

微脂粒包覆蠶絲蛋白之製備與功能性評估

陳麗妃¹ 陳麗舟¹ 陳崇裕^{2*}

摘要 本研究以不同脂質利用酒精注射法及薄膜水合 / 超音波震盪法，製備蠶絲蛋白微脂粒，並進行皮膚保濕及彈力之功能性與配方安全性評估。實驗結果，不同製備方法以酒精注射法所得之微脂粒平均粒徑較小，約為 72~85 nm 之間；且包覆率較佳，約為 85~90% 之間。在安定性方面，無論儲存於 4°C 或室溫環境下，以薄膜/超音波震盪法製備之微脂粒較為安定，顯示粒徑大小會影響其穩定性。在有效性方面，將不同方法製備的微脂粒配方 (共 10 組) 塗抹於皮膚，分別測試保濕與彈力效果。以皮膚角質水分含量測試，各組配方在塗抹 120 min 後，顯示各組配方皆比控制組佳，且具有保濕效果；連續塗抹於手臂內側四星期後，皮膚彈性效果也明顯增加。蠶絲蛋白微脂粒 10 組配方，經 10 人接受 48 小時過敏測試，並無過敏現象產生。

關鍵詞：蠶絲蛋白、微脂粒、皮膚保濕、皮膚有彈性。

The Manufacture and Effectiveness Evaluation of Liposome Incorporated with Silk Protein

Li-Fei Chen¹ Li-Chou Chen¹ Chon-Yu Chen^{2*}

ABSTRACT This study selected different lipids to prepare silk protein encapsulated liposomes by using ethanol injection method and thin film sonication/ethanol injection method. The prepared formulations also checked with safety test and skin hydration and elasticity. The experimental results showed smaller average particle size about 72~85 nm and better encapsulation rate about 85~90% by using ethanol injection method. For safety test, the sonication/ethanol injection method expressed better particle size stability for both 4°C and room temperature. For efficacy test, ten different prepared methods and formulations were applied on skin to test skin hydration, elasticity and water content of stratum corneum. Every experimental samples treated 120 min showed better skin hydration than the control sample. After four weeks treatment with inner side of the arm, the skin elasticity also showed obviously improvement. These ten experimental samples also proceed with allergy test for ten people with 48 hours revealed no allergy positive results.

Key Words: Silk Protein, Liposome, Skin Hydration, Skin Elasticity.

一、前言

以生物材料具有組織相容性之優點，將其應用於化妝品相關領域，著重於保護皮膚組織之功效。在天然蛋白質方面，主要大多是以膠原蛋白、蠶絲蛋白及多醣類等生物高分子為主^[11]。蠶絲蛋白是一種常用的天然生物聚合物，應用在人體做為縫合線的歷史悠久^[12,30]，目前絲蛋白線縫合應用在嘴唇、眼睛、口腔手術和皮膚傷口

^[27]及人造皮膚、血管、肌腱、韌帶、骨骼和牙齒等人造組織。蠶絲蛋白質還有良好的透氣性與保濕能力、抗 UV 的保護作用以及促進膠原蛋白分泌等效果，無毒且無刺激性，與人體相容性強的生物材料，也廣泛用於美容化妝品中^[7]。

蠶絲蛋白主要是由絲素蛋白 (Fibroin) 和絲膠蛋白 (sericin) 所組成，絲素蛋白約占質量的 70%；絲膠蛋白約占質量的 25%，其餘為雜質約含有 5%^[5]。絲素蛋

¹ 慈惠護理管理專科學校美容造型設計科

Dept. of styling and cosmetology, Tzu Hui Institute of Technology, Pingtung 92641, Taiwan.

² 樹德科技大學流行設計系

Dept. of Fashion Design, Shu-Te University, Kaohsiung 82445, Taiwan.

* Corresponding Author. E-mail: chonyu@stu.edu.tw

白是由親水性較低的氨基酸所組成，是蠶絲主要纖維結構，用來構成蠶絲骨架^[23]；絲膠蛋白主要由親水性較高的氨基酸所組成，因此水溶性較佳，為蠶絲之黏液結構，附著絲素蛋白的外圍，使蠶絲整體骨架更為堅固^[35]。將鼠細胞 L-929 在蠶絲蛋白膜與膠原蛋白上的生長情況，證明細胞在蠶絲蛋白膜上的生長速度與在膠原蛋白上的生長速度相當^[25]；利用蠶絲與軟骨細胞進行復合培養，結果發現蠶絲對軟骨細胞具有良好的吸附作用，並能維持軟骨細胞正常形態和功能，是適合軟骨細胞立體培養的良好天然支架^[3]。另外，蠶絲蛋白在降解後，產物本身不僅對組織無毒性之副作用，還對如皮膚、牙周組織等有營養與修復的作用^[13]。絲膠蛋白中具有很強的抗氧化活性^[21,36]，並且具保濕性及改善皺紋的效果，由於絲氨酸含量高（占總氨基酸量之 30~33%）並與皮膚中的天然保濕因子（NMF）非常相似^[31]，因此具應用於化妝保養品中的潛力。

近年來，微脂粒技術普遍應用於生物體內比例居多，除了醫藥製劑之藥物載體，做為腫瘤的診斷和治療外，也應用於其他領域。如在生物化學、分子生物、羊毛與絲織物之染色加工^[22]、食品科技、動物飼料、民生工業、化妝品及染髮劑^[15]等也都有其相關的應用。微脂粒以蛋黃磷脂質（egg phosphatidylcholine，EPC）、大豆磷脂質 SPC（soybean phosphatidylcholine）或高分子 PEG（polyethylene glycol）材料所形成之脂雙層空心球。其結構中主要脂質成分與生物體之細胞膜相似，具有極佳之生物相容性（compatibility）與生物分解性（biodegradability），可同時攜帶極性（親水性）與非極性（疏水性）的藥物，也具有乳化、保濕及可促進皮膚經皮吸收等作用，因此被視為傳輸系統中的重要成分^[9]。微脂粒技術經臨床試驗證實，作為控制釋放藥物載體（carrier）具有提高藥物的穩定性及有效性、延長藥效時間以改變藥物在人體內的分布、降低藥物毒性及減少副作用等優點^[33]。利微脂粒會隨著製備方法及包覆物質的不同，所製備之微粒粒徑、形狀大小也會有所差異^[32]，故可藉由此控制所包覆物質的滲透性、釋放活性、快速溶解或延緩釋放時間及增加其有效性。由於微脂粒在熱力學上處於介穩態（metastable），會因外界影響而產生結構性的改變，因而造成微脂粒的不穩定。影響微脂粒的穩定因素包括物理穩定性（physical stability）及化學穩定性（chemical stability）。影響物理穩定性（physical stability），是因為微脂粒結構自身之聚集（aggregation）、融合（fusion）和滲透，導致微脂粒平均粒徑大小、分佈的改變與包覆物質的減少。微脂粒製備及保存過程中發生氧化（oxidation）或水解（hydrolysis）反應，則會導致脂質分子碳鏈結構的改變，而影響微脂粒化學穩定性（chemical stability）。微脂粒製程中添加膽固醇，可降低脂質層之流動性，並可抑制包覆物質的洩漏^[34]；適當的乙醇亦可提高配方的

穩定^[20]將微脂粒包覆具功能性蕊質應用於皮膚，Schaller 等人的報告中指出微脂粒本身與皮膚及其他組織都能相容、無過敏性，並且會被降解為磷脂質，成為細胞膜的結構成分^[29]。以大豆磷脂質製成之微脂粒，對於皮膚刺激相當低，因此可利用微脂粒作為經皮吸收藥劑的基質^[18]。化妝品中利用微脂粒在皮膚上經由水合作用後，能進入到角質層，微脂粒對皮膚之作用可藉其中所含水分與皮膜之作用達到保濕效果，而磷脂質則可與角質蛋白結合，達到加強皮膚吸收與協助細胞修復^[2]。此外，研究報告顯示以微脂粒包覆 Co Q10 活性再加入化妝品，可增加其皮膚彈力及抗老化功效^[8]。針對上述研究報告得知，以微脂粒作為藥物的傳輸載體，能增加藥物於皮膚的吸收，更能將有效成分滲透至皮膚裡。故本研究以微脂粒作為傳送載體的特性，利用不同脂質及不同製備方法，以微脂粒包覆蠶絲蛋白，觀察其粒徑大小分佈、包覆率及安定性，並進行不同微脂粒配方之皮膚保濕和彈力之有效性與安全性評估。

二、實驗材料與方法

(一) 材料

本實驗使用的磷脂質 Phospholipon[®]90G 含 Phosphatidylcholine 92~98%，購自 Natterermann, Germany；Cholesterol，≥99%，購自 Sigma, USA；Dihexadecyl phosphate，≥98%，購自 Sigma, USA；Silk protein, MY-30 N/P，≥30%，購自新中村化學工業株式會社，Japan；溶劑 Absolute ethyl alcohol（99.5+v/v%），購自 Merck, Germany；Bradford Reagent 反應劑，購自 Sigma, USA；牛血清蛋白（Albumin bovine serum），購自 Sigma, USA。

(二) 實驗配方設計

1. 微脂粒的膽固醇配方組成

預試實驗中將磷脂質和不同的膽固醇重量比 4:0、4:0.5、4:1、4:2 等比例製備微脂粒。

2. 微脂粒的脂質配方組成

實驗中所製備的微脂粒配方，分別以 PC（Phosphatidylcholine）、膽固醇（Cholesterol）、DHDP（Dihexadecyl phosphate）成分，以重量比 4:0:0、4:0.5:0、4:0.5:0.1、4:1:0、4:1:0.1 等比例，以不同製備方法製備各 5 組微脂粒配方，依序為薄膜/超音波震盪法（Thin film / Sonication）TSA01、TSA02、TSA03、TSA04、TSA05 及酒精注射法（Ethanol injection）EIA01、EIA02、EIA03、EIA04、EIA05，共 10 組微脂粒配方。

(三) 微脂粒的製備

本實驗別以磷脂質和不同的膽固醇重量比 4:0、4:0.5、4:1、4:2 作為脂質配方，並以不同製備方法來製備蠶絲蛋白微脂粒。

1. 薄膜/超音波震盪法 (Thin film / Sonication)

將脂質配方溶解於無水酒精裡，調配成不同脂質之酒精溶液，取 5 mL 的脂質酒精溶液放入 50 mL 的濃縮瓶中，在減壓濃縮的裝置 (EYELA, SB-1000) 下溫度控制在 37°C，將溶劑完全抽乾，使其脂質於瓶壁上形成一層半透明的薄膜後，加入 10 mL 原購未經稀釋的蠶絲蛋白水溶液震盪均勻，即可得到多層微脂粒 (Multilamellar vesicles, MLVs)。再將多層微脂粒 (MLVs) 溶液以超音波細胞粉碎機 (MISONIX, Sonicator 3000) 在功率 6W 下震盪 10 分鐘，即完成單層小微脂粒 (Small unilamellar vesicles, SUVs) 的製備。

2. 酒精注射法 (Ethanol injection)

將脂質配方依不同比例溶解於無水酒精裡，調配成不同脂質之酒精溶液，取 2 mL 的脂質酒精溶液，利用注射針筒 (TERUMO, U-100 INSULIN 1mL) 快速注入 8 mL 原購未經稀釋的蠶絲蛋白溶液中 ($\geq 30\%$)，並同時以震盪器 (Heidolph, Reax control) 震盪 1~2 分中使配方均勻，即完成單層小微脂粒之製備。

(四) 蠶絲蛋白的含量測定

將牛血清蛋白粉末以水分別調配 0.125 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、0.75 mg/mL、1 mg/mL，取各濃度之 BSA 溶液之樣品，加入 Bradford Reagent 反應劑混合均勻，以分光光度計 (HITACHI U-1800) 測定波長 595 nm 的吸光值，製作成標準濃度曲線 (standard curve)。本實驗完成標準濃度曲線，為 $R^2 = 0.9999$ 。將蠶絲蛋白溶液 0.1 mL，加入 Bradford Reagent 反應劑 3 mL 均勻混合，以分光光度計分析，再利用 BSA 標準濃度曲線回推樣品中蠶絲蛋白之含量。

(五) 粒徑分析和電位分析

以粒徑分析儀 (Malvern Zetasizer Nano ZS, UK) 分析微脂粒粒徑。利用乾淨的注射針筒吸取製備好的微脂粒溶液約 1 mL 緩緩注入 zeta cell 中，每個樣品量測 4 次後求其平均值，即完成粒徑分析和電位分析。分佈指數 (Polydistribution Index, P.I.) 其為膠體溶液中粒子分佈所呈現情況之重要指標。當儀器測量出平均粒徑及粒徑分佈 (Size Distribution) 後可經由公式換算成分佈指數，因此觀察 P.I. 值即可得知微脂粒粒徑之分佈曲線，亦觀察微脂粒儲存時其粒徑分佈是否有變化。當 P.I.

值為 0.03~0.06 時，可定義為單一分佈群體 (Monodisperse Population)，即是微脂粒之群體粒徑較統一。而 P.I. 值為 0.1~0.2 時，則定義為分佈均一 (Narrow Size Distribution) 之群體，P.I. 值 > 0.5 時，其粒徑較不平均，且粒徑分佈非常的寬廣 (Very Broad Size)。

(六) 微脂粒的包覆率

取 5 mL 製備完成的微脂粒溶液至離心管內，以超高速離心機 (Himac CP80MX) 進行離心。所使用的條件以溫度 4°C，轉速 300000 g 時間為 16 小時。離心完成後取離心管中的上清液，加入 Bradford Reagent 反應劑混合均勻，以分光光度計來進行分析，並計算其包覆率。

※ 包覆率 (Encapsulation ratio, ER%) 之計算公式：

$$E.R. (\%) = \frac{(C_1 - C_2)}{C_1} \times 100\%$$

C_1 ：樣品溶液之原始濃度

C_2 ：離心後上清液之濃度

(七) 微脂粒安定性測試

微脂粒之儲存會隨著時間的增加而產生凝集、融合或包覆物質外漏等現象，而造成粒徑的變化。因此可藉由儲存溫度或儲存時間的變化，觀察其粒徑大小的差異，藉此瞭解微脂粒之安定性。因此實驗中將已製備完成之微脂粒溶液儲存於 4°C 冰箱 (Hitachi, RN43PS) 和室溫兩種不同環境下，在 28 天的儲存期間內，分別於 1、7、14、21、28 天，5 個時間取樣觀察受測樣品之粒徑變化。

(八) 皮膚保濕效果測試

以 10 位自願受測者、年齡在 30-60 歲，皮膚健康且無過敏病史，在實驗前 24 小時受測的皮膚部位不塗抹任何保養品或藥品。實驗時，受測者以純水清洗受測之手臂內側皮膚，洗淨後拭乾，並在檢測環境溫度保持在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 及相對濕度為 45~50% RH 下休息 30 分鐘，並在左右手由手腕至手肘內側分別以 3 cm×3 cm 的區域，標記 6 個測試位置。

取 0.1 mL 受測配方溶液，塗抹於所標記的皮膚上，以超純水作為空白組，塗抹均勻後依不同時間做測試，連續 2 小時以皮膚角質保濕能力分析儀 (Corneometer CM 825PC, Germany) 測定皮膚角質水分含量的變化。

(九) 皮膚彈性效果測試

以 10 位自願受測者、年齡在 30-60 歲，皮膚健康並無過敏病史，在實驗前受測者先以純水清洗受測之手臂內側皮膚，並且在檢測環境溫度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 及相對濕度

為 45~50% RH 下休息 30 分鐘，並在左右手由手腕至手肘內側分別以 3 cm×3 cm 的區域，標記 6 個測試位置。

皮膚彈性效果測試是採用吸允法測量皮膚的彈性^[14]。實驗時，受測者每天取製備含有蠶絲蛋白之微脂粒溶液 0.1 mL，塗抹於所標記的皮膚上，並且每星期以皮膚彈性測定儀 (Cutometer MPA580, Germany)，測試自願受測者在使用四星期前後手臂皮膚彈性之差異，並依據皮膚彈性指標 R2 值 (彈性明顯度，數值越接近 1，代表越有彈性) 記錄其測試結果。

R2 Index 的計算公式： $R2 = [e(a) - e(a + b)]/e(a)$

a=負壓吸時間；b=釋壓時間；e(x)=振幅，在 t=x。

(十) 皮膚過敏測試

為評估本實驗所製備樣品，是否造成人體皮膚過敏不適，故將進行人體貼布測試。在實驗上採用過敏貼布 (Finn Chambers on Scanpor)，分別將所製備的含蠶絲蛋白之微脂粒溶液貼布貼於上臂內側，待受測 48 小時後移除，觀察受測者的皮膚變化，根據皮膚反應評價的評分法^[17]，判斷是否有產生皮膚刺激感或過敏現象，並記錄其結果。

(十一) 統計分析

本研究之數據以 Microsoft Excel 2000 版及 SPSS 第 10 版統計套裝軟體進行分析統計。實驗中，兩組數據間之比較是以 Student's t-test 來檢定是否呈現有意義的差異。對於三組以上數據間之比較是以 one way ANOVA 分析統計，再以 LSD (Least Significant Difference) 檢定其差異的顯著性。本實驗判斷有無差異是採取虛無假說，若 P 值小於 0.05 (P < 0.05)，則視為有顯著性差異。

三、結果與討論

(一) 不同膽固醇比例之粒徑分析

依據文獻在製備微脂粒的過程中，會因外在環境的溫度或氧化、水解等因素而使微脂粒產生不穩定。因此，添加適量的膽固醇，可幫助脂雙層結構的排列，除了可降低包覆物質的洩漏外，實驗結果也證實能提高微脂粒的穩定性^[4,10,16]。本實驗將在不同脂質配方中添加膽固醇，並觀察其粒徑大小分佈，實驗結果如圖 1 所示。以酒精注射法製備的微脂粒，其平均粒徑在 74~120 nm 之間；薄膜 / 超音波震盪法製備之微脂粒，平均粒徑約 81~238 nm 之間。在未添加膽固醇的脂質成分中，無論是以酒精注射法或薄膜 / 超音波震盪法製備之微脂粒，其粒徑大小無明顯差異。但隨著脂質成分中膽固醇含量的增加，所形成的微脂粒粒徑就越大。以重量比在

含膽固醇比例 4:2 的脂質成分中，利用薄膜/超音波震盪法所製成的微脂粒溶液，靜置於 1 天後會產生沉澱現象；以酒精注射法所製成的微脂粒溶液，經過 1 星期後亦有沉澱的現象產生，推斷脂質組成中膽固醇的含量過高所致。

(二) 不同製備方法之粒徑比較分析

以不同的脂質配方，分別以薄膜/超音波及酒精注射法所製備之微脂粒，比較不同方法其粒徑大小分佈情形，其結果如表 1 所示。酒精注射法製備的微脂粒，平均粒徑在 72~85 nm、PI 值介於 0.51~0.65 之間；薄膜 / 超音波震盪法製備的微脂粒，平均粒徑在 73~150 nm 之間、PI 值介於 0.45~0.56 之間。在 EIA01、TSA01 未添加膽固醇的配方及 EIA03、TSA03、EIA05、TSA05 添加負電荷的脂質配方中，粒徑大小分佈均無顯著性差異。但在 EIA02、TSA02、EIA04、TSA04 添加膽固醇的配方中，粒徑大小分佈有極高度顯著性差異 (p < 0.001)。以酒精注射法製備的微脂粒 EIA02、EIA04 所測得的平均粒徑均在 100 nm 以下，但以薄膜/超音波震盪法製備的微脂粒 TSA02、TSA04，其平均粒徑大於 100 nm。另外，在配方中加入帶負電荷的脂質，能增加粒子之間的排斥力，而降低粒子之間的凝集與融合^[6]，因而減小微脂粒的粒徑，故無論是酒精注射法或薄膜 / 超音波震盪法，所測得的平均粒徑均比有添加膽固醇的中性脂質的粒徑小。

經由不同製備方法分析比較結果，酒精注射法製備的微脂粒，除配方 EIA02 和 EIA04 粒徑小於薄膜/超音波震盪法製備的微脂粒粒徑，其於配方只有微小差異。

(三) 表面電位量測

比較酒精注射法及薄膜 / 超音波震盪法，兩種不同

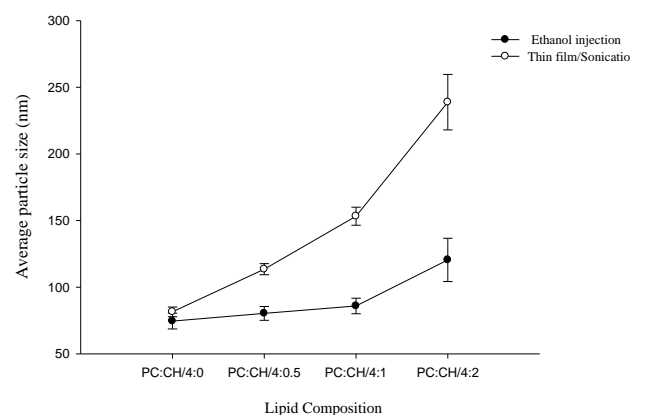


圖 1 不同膽固醇比例之粒徑分析圖 N = 4，(Mean ± S.D.)

Fig. 1 Analytical Graph of Particle Sizes of Liposomes with Different Ratios of Cholesterol

製備方法完成的微脂粒，其平均表面電位也不相同。實驗結果如表 2 所示，以酒精注射法製備的微脂粒，平均表面電位均比薄膜 / 超音波震盪法製備的微脂粒還接近正表電位，且 pH 值也更接近中性。以 PC 所製成的微脂粒其表面之 zeta potential 遠低於帶負電之微脂粒系統^[26]。Eklund *et al* 認為微脂粒的脂雙層之電荷密度有關，由於飽和酸鏈具有較緊密之排列，造成較高之電荷密度，因此與陽離子之交互作用較強，因此造成微脂粒聚集現象就更為明顯^[19]。因此本實驗設計以添加負電荷 (DHDP) 使配方成為分散液，避免聚集現象產生故檢測其表面電位，依檢測結果可得知是配方是否穩定。

由於表面電位可用來量測分散液的穩定性，若將微脂粒的平均表面電位作為評估微脂粒的穩定性，可推斷以薄膜 / 超音波震盪法製備的微脂粒，相較於酒精注射法製備的微脂粒來得穩定。

(四) 微脂粒的包覆率

比較酒精注射法及薄膜/超音波震盪法，兩種不同製備方法對微脂粒包覆率的影響。將兩種不同製備方法所製得的微脂粒溶液，以超高速離心機離心後，分別取其上清液，利用分光光度計來進行分析並計算包覆率。

酒精注射法製備之微脂粒 5 組配方的包覆率達 85~90%之間；薄膜/超音波震盪法製備之微脂粒，5 組配方的包覆率為 48~68%之間。如圖 2 所示，以酒精注射法製備之微脂粒，包覆率均高於薄膜 / 超音波震盪法

所製備的微脂粒，且有極顯著的差異性。在微脂粒製備過程中酒精的作用主要是作為脂質的溶劑，若缺乏酒精的存在，會使脂質雙層更為堅固，造成藥物不易包覆。在採用薄膜 / 超音波震盪法製備微脂粒的過程中，先以薄膜法將酒精溶劑完全去除後，再加入蠶絲蛋白溶液完成微脂粒的製備。因此，以薄膜 / 超音波震盪法製備的微脂粒溶液，因完全無酒精成分，使得脂質雙層較為堅固，導致藥物不易進入而影響了包覆率。反之，採用酒精注射法製備的微脂粒溶液裡，仍有酒精的存在，故微脂粒溶液中含有適度的酒精成分，則能夠增加藥物的包覆效率。

文獻中提到當脂質中含有膽固醇時，脂雙層膜中的磷脂質排列會受到影響。因此膽固醇之嵌入 PC 脂雙層有助於提升 PC 微脂粒脂雙層結構之穩定度，並減少微脂粒融合現象^[24]。微脂粒在磷脂質比膽固醇為 4:1 時的微脂粒組成，屬穩定性較佳的微脂粒，能提升脂雙層脂質分子間的結構穩定度，降低膜的流動性，增加膜的硬度^[28]。當脂質中的膽固醇含量越高時，脂質雙層也會變得較為堅硬，而脂質膜過於堅硬時，就容易造成藥物不易進入，導致包覆率降低。微脂粒中含膽固醇的配方，不論是酒精注射法或薄膜 / 超音波震盪法所製備的微脂粒，其包覆效果均低於未含膽固醇的配方。以酒精注射法配方之 A01 (未添加膽固醇) 之包覆率為 90%；但 A04 (PC:CH/4:1) 之包覆率下降為 85%，顯示膽固醇含量亦會影響到微脂粒內藥物的多寡。

表 1. 不同製備方法之粒徑比較分析表

Table 1. Comparative Analysis of Particle Sizes of Liposomes Prepared by Different Methods

編號	脂質成分比例	酒精注射法		薄膜 / 超音波震盪法	
		平均粒徑 (nm)	PI值	平均粒徑 (nm)	PI值
A-01	PC:CH/4:0	79.30±5.96	0.51±0.19	80.70±2.99	0.56±0.08
A-02	PC:CH/4:0.5	80.73±5.85	0.51±0.16	***114.35±4.33	0.55±0.07
A-03	PC:CH:DHDP/4:0.5:0.1	72.81±3.80	0.50±0.18	73.23±4.83	0.47±0.22
A-04	PC:CH/4:1	85.73±5.66	0.65±0.27	***150.95±6.65	0.47±0.04
A-05	PC:CH:DHDP/4:1:0.1	82.70±5.39	0.54±0.24	92.38±4.16	0.45±0.08

以 Student's t-test 來檢定不同方法製備之粒徑是否呈現顯著性的差異

*P < 0.05 · **P < 0.01 · *** P < 0.001 · N = 4 · (Mean±S.D.)

表 2. 不同製備方法之表面電位比較分析

Table 2. Comparative Analysis of Zeta Potential of Liposomes Prepared by Different Methods

脂質成分比例	酒精注射法		薄膜/超音波震盪法	
	平均表面電位 (mV)	pH 值	平均表面電位 (mV)	pH 值
PC:CH/4:0	-1.34±1.09	6.86	-1.62±0.57	6.70
PC:CH/4:0.5	-0.56±0.39	6.84	-1.47±0.38	6.74
PC:CH:DHDP/4:0.5:0.1	-3.88±1.15	6.80	-6.32±1.49	6.52
PC:CH/4:1	-0.58±0.52	6.86	-1.52±0.25	6.72
PC:CH:DHDP/4:1:0.1	-4.29±1.45	6.70	-7.17±2.07	6.47

Zeta potential 單位為 mV · N = 4 · (Mean±S.D.)

(五) 安定性測試

1. 以酒精注射法製備之微脂粒於不同環境下之安定性測試

將酒精注射法所製備的 5 組配方放置於 4°C 及室溫環境下，觀察比較其平均粒徑之變化。結果如表 3 所示，酒精注射法製備之微脂粒儲存於 4°C 環境下，在 28 天的儲存期間內，觀察不同儲存時間下粒徑之變化。在配方中，以 EIA03 配方儲存於 4°C 的環境，相較於其他配方，顯得特別不安定，經過 28 天後已由原來的粒徑大小 73.45 nm，增加至 90.18 nm。

將微脂粒配方儲存於室溫環境下 7 日後，配方 EIA02、EIA03、EIA04、EIA05 之粒徑都比儲存於 4°C 環境下的配方來得不安定，且隨著時間的增加，儲存於室溫的微脂粒配方，粒徑都明顯變大。28 天後，平均粒徑均變大，已由原本的 76~85 nm 之間，增加至 92~107 nm 之間，顯示以酒精注射法製備之微脂粒存放於室溫環境下，粒徑會隨著時間的增加而變得不穩定。配方中無添加膽固醇及 DHDP 的 EIA01 配方，儲放於室溫中在 14 日後相較於存放 4°C 下，粒子因聚集、融合亦明顯

表 3. 不同製備方法儲存於 4°C 及室溫 (25°C) 環境下之粒徑變化差異

Table 3. Changes in Particle Sizes of Liposomes Prepared by Different Methods When Stored at 4°C and Room Temperature

編號	配方	溫度	1 day	7 days	14 days	21 days	28 days
EIA01	PC:CH/4:0	4°C	78.65±4.79	79.65±6.61	74.20±2.21	81.90±6.46	84.93±3.44
		25°C	79.30±5.96	86.58±3.56	***87.53±1.68	***99.93±5.85	***100.75±3.44
EIA02	PC:CH/4:0.5	4°C	80.50±5.96	83.35±4.77	81.68±4.12	78.88±5.18	89.10±4.27
		25°C	80.73±5.85	*91.45±3.21	**91.65±3.36	*95.35±8.95	*99.88±6.64
EIA03	PC:CH:DHDP/4:0.5:0.1	4°C	73.45±3.68	76.18±3.80	80.25±7.75	85.78±3.94	90.18±2.81
		25°C	76.18±3.80	*86.93±4.94	83.28±1.33	89.30±2.72	*92.18±3.49
EIA04	PC:CH/4:1	4°C	83.25±5.16	85.73±5.66	81.13±7.43	82.58±4.16	91.83±6.67
		25°C	85.73±5.66	**98.25±2.32	**101.38±8.83	***102.80±7.56	107.53±5.31
EIA05	PC:CH:DHDP/4:1:0.1	4°C	78.63±5.23	82.70±5.39	81.35±4.41	81.18±7.38	88.98±6.15
		25°C	82.70±5.39	**92.83±3.53	**97.68±6.62	*100.40±10.39	***103.83±6.00
TSA01	PC:CH/4:0	4°C	80.83±3.99	81.85±4.72	85.25±4.63	81.73±1.60	81.18±3.19
		25°C	80.70±2.99	81.08±6.46	82.45±3.74	81.73±1.60	88.80±9.43
TSA02	PC:CH/4:0.5	4°C	110.25±4.01	114.9±3.14	115.75±2.79	113.35±1.70	116.38±3.62
		25°C	114.35±4.33	114.10±3.03	114.15±1.25	113.35±1.70	113.60±0.49
TSA03	PC:CH:DHDP/4:0.5:0.1	4°C	71.53±4.43	78.58±5.06	76.48±2.47	73.28±5.07	80.13±7.57
		25°C	71.13±4.83	75.03±4.39	74.05±2.67	73.28±5.07	71.050±3.33
TSA04	PC:CH/4:1	4°C	149.93±5.56	149.75±2.08	150.18±1.53	148.43±4.36	154.35±6.82
		25°C	150.95±6.65	151.65±4.81	151.38±6.60	148.43±4.36	152.88±3.84
TSA05	PC:CH:DHDP/4:1:0.1	4°C	91.30±3.65	97.98±2.94	97.65±2.14	95.40±4.27	97.73±6.39
		25°C	92.38±4.16	96.03±5.14	94.20±1.76	95.40±4.27	95.18±1.94

以 ANOVA 分析統計，再以 LSD 來檢定不同脂質配方儲存於不同溫度及不同時間粒徑之變化是否呈現顯著性差異

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, N = 4, (Mean ± S.D.)

變大，顯示微脂粒配方溶液儲存於室溫下極為不安定。

2. 以薄膜/超音波震盪法製備之微脂粒於不同環境下之安定性測試

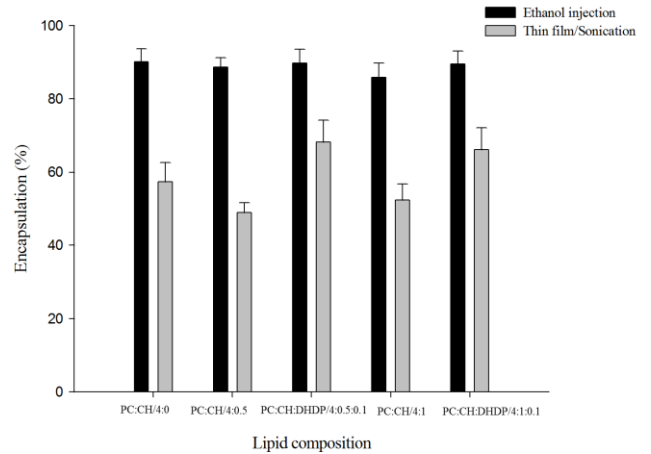


圖 2. 不同製備方法之包覆率比較分析圖 N = 4, (Mean ± S.D.)

Fig. 2. Comparative Analysis of Encapsulation Efficiency of Liposomes Prepared by Different Methods

分別將薄膜 / 超音波震盪法所製備的 5 組配方儲存於 4°C 及室溫環境下在 28 天的儲存期間內，觀察不同儲存時間下粒徑之變化。結果各組微脂粒配方溶液儲存 28 天後，粒徑大小均無顯著性差異。顯示各組微脂粒溶液，無論儲存於 4°C 或室溫的環境下，粒徑大小變化不大，仍然維持穩定。由實驗得知，以酒精注射法製備之微脂粒，其平均粒徑大小無論是儲存於 4°C 或室溫環境下都極為不安定，尤其儲存於室溫下經過 7 天後，微脂粒粒徑明顯變大。反之，薄膜/超音波震盪法製備的微脂粒，不論儲存於 4°C 或室溫環境下，其平均粒徑大小經過 28 天後變化不大，較為安定。

(六) 皮膚保濕效果測試

分別以酒精注射法及薄膜/超音波震盪法製備的 5 組配方及控制組 (H₂O) 共 11 組配方，進行皮膚保濕效果測試。結果如表 4 所示，塗抹 10 min 後測試皮膚角質水分含量，除了控制組 B01 無顯著差異外，其餘配方包括蠶絲蛋白溶液在塗抹 10 min 後均有顯著性差異，顯示含蠶絲蛋白的微脂粒配方在塗抹 10 min 後，皮膚角質水分含量快速上升。

以酒精注射法製備的樣品配方，在塗抹 10 min 後測試皮膚角質水分含量，結果以配方 EIA03 的水分提升約 77 (a.u.) 最多；其次為配方 EIA02 及 EIA04 約為 71~72 (a.u.)。塗抹以薄膜/超音波震盪法製備的樣品配方 TSA03 經過 10 min 後，皮膚角質水分含量提升約 77 (a.u.) 最多；其次為樣品配方 TSA02、TSA04 約為 70~75 (a.u.)。兩種不同製備方法的樣品配方相互比較，結果發現無論是酒精注射法或薄膜/超音波震盪法所製備的微脂粒溶液，塗抹配方 10 min 後，皮膚角質水分含量與測試前的皮膚水分含量相比，結果均以塗抹 EIA03、TSA03 配方的皮膚角質水分含量最高，其次為

配方 EIA02、TSA02 及 EIA04、TSA04。

各組配方在經由塗抹 30 min 後，測得皮膚角質水分含量，相較於測試前所測得的皮膚角質水分含量，都無顯著性差異，顯示各組配方的角質含水量都已下降，其中以酒精注射法所製備的配方 EIA03、EIA04 及 EIA05，都比測試前的水分含量值低，初步推斷由於人體溫度會將溶液中的酒精揮發，使皮膚表皮的水分被帶走。各組配方在塗抹 120 min 後和測試前相比較，以 TSA02 配方對皮膚角質含水量提升 11.8 % 最為顯著，其次是 TSA03 配方，皮膚角質含水量提升了 7.2 %，顯示 TSA02、TSA03 配方對皮膚的保濕效果較佳，其次為 TSA04、TSA01，而 TSA05 配方皮膚角質含水量略為散失。

(七) 皮膚彈力效果評估

分別以酒精注射法及薄膜/超音波震盪法製備的 5 組配方及控制組 (H₂O)，共 11 組配方進行皮膚彈力效果測試，觀察使用四星期前後對皮膚彈性指標 R2 值之影響。

由表 5 顯示，塗抹純水在使用四星期前後對皮膚彈性均無明顯改變。以酒精注射法及薄膜/超音波製備法製備的配方中，經由塗抹一星期後的皮膚彈性和測試前相比較，R2 值相較於測試前都呈現上升趨勢，除 EIA05 配方外，各組配方在塗抹四星期後的皮膚彈性指標 R2 值和測試前相比較，提升了 3.4~12.8%，其中以 EIA03 配方的 R2 值相較於測試前提升了 12.8%，TSA02 配方的 R2 值上升了 12.3% 最為顯著。

整體而言，不同製備方法所含蠶絲蛋白的微脂粒配方，都能增加皮膚的彈性效果。含蠶絲蛋白的微脂粒配方，連續塗抹於手臂內側四星期後，除了 EIA05 配方無變化差異外，相較於未塗抹前皮膚的彈性指數均有明顯

表 4. 皮膚角質層水分含量測試分析表

Table 4. Analysis of Horny Layer Moisture in Hydration Test

編號	配方	測試前	10min	30min	60min	90min	120min
B01	H ₂ O	65.27±5.92	67.80±9.64	64.13±8.55	66.07±8.87	64.93±9.22	64.07±8.14
EIA01	PC:CH/4:0	53.33±6.70	***61.67±8.42	57.80±8.65	*61.20±9.78	57.47±8.47	55.00±9.10
EIA02	PC:CH/4:0.5	58.33±7.28	***70.73±9.30	58.40±8.93	63.07±8.88	61.20±8.58	61.13±8.23
EIA03	PC:CH:DHDP/4:0.5:0.1	63.07±9.41	***76.73±4.83	60.07±9.21	60.60±8.50	61.80±9.63	63.40±8.58
EIA04	PC:CH/4:1	62.80±9.10	***72.07±6.79	60.53±8.91	63.87±9.75	62.87±9.52	61.20±9.61
EIA05	PC:CH:DHDP/4:1:0.1	66.40±8.51	*73.07±8.08	64.27±9.63	67.80±9.50	65.93±7.24	68.00±9.49
TSA01	PC:CH/4:0	56.07±8.39	***65.40±9.63	56.47±7.68	59.07±8.90	59.87±8.76	55.47±9.30
TSA02	PC:CH/4:0.5	53.47±7.34	***70.13±8.14	58.93±9.83	**62.40±9.26	***64.47±7.72	59.80±7.51
TSA03	PC:CH:DHDP/4:0.5:0.1	55.87±8.25	***76.67±9.84	62.27±9.47	**64.40±8.53	*63.80±8.60	60.20±8.27
TSA04	PC:CH/4:1	62.73±9.71	***74.40±9.05	62.80±8.51	63.60±7.81	66.20±9.09	62.73±9.42
TSA05	PC:CH:DHDP/4:1:0.1	68.87±7.78	*73.80±8.50	68.13±9.78	68.60±9.03	67.87±9.93	64.13±9.96

以 ANOVA 分析統計，再以 LSD 檢定不同脂質配方，在不同測試時間對於皮膚角質層水分含量是否呈現顯著性差異
單位：arbitrary units(a.u.) · *P < 0.05 · **P < 0.01 · ***P < 0.001 · N = 10 · (Mean±S.D.)

的增加，其中以 EIA03 配方的 R2 值提升至 12.8% 的效果最為顯著。

(八) 皮膚過敏測試

10 位皮膚健康、無過敏病史的受測者，接受 48 小時的貼布測試後，依據皮膚測試反應結果，這些樣品配方均不會有皮膚過敏現象產生，且不會對皮膚產生紅腫情形。

四、結論

本研究以不同脂質配方，利用酒精注射法及薄膜 / 超音波震盪法製備蠶絲蛋白微脂粒。在不同製備方法以酒精注射法所得之微脂粒平均粒徑較小，約為 72~85 nm 之間；且包覆率較佳，約為 85~90% 之間。在脂質配方中添加負電荷 DHDP，不論是酒精注射法或薄膜 / 超音波震盪法，都有較高的包覆率。在安定性測試，無論儲存於 4°C 或室溫環境下，經過 28 天後觀察，以薄膜 / 超音波震盪法所得微脂粒配方較為穩定。

有效性評估，以配方塗抹後進行皮膚角質水分含量測試，經 120 min 後所得結果為 TSA02 和 TSA03 配方之皮膚角質含水量最為顯著（提升了 7.2~11.8%），顯示 TSA02、TSA03 配方對皮膚的保濕效果較佳。在皮膚的彈力測試中以 EA03 配方的 R2 值提升至 12.8%、R8 值提升至 28% 的效果最為顯著。將 10 組實驗配方進行皮膚過敏性測試，在 10 位受測者接受 48 小時貼膚測試後，並無紅腫及皮膚過敏現象產生，顯示蠶絲蛋白微脂粒配方是安全無虞的。

參考文獻

[1] 于同隱 (2003)，「絲素蛋白在組織工程中的應用」，復旦學報，42(6) 12 月。

[2] 李文鴻、黃焯家、吳鎰州、周新彬、鍾文能 (2011)，「微脂粒於化妝品開發之應用」，黎明學報 22(1): 143-148。

[3] 吳海濤、鍾翠平 (2000)，「蠶絲在軟骨細胞立體培養中的應用」，組織工程 14(5): 301-304。

[4] 洪佳惠 (2003)，「膽固醇和膽鹽對微脂粒穩定度的影響」，國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。

[5] 胡玉洁 (2003)，「天然高分子材料改性與應用」，化學工業出版社，北京。

[6] 邱智信 (2005)，「不同磷脂質包覆維生素 E 之微脂粒系統特性研究」，南台科技大學化學工程系碩士論文。

[7] 陳永昌 (2007)，「奈米粒子與蛋白質的互相影響」，國立交通大學奈米科技研究所碩士論文。

[8] 陳麗妃、鍾曉慧、陳崇裕 (2010)，「微脂粒包覆 CoQ10 之製備與特性評估研究」，科學與工程技術期刊 6(4): 39-46。

[9] 賴永沛 (1997)，「蛋黃卵磷脂」，食品資訊 142: 50-55，10 月。

[10] 劉得任 (2000)，「微卡計於液膜交互作用力量測之應用 - 微脂粒系統穩定度之探討」，國立中央大學化學工程研究所博士論文。

[11] 糜福龍、邱秀娟、陳俊瑜 (2005)，「天然高分子生物醫用材料在化粧品領域之應用」，化工技術 13(7): 155-164，7 月。

[12] Akai, H., Nagashima, T. and Aoyagi, S. (1993). "Ultrastructure of posterior silk gland cells and liquid silk in Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta drury* (Lepidoptera: Saturniidae), Int." *J. Insect Morphol. Embryol.* 22: 497-506.

表 5. 皮膚彈力測試 R2 值分析表

Table 5. Analysis of R2 Indices Measured in Skin Elasticity Test

編號	樣品配方	測試前	第 1 週	第 2 週	第 3 週	第 4 週
B01	Blank(H ₂ O)	0.85±0.04	0.85±0.06	0.85±0.05	0.84±0.04	0.85±0.04
EIA01	EI-PC:CH/4:0	0.77±0.09	0.81±0.05	**0.86±0.05	*0.84±0.08	**0.86±0.04
EIA02	EI-PC:CH/4:0.5	0.79±0.05	0.82±0.05	**0.87±0.05	**0.87±0.05	*0.85±0.04
EIA03	EI-PC:CH:DHDP/4:0.5:0.1	0.78±0.05	0.83±0.05	**0.86±0.04	***0.87±0.05	***0.88±0.02
EIA04	EI-PC:CH/4:1	0.80±0.05	*0.86±0.04	**0.88±0.04	**0.87±0.06	**0.89±0.04
EIA05	EI-PC:CH:DHDP/4:1:0.1	0.87±0.06	0.87±0.04	0.90±0.05	0.91±0.04	0.90±0.04
TSA01	T/S-PC:CH/4:0	0.76±0.10	0.80±0.09	0.83±0.08	0.83±0.06	*0.85±0.05
TSA02	T/S-PC:CH/4:0.5	0.79±0.06	0.82±0.06	**0.86±0.06	*0.85±0.05	***0.88±0.04
TSA03	T/S-PC:CH:DHDP/4:0.5:0.1	0.81±0.08	0.83±0.05	*0.88±0.04	*0.88±0.05	*0.88±0.04
TSA04	T/S-PC:CH/4:1	0.82±0.06	*0.88±0.05	***0.92±0.03	***0.91±0.03	***0.90±0.02
TSA05	T/S-PC:CH:DHDP/4:1:0.1	0.83±0.04	*0.88±0.04	**0.89±0.03	**0.90±0.03	***0.90±0.01

以 ANOVA 分析統計，再以 LSD 檢定不同脂質配方，在不同測試時間對於皮膚彈力 R2 值是否呈現顯著性差異 P < 0.05，**P < 0.01，***P < 0.001，N = 10，(Mean ± S.D.)，R2 值：彈性明顯度，數值越接近 1，越有彈性

- [13] Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J. and Kaplan, D. L. (2003). "Silk-based biomaterials." *Biomaterials*, 24(3): 401-416.
- [14] Barel, A. O. and Clarys, P. (1995). "Measurement of epidermal capacitance." *Handbook of Non-Invasive Methods and skin*, Ed. By Serup, J. Jemec, G. B. E. CRC Press Boca Raton, FL, Chapter 8.2: 165-170.
- [15] Chen, L. C. and Chen, C. Y. (2011). "Preparation and Evaluation of Semi-Permanent Hair Dyes Liposome." *J. Microencapsulation*. 28(3): 176-182.
- [16] Collins, J. J. and Phillips M. (1982). "The Stability and Structure of Cholesterol- rich Codispersions of Cholesterol and Phosphatidyl choline." *J. Lipid Res.*, 23: 291-298.
- [17] Draize, J. H., Woodard, G. and Calvery, H. O. (1948). "Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82: 377-390.
- [18] Dreher, F., Luoso, P. L., Walde, P. and Elsner, P. (1996). "Human skin irritation studies of a lecithin microemulsion gel and of lecithin liposomes." *Skin Pharmacology*. 9(2): 124-129.
- [19] Eklund, K. K., Takkunen J. E. and Kinnunen, P. K. J. (1991). "Cation-Induced Aggregation of Acidic Phospholipid Vesicles: The Role of Fatty Acid Unsaturation and Cholesterol. Chem." *Phys. Lipids.*, 57: 59-66.
- [20] Jia-You Fang, Tsong-Long Hwang, Yen-Ling Huang, Chia-Lang Fang, 2006. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. *International. Int. J. Pharm.* 310, 131-138
- [21] Kato, N., Sato, S., Yamanaka, J., Yamada, H., Fuwa, N. and Nomura, M. (1998). "Silk protein, sericin inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 145-147.
- [22] Kitano, M. and Yamamoto, S. (2002). "Application of Liposome in Dyeing and Finishing." *纖維染色加工用リポソームの利用技術*. (6):354-357.
- [23] Kim, U. J., Park, J. Y., H. I. and Kaplan, D. L. (2004). "Structure and properties of silk hydrogels." *Biomacromolecules*. 5: 788-792.
- [24] Liu, D. Z., Chen, W. Y., Tasi, L. M. and Yang, S. P. (2000). "The Effects of Cholesterol on the Release of Free Lipids and Physical Stability of Lecithin Liposomes." *J. Chin Inst Chem Eng*, 31: 269-276.
- [25] Minoura, N., Aiba, S. and Gotoh, Y. (1995). "Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices." *J. Biomed Mater Res*, 29: 1215-1221.
- [26] McLaughlin, W. K. Eng, G. Vaio, Tazewell Wilson and S. McLaughlin (1983). "Dimethonium, A Divalent Cation that Exerts Only a Screening Effect on the Electrostatic Potential." *J. Membrane Biol.*, 76: 183-193.
- [27] Omenetto, F. G. and Kaplan, D. L. (2010). "New opportunities for an ancient material." *Science*. 329: 528-531.
- [28] Raffy S. and Teissie, J. (1999). "Control of Lipid Membrane Stability by Cholesterol Content." *Biophysical Journal*, 76: 2072-2080.
- [29] Schaller, M. and Korting, H. C. (1996). "Interaction of liposomes with human skin: the role of the stratum corneum." *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18: 303-309.
- [30] Vollrath, F. Spiders' webs, *Curr. Biol.* (2005). R364-R365.
- [31] Voegeli, R., Meier, J. and Blust, R. (1993). "Sericin silk protein: unique structure and properties." *Cosmetics Toiletries*, 108: 101-108.
- [32] Vandegaer, J. E. (1974). "Microencapsulation Processes and Application." *Phenum Press*, New York.
- [33] Wissing, S. A.; Kayser, O. and Müller, R. H. (2004). "Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery." *Adv. Drug Delivery Rev.* 56(9): 1257-1272.
- [34] Yu, H. Y. and Liao, H. M. (1996). "Triamcinolone permeation from different liposome formulations through rat skin in vitro." *Int. J. Pharm.* 127: 1-7.
- [35] Yoo, M. K., Chu, C. S., Lee H. L., Kweon, H. Y. and Lee, K. G. (2004). "Preparation of semi-interpenetrating polymer networks composed of silk fibroin and poloxamer macromere." *Int. J. Biol. Macromol.* 34: 263-270.

- [36] Zhaorigetu, S., Yanaka, N., Sasaki, M., Watanabe, H. and Kato, N. (2003). "Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse." *J. Photochem. Photobiol. B*, 71: 11-17.
-

2014 年 11 月 05 日 收稿

2015 年 01 月 23 日 修正

2015 年 02 月 18 日 接受

