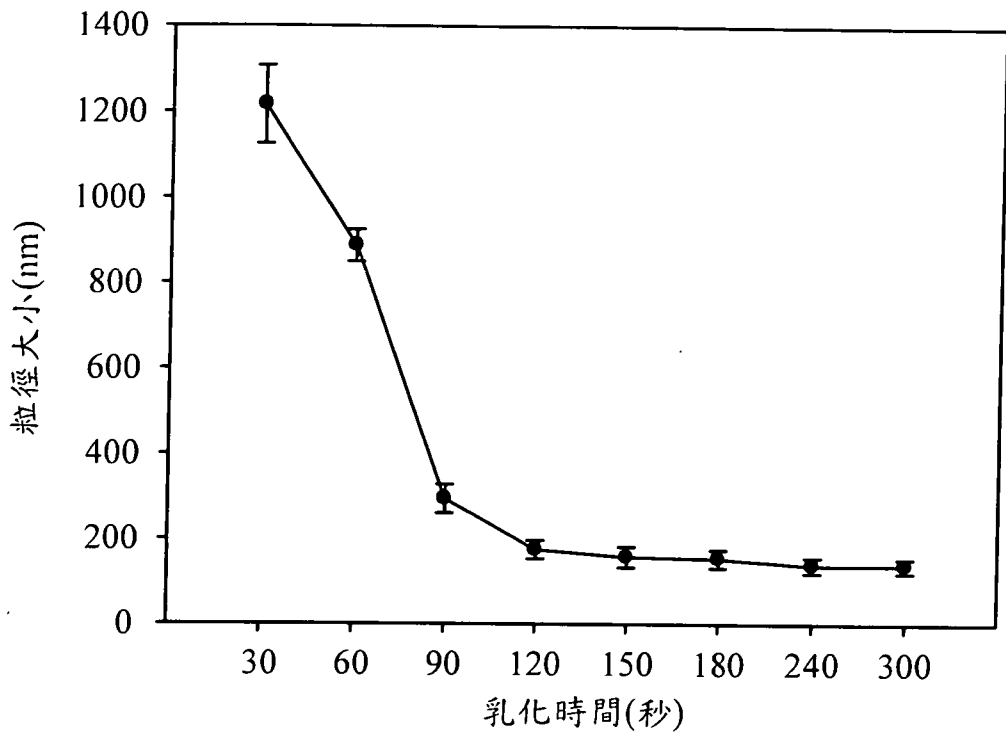
圖一



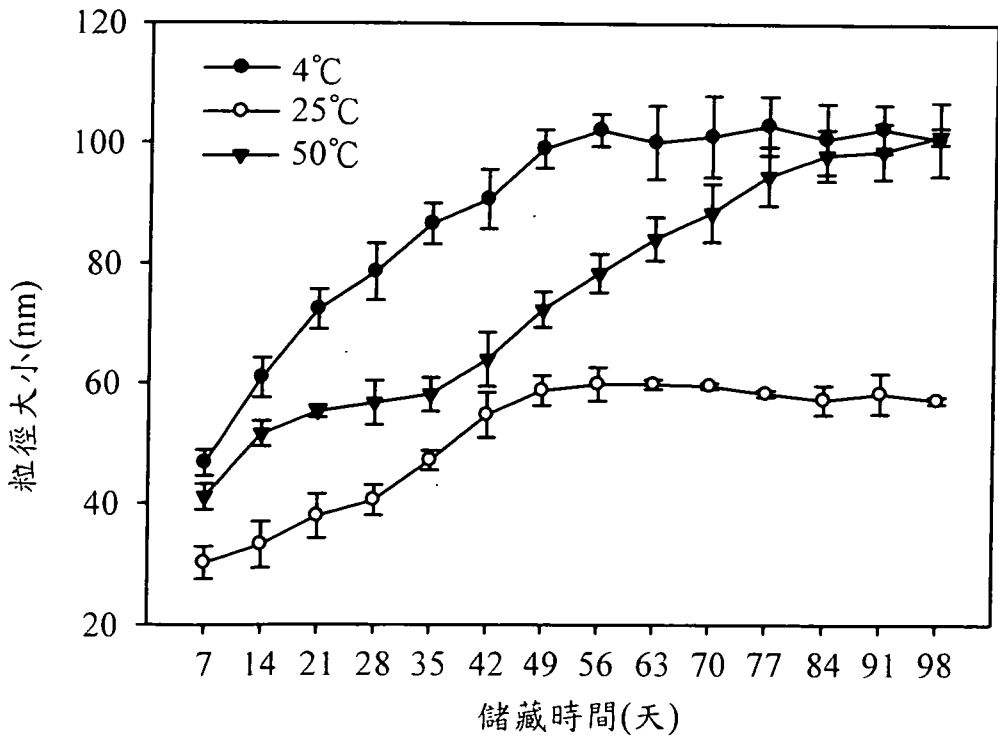
圖二



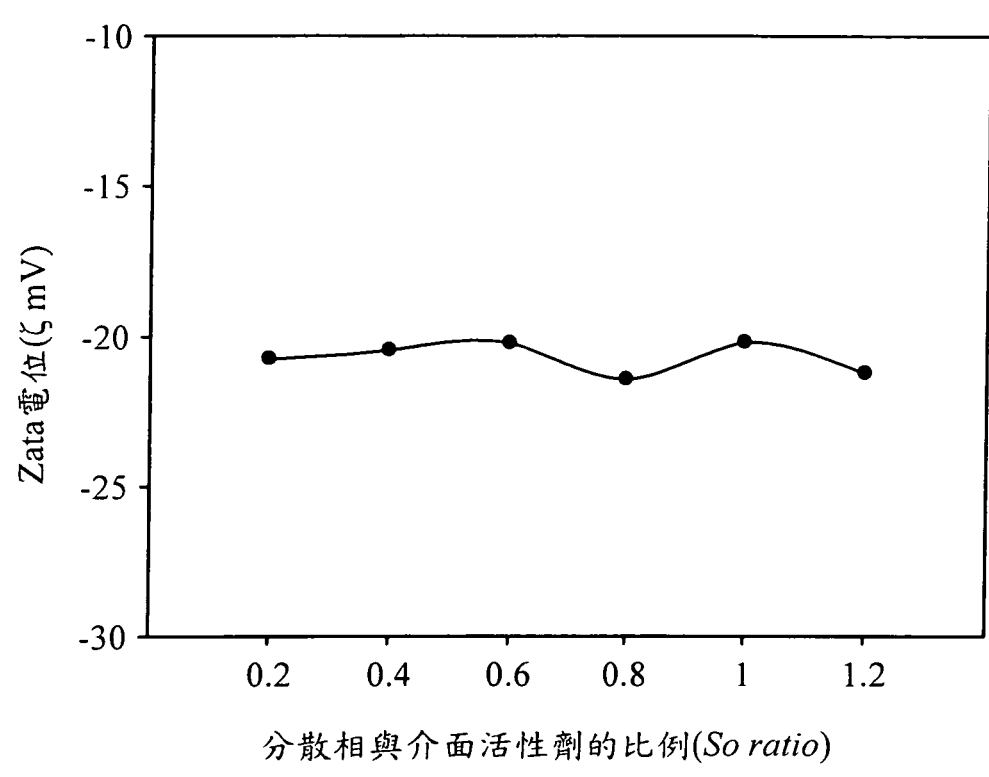
圖三



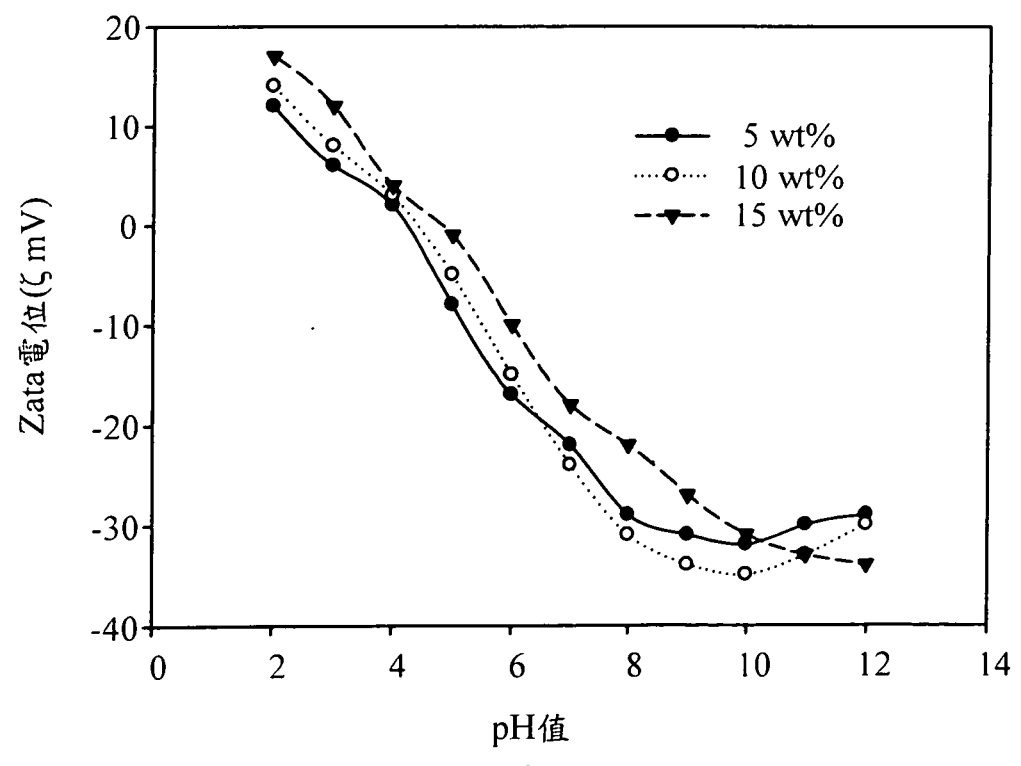
圖四



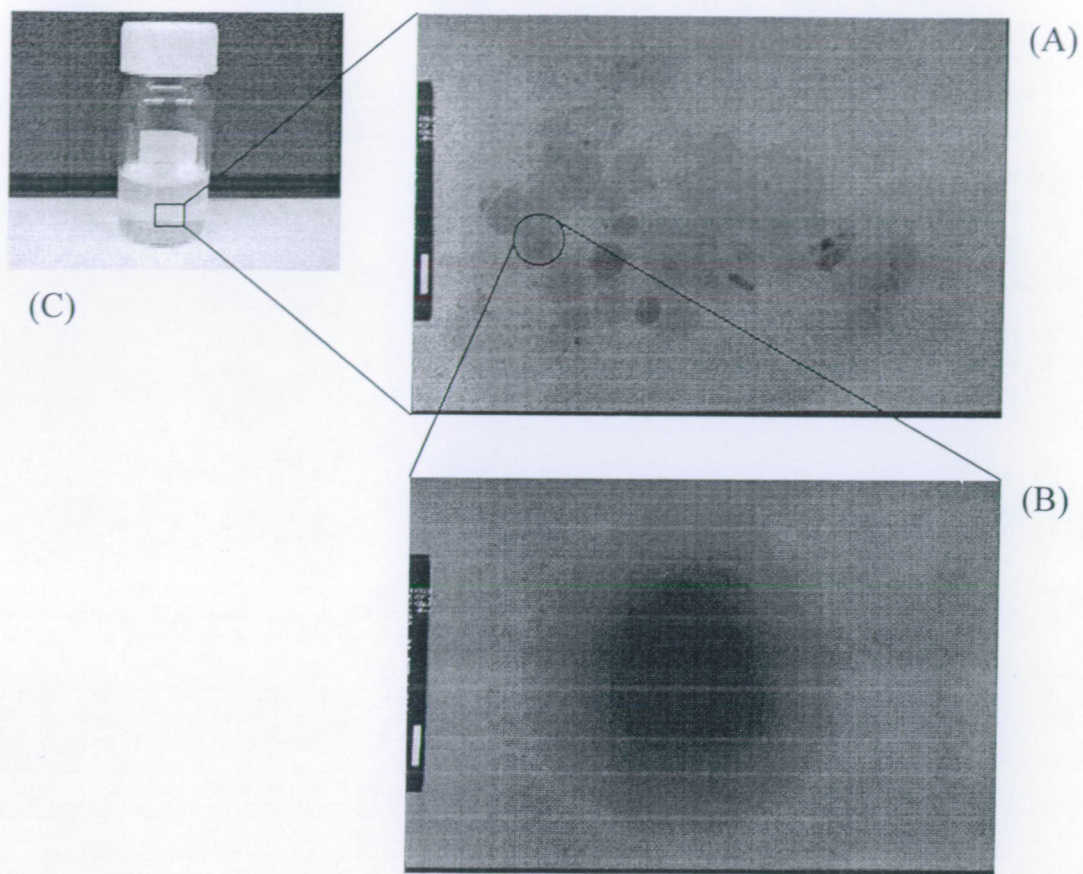
圖五



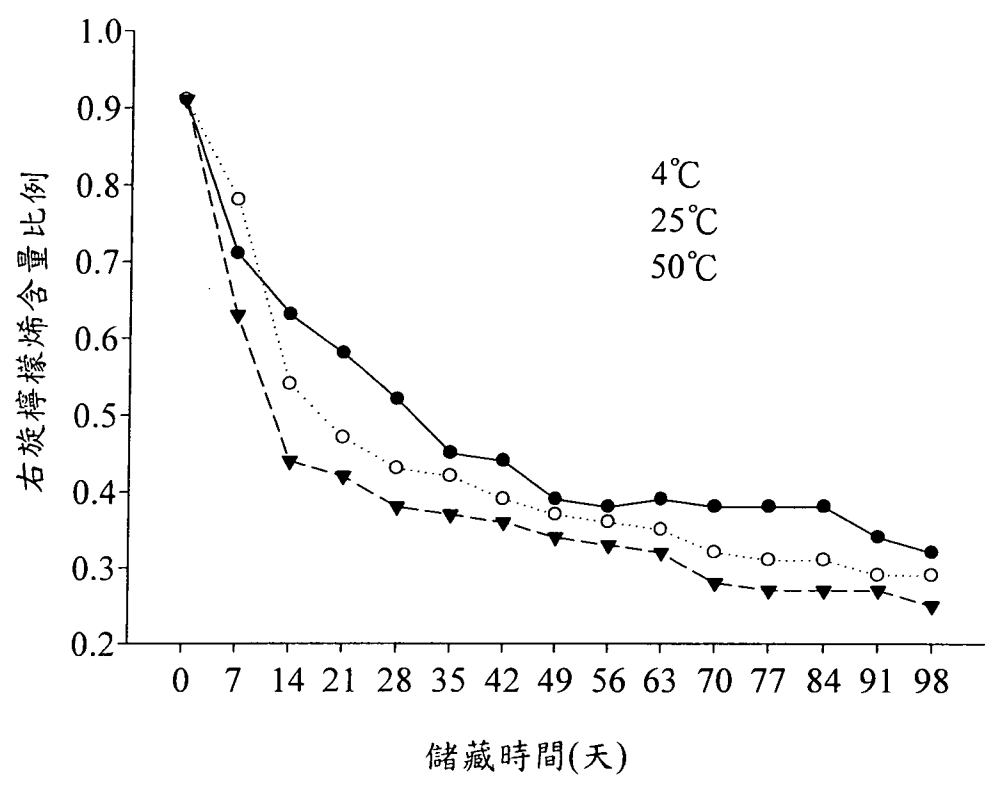
圖六



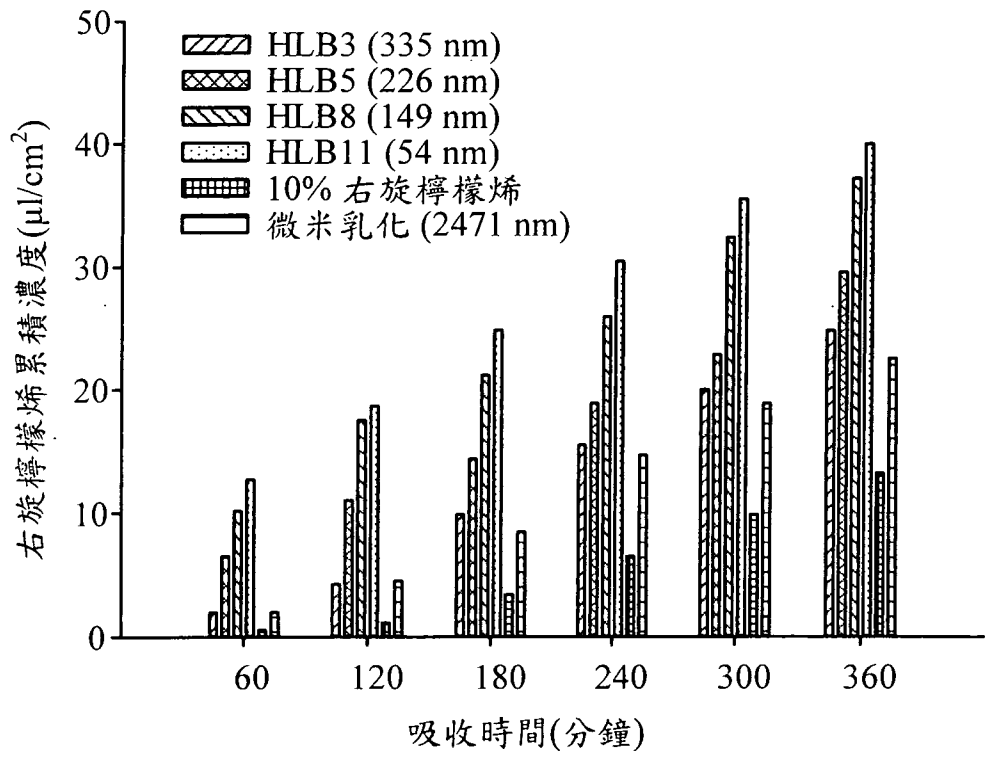
圖七



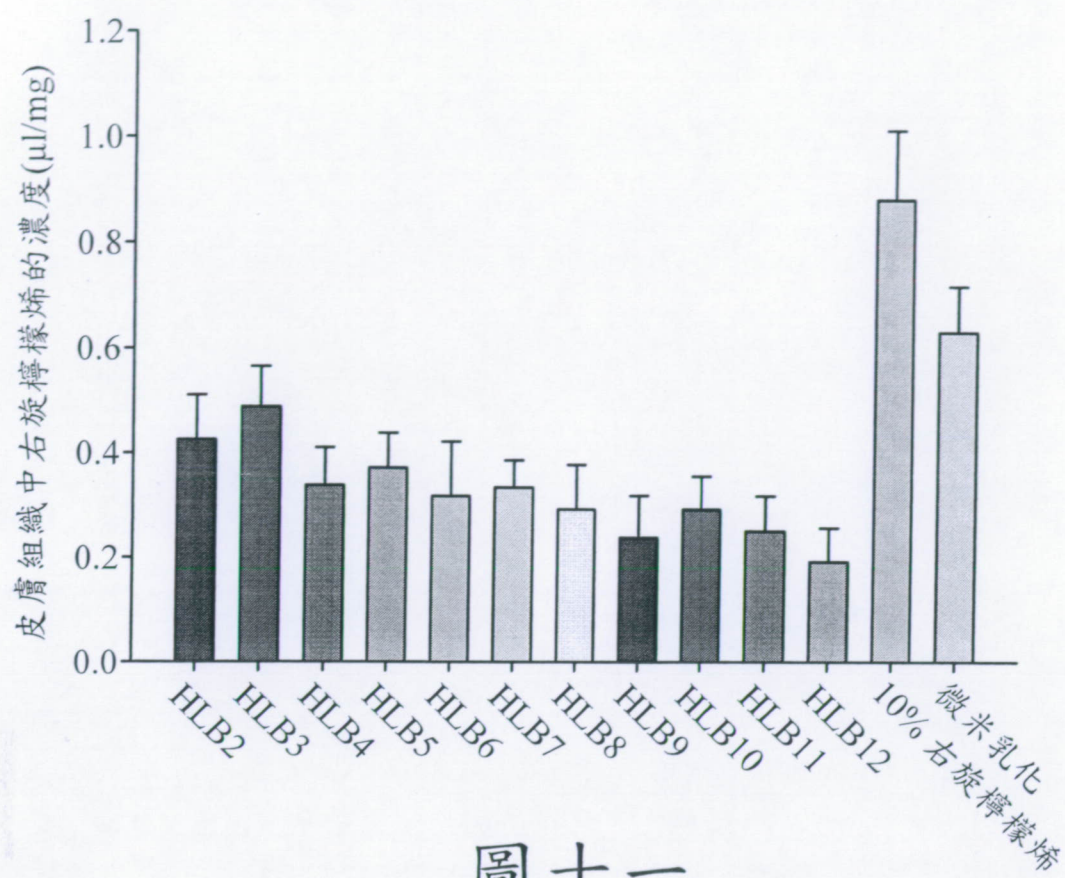
圖八



圖九



圖十



圖十一