

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

以天然素材建構新穎性微乳膠包覆植物雌激素之活性評估

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2320-B-157-001

執行期間：104年8月1日至105年7月31日

執行機構及系所：中華學校財團法人中華科技大學食品科學系

計畫主持人：林娟娟

共同主持人：鄧述諄、李玫樺

計畫參與人員：陳姿妤、高大佑、江東益、劉欣茹

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 2 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

中 華 民 國 105 年 8 月 31 日

中文摘要

本研究試圖以天然物衍生材料，包括大豆油(油相)及卵磷脂、橄欖萃取物(介面活性劑)，建構一新穎性微乳膠，包覆生體可用率低之難溶性植物雌激素(含異黃酮一條根萃取物)，並分別以體外經皮穿透試驗、基因重組酵母菌系統及小鼠骨母細胞增生試驗來評估此含植物雌激素微乳膠之生體可用率與生理活性。本年度計畫中，我們完成開發新天然材料建構新型微乳膠系統 (ME)及包覆植物雌激素(PHY-ME)，以體外小鼠經皮穿透生物模式評估 PHY-ME 是否可解決低生體可用率，以及以酵母菌系統模式評估 PHY-ME 是否可提升生理活性。由研究實驗結果顯示:1)以微乳化包覆之 GT 萃取物 (ME-GT)粒徑大小及穿透係數(K_p)之比較中發現，以不同萃取方式得到之 GT extract，其中不同基質組成會影響異黃酮之穿透能力；2)以不同比例 tween/oleuropein 製備之異黃酮微乳膠穿透係數 (K_p)之比較中顯示無論以何種配方包覆之 genistein，其穿透係數 $K_{p\text{gen}}$ 皆遠比 $K_{p\text{dai}}$ 小，特別是 daidzein，以 O/T 取代 tween80 之穿透能力隨著 oleuropein 比例的增加，呈現從 3 倍至 10 倍以上顯著性的提升。基於目前對植物雌激素，特別是台灣特有種含異黃酮之一條根萃取物，以天然可食用材料來建構新穎性奈米包覆技術，於當今台灣食品安全議題中，本研究結果應可提供台灣食品產業技術未來發展中具價值重要參考。

關鍵詞：微乳膠、植物雌激素、橄欖多酚、生體可用率、酵母菌系統模式

Abstract

This study aims at an up-graded microemulsion system using natural ingredients, including soybean oil and lecithin, OLE (natural surfactant), were constructed for encapsulation of phytoestrogens (isoflavones-enriched I-Tiao-Gen extracts). Ex-vivo skin penetration experiment, recombinant yeast-based system as well as mouse osteoblast proliferation were used for testing the enhancement of bioavailability and bioactivity of the novel microemulsion. In the first year of study, we have constructed a novel food-grade microemulsion (ME) system for encapsulation of phytoestrogens (PHY-ME). The enhanced transdermal ability of PHY-ME by ex-vivo mouse skin penetration experiment and the increased bioactivity of PHY-ME by a recombinant yeast-based system were also examined. The results indicated: 1) By comparison of particle sizes and permeation coefficients (K_p) among various encapsulated GT extracts (ME-GT), the resulting matrix compositions from the different extraction process would affect the permeation ability of isoflavones; 2) no matter what different ratios of tween/oleuropein for preparing isoflavones-encapsulated microemulsions, the permeation coefficient of genistein ($K_{p\text{gen}}$) is usually far less than that of daidzein ($K_{p\text{dai}}$). In addition, the K_p was significantly increased from 3- to 10-fold when the percentage of oleuropein in substituting tween 80 (O/T from 1:3 to 1:1) increased, especially in the case of $K_{p\text{dai}}$. In the past few years, our lab. has established a microemulsion system for encapsulation of herbal polyphenols with low bioavailability. Due to the food safety concern in Taiwan now, using natural food-acceptable ingredients to construct a novel nano-emulsion for isoflavones-enriched Taiwan's specific herbal extract should be a valuable model for the future development in food industry.

Keywords: microemulsion, phytoestrogen, oleuropein, bioavailability, yeast-based system model

一、前言與研究目的

由於食品產業界對以天然素材作為食品製造過程中所需佐劑的需求日漸增加，橄欖葉萃取物因含有多種多酚且其中主成分橄欖苦苷(oleuropein)具有極佳的抗菌活性與抗氧化能力，因此在食品及製藥領域中被視為極具發展潛力的標的。由於橄欖苦苷的裂環烯醚萜苷類化學結構，可溶於具脂肪類及水相中，最近的研究指出於適當的油相(包括橄欖油、黃豆油及中鏈中性脂肪)及水相構成乳化結構中，橄欖苦苷具有減低油水相間表面張力，進而穩定乳化結構。本實驗室及先前其他論文研究顯示，染料木黃酮素(genistein)等異黃酮不易經體外皮膚穿透，且目前發表有關以微小化技術包覆異黃酮之技術，須部分使用非食用材料或需要有機溶劑參與，且包覆後粒徑大小及生體可用率之提升有限，基於以上考量，本研究擬延續先前研究結果，試圖以天然物衍生材料，包括大豆油(油相)及卵磷脂、橄欖萃取物(介面活性劑)，建構一新穎性微乳膠，包覆生體可用率低之難溶性植物雌激素(含異黃酮一條根萃取物)，並分別以體外經皮穿透試驗、基因重組酵母菌系統及小鼠骨母細胞增生試驗來評估此含植物雌激素微乳膠之生體可用率與生理活性。

本實驗室於前幾年間已建立微乳化技術包覆中草藥中難溶性多酚成分，基於目前對植物雌激素，特別是台灣特有種含異黃酮之一條根萃取物，以天然可食用材料來建構新穎性奈米包覆技術，於當今台灣食品安全議題中，常見以使用化工材料或其他合成添加物所造成之食安問題，本研究結果應可提供台灣食品產業技術未來發展中具價值重要參考。

二、文獻探討

植物雌激素是一類非類固醇類的化合物，具有與雌激素受體結合的能力，其中包含有異黃酮的成分，它們存在許多植物之中 (Jungbauer et al., 2014)。近年來植物雌激素和其植物來源的化合物及萃取物已經被開發用於治療，而且植物雌激素的副作用風險較低，植物雌激素將會是有希望的治療方式 (Schilling et al., 2014)。由先前的研究得知大豆屬中所含有的異黃酮包含有：染料木黃酮素(Genistein)、異黃酮苷素(Daidzein)、黃豆黃素(Glycitein)三種不含有葡萄糖苷的大豆異黃酮，這三種成分是較具有植物雌激素效果的，而且更勝於合成的雌激素，可作用於人體不同器官上 (Ahn et al., 2003 ; Lin et al., 2010)。金門一條根為豆科植物推測如其他豆科植物，含有豐富的多酚類成分，特別是異黃酮類化合物，先前執行 95 年國科會計畫時，結果顯示具有抗氧化及植物雌激素作用。已有許多研究在探討闊葉大豆可能的各種藥理作用，包括其水萃取物具有清除自由基及預防動脈粥狀硬化的可能性、與健康食品法相關之保健功效評估，如降血脂、腸胃功能改善、保肝作用，以及安全性評估 (Ko et al., 2004; Lin et al., 2000, Wu et al., 2001)。但仍以一條根醇萃取物於抗氧化、抗發炎方面的功效較為顯著。一條根在近年來研究中發現一條根預防骨質疏鬆之功效，其效果則來自於 *Flemingia species* 所含有的植物性雌激素(Ho et al., 2011)，但尚未有對台灣產 *Glycine tomentella* 之相關研究報告。

橄欖葉含有 30 多種多酚，其中有橄欖苦苷(oleuropein, 苦味成份)、橄欖多酚配糖体(oleuropein aglycon)和水合酪氨酸(hydroxytyrosol)。另外，除此之外，還含有多種類黃酮(如蘆丁、芹黃素、黃酮)和三萜等。橄欖苦苷是橄欖作物中最顯著的酚類化合物，葉片乾燥物中每克達 60-90mg(Le Tutour et al., 1992)。橄欖苦苷是一種完全無毒的化合物，而作為膳食補充劑(Durlu-Özkaya et al, 2011) 橄欖葉萃取物已被美國 F. D. A. (食物藥品管理局) 列為自然的膳食補充品。先前研究指出 oleuropein 對葛蘭氏陽性及陰性菌接具抗菌效果原因部分來自其對細菌細胞膜具表面活性的影響

(Casas-Sanchez et al., 2007)。另外研究 oleuropein 的抗氧化能力主要作用於磷脂質微脂粒 (phospholipid liposome) 雙層結構中 (Paiva-Martins et al., 2003)。最近的研究指出於適當的油相 (包括 olive oil、soybean oil 及中鏈中性脂肪) 及水相構成乳化結構中，oleuropein 具有減低油水相間表面張力，進而穩定乳化結構 (Mattia et al., 2011; Souilema et al., 2014)。

近年來食品工業界對以微乳膠技術來包覆一些難溶性機能性成分或食品添加物於食品配方之應用技術開發漸受重視 (Gaonkar and Bagwe, 2003; Acosta, 2009)。有一些文獻以微乳化系統當做藥物輸送的平台，但是大部分的研究都需要以短鏈的醇類作為共界面活性劑才能形成穩定的微乳膠，但這些短鏈的醇類如乙醇、己醇等分子對身體具有相當的毒性，所以無法使用以醇類為共界面活性劑的微乳膠系統，雖已有研究發表以天然可食用素材如卵磷脂或大豆油來建構微乳化系統，但仍免不了需使用到醇類之共界面活性劑 (Hwang et al., 2004; Patel et al., 2006; Polizelli, et al., 2006)。本實驗於前幾年研究混和卵磷脂 (Lecithin) 和 Tween80 兩種非離子性界面活性劑、並與油相及水相形成微乳膠系統，用於包覆難溶性多酚，並檢驗其經皮穿透效率，其中卵磷脂是構成細胞膜結構的主要成分，Tween80 則是 FDA 所核准的食品添加劑，此兩種成分在生物相容性及藥學應用上是可以接受的 (Lin et al., 2009; Lee et al., 2009; Lee et al., 2011)。於最近研究中，我們又嘗試將油酸 (oleic acid) 以食用大豆油取代，並成功的建構包覆薑黃素微乳膠之 soybean oil- lecithin/tween80- H₂O 三相圖 (pseudoternary phase diagram)，並研究其對促進人類肝炎細胞株 (human hepatoma HepG2 cell line) 毒性的作用 (Lin et al., 2012; Lin et al., 2014)。

本研究試圖以天然物衍生材料，包括大豆油 (油相) 及卵磷脂、橄欖萃取物 (介面活性劑)，建構一新穎性微乳膠，包覆生體可用率低之難溶性植物雌激素 (含異黃酮一條根萃取物)，並分別以體外經皮穿透試驗、基因重組酵母菌系統及小鼠骨母細胞增生試驗來評估此含植物雌激素微乳膠之生體可用率與生理活性。本年度計畫中，我們完成開發新天然材料建構新型微乳膠系統 (ME) 及包覆植物雌激素 (PHY-ME)，以體外小鼠經皮穿透生物模式評估 PHY-ME 是否可解決低生體可用率，以及以酵母菌系統模式評估 PHY-ME 是否可提升生理活性。

三、研究方法

1. 藥品與設備

本實驗所使用的天然物標準品，包括 genistein、dadizein 及 oleuropein，來自 SIGMA-ALDRICH 代理商友和貿易股份有限公司；界面活性劑分別為大豆卵磷脂 (Soybean Lecithin)，Sigma 公司 (美國，Saint Louis) 所製造及山梨糖醇類乳化劑 (Tween 80、Tween 20)，Aldrich 公司 (美國，Saint Louis) 所製造；油相液體為大豆沙拉油 (Soybean oil，由統一企業公司出產)；實驗中所使用的去離子水電阻為 17MΩ-cm 以上。為了測微乳液的穩定性，本實驗利用粒徑分析儀及界面電位儀 (Zeta-potential) 儀器來進行測試。製作微乳液所需振盪混合器 (Vortex mixer) 為 Vision Scientific 公司 (韓國，Kyunggi) 製造的 KMC-1300V 型。用於穩定性測試的粒徑分析儀及界面電位 Zeta-potential 分別為粒徑分析儀型號為 90Plus 及 Zeta Plus，皆由 Brookhaven Instruments Corporation 公司製造。

本實驗使用來自金門農業試驗所生產之金門一條根闊葉大豆，及市面上藥行所販賣的大陸一條根大葉千斤拔。實驗中所使用之 ICR 小鼠來自國立臺灣大學醫學院。

2. 萃取物樣品製備

2.1 含異黃酮一條根萃取物製備: 將一條根樣品使用粉碎機磨成粉末，過孔徑 60 的篩網，樣品與醇溶劑以 1:10 的比例浸泡，利用磁石攪拌，三天後取出，過濾殘渣取清澈液，之後使用減壓濃縮機進行濃縮，樣品即製備完成。分別為金門一條根 GT-Met、市售一條根 FL-Met。將一條根甲醇萃取物(40 g)以 silica gel 進行粗分(70-230 mesh，管柱體積約 1000 cm³ 並用三種不同比例的溶劑 hexane:ethyl acetate=3:1、1:1、1:3 沖提，沖提液分別為管柱體積的 1.5 倍、2 倍、2 倍。最後製備出六種樣品，分別為金門一條根: GT-1(Hex:EA=3:1 fraction)、GT-2(Hex:EA=1:1 fraction)、GT-3(Hex:EA=1:3 fraction)及市售千金拔品種:FL-1(Hex:EA=3:1 fraction)、FL-2(Hex:EA=1:1 fraction)、FL-3(Hex:EA=1:3 fraction)。

2.2 含橄欖苦苷萃取物製備:取歐洲進口橄欖苦苷萃取粉末(綠壯國際股份有限公司提供)10g以醇溶劑100 mL(1:10比例)萃取一天後，再以3500rpm、10min離心，上層液再以0.45 μm濾膜過濾，以真空旋轉濃縮儀50°C，150rpm濃縮後得到橄欖苦苷萃取物，經HPLC檢測約含橄欖苦苷大於20%。再以不同管柱層析方式處理，將橄欖苦苷含量提高，取得含不同比例橄欖苦苷萃取物，作微乳化系統最適化研究，找出最適合比例萃取物。

3. 超音波震盪法製作微乳液

在常壓下，首先將大豆沙拉油、橄欖苦苷萃取物乳化劑、含異黃酮一條根萃取物及大豆卵磷脂均勻混合後，利用加熱器使大豆卵磷脂溶化，溶化後加入水相，期間利用震盪混合器(Vortex mixer)攪動試管直至溶液呈現單一均勻相。使用以上四種成分為基礎，改變此四種的重量(比例)，希望能達到縮短形成微乳液的時間。本實驗利用改變不同配方，建構包覆植物雌激素微乳膠之soybean oil- lecithin/OLE- H₂O三相圖(pseudoternary phase diagram)來達到不需能源，既可以自組裝方式製備包覆植物雌激素之微乳膠(PHY-ME)。

4. 植物雌激素之微乳膠(PHY-ME)穩定度實驗

將能形成PHY-ME微乳液配方，分別進行澄清度比較，每隔數日要觀察其穩定度。檢測方面以粒徑分析儀(Particle Size Analyzer)、及表面電性儀(Zeta-potential)來檢測其穩定度、以Franz直式擴散槽檢測經皮吸收。

5. 界面電位儀Zeta-potential

Zeta-potential 為量測懸浮微粒之界達電位，由Brookhaven Instruments Corporation 製造、其型號為Zeta Plus。其所帶負電子越多，代表越穩定且其STDEV 越小代表誤差越少。本實驗的每筆資料為十次的平均值，可由每日所計的數值來作穩定度的比較。

6. 粒徑分析儀

粉體粒徑分析儀(Particle Size Analyzer)由Brookhaven Instruments Corporation 公司製造，型號為90Plus 的粒徑分析儀可用來測量包覆含異黃酮一條根萃取物微乳液粒徑分佈。

7. HPLC 分析方法

將萃取物或製備好之微乳膠溶液，以 0.45 μm 濾膜過濾顆粒大之不溶物後，取定量濾液並以 HPLC 級溶劑稀釋至適當濃度，以 HPLC 分析其主要成分含量，並計算主要成分含量或微乳膠中主成分之包覆量 (particle size < 450 nm)，分析條件如下：樣品(20 μl) 注入 HPLC 管柱：Cosmosil 5C18-AR-II, 4.6 I.D. x 25 cm (Nacalai Tesque, Japan)，流動相組成為 0.1% H_3PO_4 水溶液 (A) 和 acetonitrile (B) 及梯度設定：0-5 min, from 90% A, 10% B to 70% A, 30% B; 5-20 min, from 70% A, 30% B to 60% A, 40% B; 20-40 min, from 60% A, 40% B to 10% A, 90% B; 40-45 min, from 10% A, 90% B to 5% A, 95% B。流速及偵測波長分別為 1.0 mL/min and 254 nm。一條根中主要異黃酮 genistein 及 daidzein 的含量分別以標準品求得之標準曲線以內插法計算出。

8. 經皮穿透試驗

將裸鼠皮去除皮下脂肪後剪裁成適當大小，約為 2x2，置於 -20°C 冰箱冷藏保存，於實驗前 1 小時再放置室溫下解凍。將裸鼠皮膚置於透明膠帶上，以相同的力道作撕除的動作，重複 20 次，以去除裸鼠皮膚的角質層。去除裸鼠皮膚內的脂質是將裸鼠固定在 Franz cell 上後加入 chloroform:methanol=1:1 的混合溶液，1 小時後移除有機溶媒進行實驗。經皮穿透試驗採用 Franz 所設計之置直立式擴散裝置。構造為一組直立式，上下可分離的雙層擴散玻璃容器。供藥端為一圓柱狀之雙層玻璃擴散槽，受藥端為底部具接觸面柱狀玻璃管，接觸面可供緊密結合，中間以裸鼠皮膚當作穿透障壁，供藥端(靠近皮膚之表皮層，位於上方)內部空間填充 1ml 含有不同藥物濃度溶液並以 parafilm 封口，受藥端(靠近皮膚之內表層，位於下方)內部空間填充 10ml 不含藥物之 PH7.4 的緩衝溶液，供藥底部放入磁性攪拌石並置於多磁點攪拌器上以 600rpm 的速度攪拌，而供藥端擴散槽內之內外玻璃夾層間以循環水浴串聯之，其溫度控制於 37 \pm 1°C。分別在不同的時間點抽取藥液 1 ml 再注入 1 ml 空白溶媒於受藥端以維持直立式雙層擴散玻璃容器容量固定，以 HPLC 分析受藥端異黃酮累積穿透量。

9. 以基因重組建構之酵母菌株檢測萃取物中之雌激素活性

本實驗所使用之原始母酵母菌株為 YPH250。ERE-ADE2 的建構為 Dr. Picard 實驗室發表的方法如下(Balmelli-Gallacchi et al, 1999) : pU/ERE-Ade2 (an ERE upstream of the minimal *CYC1* promoter driving the expression of *ADE2* and the *URA3* marker) was linearized with BstBI within the *URA3* gene and integrated into the *ura3* locus of YPH250，得到 strain DP160 (*URA3::ERE-ADE2* [pU/ERE-Ade2])。本研究使用之酵母菌株建構於台大醫學院鄧述諄教授實驗室: CLY-3 [derived from DP160 carrying ERE-ADE2 (provided by Dr. D. Picard, Switzerland), transformed with plasmid YepHEGO carrying hER (provided by Dr. P. Chambon, France)。將一條根萃取物或 PHY-ME 微乳膠依不同濃度加入 25 ml 之 yeast synthetic complete medium without uracil and histidine plus limited amount of adenine (5g/ml)(SC-ura-his+ low ade)，再倒入培養皿中使其凝固，以劃碟法接種 CLY-3，置於 30 °C 培養箱三天後檢視結果。R-red colonies (negative); W-white colonies (equivalent to 100 pM of estradiol)。

四、結果與討論

本研究首先以先前發表之最適化微乳膠配方，以 lecithin/tween80 為界面活性劑來包覆金門一條根 GT 萃取物(ME-GT)，再以小鼠皮經皮穿透實驗，檢視其粒徑大小及穿透係數(K_p)之關係。研究結果如表一，其中發現當微乳膠粒徑小於 100 nm 情形下，粒徑大小並不是會影響穿透速率的因素，以不同萃取方式得到之 GT extract，其中不同基質組成會影響異黃酮 daidzein 之穿透能力，其中以 GT2 及 GT5，兩者基質較具親水性特性，遠比其他較親脂性之 GT3 及 GT6 extracts 於穿透能力上具有正向協助異黃酮穿透之效果，但是由實驗結果可得知 ME-Gen 的穿透效果最差，其 K_p 值僅 1.91 ± 0.4 ，相較於 ME-Dai 的 K_p 值 13.131 ± 5.2 ，目前還不了解為何 genistein 的穿透效果和其結構的特異性之關係。

基於先前研究結果，我們試圖以天然界面活性劑含橄欖苦苷(oleuropein)之萃取物來取代 tween80，建構新型可食用性微乳膠系統包覆植物雌激素之構想已申請並獲得專利通過（專利名稱：**具一條根萃取物微乳膠結構之裝置，新型專利第 M 504611 號**）。比較以界面活性劑 tween80 與天然橄欖苦苷萃取物建構之含植物雌激素微乳膠系統(PHY-ME)之經皮穿透結果。初步結果如圖一顯示添加部分含橄欖苦苷萃取物(OLE)取代 tween80，於包覆大豆異黃酮萃取物微乳膠之經皮穿透試驗中，含橄欖苦苷萃取物為天然界面活性劑配方能提升明顯大豆異黃酮 genistein 及 daidzein 穿透量達 4-5 倍。

本次實驗中我們選擇使用重組酵母系統作為植物雌激素活性篩選的平台，我們已於先前利用基因工程建構法，將雌激素應答元件 (estrogen response element)加在一個 ADE2 的表達基因之前，再將它插在酵母菌的染色體上，之後再將一帶有雌激素受體基因之載體植入此母菌株中，最後所得之酵母菌株便可用來快速篩選雌激素的活性，如圖二。因其較為簡單且快速，方便使用，將於下年度實驗中作為測試 PHY-ME 是否可提升生理活性之指標。

本實驗繼續以不同比例 tween/oleuropein，包括 0/T = 1:3 及 1:1 取代 tween80，並以先前發表 lecithin/tween80 為界面活性劑之最適化配方比例製備之 genistein 和 daidzein 微乳膠，檢視其經皮穿透量 vs. 時間之曲線圖(圖三和圖四)，並以線性回歸曲線計算其斜率，同時亦將兩種 0/T 比例之 oleuropein 隨時間之穿透量作圖，結果發現 oleuropein 本身於經皮穿透過程中，也和異黃酮一起通過小鼠皮屏障穿透至接收端，且呈現良好之線性關係($R^2 > 0.94$)，推測 oleuropein 分子較 tween80 小，且具界面活性特性，除了於微乳膠配方中穩定配方外，穿透過程中也協助 genistein 和 daidzein 等之成分之穿透。但如僅以 OLE 完全取代 tween80 無法形成穩定微乳膠 (data not shown)。

最後計算不同比例 tween/oleuropein 製備之異黃酮微乳膠穿透係數(K_p)，表二中顯示 genistein 及 daidzein 於不同界面活性劑製備的微乳膠中，包括包覆濃度(C_0)、穿透率(J_s)及穿透係數(K_p)。首先於包覆率做比較，以三種不同組成配方包覆 genistein 或 daidzein 皆可達到 50-80%之包覆率。再由穿透係數(K_p)做比較，發現無論以何種配方包覆之 genistein，其穿透係數 K_{pgen} 皆遠比 K_{pdai} 小，特別是 daidzein，以 0/T 取代 tween80 之穿透能力隨著 oleuropein 比例的增加，呈現從 3 倍至 10 倍以上顯著性的提升，推估可能因 oleuropein 和 daidzein 極性較相近，使得其協助穿透效果比較明顯。

五、參考文獻

- Acosta, E. (2009) Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 14, 3-15.
- Balmelli-Gallacchi, P., Schoumacher, F., Liu, J. W., Eppenberger, U., Mueller, H. and Picard, D. (1999). A yeast-based bioassay for the determination of functional and non-functional estrogen receptors. *Nucleic Acids Res.*, 27, 1875-1881.
- Casas-Sanchez, J., Alsina, M.A., Herrlein, M. and Mestres, C. (2007). Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. *Colloid Polym. Sci.* 285, 1351-1360.
- Durlu-Özkaya, F., Özkaya, M.T. (2011) Oleuropein using as an Additive for Feed and Products used for Humans. *J Food Process Technol* 2:113. doi:10.4172/2157-7110.1000113
- Gaonkar, A. G. and Bagwe, R. P. (2003). Microemulsions in foods: Challenges and applications. *Surfactant Science Series* 109, 407-430.
- Ho, H.Y., Wu, J.B. and Lin W.C. (2011) Flemingia macrophylla extract ameliorates experimental osteoporosis in ovariectomized rats. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* Article ID 752302.
- Hwang, S. R., Lim, S.-J., Park, J.-S. and Kim, C.-K. (2004). Phospholipid-based microemulsion formulation of all-trans-retinoic acid for parenteral administration. *Int. J. Pharm.* 276, 175-183.
- Jungbauer, A. and Medjakovic, S. (2014). Phytoestrogens and the metabolic syndrome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 139, 277-289.
- Ko Y.J., Wu, Y.W. and Lin, W.C. (2004). Hypolipidemic effect of Glycine tomentella root extract in hamsters. *Am. J. Chin. Med.* 32, 57-63.
- Le Tutour, B. and Guedon, D. (1992) Antioxidant activities of Olea europaea leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry* 31, 1173–1178.
- Lee, M.-H., Kao, L. and Lin, C.C. (2011). Comparison of the antioxidant and transmembrane permeative activities of the different polygonum cuspidatum extracts in phospholipid-based microemulsions. *J. Agri. Food Chem.* 59, 9135-9141.
- Lee, M.H., Yu, M.W., Kao, L. and Lin, C.C. (2009). Enhancement of the encapsulation and transmembrane permeation of isoflavone-containing red clover extracts in phospholipid-based microemulsions using different extraction processes. *J. Agri. Food Chem.* 57, 9489-9495.
- Lin, C.C., Lin, H.Y., Chen, H.C., Yu, M.W. and Lee, M.H. (2009). Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. *Food Chem.* 116, 923-928.
- Lin, C.C., Lin, H.Y., Chi, M.H., Shen, C.M. Chen, H.W., Yang, W.J. and Lee, M.H. (2014) Preparation of curcumin microemulsions with food-grade soybean oil/lecithin and their cytotoxicity on the HepG2 cell line. *Food Chem.* 154, 282-290.
- Lin, H.Y., Thomas, J. L., Chen, H.W., Shen, C.M., Yang, W.J. and Lee, M.H. (2012). In vitro suppression of oral squamous cell carcinoma growth by ultrasound-mediated delivery of curcumin microemulsions. *Intl. J. Nanomedicine* 7, 941-951.
- Lin, W.C, Ko, Y.J. and Wu, Y.W. (2000) Effects of 28-day's repeated oral administration of crude aqueous extracts of Glycine tomentella hayata on rats. *J. Chin. Med.* 11, 205-215.

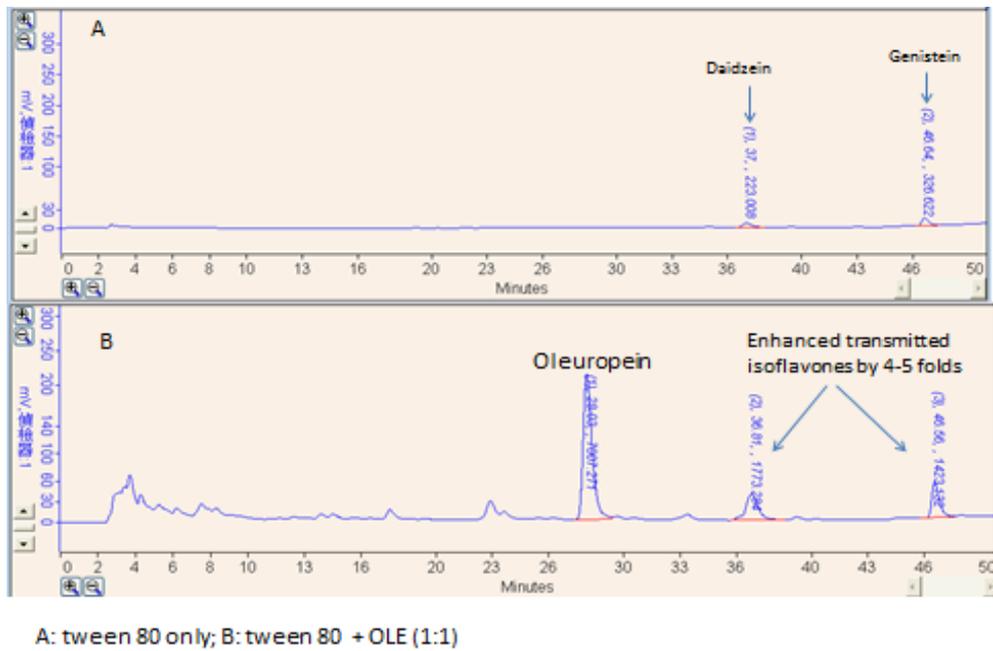
- Mattia, C., Sacchetti, G. and Pittia, P. (2011). Interfacial behavior and antioxidant efficiency of olive phenolic compounds in O/W olive oil emulsions as affected by surface active agent type. *Food Biophysics* 6, 295–302.
- Paiva-Martins, F., Gordon, M. H. and Gameiro, P. (2003). Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. *Chem. Phys. Lipids*. 124, 23-36.
- Pan, B.S., Kuo, Y.Y., Chen, T.Y. and Liu, Y.C. (2005). Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of two different species of a Chinese herb I-Tiao-Gung. *Life Sci*. 77, 2830-2839.
- Patel, N., Schmid, U. and Lawrence, M. J. (2006). Phospholipid-based microemulsions suitable for use in foods. *J. Agri. Food Chem*. 54, 7817-7824.
- Polizelli, M. A., Telis, V. R. N., Amaral, L. Q. and Feitosa, E. (2006). Formation and characterization of soy bean oil/surfactant/water microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 281, 230-236.
- Schilling, T., Ebert, R., Raaijmakers, N., Schütze, N. and Jakob, F. (2014) Effects of phytoestrogens and other plant-derived compounds on mesenchymal stem cells, bone maintenance and regeneration. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 139, 252-261.
- Souilema, S., Kobayashi, I., Neves, M.A., Jlaiel, L. , Isoda, H., Sayadi, S. and Nakajima, M. (2014) Interfacial characteristics and microchannel emulsification of oleuropein-containing triglyceride oil–water systems. *Food Res. Intl*. 62, 467–475.
- Wu, L.T., Wu, Y.W., Shih, C.C., Ko, Y.J. and Lin, W.C. (2001) Primary studies on the genotoxicity of aqueous extracts from *Anoectochilus formosanus* and *Glycine tomentella*. *J. Chin. Med*. 12, 173-178.

表一、以微乳化包覆之 GT 萃取物(ME-GT)粒徑大小及穿透係數(K_p)之比較

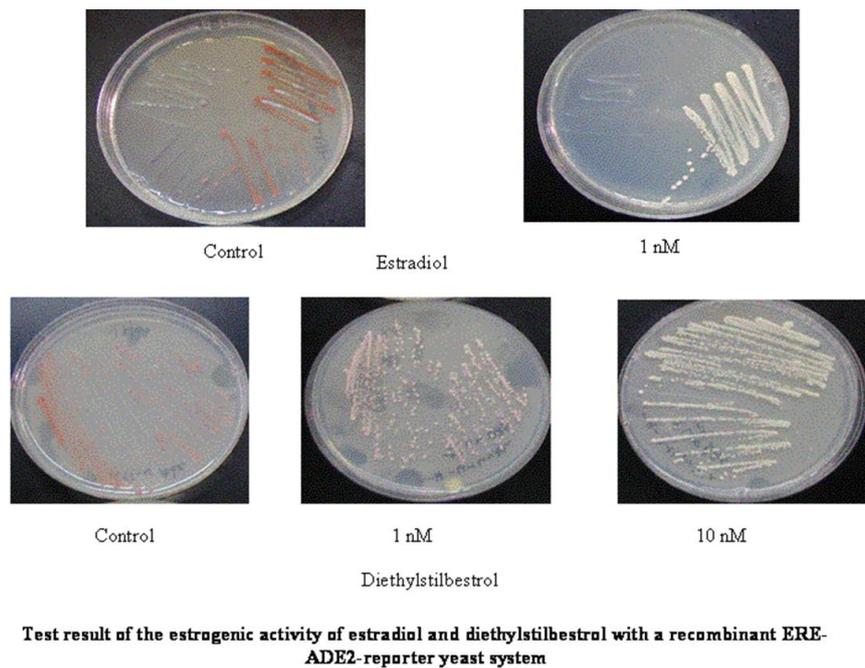
Vehicles	Diameter (nm)	J_s Daidzein ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	K_p Daidzein ($\times 10^3 \text{ cm}/\text{h}$)
ME-GT2	100.6 \pm 7.5	0.4393	19.233 \pm 2.6
ME-GT3	78.2 \pm 3.5	0.4124	8.425 \pm 1.6
ME-GT5	88.1 \pm 3.0	0.4434	26.432 \pm 7.0
ME-GT6	74.3 \pm 2.0	0.7065	8.312 \pm 4.1
ME-Dai	71.5 \pm 0.5	0.9146	13.131 \pm 5.2
ME-Gen	93.1 \pm 4.8	0.1726	1.91 \pm 0.4

表二、以不同比例 tween/oleuropein 製備之異黃酮微乳膠穿透係數(K_p)之比較

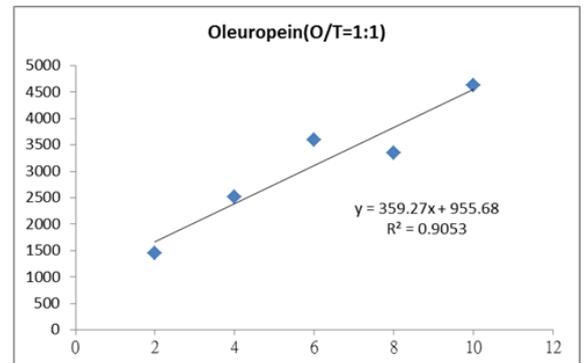
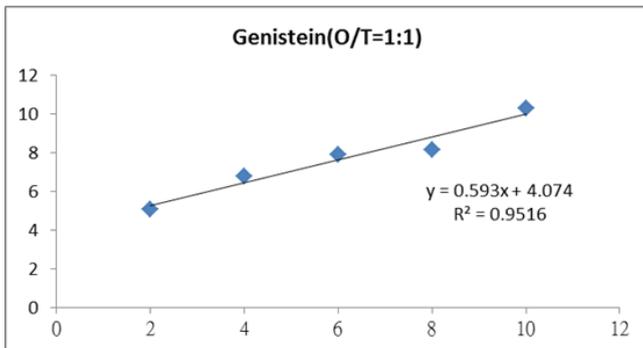
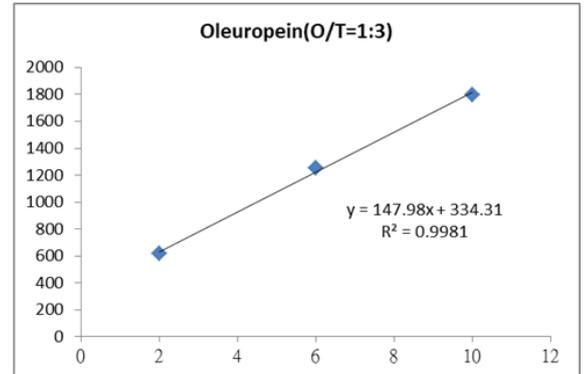
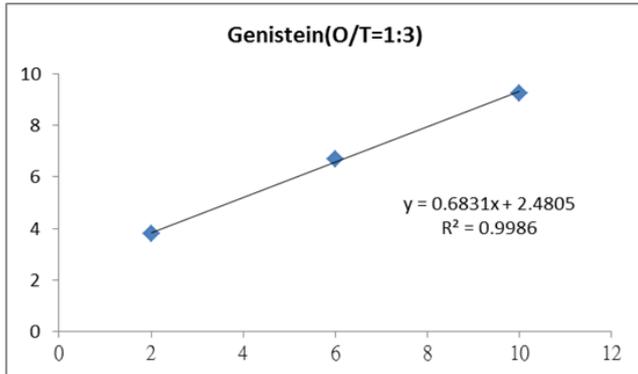
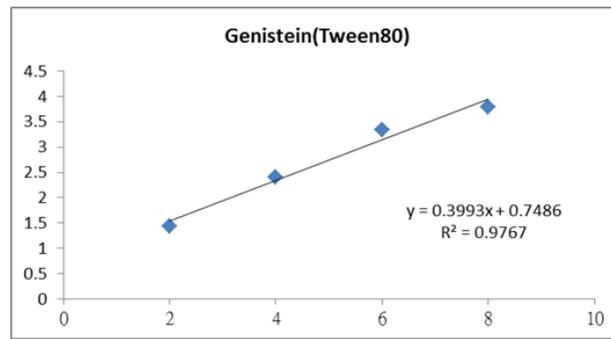
T/O ratio	C0($\mu\text{g}/\text{ml}$)	J_s Isoflavone ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	K_p Isoflavone ($\times 10^3 \text{ cm}/\text{h}$)
Genistein			
Tween80	112.7352	0.3993	3.542
O/T=1:3	154.3526	0.6831	4.426
O/T=1:1	170.5463	0.593	3.477
Daidzein			
Tween80	158.9273	1.5874	9.988
O/T=1:3	109.0902	3.3185	30.42
O/T=1:1	117.0888	8.253	70.485



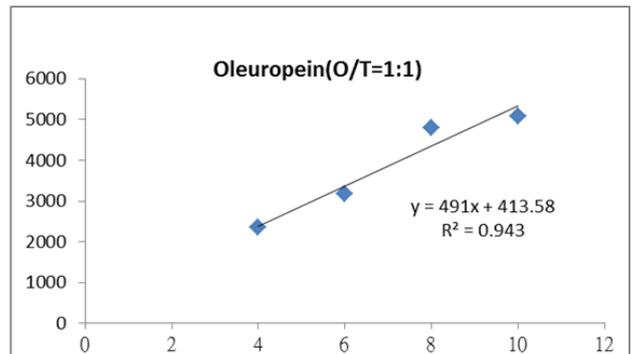
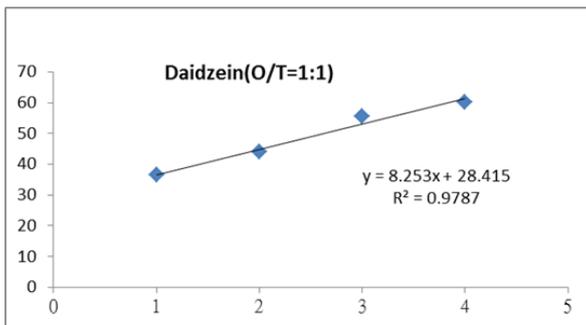
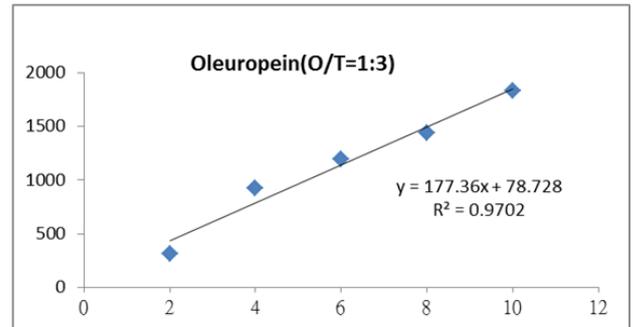
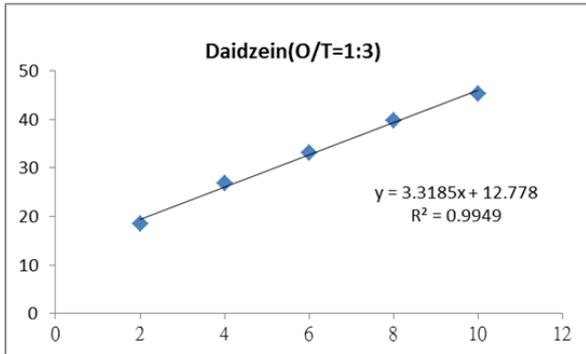
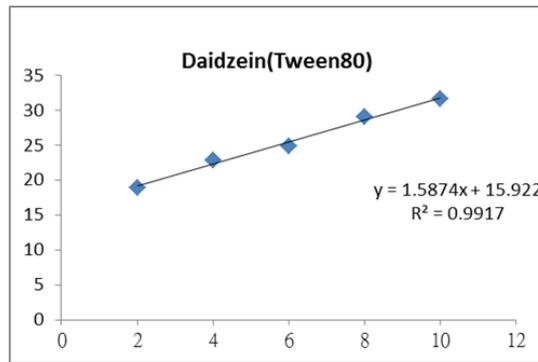
圖一、添加部分含橄欖苦苷萃取物(OLE)取代 tween 於包覆大豆異黃酮萃取物微乳膠之經皮穿透 HPLC 圖



圖二、以基因重組建構之酵母菌株檢測萃取物中之雌激素活性



圖三、以不同比例 tween/oleuropein 製備之 genistein 微乳膠經皮穿透量 vs. 時間之曲線圖



圖四、以不同比例 tween/oleuropein 製備之 daidzein 微乳膠經皮穿透量 vs. 時間之曲線圖

計畫成果自評

本研究原提出為二年期計畫之架構，擬延續先前研究結果，試圖以天然物衍生材料，包括大豆油(油相)及卵磷脂、橄欖萃取物(介面活性劑)，建構一新穎性微乳膠，包覆生體可用率低之難溶性植物雌激素(含異黃酮一條根萃取物)，並分別以體外經皮穿透試驗、基因重組酵母菌系統及小鼠骨母細胞增生試驗來評估此含植物雌激素微乳膠之生體可用率與生理活性。於本年研究目標包括:1)開發新天然材料建構新型可食用性微乳膠系統 (ME)及包覆植物雌激素(PHY-ME); 2)以體外小鼠經皮穿透生物模式評估 PHY-ME 是否可解決低生體可用率。自評已達到第一年目標，將於第二年計畫中完成以酵母菌系統及小鼠骨母細胞模式評估 PHY-ME 是否可提升生理活性。