

行政院農業委員會林務局委託研究計畫 100-00-5-10

土肉桂葉子精油微膠囊之開發與應用

Investigation of Microencapsulation of
Cinnamomum osmophloeum Leaf Essential Oils



委託機關：行政院農業委員會林務局

執行機關：臺灣大學森林環境暨資源學系

中華民國 100 年 12 月

一、中文摘要

本計畫的目的分析土肉桂葉子精油的安定性，並利用 β -環糊精進行土肉桂葉子精油微膠囊的製備，期望藉由微膠囊的包覆，提高土肉桂葉子精油的保存性，擴展土肉桂葉子精油的利用範疇，並開發高經濟價值與多樣化的土肉桂葉子精油產品。精油微膠囊的製備條件為精油與 β -環糊精的比例為 15/85，以及溶液中乙醇與水的比例為 1/3 至 1/5，可以得到較高的微膠囊收率，桉羅木醇型精油微膠囊與肉桂醛型精油微膠囊的收率分別為 96.5% 與 86.3%。利用傅立葉轉換紅外線光譜分析精油微膠囊的化學組成分，確定微膠囊中存在精油成分的特定吸收。以頂空氣相層析質譜分析精油微膠囊在不同溫度下的揮散情形，精油微膠囊在環境溫度為低於 60°C 時，精油成分可維持在穩定的狀態，顯示微膠囊包覆可以提高土肉桂葉子精油的保存性。分析溫度對桉羅木醇型土肉桂葉子精油成分的影響，顯示桉羅木醇型精油在高溫環境下，主成分 Linalool 經由去羥基與環化反應，轉變為 *trans*-Ocimene、 β -Myrcene、Limonene、*cis*-Ocimene 與 Terpinolene。由肉桂醛型精油在高溫下的成分分析，得知 *trans*-Cinnamaldehyde 在短時間內無明顯的轉變，頂空採樣與原始精油成分相近。由二種老化試驗評估結果，顯示 β -環糊精在高溫時熱穩定性良好，同時可以減緩土肉桂葉子精油的揮散。

關鍵詞：土肉桂、 β -環糊精、微膠囊、桉羅木醇、肉桂醛。

二、英文摘要

The objective of this study was to investigate the microencapsulation of *Cinnamomum osmophloeum* leaf essential oil with β -cyclodextrin; it is expected to improve the preservation of *C. osmophloeum* leaf essential oil. The higher yield of microcapsules was achieved at the leaf oil to beta-cyclodextrin ratio of 15:85 and ethanol to water ratio ranging from 1:3 to 1:5. The maximum yields of microencapsulated linalool chemotype leaf oil and microencapsulated cinnamaldehyde chemotype leaf oil were 96.5% and 86.3%, respectively. Based on the FTIR analysis, the characteristic absorption bands of constituents appeared in the FTIR spectra of microcapsules. The volatile property of microencapsulated leaf oil was evaluated by headspace GC-MS. The emission of constituents from microcapsules was less when the environmental temperature was below 60°C. Results obtained in the present study

revealed that the preservation of *C. osmophloeum* leaf oil can be definitely improved by microencapsulation. Influence of temperature on changes of constituents of *C. osmophloeum* leaf oil was also analyzed in the study. After dehydroxylation or cyclization, linalool was converted to *trans*-ocimene, β -myrcene, limonene, *cis*-ocimene and terpinolene under the high temperature condition. The thermostability of *trans*-cinnamaldehyde was better than that of linalool. Results from two kind of aging tests, β -cyclodextrin was stable under the high temperature condition, and it was beneficial to reduce the constituent emission from *C. osmophloeum* leaf essential oil.

Keywords: *Cinnamomum osmophloeum*; β -cyclodextrin; microcapsule; linalool; *trans*-cinnamaldehyde.

三、研究團隊說明

| 序號 | 機關名稱 | 單位名稱 | 研究人員 | 職稱 |
|----|--------|-----------|------|-------|
| 1 | 國立臺灣大學 | 森林環境暨資源學系 | 張上鎮 | 特聘教授 |
| 2 | 國立臺灣大學 | 森林環境暨資源學系 | 張惠婷 | 副教授 |
| 3 | 國立臺灣大學 | 森林環境暨資源學系 | 林群雅 | 博士班學生 |
| 4 | 國立臺灣大學 | 森林環境暨資源學系 | 許立昇 | 碩士班學生 |
| 5 | 國立臺灣大學 | 森林環境暨資源學系 | 鄭秉和 | 碩士班學生 |
| 6 | 國立臺灣大學 | 森林環境暨資源學系 | 程悅君 | 臨時工 |

四、計畫目的

植物為生物化學家，能製造各種化學物質，包括大家所熟知之精油，精油成分不只能使我們生活環境中的空氣清爽，更有殺菌、殺蟲、鎮定精神及提神紓壓等功效。土肉桂 (*Cinnamomum osmophloeum* Kaneh., 俗稱 Indigenous cinnamon) 是台灣常見的本土闊葉樹種之一，植物分類上屬於樟科 (Lauraceae) 之樟屬 (*Cinnamomum*)，土肉桂的特殊之處在於葉子精油含有與大陸茵桂樹皮精油相似的成分，如能直接採收「葉子」利用，就不需要砍伐樹木或剝皮採收；計畫主持人的研究結果亦證實土肉桂的葉子精油分具有良好抗細菌、抗室塵蟎、抗白蟻、病媒蚊幼蟲、抗腐朽菌、抗病原真菌等生物活性(鄭森松等，2008；許立昇等，2009；林群雅等，2010；Chao *et al.*, 2005; 2008; Cheng *et al.*,

2006; 2008a; 2008b; 2009; Chua *et al.*, 2008; Hsu *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2005; Tung *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005; 2008; Yen and Chang, 2008)；而各種化學品系之土肉桂葉子，由於其精油所含主成分不同，具有不同的功效與用途，顯示土肉桂葉子為相當具有潛力可供開發應用之本土資源。由於精油成分大多為高揮發性的單萜與倍半萜類化合物，精油成分容易揮散，部分精油成分在使用環境下亦可能產生氧化變質的情形，使精油保存性降低，以及在產品利用上受到許多限制。 β -環糊精為常見的微膠囊殼層材料之一，優點為對光線與空氣與熱等環境因子的穩定性佳，廣泛應於食品、醫藥、化工等相關領域 (Szejtli, 1998; Waleczek *et al.*, 2003; Kaiser *et al.*, 2004; Tozzi *et al.*, 2008; Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Jyothi *et al.*, 2010)。

由第一年的研究結果得知精油微膠囊的製備條件為精油與 β -環糊精的比例為15/85，以及溶液中乙醇與水的比例為1/3至1/5，可以得到較高的微膠囊收率，枷羅木醇型精油微膠囊與肉桂醛型精油微膠囊的收率分別為96.5%與86.3%。利用傅立葉轉換紅外線光譜分析精油微膠囊的化學組成分，確定微膠囊中存在精油成分的特定吸收。以頂空氣相層析質譜分析精油微膠囊在不同溫度下的揮散情形，精油微膠囊在環境溫度為低於60°C時，精油成分可維持在穩定的狀態，顯示微膠囊包覆可以提高土肉桂葉子精油的保存性。

本計畫的目的為利用 β -環糊精進行土肉桂葉子精油微膠囊的製備，期望藉由微膠囊的包覆，提高土肉桂葉子精油的保存性，擴展土肉桂葉子精油的利用範疇，並開發高經濟價值與多樣化的土肉桂葉子精油產品。

五、重要工作項目及實施方法

(一) 試驗材料

本計畫採集二種化學品系（枷羅木醇型與肉桂醛型）的土肉桂 (*Cinnamomum osmophloeum* Kaneh.) 葉子精油，進行後續精油微膠囊的製備。

(二) 試驗藥品

試驗使用的藥品包括 β -環糊精、乙醇、乙酸乙酯、枷羅木醇 (Linalool)、肉桂醛 (*trans*-Cinnamaldehyde)、黃嘌呤 (Xanthine)、黃嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase)。

(三) 精油之萃取

本試驗擬以傳統的水蒸餾法萃取精油，將約 100 g 的土肉桂葉子，裝入圓底燒瓶中，並加入約 1 L 的蒸餾水進行精油萃取，加熱萃取時間為 6 hr。另外，取部分試樣測其含水率，並計算精油收率。

(四) 精油微膠囊的製備

β -環糊精 (β -Cyclodextrin, $C_{42}H_{70}O_{35}$) 為環狀結構的化合物，內外徑分別為 0.06 與 0.15 micrometer，將 β -環糊精加入於乙醇與水的混合溶液，於 50°C 攪拌使其溶解，待 β -環糊精完全溶解後，使溶液降溫至 25°C，另外，將土肉桂葉子精油或精油成分 (Linalool、*trans*-Cinnamaldehyde) 精油預溶於乙醇 (10 mL)，將不同混合比例的精油成分或精油加入 β -環糊精溶液，攪拌機 (600 rpm) 攪拌 1 hr 後，將溶液靜置於 4°C 冷藏櫃 12 hr，續將精油微膠囊過濾移除溶液，乾燥方式為 50°C 烘箱乾燥 24 hr，乾燥後秤重計算 β -環糊精微膠囊的收率 (公式 1)。精油微膠囊乾燥後為粉狀，將精油微膠囊保存樣品瓶中，供後續進行分析試驗。桉羅木醇型精油微膠囊與肉桂醛型精油微膠囊中精油量的含量分別為 15.85 與 14.93%。

$$\text{收率(\%)} = [\text{精油微膠囊的重量} / (\beta\text{-環糊精的重量} + \text{精油的重量})] \times 100 \quad (1)$$

(五) 氣相層析質譜分析 (Gas chromatography-mass spectroscopy, GC-MS)

精油的成分分析係利用 Thermo 公司之 Trace GC Ultra 氣相層析儀配合 PoLaris Q MSD 質譜儀進行鑑定。使用之管柱為 DB-5MS (Crossbond 5% phenyl methylpolysiloxane, Length 30 m, I.D. 0.25 mm, Film 0.25 μ m)，載送氣體氮氣的流速為 1 mL/min，升溫條件為起始溫度為 60°C，持溫 1 min，第一段升溫以 4°C/min 升溫至 220°C 後，持溫 2 min，第二段升溫以 20°C/min 升溫至 250°C 後，持溫 3 min。以 10:1 之分流比例導入質譜儀，質譜範圍 (Mass range) m/z 為 50-650 a.m.u.，各成分的質譜經由資料庫 (National Institute of Standards and Technology (NIST) V. 2.0 與 Wiley 7.0) 進行比對分析。並使用 Kovats index (KI) 進行比對 (Adams, 2007)，KI 值的公式如下所示 (公式 2)。精油成分的含量以氣相層析儀配合火焰離子偵測器 (Flame ionization detector, FID) 進行定量。以頂空氣相層析質譜分析 (Headspace GC-MS, HS-GC-MS) 進行土肉桂精油微膠囊的精油釋

放情形，將定量的土肉桂精油微膠囊放入樣品瓶後密封，將樣品瓶置入可加溫之樣品室，於相同加溫時間 (30 min) 以注射針採樣 10 μ L 樣品瓶內的氣體，以氣相層析-質譜儀分析樣品的揮發性成分。

$$KI(x) = 100z + 100 [(\log RT(x) - \log RT(P_z)) / (\log RT(P_{z+1}) - \log RT(P_z))] \quad (2)$$

RT(x): 為未知化合物 X 之滯留時間; RT(P_z)與 RT(P_{z+1})為碳數為 z 與 z+1 直鏈烷(*n*-Alkanes)化合物的滯留時間; $RT(P_z) \leq RT(x) \leq RT(P_{z+1})$

(六) 乾熱加速老化試驗

以 105°C 乾熱處理使試樣加速老化後，進行性質評估 (CNS 12886)。試樣在室溫下經長時間之曝露，多項性質均會降低，此一現象稱為老化，藉由高溫 (105 \pm 2°C) 處理試樣，使其在短時間內呈老化結果，即所謂加速老化 (Accelerated aging)，可了解乾熱對於試樣各項性質老化程度之影響。試驗時間為 1、2、4 天，記錄精油微膠囊經乾熱老化試驗後的重量變化 (公式 3)。

$$\text{重量留存率(\%)} = (\text{老化試驗後微膠囊的重量} / \text{試驗前微膠囊的重量}) \times 100 \quad (3)$$

(七) 溼熱加速老化試驗

本試驗並採用 80°C 及 65% RH 溼熱處理法作為加速老化試驗之溼熱條件 (CNS 12887-1)，將精油微膠囊置於溼熱老化試驗機，試驗時間為 1、2、4、8 天，後續評估精油微膠囊經溼熱老化試驗後的性質變化。

(八) 傅立葉轉換紅外線光譜分析

以 Bio-Rad FTS-40 傅立葉轉換紅外線光譜儀 (Fourier transform infrared spectroscope, FTIR) 進行分析，檢測器為 DTGS (Deuterated triglycine sulphate)，分析方法採用散反射分析，解析度為 4 cm^{-1} ，掃描次數為 64 次，波長掃描範圍為 400 - 4000 cm^{-1} ，利用傅立葉轉換紅外線光譜分析 β -環糊精與精油微膠囊的化學組成。

(九) 黃嘌呤氧化酶抑制試驗

黃嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase) 會催化黃嘌呤 (Xanthine) 氧化成尿酸，尿酸在波長 290 nm 具有特定的吸光值，可由吸光值之變化判斷試樣抑制黃嘌呤氧化酶將黃嘌呤氧化成尿酸之能力。本試驗參考 Ahmad 等人 (2008) 的黃嘌呤氧化酶抑制方法，取 117

μL Potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.8)、3 μL 試樣和 60 μL 濃度為 0.025 U/mL 之 Xanthine oxidase，混合均勻後於室溫下靜置 10 min，加入 100 μL 濃度為 0.15 mM 的 Xanthine solution，於 37°C 下避光反應 30 min 後，取 20 μL 濃度為 1N 的 HCl 終止反應，而後以酵素免疫分析儀 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 測定波長為 290 nm 時試樣之吸光值，抑制率計算方式如下所示 (公式 4)。

$$\text{抑制率 (\%)} = (1 - \text{實驗組吸光值} / \text{對照組吸光值}) \times 100 \quad (4)$$

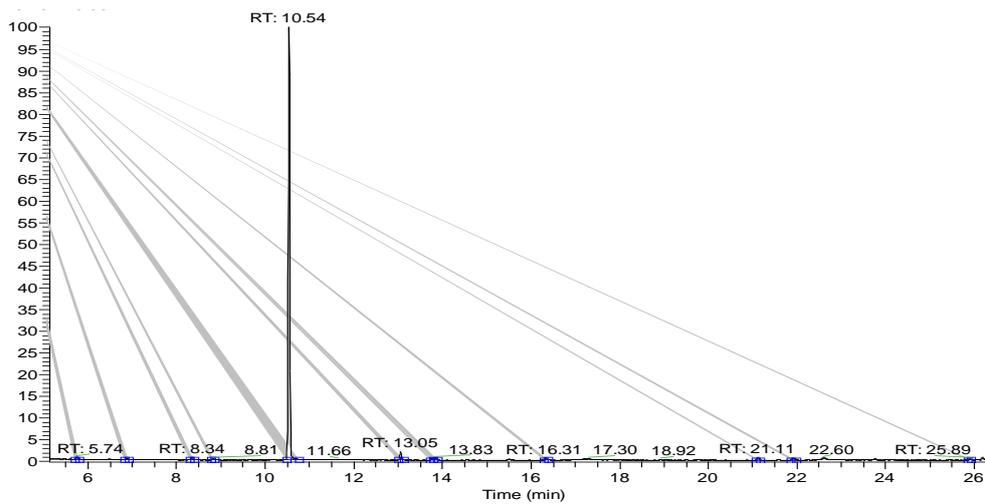
六、結果與討論

(一) 溫度對桉羅木醇型土肉桂葉子精油成分的影響

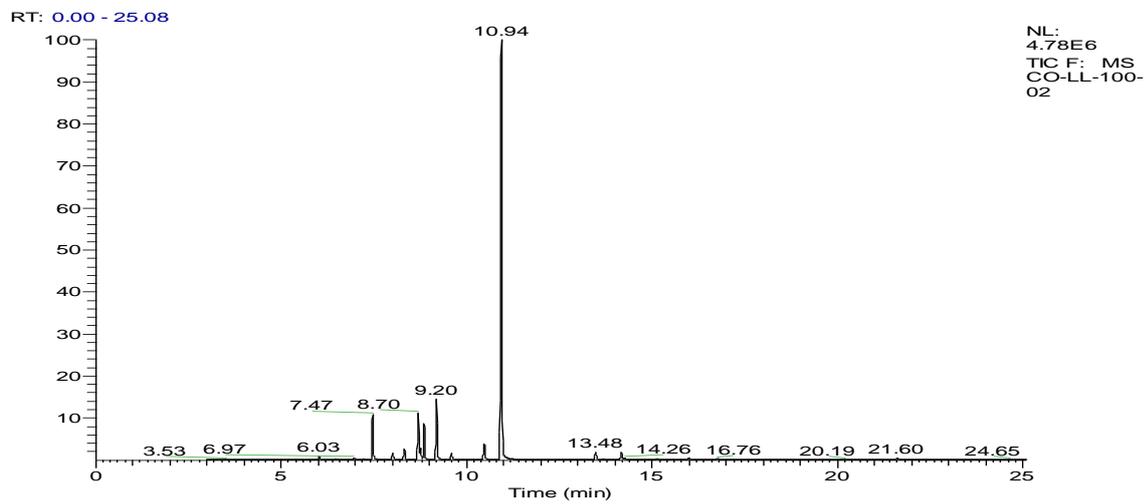
桉羅木醇型土肉桂葉子精油之氣相層析圖如圖 1A 所示，主要化合物為 Linalool，在精油中的含量高達 93.30% (表 1)，其他少量成分為 2-Methylbenzofuran (1.99%)、 α -Pinene (0.66%)、Cinnamyl acetate (0.63%)、Limonene (0.61%)、 β -Caryophyllene (0.59%)、Methyl chavicol (0.57%) 與 *trans*-Cinnamaldehyde (0.52%)。將精油置於密閉樣品瓶中以 100°C 的溫度加熱 30 分鐘，並以頂空採樣分析樣品瓶中精油成分變化，由圖 1B 的氣相層析圖發現除了原本的主成分 Linalool 之外，產生許多新的波峰，經由質譜資料庫與 KI 值確定化合物的種類，增加的化合物為 β -Myrcene (5.56%)、 α -Phellandrene (0.91%)、 α -Terpinene (1.49%)、*cis*-Ocimene (4.70%)、 γ -Terpinene (0.86%) 與 Terpinolene (2.53%) (表 1)，同時 Limonene 與 *trans*-Ocimene 的含量亦大幅增加為 7.77% 與 7.94%，而 Linalool 的含量則降低為 64.01%。

圖 1C 為桉羅木醇型葉子精油以 150°C 加熱 30 分鐘後的氣相層析圖，Linalool 的含量進一步降低為 27.54%，新化合物的波峰更為明顯，Limonene 與 *cis*-Ocimene 的含量增加為 11.40% 與 11.72%，Terpinolene 輕微上升為 3.37%，含量變化最顯著的化合物為 β -Myrcene (17.89%) 與 *trans*-Ocimene (20.08%)，這些化合物的增加量與 Linalool 含量降低的數值相近，而其餘精油成分的含量無明顯變化，顯示化合物 Linalool 於高溫的環境下降解，形成大量的降解物，圖 2 為 Linalool 與降解物的化學結構，由化合物的結構變化得知，Linalool 在高溫下產生去羥基反應 (Dehydroxylation) 與環化反應 (Cyclization)，轉變為 *trans*-Ocimene、 β -Myrcene、*cis*-Ocimene、Limonene 與 Terpinolene 等化合物。

A. 伽羅木醇型精油 Original – GC



B. 100 °C, 30 min – HS-GC



C. 150 °C, 30 min – HS-GC

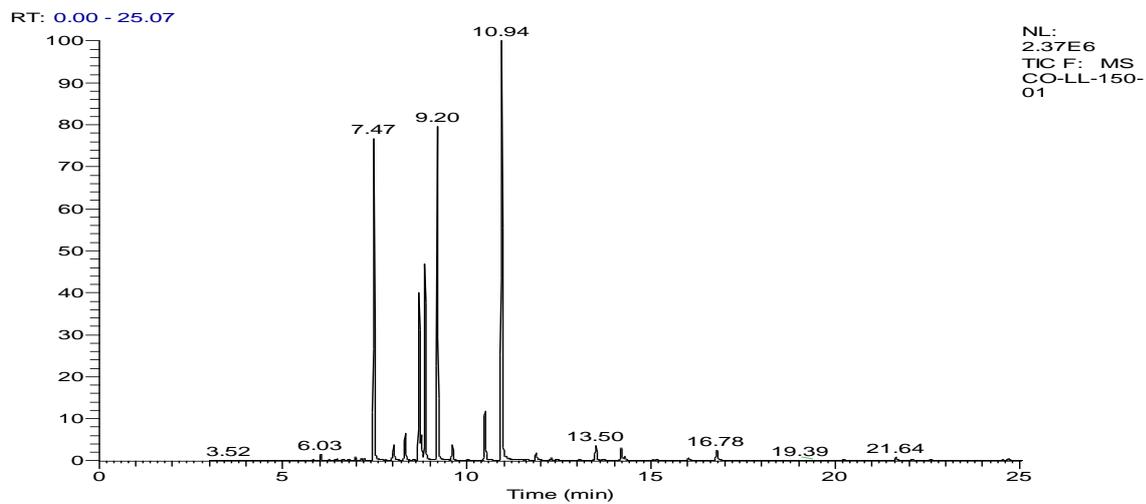


圖 1. 伽羅木醇型土肉桂葉子精油於高溫時之氣相層析圖

表 1. 桉羅木醇型土肉桂葉子精油於高溫時精油成分的變化

| Rt (min) | KI | Constituent | Content (%) | | |
|-------------|------|------------------------------|-------------|-------|-------|
| | | | Original | 100°C | 150°C |
| 6.03 | 938 | α -Pinene | 0.66 | 0.36 | 0.29 |
| 7.21 | 982 | β -Pinene | 0.28 | 0.07 | 0.06 |
| 7.47 | 991 | β -Myrcene | - | 5.56 | 17.89 |
| 8.01 | 1007 | α -Phellandrene | - | 0.91 | 0.98 |
| 8.32 | 1017 | α -Terpinene | - | 1.49 | 1.69 |
| 8.70 | 1027 | Limonene | 0.61 | 7.77 | 11.40 |
| 8.86 | 1032 | <i>cis</i> -Ocimene | - | 4.70 | 11.72 |
| 9.20 | 1049 | <i>trans</i> -Ocimene | 0.32 | 7.94 | 20.08 |
| 9.60 | 1055 | γ -Terpinene | - | 0.86 | 0.97 |
| 10.48 | 1082 | Terpinolene | - | 2.53 | 3.37 |
| 10.94 | 1100 | Linalool | 93.30 | 64.01 | 27.54 |
| 13.48 | 1049 | 2-Methylbenzofuran | 1.99 | 1.23 | 1.07 |
| 14.17 | 1196 | α -Terpineol | 0.28 | 1.50 | 1.12 |
| 14.28 | 1198 | Methyl chavicol | 0.57 | - | - |
| 16.80 | 1273 | <i>trans</i> -Cinnamaldehyde | 0.52 | 0.15 | 0.74 |
| 21.64 | 1420 | β -Caryophyllene | 0.59 | 0.22 | 0.17 |
| 22.42 | 1445 | Cinnamyl acetate | 0.63 | 0.02 | - |

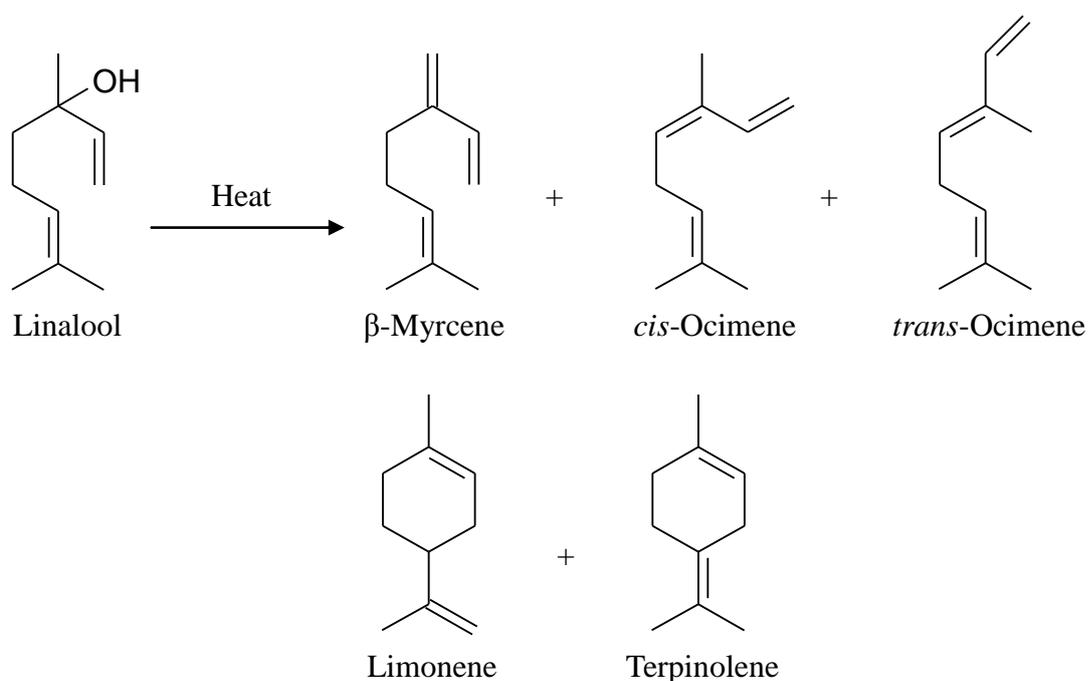


圖 2. Linalool 經熱降解後的降解物結構

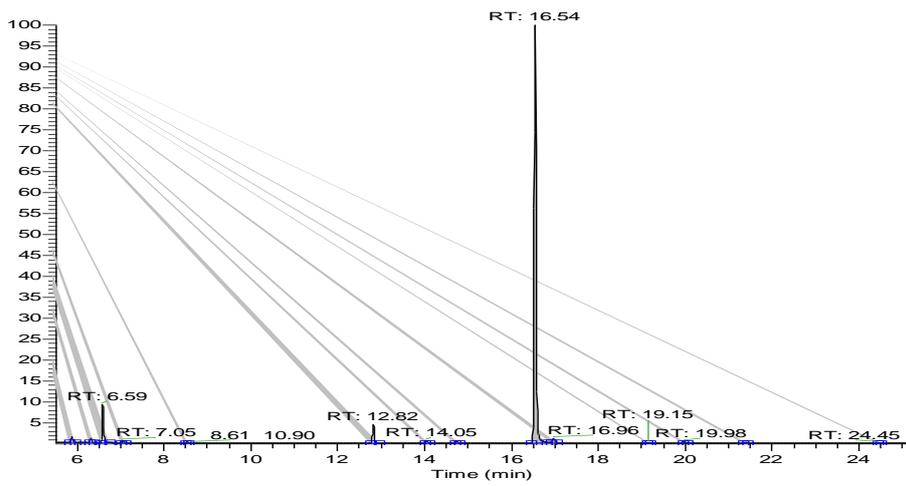
(二) 溫度對肉桂醛型土肉桂葉子精油成分的影響

由肉桂醛型土肉桂葉子精油之氣相層析分析(圖 3A)，精油成分鑑定結果如表 2 所示，主要的波峰為化合物 *trans*-Cinnamaldehyde，相對含量為 84.13%，其他次要成分為 Benzaldehyde (7.16%)、3-Phenylpropionaldehyde (3.62%)、 α -Pinene (1.09%)、L-Bornyl acetate (0.92%) 與 Camphene (0.79%)。圖 3B 與 3C 為肉桂醛型精油於 100 與 150°C 加熱 30 分鐘後的氣相層析圖，由圖中可看出 30 分鐘的高溫處理對精油的組成分並無影響，精油成分的種類與含量均與原始精油相近。後續將進一步分析長時間高溫處理對肉桂醛型精油成分的影響。

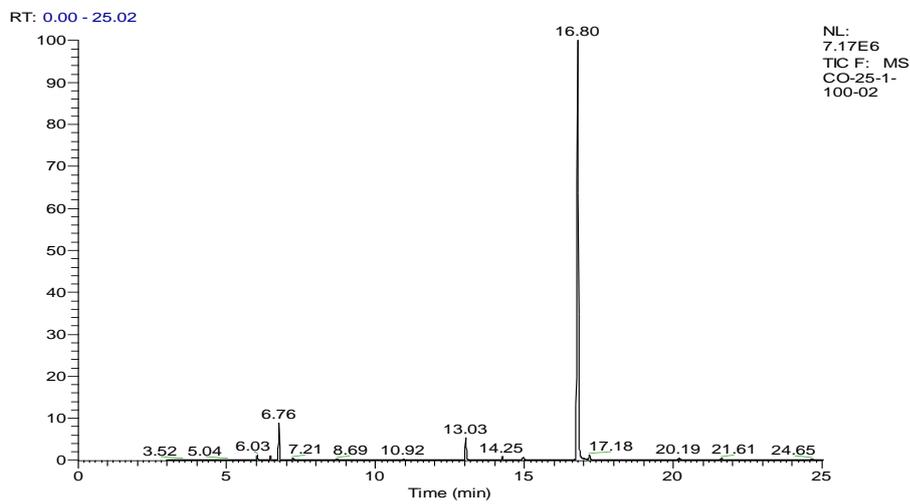
表 2. 肉桂醛型土肉桂葉子精油於高溫時之成分變化

| Rt (min) | KI | Constituent | Content (%) | | |
|-------------|------|------------------------------|-------------|-------|-------|
| | | | Original | 100°C | 150°C |
| 6.03 | 938 | α -Pinene | 1.09 | 0.75 | 0.80 |
| 6.47 | 955 | Camphene | 0.79 | 0.60 | 0.70 |
| 6.76 | 965 | Benzaldehyde | 7.16 | 5.39 | 6.06 |
| 7.21 | 982 | β -Pinene | 0.36 | 0.30 | 0.17 |
| 8.69 | 1033 | Limonene | 0.21 | 0.17 | 0.32 |
| 13.03 | 1164 | 3-Phenylpropionaldehyde | 3.62 | 3.95 | 3.73 |
| 14.28 | 1198 | Methyl chavicol | 0.55 | 0.69 | 0.66 |
| 14.95 | 1219 | <i>cis</i> -Cinnamaldehyde | 0.50 | 0.52 | 0.50 |
| 16.80 | 1273 | <i>trans</i> -Cinnamaldehyde | 84.13 | 85.11 | 84.47 |
| 17.18 | 1285 | L-Bornyl acetate | 0.92 | 0.81 | 0.79 |
| 19.36 | 1351 | Eugenol | 0.03 | 0.09 | 0.10 |
| 20.20 | 1376 | α -Copaene | 0.34 | 0.36 | 0.34 |
| 21.60 | 1420 | β -Caryophyllene | 0.29 | 0.33 | 0.15 |
| 24.64 | 1517 | δ -Cadinene | 0.02 | 0.14 | 0.18 |

A. 肉桂醛型精油 Original – GC



B. 100 °C, 30 min – HS-GC



C. 150 °C, 30 min – HS-GC

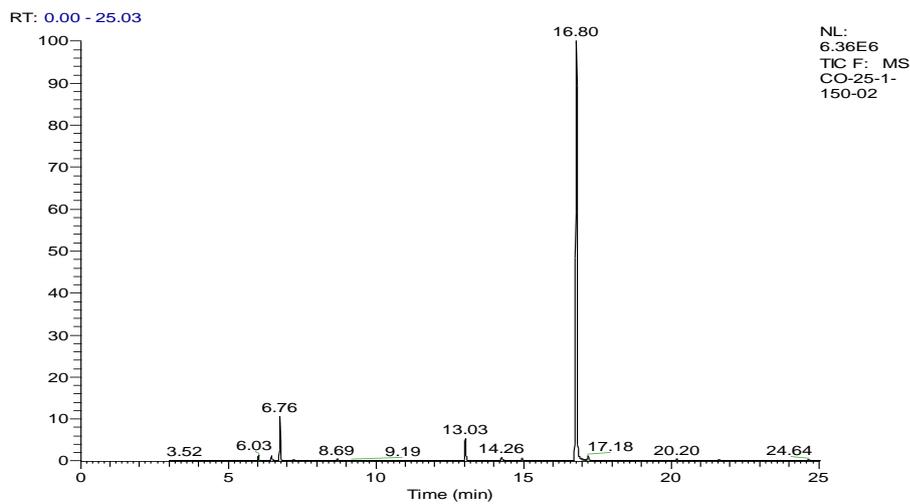


圖 3. 肉桂醛型土肉桂葉子精油於高溫時之氣相層析圖

(三) 精油微膠囊於老化試驗之耐久性評估

桉羅木醇型精油微膠囊經 105°C 乾熱老化試驗後的重量變化如圖 4 示，試驗 8 天後 β -環糊精的重量仍可維持於 100%，表示 β -環糊精在 105°C 時熱穩定良好；而桉羅木醇型精油 (LL oil) 經 105°C 乾熱老化 1 小時後，精油即完全揮發；桉羅木醇型精油微膠囊在老化試驗 1 天、2 天、4 天與 8 天後，重量留存率依續為 93.27%、90.67%、87.86% 與 86.60%，顯示精油在高溫環境下緩慢由微膠囊中釋出，相較於精油的揮發性， β -環糊精可以減緩精油於高溫下的揮發速率。

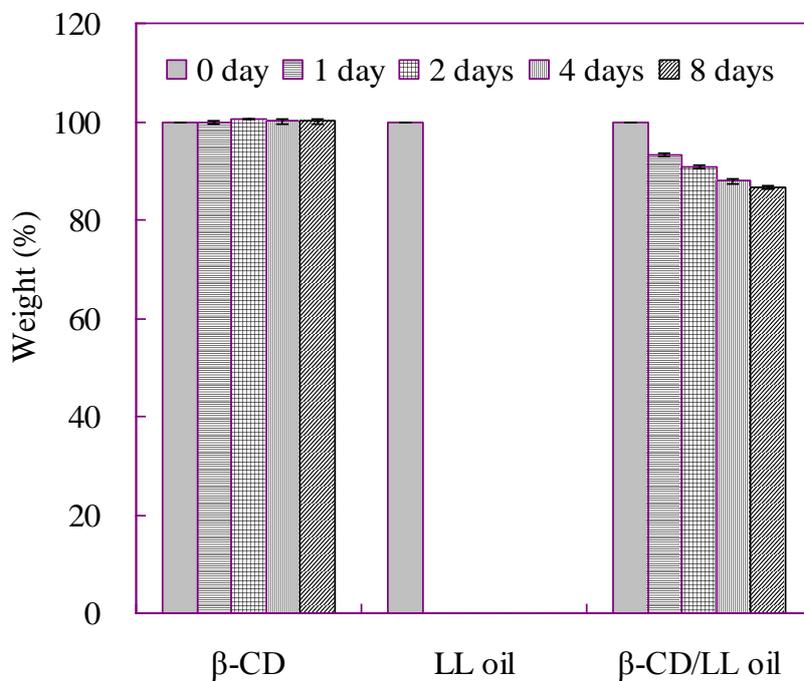


圖 4. 桉羅木醇型精油微膠囊經乾熱老化試驗後的重量變化

圖 5 為肉桂醛型精油微膠囊 (β -CD/Cin oil) 經乾熱老化試驗後的重量變化，趨勢與桉羅木醇型精油微膠囊相似，肉桂醛型精油 (Cin oil) 同樣於老化試驗 1 小時後即完全揮散(表 3)，精油微膠囊在試驗 1 天後，重量留存率為 95.08%，乾熱老化試驗 8 天後，肉桂醛型精油微膠囊重量留存率降低為 88.07%。

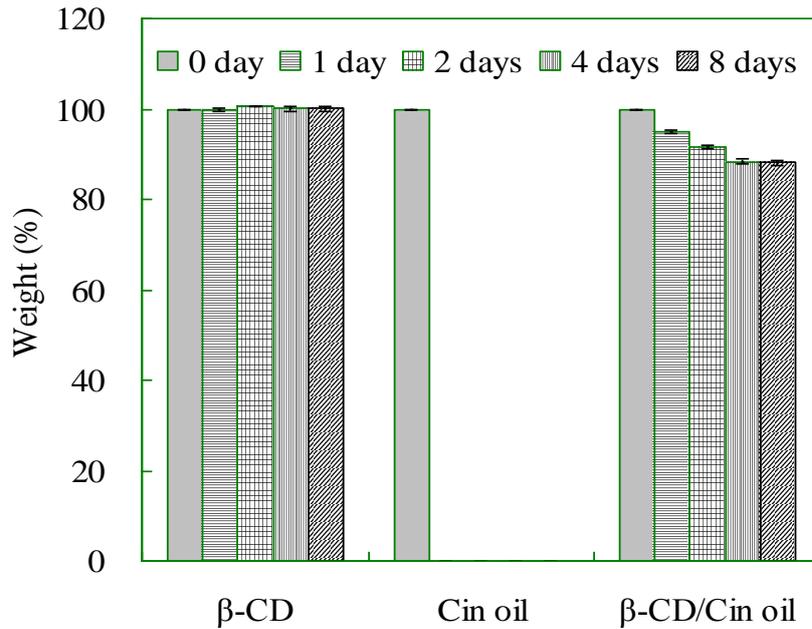


圖 5.肉桂醛型精油微膠囊經乾熱老化試驗後的重量變化

表 3. 肉桂醛型土肉桂葉子精油於高溫時之成分變化

| Time (Hr) | 105°C | | 80°C 65% RH | |
|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | LL oil | Cin oil | LL oil | Cin oil |
| 0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| 0.5 | 0.9 ± 0.2 | 11.7 ± 0.2 | 62.3 ± 4.2 | 81.9 ± 0.7 |
| 1 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 47.0 ± 3.2 | 73.9 ± 2.1 |
| 2 | - | - | 5.7 ± 0.9 | 69.9 ± 3.9 |
| 4 | - | - | 0.0 ± 0.0 | 51.1 ± 3.1 |
| 6 | - | - | - | 34.2 ± 3.7 |
| 8 | - | - | - | 14.7 ± 2.6 |
| 10 | - | - | - | 0.0 ± 0.0 |

單位: %

表 4 為土肉桂葉子精油微膠囊於溼熱老化試驗的重量變化，試驗 8 天後 β-環糊精的重量未產生明顯變化，表示 β-環糊精在 80°C 與 65% RH 的環境下亦具有良好的熱穩定性；枷羅木醇型精油與肉桂醛型精油經過 4 小時與 10 小時後（表 3），精油即完全揮散；枷羅木醇型精油微膠囊經過溼熱老化試驗 1 天與 8 天後，重量留存率分別為 94.5% 與 90.4%，相較於 105°C 乾熱老化試驗，溼熱老化試驗中微膠囊釋出精油的程度較為緩和，精油微膠囊的重量留存率較高。肉桂醛型精油微膠囊經過溼熱老化試驗 8 天後，重量留存率為 90.3%，重量變化與枷羅木醇型精油微膠囊相近。

表 4. 精油微膠囊經 80°C 與 65% RH 溼熱老化試驗後的重量留存率

| Time (Day) | β -CD | β -CD/LL oil | β -CD/Cin oil |
|------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| 0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 | 100.0 \pm 0.0 |
| 1 | 99.7 \pm 0.4 | 94.5 \pm 0.4 | 94.4 \pm 0.1 |
| 2 | 99.9 \pm 0.5 | 92.1 \pm 0.4 | 92.5 \pm 0.2 |
| 4 | 99.8 \pm 0.4 | 90.7 \pm 0.2 | 91.2 \pm 0.3 |
| 8 | 99.9 \pm 0.4 | 90.4 \pm 0.3 | 90.3 \pm 0.3 |

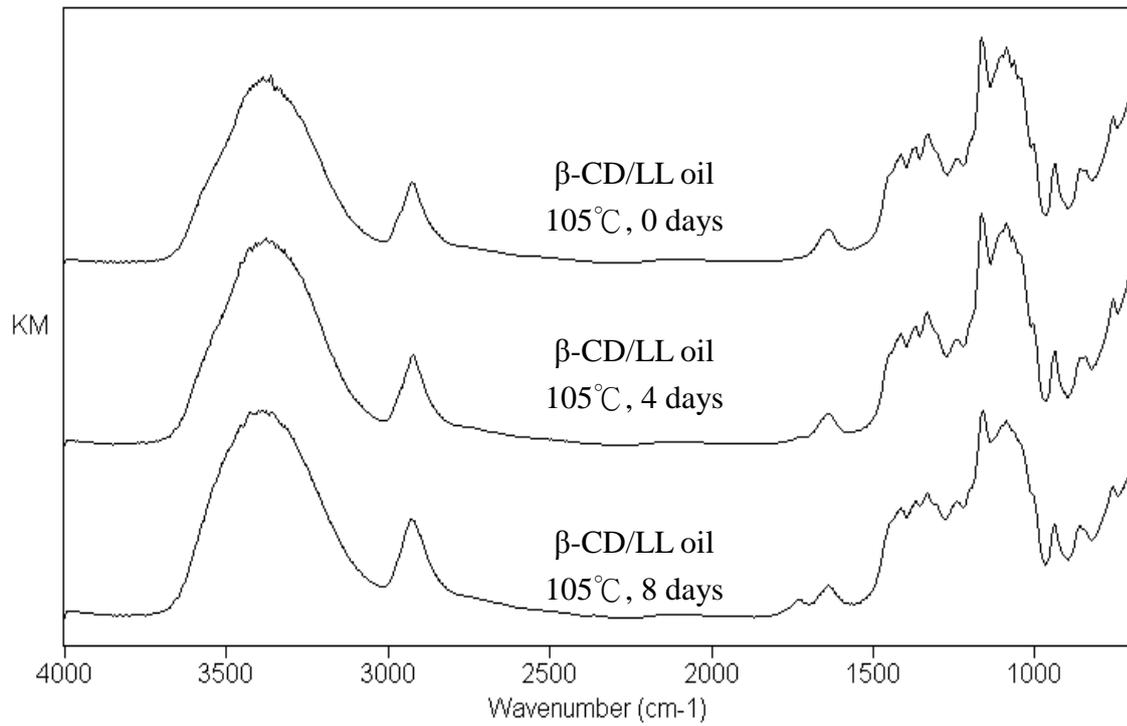
單位: %

(四) 精油微膠囊經老化試驗後之紅外線光譜變化

精油微膠囊為經 105°C 乾熱老化試驗後的傅立葉轉換紅外線光譜如圖 6 所示，枷羅木醇型精油微膠囊隨著試驗時間增加，在 1728 cm^{-1} 出現新的特性吸收(圖 6A)，屬於羰基 (C=O) 的特性吸性，顯示枷羅木醇型精油微膠囊在 105°C 的環境下產生輕微的氧化作用。105°C 老化試驗 8 天後，由於 Linalool 由微膠囊中揮散，使得 Linalool 分子中 Enol 結構的烯基 (1641 cm^{-1} , C=C) 與甲基 (1371 cm^{-1} , CH₃) 特性吸收峰的相對強度下降。圖 6B 為肉桂醛型精油微膠囊的紅外線光譜變化，在 1630 (C=C) 與 1681 (C=O) cm^{-1} 的吸收峰為肉桂醛分子中烯基與醛基在連續共軛 (Extended conjugation) 結構下的特性吸收，經過老化試驗 4 天與 8 天後，相對強度下降，同樣表示肉桂醛在 105°C 老化試驗後揮散，使得紅外線光譜產生輕微變化，其他 β -環糊精的紅外線光譜特性吸收仍與試驗前相似。

圖 7 為精油微膠囊在 80°C 與 65% RH 老化試驗後的傅立葉轉換紅外線光譜，枷羅木醇型精油微膠囊在溼熱老化試驗的變化較為緩和(圖 7A)，光譜中 Linalool 烯基的特性吸收 (1641 cm^{-1} , C=C) 輕微下降，在 1728 cm^{-1} 並未出現新的羰基特性吸收，顯示枷羅木醇型精油微膠囊在 80°C 與 65% RH 的環境下的結構變化較少。肉桂醛型精油微膠囊的紅外線光譜變化(圖 7B)與 105°C 老化試驗相似，紅外線光譜的特性吸收僅有輕微變化。

A. 伽羅木醇型精油微膠囊 (β -CD/LL oil)



B. 肉桂醛型精油微膠囊 (β -CD/Cin oil)

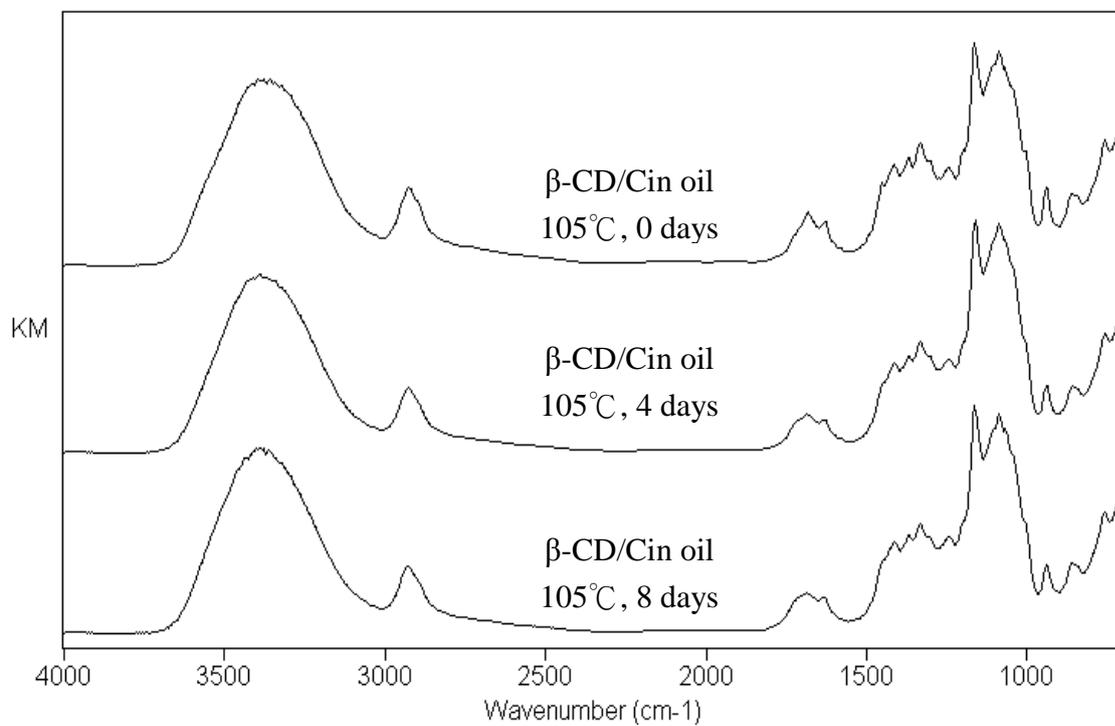
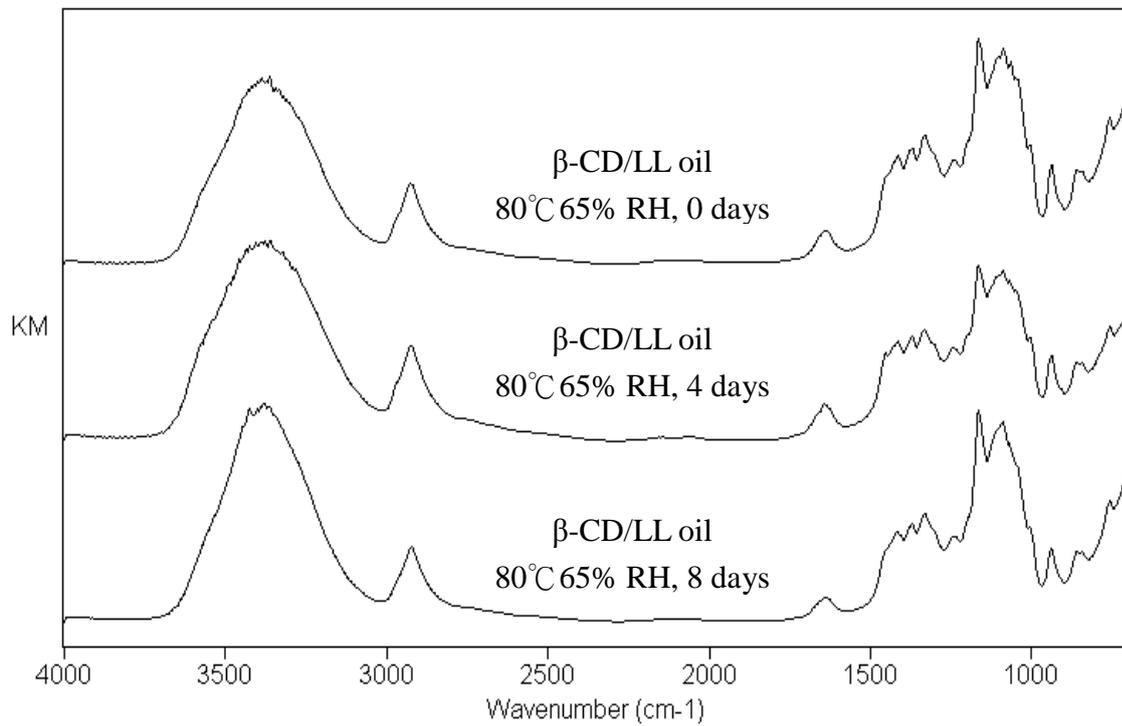


圖 6. 土肉桂葉子精油微膠囊經 105°C 老化試驗後之紅外線光譜分析

A. 伽羅木醇型精油微膠囊 (β -CD/LL oil)



B. 肉桂醛型精油微膠囊 (β -CD/Cin oil)

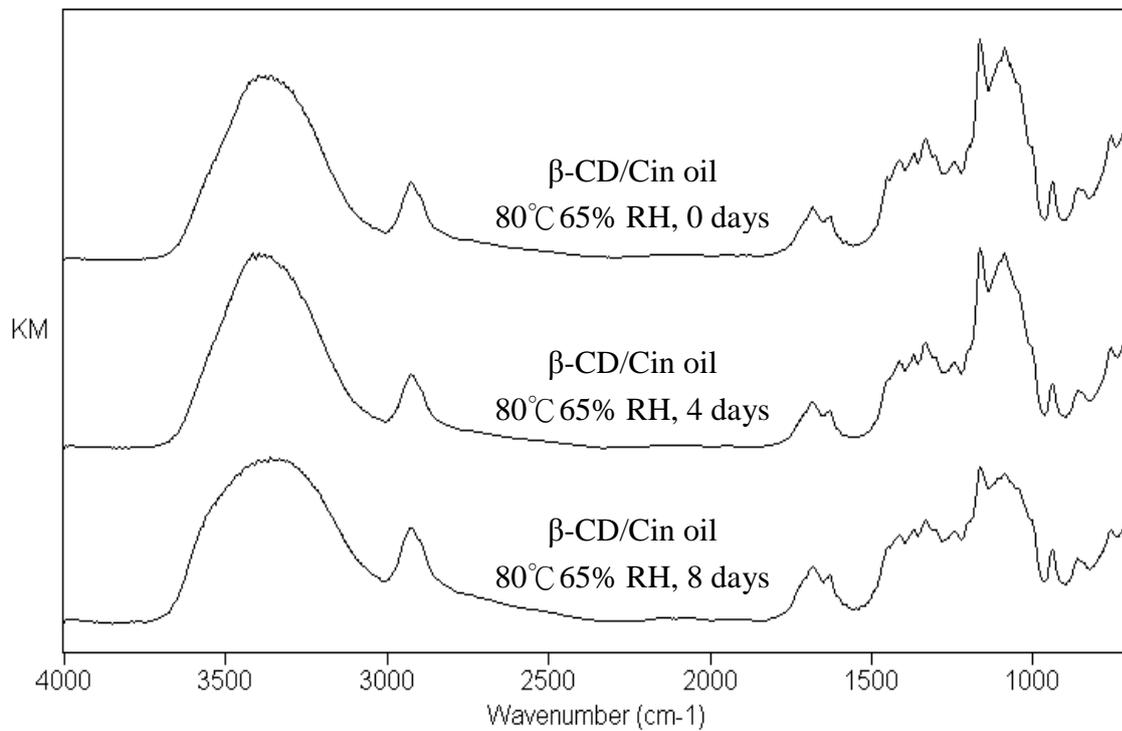


圖 7. 土肉桂葉子精油微膠囊經 80°C 與 65% RH 老化試驗後之紅外線光譜分析

(五) 肉桂醛型精油微膠囊之黃嘌呤氧化酶抑制活性

Wang 等人 (2008) 評估土肉桂葉子的乙醇抽出物、熱水抽出物和精油對黃嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase) 之抑制活性，研究結果顯示土肉桂葉子精油具有最佳之抑制黃嘌呤氧化酶活性，其半抑制濃度(IC_{50})為 $16.3 \mu\text{g/mL}$ ，葉子精油中以肉桂醛 (Cinnamaldehyde) 的含量最高 (75.05%)，屬於肉桂醛型 (Cinnamaldehyde chemotype) 的精油品系，其他精油成分包括 Benzaldehyde、Eugenol、3-Phenylpropionaldehyde、Camphene、 α -Pinene 和 β -Pinene 等成分，精油成分中又以肉桂醛表現出最佳的抑制效果， IC_{50} 值為 $8.4 \mu\text{g/mL}$ ，確定葉子精油中肉桂醛為抑制黃嘌呤氧化酶的活性化合物，使肉桂醛型精油具有降低尿酸生成的生物活性。肉桂醛精油以 β -環糊精包覆後形成精油微膠囊 (圖 8)，表 5 為肉桂醛型精油微膠囊對黃嘌呤氧化酶之抑制活性，肉桂醛型精油對黃嘌呤氧化酶的 IC_{50} 值為 $11.4 \mu\text{g/mL}$ ，肉桂醛型精油微膠囊的 IC_{50} 值為 $121.9 \mu\text{g/mL}$ ，顯示肉桂醛型精油微膠囊亦具有抑制黃嘌呤氧化酶的活性。

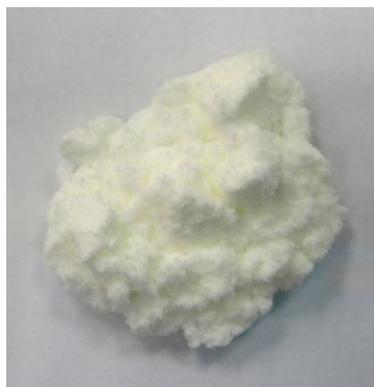


圖 8. 肉桂醛型精油微膠囊之外觀

表 5. 肉桂醛型精油微膠囊對黃嘌呤氧化酶之半數抑制濃度

| Specimen | IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------|--------------------------------|
| Cin oil | 11.4 ± 0.7 |
| β -CD/Cin oil | 121.9 ± 0.5 |
| Allopurinol | 0.5 ± 0.1 |

七、結論

分析土肉桂葉子精油的熱降解，研究結果顯示枷羅木醇型精油在高溫環境下，主成分 Linalool 受熱產生去羥基與環化反應，轉變為 *trans*-Ocimene、 β -Myrcene、Limonene、*cis*-Ocimene 與 Terpinolene，其中，又 β -Myrcene 與 *trans*-Ocimene 的增加量最多。由肉桂醛型精油在高溫下的成分分析，得知 *trans*-Cinnamaldehyde 在短時間內無明顯的結構轉變，頂空採樣分析的成分種類與含量均與原始精油相近。由老化試驗的結果得知， β -環糊精在乾熱與溼熱環境下的熱穩定良好，而二種土肉桂葉子精油經老化 1 天後，精油即完全揮發；精油微膠囊在老化試驗中，重量留存率緩慢下降，顯示 β -環糊精可以減緩精油於高溫下的揮發，精油成分的揮散在溼熱環境下較高溫乾熱為緩和。老化試驗後精油微膠囊的紅外線光譜變化，以 105°C 的乾熱老化試驗較為明顯。肉桂醛型精油經 β -環糊精包覆形成微膠囊後，亦具有抑制黃嘌呤氧化酶的活性。

八、參考文獻

- 鄭森松、林群雅、王亞男、許原瑞、張上鎮 (2008) 臺灣土肉桂種源庫之設置-葉子精油成分與化學多態性分析。臺大實驗林研究報告。22(1): 21-34.
- 許立昇、古惠菁、張惠婷、張上鎮 (2009) 臺灣杉心材與土肉桂葉子應用於植物病原真菌防治之評估。中華林學季刊。42(3): 411-420.
- 林群雅、陳品昇、許原瑞、張上鎮 (2010) 頂空氣相層析質譜法鑑別肉桂節植物。中華林學季刊。43(1): 157-169.
- Adams, R.P. (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation. Illinois. 804pp.
- Ahmad, N.S., M. Farman, M.H. Najmi, K.B. Mian, and A. Hasan (2008) Pharmacological basis for use of *Pistacia integerrima* leaves in hyperuricemia and gout. Journal of Ethnopharmacology 117:478-482.
- Chao, K.-P., K.-F. Hua, H.-Y. Hsu, S.-S. Cheng, J.-Y. Liu, and S.-T. Chang (2005) Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(18): 7274-7278.

- Chao, L. K.P., H.-Y. Hsu, K.-F. Hua, S.-S. Cheng, I.-F. Lin, and S.-T. Chang (2008) Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 220-231.
- Cheng, S.-S., J.-Y. Liu, Y.-R. Hsui, and S.-T. Chang (2006) Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology*. 97(2): 306-312.
- Cheng, S.-S., J.-Y. Liu, E.-H. Chang, and S.-T. Chang (2008a) Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*. 99(11): 5145-5149.
- Cheng, S.-S., J.-Y. Liu, C.-Y. Lin, Y.-R. Hsui, M.-C. Lu, W.-J. Wu, and S.-T. Chang (2008b) Terminating red imported fire ants using *Cinnamomum osmophloeum* leaf essential oil. *Bioresource Technology*. 99: 889-893.
- Cheng, S.-S., J.-Y. Liu, C.-G. Huang, Y.-R. Hsui, W.-J. Chen, and S.-T. Chang (2009) Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. *Bioresource Technol.* 100: 457-464.
- Chua, M.-T., Y.-T. Tung, and S.-T. Chang (2008) Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresource Technology*. 99(6): 1918-1925.
- Hsu, F.-L., H.-T. Chang, and S.-T. Chang (2007) Evaluation of antifungal properties of octyl gallate and its synergy with cinnamaldehyde. *Bioresource Technology*. 98(4): 734-738.
- Jyothi, N.V.N., P.M. Prasanna¹, S.N. Sakarkar, K.S. Prabha¹, P.S. Ramaiah, and G.Y. Srawan¹ (2010) Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*. 27: 187-197.
- Kaiser, C.S., H. Rompp, and P.C. Schmidt (2004) Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Chamomile Flowers: Extraction Efficiency, Stability, and In-line Inclusion of Chamomile–Carbon Dioxide Extract in β -cyclodextrin. *Phytochemical Analysis*. 15: 249-256.
- Kalogeropoulos, N., S. Konteles, I. Mourtzinos, E. Troullidou, A. Chiou, and V.T.

- Karathanos (2009) Encapsulation of complex extracts in β -cyclodextrin: An application to propolis ethanolic extract. *Journal of Microencapsulation*. 26: 603-613.
- Lee, H.-C., S.-S. Cheng, and S.-T. Chang (2005) Antifungal property of the essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum* leaf against tree pathogenic fungi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(12): 2047-2053.
- Szejtli, J. (1998) Introduction and General overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*. 98: 1743-1753.
- Tozzi, R., N. Mulinacci, K. Storlikken, I. Pasquali, F.F. Vincieri, and R. Bettini (2008) Supercritical extraction of carotenoids from *Rosa canina* L. Hips and their formulation with β -cyclodextrin. *AAPS PharmSciTech*. 9: 693-700.
- Tung, Y.-T., M.-T. Chua, S.-Y. Wang, and S.-T. Chang (2008) Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource Technology*. 99: 3908-3913.
- Waleczek, K.J., H.M.C. Marques, B. Hempel, and P.C. Schmidt (2003) Phase solubility studies of pure (2)- α -bisabolol and camomile essential oil with β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 55: 247-251.
- Wang, S.-Y., P.-F. Chen, and S.-T. Chang (2005) Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*. 96(7): 813-818.
- Wang, S.-Y., C.-W. Yang, J.-W. Liao, W.-W. Zhen, F.-H. Chu, and S.-T. Chang (2008) Essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum* acts as a xanthine oxidase inhibitor and reduces the serum uric acid levels in oxonate-induced mice. *Phytomedicine*. 15(11): 940-945.
- Yen, T.-B. and S.-T. Chang (2008) Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology*. 99: 232-236.

一、期中報告審查意見回覆表

| 審查意見 | 意見回覆 |
|---|--|
| 製備精油微膠囊所用乙醇與水的混合溶液，其混合比例為何?又土肉桂葉子精油預溶於乙醇 (10 mL)，其濃度為多少? 請一併說明。 | 桉羅木醇型精油微膠囊所用乙醇與水的混合比例為 1:5，肉桂醛型精油微膠囊所用乙醇與水的混合比例則為 1:3。土肉桂葉子精油預溶於乙醇的濃度為 8.8% (w/v)。 |
| 精油微膠囊有乾燥方式為 50°C 烘箱乾燥 24 hr 或以冷凍乾燥機乾燥 24 hr，本試驗使用何種方法? 及兩種方法之效果有無差別?請一併說明。 | 本試驗使用的乾燥方式為 50°C 烘箱乾燥 24 hr，兩種方法之效果並無差別，後續乾燥皆以 50°C 烘箱乾燥。 |
| 第 6 頁，第八行 (圖 2A) 應為 (圖 3A)，之筆誤，請查明修正。 | 已修正圖 2A 為圖 3A。 |
| 在 105°C 老化試驗 1 天後，兩種土肉桂葉子精油已完全揮發，為瞭解兩種精油揮發之速率，建議可在天以內幾個適當之較短時間點，測定其重量留存率。 | 已於成果報告加入兩種精油在老化試驗中短時間的重量留存率變化。 |
| 第 8 頁，兩種葉子精油微膠囊在 105°C 老化試驗後之重量留存率各為 87.86% 與 88.40%，其值應屬大致相近，不宜以同樣為 88.40% 敘述，請查明修正。 | 已於成果報告修正。 |
| β -環糊精之基本性質，及其製備精油微膠囊之形狀、尺寸大小、質量等，請加以說明。另土肉桂葉子精油屬於 Linalool 者易熱降解成許多具有芬多精性質之萜類，是否需要使用 β -環糊精包覆加予保存?請加以說明。 | β -環糊精與精油微膠囊之性質已補述於成果報告，土肉桂葉子精油屬於 Linalool 者易熱降解成許多具有芬多精性質之萜類，降解物雖然是芬多精性質之萜類，但考量精油的保存性與成分標示，使用 β -環糊精包覆可使精油的組成分較為穩定。 |
| β -環糊精應用時，包覆物的形成會受到反應時間、反應溫度、反應濃度、攪拌或超音波震盪時間因子影響，本研究是否有考慮以上參數?請加以說明。 | 精油微膠囊的反應條件已於第一年度計畫中測試，本年度計畫的重點為精油微膠囊的保存性。 |
| 本計畫為 2 年期第 2 年計畫，請於期末報告增列第 1 年成果摘要及後續運用情形。 | 第 1 年成果摘要已增列於成果報告。 |

二、期末報告書面審查意見回覆表

| 審查意見 | 意見回覆 |
|--|---|
| 包含英文題目在內，建議是否於 leaf oil 中加上 Essential ? | 已於英文題目 leaf oil 中加上 Essential。 |
| 中英文摘要漏列關鍵詞與 Keywords。 | 關鍵詞與 Keywords 已增列於成果報告。 |
| 文章中均可見使用 Microencapsule 與 Microcapsule，請問兩者差異為何? | 已於成果報告修正為 Microcapsule。 |
| 第 4 頁，建議列出 β -環糊精的收率計算公式。 | β -環糊精的收率計算公式已增列於材料與方法。 |
| 建議文章中所列公式加註序號。並於文章中加註依公式(1)所示計算.....。餘類推。 | 已加註公式序號於成果報告。 |
| 第 6 頁，抑制率公式應修改為吸光值。 | 已於成果報告修正抑制率公式。 |
| 數字與單位間應空一格。 | 已於成果報告修正。 |
| 表 1, 2 試驗值重複數為何? 如重複 2 次以上建請加上 SD 值。 | 試驗值重複數為 2，因表格數據過多，不適宜增列 SD 值。 |
| 第 11 頁，請問重量留存率如何計算? 建議加註公式。 | 重量留存率的公式已加註於材料與方法。 |
| 請問製得之精油微膠囊的直徑約? μm ；未來有無製造較大尺寸的可能性? 又微膠囊內存留的精油量為何? 可否定量? | β -環糊精的內外徑分別為 0.06 與 0.15 micrometer。製造較大尺寸的精油微膠囊可採用其他植物膠或高分子樹脂。微膠囊內存留的精油量可定量，已增列於成果報告。 |
| 表 1 及 2 顯示，葉子精油以 100°C 及 150°C 加熱處理，請問是隔水加熱或直接加熱? | 葉子精油為直接加熱。 |
| 第 9 頁，表 2 肉桂醛型土肉桂葉子精油之 <i>trans</i> -Cinnamaldehyde 相對含量為 84.13%，但於 100°C、150°C 加熱 30 分鐘，精油含量分別為 85.11 及 84.47%，建請說明為何高溫後肉桂醛含量會增加? | 肉桂醛型土肉桂葉子精油之 <i>trans</i> -Cinnamaldehyde 相對含量在高溫後輕微上升，主要為氣相層析質譜分析的實驗誤差。 |
| 土肉桂葉子精油微膠囊的外觀照片，建請報告書中能夠顯示。 | 土肉桂葉子精油微膠囊的外觀照片已增列於成果報告。 |

| | |
|---|--|
| 土肉桂葉子精油微膠囊從紅外線光譜分析具有親水性的羥基，未來貯存及應用期間是否吸濕結塊，間接影響精油的釋出？ | 土肉桂葉子精油微膠囊雖然具有親水性的羥基，貯存在不會接觸到水的環境下，應不會產生吸濕結塊或使精油釋出的情形。 |
| 第 17 頁，參考文獻第 3 篇”43:157-169”，應為”43(1):157-169”之筆誤，建請查明修正。 | 已於參考文獻修正。 |
| 第 6 頁，抑制率公式中之實驗組吸收值應為實驗組吸光值。 | 已於成果報告修正抑制率公式。 |
| 第 12 頁，第三行，枷羅木醇型精油與肉桂醛型精油經過 4 小時與 10 小時後，精油即完全揮散，表 3 中並無此項資料。而乾熱老化試驗者，兩種精油均 1 小時後即完全揮發，兩種不同老化試驗，精油完全揮發所需時間相差甚大，是否因溫度之關係，或有其他原因。 | 已於成果報告加入兩種精油在老化試驗中短時間的重量留存率變化。兩種不同老化試驗，精油完全揮發所需時間相差甚大，確實是因為試驗溫度之關係，高溫時兩種精油的揮發較為相近。 |
| 依表 4，肉桂醛型精油微膠囊的半抑制濃度 IC50 值為 121.9mg/mL，是否就剛製備好，即放置時間 0 者所試驗者，因依圖 4 及圖 5，隨時間之經過其留存率會逐漸降低，勢必影響 IC50 值，且未來商品化時，是否也將對商品的有效期間產生影響。 | 如果精油留存率降低會影響肉桂醛型精油微膠囊的生物活性，對於未來商品化的有效期間可能會產生影響，後續將進行相關的分析與評估。 |

三、期末報告簡報審查意見回覆表

| 審查意見 | 意見回覆 |
|------------------------------|-----------------------------|
| 有關土肉桂葉子精油微膠囊的外觀照片，仍請補充於成果報告。 | 土肉桂葉子精油微膠囊的外觀照片已補充於成果報告。 |
| 有關本計畫試驗之化學材料，請補充於試驗材料項下。 | 本計畫試驗之相關化學材料已補充於成果報告的試驗材料中。 |