

行政院農業發展委員會專題研究計畫
期末成果報告

【園產品分離純化生物醫學材料】

計畫編號：92 農科-1.1.2 -糧-Z(4)2.

執行期限：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

計畫主持人：蘇慶華

計畫參與人員：蘇慶華

執行機構及單位名稱：臺北醫學大學生物醫學材料所

中文摘要

年生的蔓性植物。果實呈圓筒。喜高溫和日照充分的氣候是夏季重要的蔬菜。絲瓜果實未熟時很柔軟可供蔬菜食用，老熟後纖維發達不能食用，但纖維可供洗浴的材料，而絲瓜水亦有養顏美容的效果。本實驗之目的是粹取絲瓜溶液做為生醫材料之傷口敷料(wound dressing)。將購自傳統市場之絲瓜，加上同體積的水混合以果汁機打碎，加入5%醋酸以水浴鍋加熱2 個小時80 °C，3600rpm 離心並收集上清液，以1N 的氫氧化鈉(NaOH)將上清液ph 值調至7.0 左右。再以超微過濾(UF)將低分子粗分離。最後經冷凍乾燥後呈現深綠色粉末。取粉末5 mg 分別加入2 M 鹽酸(HCl)或三氟醋酸(trifluoroacetic)置入安培瓶 (ampule)並熔封，於100 °C下作用5、10、15 小時進行醣類水解，再將水解之產物以薄層液相色層分析法(TLC)。利用Elson-Morgenreagent 呈色後，結果顯示絲萃取物含有幾丁聚醣之單醣：glucosamine 及N-acetyl-D-glucosamine。以高效能液相色層分析儀(HPLC)分析絲瓜萃取物的分子量。傅氏紅外光譜(MICRO FT-IR)分析之絲瓜醋酸萃取物，顯示與幾丁聚糖有相同的官能基。利用直徑70 厘米0.5 公克的濾紙混合5 公克的絲瓜萃取物及1 公升的水，以果汁機均勻混合，使用布氏漏斗及抽氣瓶以抽氣法將產物瀝乾，經冷凍乾燥製膜。然後以8 週齡、體重至少300g 之大白鼠 (Wistar rats)做動物實驗，觀察促進傷口癒合之效果。先用麻醉劑將動物麻醉，再分別於脊髓兩側以施以全皮膚切除(full thickness wound)切兩個2 cm x 2 cm 鏡相之傷口，再將絲瓜萃取物薄膜與SACCHACHITIN 或紗布比較分別貼覆於傷口上，並於切除後第7、14、18、21、25 天觀察癒合情形及傷口大小。結果顯示菜瓜萃取物薄膜與靈芝薄膜能促進傷口癒合(約25 天癒合完全)，較紗布(大於25 天)快速。在組織切片上也可明顯看出絲瓜萃取物薄膜與靈芝薄膜比紗布更能幫助組織的復原。經過對20種以上之園藝作物篩選之結果，顯示N-Glucosamine含量在20%以上之材料有除*Luffa aegyptiaca* 絲瓜及絲瓜布外；尚有靈芝(*Ganoderma species*) 根黴(*Rhizopus stolonifer*)，雙結棍蟲草或植生蟲草(*Cordyceps biifusispora* or *Phytocordyceps ninchukispora*) 水苔(*Sphagnum moss*) 山粉圓或山香(*Hyptis suaveolens* (L.) Poir)均可做為生物醫學材料之開發。

Abstract

Chitosan, a mucopolysaccharide having structural characteristics similar to glycosamines, is the alkaline deacetylated product of chitin, derived from the exoskeleton of crustaceans. It seems to be a biopolymer with a wide variety of biomedical and industrial applications. The purpose of this study is trying to find a new source of chitosan as biomaterial for wound healing. *Luffa aegyptiaca* is a common vegetable in Taiwan. We use fresh fruit as *L. aegyptiaca* as a material to investigate the potential of the vegetable as a wound dressing. *L. aegyptiaca* was been smashed, extracted, filtered, and lyophilized to make as a dressing. The dressing was hydrolyzed by 2M HCl or trifluoroacetic acid at 100°C for 5 hr. and then was analyzed by thin layer chromatography (TLC) as well as high performance liquid chromatography (HPLC). Infrared spectrometry (FT-IR) of the membrane showed signal of amine group that characterized the structure of chitosan. The results indicated that *L. aegyptiaca* membrane contained glucosamine, the monomer of chitosan, visualized by Elson-Morgen reagent. HPLC show the molecular weight was about 1.2kDa. Finally, animal tests were carried out the ability of wound healing enhanced by the novel material. SACCHACHITIN was employed as positive control and the negative control is using cotton gauze. The wound size and the healing progression were observed. In our results, *L. aegyptiaca* dressing showed significant difference in the enhancement healing when compared to cotton gauze. In histological observations, we could see that *L. aegyptiaca* dressing was better than cotton gauze in tissue healing. Based on the results, the *L. aegyptiaca* dressing could be an effective material for the wound dressing. Other than the material from *Luffa*, similar investigations had also launched to select high N-Glucosamine content (over 20%) in horticultural crops. Among them *Ganoderma* species, *Rhizopus stolonifer*, *Cordyceps biifusispora* or *Phytocordyceps ninchukispora*, *Sphagnum* moss *Hyptis suaveolens* (L.) Poir were screened for further study.

一 計劃簡介

本實驗室以開發新的生物醫學材料來源為主要發展目標。早先，一般靈芝在粹取出多醣類後多會將剩餘的部分廢棄，靈芝廢渣在經由磨碎、軟化、漂白、鹼處理、冷凍乾燥後，再利用布式漏斗來製膜，經由動物實驗證實也可當作人工敷料來運用。本實驗室以靈芝作為幾丁質來源自1991年開始，並經過多次實驗證實靈芝之幾丁質有相當良好之生物活性，特別是促進傷口癒合方面，因此將此來源之幾丁質命名為SACCACHITIN，不但不會引起患者免疫性的問題，靈芝薄膜的生物分解性，在傷口癒合後會自動脫落，不會與癒合的皮膚組織沾黏在一起，是一種相當不錯的傷口癒合材料。此外若以12N的氫氧化鈉鹼處理SACCACHITIN，來達到去乙酰化的目的，所得到之物質稱之為SACCACHITOSAN。在2002年，本實驗室又以菜瓜布為另一材料來源，進行分析及研究。絲瓜為葫蘆科絲瓜屬一年生蔓草本植物，老熟瓜體纖維稱做「菜瓜布」，原產印度，唐朝時傳入我國清末引入台灣種植。別稱菜瓜、布瓜、蠻瓜、天絲瓜、水瓜天羅、天絡、先人拐。學名*Luffa aegyptiaca* Mill。英文名Vegetable Sponge。夏季5~9月盛產，冬季量較少。絲瓜喜高溫短日性，20~30°C發育良好，擇土壤肥厚，富腐植質多施堆肥，保水與排水良好的土壤，pH5.8~6.8為宜。絲瓜的營養成分主要有水分94.3%、熱量8%、蛋白質0.7%、脂質0.2%、醣類1.2%、纖維2.8%、灰質0.3%、鈣31%、磷14%、鐵0.8%、菸鹼酸0.2，此外還有維生素A、B1、B2、C等。絲瓜藤之汁液，俗稱「菜瓜露」，具有清涼解渴，去火、毒的功效。沿土地50公分主莖處切斷，莖口放入玻璃瓶內，天亮時就會滴滿平液汁，加一倍冷開水喝，有解毒消暑，治青春痘之功效。臺語稱絲瓜絡為「菜瓜布」，即纖維變粗、剝去外皮、倒出比西瓜子略大的眾多成熟黑種子後的老瓜殘骸。這些廚房好幫手通常都是菜瓜盛產後的副產品，因一整夏吃不完，於是任其自然老化，直隨一年生老株同枯於冬季。採收時，蔓藤仍緊緊拉住原瓜，瓜形沒變，咖啡色外皮卻常已殘破易碎，瓜肉不存，僅剩縱橫交錯、牢牢密織的纖維化菜瓜布。絲瓜乾瓜體纖維與靈芝之物理性質相似，久煮不爛且十分堅韌，類似幾丁質，本實驗室於2002年證實確實含有幾丁質，並命名為Luffachitin。絲瓜乾纖維經處理後製成膜，進行動物實驗，結果顯示確實有幫助傷口癒合的能力，也可當生物材料的來源之一。幾丁聚醣(CHITOSAN)是甲殼類動物、昆蟲和其他無脊椎動物外殼中的甲殼質(CHITIN)， β -(1-4)聚-2-乙醯胺基-D-3葡萄糖經脫乙酰化制得。它的化學名稱為聚葡萄糖胺。幾丁聚醣(CHITOSAN)存在於低等植物菌類、藻類的細胞，甲殼動物蝦、蟹、昆蟲的外殼，高等植物的細胞壁中，佔生物種類的80%，分布很廣。自然界中，甲殼質(CHITIN)是地球上第二大類有機資源，是人類取用不竭的巨大再生資源寶庫。其量不低於豐富的纖維素，是除纖維素以外的又一大類重要的多醣。自然界中的甲殼質(CHITIN)是不溶性高分子物質，人體不能直接吸收利用，眾多的甲殼質(CHITIN)開發產品，由於不能解決

水溶性問題，達不到理想的保健效果。水溶性問題，是幾丁聚醣(CHITOSAN)產品的關鍵所在。其脫乙酰度的大小，決定了產品的療效。其應用範圍相當廣泛，因為它具有相當良好之生物活性，因此常被利用於生物醫學之應用，特別是作為人工皮膚。人工皮膚的發展不但可應用在燒燙傷方面，對糖尿病患者或是傷口久久不能癒合都有不錯的效果，可用來保護傷口及吸收多餘的滲出液，並且保護傷口再次受到機械性或是物理性的傷害。此外，在新鮮絲瓜在經烹飪後呈黏稠狀，此性質與幾丁聚醣溶液相似。於是假設，在新鮮瓜體中可能含有幾丁聚醣，在老化後幾丁聚醣開始乙酰化，出現幾丁質的成分，最後再與纖維素形成菜瓜布。

研究目的

此研究之目的為尋找一新的幾丁聚醣來源及生物醫學材料之應用，利用絲瓜瓜體萃取物，分析其成分是否含有幾丁聚醣，再製成薄膜進行動物實驗，探討其是否可做為促進傷口癒合之敷料。

研究動機

自1823年Odier在昆蟲外骨骼部分發現一種物質不溶於水，將其命名為幾丁質(Chitin)。在自然界中幾丁質含量僅次於纖維素，主要存在於甲殼類、節肢動物的外骨骼之中(Knorr, 1984)，以及真菌類的細胞壁，如：*Mucorrouxii* (Shyu et al., 2001)、*Ganoderma tsugae* (Su et al., 1999)，亦存在極少數高等植物之中，是自然界相當豐富的資源。1859年Rouget發現幾丁質經由氫氧化鉀溶液熱處理後，可將幾丁質轉變成可溶於有機酸的物質。1894年Hoppe-Seyler將此種可溶於有機酸的物質命名為幾丁聚醣(Chitosan)(李, 1998)。二、幾丁聚醣之結構由於一般溶劑不易溶解幾丁質，在應用上有很大的限制，但將部份或全部的乙酰氨基轉變成胺基，經過去乙酰化(deacetylation)的幾丁質，提高其溶解性及加工性；經去乙酰化的幾丁質稱為幾丁聚醣(chitosan, poly[β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose])。幾丁聚醣的胺基在酸性溶液下會帶正電，因此醋酸、乳酸、甲酸等有機酸及鹽酸、磷酸等無機酸可將幾丁聚醣溶解，但中性或鹼性溶劑無法將幾丁聚醣溶解(Knorr, 1984)。由於幾丁質及幾丁聚醣在去乙酰化程度上的差異，無明顯的劃分，Muzzarelli及Rocchetti在1985年提出，總氮含量佔聚合物重量百分之七以上為幾丁聚醣，以去乙酰化程度超過60%而溶於微酸性溶劑者為幾丁聚醣(Aiba, 1992)。

I. 幾丁質與幾丁聚醣的生合成

真菌細胞壁均含有一定量之幾丁質與幾丁聚醣，因此真菌具有合成幾丁質與幾丁聚醣的能力。幾丁質是由N-acetyl glucosamine單體經由幾丁質合成酵素(chitin synthetase)作用，使N-acetyl glucosamine連結起來而形成幾丁質(Bartnicki-Garcia, 1988)。幾丁聚醣的合成須有幾丁質去乙酰化酵素(chitin deacetylase)的作用，

但幾丁質去乙酰醯酶只對剛形成幾丁質鏈有作用，一旦形成結晶化構造，則醯酶便無法穿透結晶區作用進行去乙酰基，因此幾丁聚醣的生合成必須幾丁質合成醯酶及幾丁質去乙酰醯酶一起作用(Bartnicki-Garcia, 1988； Arcidiacono, 1989； Davis, 1984)。幾丁質合成醯酶可被 N-acetyl glucosamine 活化，但亦可被polyoxin D 和nikkomycin Z 等物質抑制(Bartnicki-Garcia, 1988； Davis, 1984； Gooday, 1989)。

II. 幾丁質與幾丁聚醣的生理活性

幾丁質與一般的多醣類相同，在生物的消化系統中，需要被降解成單體 (N-acetyl-glucosamine)，而降解幾丁質的幾丁質水解醯酶(chitinolytic enzyme)多來自動物本身、腸內細菌或所攝食的食物中。當動物攝取幾丁質時，胃酸 (pH 2.2-3.5) 及胃蛋白的作用，將大部份的幾丁質的乙酰基水解，生成幾丁聚醣，幾丁聚醣會因胃酸的酸性作用而被溶解 (Muzzarelli, 1996)。

III. 幾丁聚醣的應用

(1) 細胞生理方面

研究中指出，幾丁聚醣可以刺激白血球釋出細胞激素 (cytokine) (Otterlei et al., 2000)、活化多形性白血球(PMN, polymorphonuclear leukocytes) (Ueno et al, 8 2001)刺激巨噬細胞活化(Kosaka et al., 1996)、影響巨噬細胞分泌生長因子和細胞間質的生成 (Ueno et al., 2001)、亦可幫助止血、凝集血球(Rao et al.; 1997)、刺激纖維母細胞的增生及移動(Chunag, 1999)此外，幾丁質也能抑制腫瘤細胞生成的效果。去乙酰化30 % 及70 % 之幾丁聚醣，以靜脈注射及腹腔注射方式注射小白鼠，發現可活化小白鼠體內巨噬細胞，抑制Meth-A腫瘤細胞 (Nishimura, 1987)。

(2) 臨床應用

幾丁質及其衍生物，因其具有生物相容性、生物降解性及生物吸收性，普遍被應用於生物材料上，諸如，外科材料、硬骨修復組織物 (Muzzarelli et al., 1994)，藥物遞送載體(Zhao et al., 2002)，金屬離子的吸收(Wan, 2002)以幾丁聚醣所製成的薄膜覆蓋物，敷於傷口上，可以加速傷口癒合速度，此薄膜稱傷口敷料或人工皮膚 (Hiroshi, 1999； Nurdan, 2000)。本實驗室利用真菌中的松杉靈芝 (Ganoderma tsugae) 之廢渣作為幾丁質的來源，並命名為SACCHACHITIN (Su, 1997； Su, 1999)，也發現到與日本所開發的BESCHITIN具有相同的癒合效果，顯示真菌來源的幾丁質也可達到相同的目的。

IV. 幾丁聚醣的抑菌作用

幾丁質與幾丁聚醣皆具有抗真菌的效果，但幾丁聚醣較幾丁質更能抑制真菌的生長 (Allan, 1979； Leuba, 1986)。幾丁聚醣的抑制真菌的機制目前可歸納四點：
(a) 幾丁聚醣在酸性的條件下會質子化而形成具正電荷-NH₃⁺的官能基，此官

能基因會干擾真菌細胞表面，增加細胞的通透性，造成蛋白質外漏。

- (b) 幾丁聚醣片段，尤其是7個或更多的單體所組成的寡醣，在進入菌體後，阻止RNA的生合成及降低細胞活性 (Leuba, 1986; Hadwiger, 1986)。Leuba及Stossel (Leuba, 1986)指出幾丁聚醣干擾植物病原真菌Phythium paroecandrum的細胞膜功能，造成菌體內物質洩漏，幾丁聚醣的這種生物活性似乎可歸因於其多陽離子的特性，干擾位在細胞表面上巨大分子的陰電性官能基。
- (c) 幾丁質經去乙酰化作用所得到的幾丁質聚醣為陽離子型高分子，亦具有抗菌效果，其抗菌能力主要來自氨基官能基的作用；因此幾丁質聚醣去乙酰度越高，抗菌能力越好，其抑菌之機轉可能是當幾丁聚醣溶液其pKa值低於6.3時，帶有多價之陽離子，會與細菌脂多醣體 (Lipopolysaccharide) 上之負電荷相互吸附，改變細胞壁通透性，造成細胞物質之流失，進一步達抑菌之效果 (Helander et al 2001)。
- (d) 透過抑制蛋白質酵素 (Protease)，使細菌無法將大分子蛋白質水解為小分子蛋白質或氨基酸，來作為養份之來源，而達抑菌之效果 (郭, 2003)。

V. 皮膚之傷口癒合與幾丁聚醣的關係

當皮膚受到輕微傷害時並不會產生發炎及肉芽組織反應，上皮以再生方式進行修補，因此不會留下明顯疤痕 (Cotran, 1989)。當皮膚遭受到嚴重破壞使組織壞死時，皮膚會進行複雜的修補反應 (Kirsner, 1993)，癒合過程分為：發炎期 (inflammatory phase)、生長期 (proliferative phase) 和重塑期 (remodeling phase) 三個時期。

(A) 發炎期 (inflammatory phase)

在發炎期血管壁的通透性會增加，使免疫細胞遷移至發炎處。在傷口處最先出現的細胞是多形性白血球 (PMN, polymorphonuclear leukocytes)，負責消滅細菌清除壞死細胞 (Rubin, 1988)。其次是巨噬細胞 (macrophage)，進行吞嚥及去顆粒作用 (degranulation)，釋出溶菌泡 (lysosome) 將細菌分解，最後漿細胞 (plasma cell) 產生抗體對抗病原體。

(B) 生長期 (proliferative phase)

纖維母細胞 (fibroblast)、上皮細胞 (epidermal cell) 和血管內皮細胞 (endothelial cell) 生長增加，而免疫細胞會分泌細胞激素 (cytokine)，其中生長因子 (growth factor) (Wahl, 1989) 最為重要能促進細胞的生長與增殖。

(C) 重塑期 (remodeling phase)

傷口停止發炎、細胞停止增生、分解細胞外基質，膠原蛋白 (collagen) 會依照張力線 (tension line) 的方向重新排列整齊，微血管的數目減少。其中細胞外基質 (extracellular matrix) 的蛋白分解酵素 (proteinase) 與抑制間的平衡在傷口癒合過程中扮演重要角色 (Young, 1994; Vallamo, 1996; Yager, 1996)。MMPs (matrix

metalloproteinase)可以分解細胞外基中一些蛋白質成分，許多文獻指出在慢性潰瘍傷口組織液中含有高量的MMP-2 及MMP-9 (Wysocki, 1993)；在燒燙傷傷口組織液中測得MMP-2、MMP-3、MMP-9 的活性(Young, 1994)，因此推測MMPs 的含量與活性增加可能是導致傷口不易癒合的原因之一(Saarialho, 1992；Stricklin, 1994)。

1970 年，Prudden 等人就提出有關幾丁質可作為傷口癒合覆蓋物之報告，他們由人類軟骨中找到這些成份並證實其確實對傷口癒合有明顯的促進作用。早期最簡單的照料傷口的方式是在紗布上加入抗生素而敷蓋於傷口上，但這並無法阻止微生物的感染和增生，且會造成傷口處的組織床乾裂，蛋白質和體液流失及發炎反應。於是就發展出皮膚覆蓋物去解決以上的問題。皮膚覆蓋物，其所面臨的第一個問題是與傷口貼合的能力與它所能承受之機械力作用。早期曾用上皮和真皮之組成物或是用表皮製成的板狀物來製做皮膚覆蓋物。此種產品對傷口的附著程度相當良好，且能提供營養使周圍組織不致於壞死，但它的結構太脆，很容易破裂粉碎。有些材質對傷口的附著能力很強，但也有其負面效果：長久覆蓋著傷口會導致傷口下體液的聚集而有化膿的危險。通常為了增加附著能力，會在產品上加入生長因子(growthfactor)和某些蛋白質，這不僅能幫助纖維蛋白(fibrin)的附著，也有助於微血管的增長(Stompro, 1989；Cooper, 1990；Dong, 1993；Lynch, 1989)。最早期的人工合成品是用紗布噴上一些聚合物(Nahas, 1981)，此種產品在傷口與組成物之界面只會有少許貼合，所以會造成大量的體液置留且易包紮失敗。後則發展出封閉或半封閉式的覆蓋物，其只會保留些許體液而促進傷口癒合即moist-wound-healing (Eaglstein, 1991)。目前的產品型式包括hydrocolloids, hydrogel, foams 和polyurethanes。Polyurethane 含有一層易黏著面，易與傷口周圍皮膚貼合，但其只適用於較小的傷口，若使用於大型傷口易造成體液置留。它的優點是可以縮短傷口癒合的時間及減少疼痛感。先前有報告指出此類產品包紮傷口後，會在傷口處發現大量白血球，所以推測其易造成感染，但後來被證實其會抑制微生物的入侵(Mertz, 1985)。

VI. 靈芝廢渣

靈芝子實體在經多醣類的萃取後所剩的殘渣，含有多量的幾丁質，是真菌的細胞壁成分之一。經由軟化、軟化、漂白、鹼處理、冷凍乾燥後，可製成人工敷料，對傷口癒合上有很大的幫助。與市售的幾丁質比較，市售的幾丁質大多為甲殼類動物而來，製成人造皮膚須經過複雜的化學處理，已靈芝製成的敷料方法更為簡單。(Su, 1997；1999)九、絲瓜乾瓜體纖維利用絲瓜瓜體纖維製作成絲瓜薄膜以TLC 定性，出現與N-acetyl-D-glucosamine 相近之位置出現一醣胺類，由HPLC 鑑定其單體之組成，於10~11 分鐘之滯留時間出現波峰，與標準品N-acetyl-D-glucosamine 相同，因此確定絲瓜乾瓜體纖維具有幾丁質之單體。利用紅外光譜分析(IR)，結果顯示絲瓜乾瓜體纖維於1648.89 cm⁻¹ 出現吸收帶，

此區域是乙醯基之位置，以上結果證實出絲瓜乾瓜體纖維含有幾丁質之單體：*N*-acetyl-D-glucosamine。最後利用GC/MS 分析其鍵結方式，poly[β -1,4-*N*-acetyl-D-glucosamine]，即為幾丁質之結構。由動物實驗顯示，絲瓜薄膜有良好之癒合效果。(陳, 2002)

二 實驗結果

1、絲瓜萃取物薄膜之外觀

由於絲瓜萃取物為粉末狀，為了在製程上與靈芝薄膜相似，於是加入濾紙。加入濾紙成膜不但可以吸收滲出液，防止過多的傷口滲出液累積於傷口而導致細菌感染，且提供適當的水分儲存環境以確保濕潤的有利環境(Shyu, 2001)。另一方面還可以保護傷口避免動物實驗時老鼠破壞傷口，而使評估材料幫助傷口癒合的測量不準確。也可使傷口與外界隔離，減少細菌感染的機率。絲瓜萃取物薄膜為細緻柔軟似面紙狀之外觀，有良好之吸水力，其直徑約7 cm，呈淺綠色(Fig. 1)。靈芝薄膜之外觀似紙狀，較絲瓜萃取物薄膜硬且較不柔軟，其直徑約7 cm，厚度約0.1-0.2mm 之薄膜(Fig.2)。

2、絲瓜萃取物所佔百分比

絲瓜有95%的重量為水分，所以乾物重量只佔5%，因此三次測量的絲瓜新鮮瓜體各為512g、535g、502g，除去水分後的瓜體所佔的重量分別為25.6g、26.75g、25.01g。絲瓜在冷凍乾燥後所取得的萃取物粉末分別為1.32g、1.05g、1.58g，所以絲瓜萃取物所佔百分比分別為5.15%、3.92%、6.31%，所以絲瓜萃取物的所占百分比為5.12%。

3、絲瓜萃取物之薄層液相色層分析(TLC)

Elson-Morgan reagent 呈色分析結果

在定性是否為醣胺類可用Elson-Morgan reagent 作為呈色劑，其可以將aminodeoxyhexose 及具有乙醯(acetyl group)之aminodeoxyhexose 呈現出紫紅色(purple-violet)，再glucosamine 及*N*-acetyl-D-glucosamine 與水解之絲瓜萃取物比對。由Fig. 3 可看到先以一次的時間點10 小時作HCl 水解，可明顯的看到在glucosamine 及*N*-acetyl-D-glucosamine 位置附近皆有紫色小點出現。更進一步以不同時間點及三氟醋酸作酸水解確定絲瓜萃取物是否含有glucosamine。HCl-5、HCl-10、HCl-15、TF-5、TF-10 及TF-15 此6 個樣品皆在glucosamine 及*N*-acetyl-D-glucosamine位置附近呈現紫色小點，因為其呈現紫色表示含有醣胺類，因此推測絲瓜可能於新鮮瓜體時具有glucosamine，當瓜體漸漸老化開始有菜瓜布形成(陳盟勳,2002)因此在絲瓜萃取物裡也含有*N*-acetyl-D-glucosamine。

4..高效能液相 (High Performance Liquid Chromatography ,HPLC)

所選用之層析管柱為一分子篩之層析管柱 (Gel-permeation chromatography)，它是利用管柱內膠體孔洞的大小來做為推算相對分子量的一個依據，而我們的標準曲線是以Bulletin 此多醣類做為標準品，經由標準曲線可反推到我們所測得絲瓜萃取物之分子量。絲瓜萃取物出現的時間點分別為 13.360m、13.287m、13.334m，在經由標準曲線得知其分子量分別為12.325kDa、12.485kDa、12.278kDa，其平均分子量約12.362kDa 另外在17.587m、17.633m、17.397m 出現的波峰為醋酸。

5、絲瓜萃取物之傅氏紅外光譜儀(MICRO FT-IR)

酮類的C=O 基在1700 cm⁻¹ 區附近有吸收帶，然而醯胺中的C=O 與C=N 的共振，降低C=O 的力常數，並使高度耦合的羰基吸收降到1650 cm⁻¹ 附近。一級醯胺與二級醯胺以及一些內醯胺在1650-1515 cm⁻¹ 區有一個或多吸收帶，一級醯胺以固態測光譜時，在1650 cm⁻¹ 有一強吸收帶；若是以稀釋溶液測試時，此吸收則移到頻率較高之處，1690 cm⁻¹ 附近。而氨基的吸收帶約在 1400-1600 cm⁻¹ 左右。幾丁聚醣在1400-1600 cm⁻¹ 處出現吸收帶，與胺基吸收帶1400-1600 cm⁻¹ 相符，且在1690 cm⁻¹ 也有吸收帶出現，這有可能因為去乙酰化的程度所影響。由Fig. 9，絲瓜萃取物於1400-1600 cm⁻¹ 出現吸收帶，與胺基吸收區1400-1600cm⁻¹ 相符，亦有幾丁質的C=O 之吸收帶於1690 左右，其原因也可能是受去乙酰化的程度所照成的。

6.動物實驗

動物實驗之目的為評估絲瓜萃取物幫助傷口癒合的能力，實驗設計兩組動物試驗來評估，實驗組為絲瓜萃取物薄膜與紗布於大白鼠之傷口癒合，對照組為絲瓜萃取物薄膜與靈芝薄膜之癒合程度比較。其中經由證實指出，絲瓜萃取物薄膜大約25-28 天，靈芝薄膜約21-28 天，而以紗布處理的傷口癒合超過25 天。所以菜瓜萃取物癒合能力較靈芝差不多，但比一般紗布好。以實驗組而言，絲瓜萃取物薄膜與紗布傷口癒合試驗中共有6 組動物。由Fig10-15 觀察，以絲瓜萃取物薄膜處理的傷口，約在25 天左右癒合完成。反觀以繃帶處理的傷口，仍舊有傷口存在，癒合時間大於25 天。而觀察其傷口癒合曲線Fig16-21，絲瓜粹取物薄膜可在第25 天完全癒合，而紗布處理的傷口卻仍未癒合其傷口大小不一，這是由於每隻老鼠的生理條件不同所造成的差異。所以由Fig. 22 來看絲瓜粹取物的癒合能力確實比紗布處理來的快速，且紗布癒合速率緩慢許多。以對照組而言，絲瓜萃取物薄膜與靈芝薄膜傷口癒合試驗中共有4 組動物。由Fig. 23-26 觀察，絲瓜萃取物薄膜大約在手術後25-28 天可癒合完全，而靈芝薄膜約在手術後21-28 天癒合完全。

7.組織切片的觀察

觀察經H&E 染色的組織切片於手術後3、7、14 及21 天。可發現從手術3 天後，紗布、絲瓜及靈芝組的傷口癒合狀況皆處於發炎反應時期(inflammation)，此時所吸引的免疫細胞大多數為嗜中性白血球(neutrophils)，且紗布組組織明顯較絲瓜及靈芝組不完整，吸引的嗜中性白血球較少。而對照靈芝跟絲瓜兩組其組織

較為完整，且所吸引的嗜中性白血球數量相近。手術7 天後，紗布組的組織較第3 天時增加許多，且嗜中性白血球數量也比第3 天更多但仍處於發炎時期。絲瓜組及靈芝組已可看到新生的血管及膠原蛋白纖維產生，傷口癒合狀況皆處於生長期(proliferative phase)，但是相較之下以靈芝組的較為明顯。手術14 天後，紗布組開始有少量的膠原蛋白纖維產生，在組織較深的地方也有微血管出現，但尚未有明顯的表皮層出現，代表傷口組織正處於生長期(proliferative phase)。就靈芝組及絲瓜組而言，其真皮層及表皮層結構已長的相當完整(34-L、34-G)，傷口癒合狀況處於組織重新塑造期(tissue remodel)，膠原蛋白纖維開始收縮以增加其強度，表皮與膠原蛋白纖維層的分界更為明顯。但靈芝組已有毛囊出現，而絲瓜組卻沒有。手術21 天後，紗布組所產生的膠原蛋白纖維增多了，也有明顯的表皮層出現，且細胞排列更為整齊所以其組織開始處於重塑期(remodeling phase)。而靈芝組及絲瓜組的真皮層及表皮層已恢復完整，絲瓜組有毛囊出現，靈芝組有完整的毛囊及毛髮出現。

8. 其他非動物性生物醫學材料之開發

經過對 20 種以上之園藝作物篩選之結果，顯示 N-Glucosamine 含量在 20% 以上之材料有除 *Luffa aegyptiaca* 絲瓜及絲瓜布外；尚有靈芝(*Ganoderma species*) 根黴(*Rhizopus stolonifer*)，雙結棍蟲草或植生蟲草(*Cordyceps biifusispora* or *Phytocordyceps ninchukispora*) 水苔(*Sphagnum moss*) 山粉圓或山香(*Hyptis suaveolens* (L.) Poir) 均可做為生物醫學材料之開發。

三 文獻參考

阮勝威。1996。由靈芝子實體經萃取後之廢渣所製成之薄膜對於天竺鼠傷口及組

- 纖維母細胞之影響，臺北醫學院醫學研究所碩士論文。
- 孫啟書。1996。人工皮膚之可能材質論靈芝薄膜對傷口癒合之影響，臺北醫學院醫學研究所碩士論文。
- 劉淑慧。2001。由靈芝子實體廢渣製成薄膜（SACCHACHITIN）對角質細胞及 matrix metalloproteinase（MMPs）之影響，台北醫學大學細胞分子生物研究所碩士論文
- 陳盟勳。2002 絲瓜乾瓜體纖維的幾丁質來源並應用於生物醫學材料，臺北醫學院醫學研究所碩士論文。
- 郭子緯。2002 幾丁質與幾丁聚糖對革蘭氏陽性菌抑菌機轉，臺北醫學院醫學研究所碩士論文。
- Arcidiacono, S., Lombrard, S.J., and Kaplan, D.L. (1989).
Fermentation, procession and enzyme characterization for chitosan biosynthesis by *Mucor roxii*. In: Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. ed. by Skjak-braek G., Anthosen T., and Sandford
P. Elsevier Applied Science, London, pp319-332.
- Aiba, S.(1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially *N*-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.* 14, 225-228. 70
- Bartnicki-Garcia, S. (1988) The biochemical cytology of chitin and chitosan synthesis in fungi. In: Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. ed. by Skjak-braek G., Anthosen T., and Sandford P. Elsevier Applied Science, London, pp23-35.
- Cotran, Kumar, Robbins. (1989). Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia, W. B. Saunders Co., fourth edition, P39-86.
- Cooper, M. L., Hansbrough, J. F., and Foreman, T. J. (1990). In vitro effects of matrix peptides on a cultured dermal-epidermal skin substitute. *Journal of Surgical Research.* 48(6): 528-33.
- Chuang WY, Young TH, Yao CH, Chiu WY. (1999) Properties of the poly(vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast in vitro. *Biomaterials.* 20(16):1479-87
- Davis, L. L. and Bartnicki-Garcia, S. (1984). The co-ordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*. *Journal of General Microbiology.* 130(Pt 8): 2095-102.
- Dong, C., Mead, E., Skalak, R., Fung, Y. C., Debes, J. C., Zapata-Sirvent, R. L., Andree, C., Greenleaf, G., Cooper, M., and Hansbrough, J. F. (1993). Development of a device for measuring adherence of skin grafts to the wound surface. *Annals of Biomedical Engineering.* 21(1): 51-5.
- Eaglstain, W. H., Mertz, P. M., and Falanga, V. (1991). Wound dressings: current and

- future. *Progress in Clinical & Biological Research*. 365: 257-65.
- Gooday, G. W. (1989). Control and inhibition of chitin synthesis in fungi and nematodes. In: *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application*. ed. by Skjak-braek G., Anthosen T., and Sandford P. Elsevier Applied Science, London, pp13-20.
- Knorr, D. (1984). Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.* 45, 114-122.
- Kirsner R. S. and Eaglstein W. H. (1993) The wound healing process. *Dermatologic Clinics*. 11, 629-640
- Kosaka T, Kaneko Y, Nakada Y, Matsuura M, Tanaka S. (1996) Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. *J Vet Med Sci*. 58(10):963-7
- Leuba, J.L. and Stossel, P. (1986). Chitosan and other polamines: antifungal activity and interaction with biological membranes. In: *Chitin in Nature and Technology*. ed. by Muzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W. Plenum Press, New York, pp215-222.
- Lynch, S. E., R. B. Colvin, et al. (1989). Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *Journal of Clinical Investigation*. 84(2): 640-6.
- Mertz, P. M., D. A. Marshall, et al. (1985). Occlusive wound dressings to prevent bacterial invasion and wound infection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 12(4): 662-8.
- Muzzarelli, R. A., Mattioli-Belmonte, M., Tietz, C. (1994). Stimulatory effect on bone formation exerted by modified chitosan. *Biomaterials*. 15, 1075-1081.
- Haque MI, Beekley AC, Gutowska A, Reardon RA, Groo P, Murray SP, Andersen C, Azarow K. (2001). Bioabsorption qualities of chitosan-absorbable vascular templates (1). *Curr Surg*. 58(1):77-80. 72
- Helander, I.M., Nurmiäho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*. 30;71(2-3):235-44.
- Nishimura, K., Nishimura, S., Seo, H., Nishi, N., Tokura, S., and Azuma, I. (1987). Effect of multiporous microspheres derived from chitin on the activation of mouse peritoneal macrophages. *Vaccine*. 5, 136-140.
- Nahas, L.F. and B. L. Swartz. (1981). Use of semipermeable polyurethane membrane for skin graft dressings. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 67(6): 791-2.
- Otterlei M, Varum KM, Ryan L, Espevik T. (1994). Characterization of binding and TNF-alpha-inducing ability of chitosans on monocytes: the involvement of CD14. *Vaccine*. 12(9): 825-32
- Peluso, G., Petillo, O., Ranieri M. (1994). Chitosan-mediated stimulation of

- macrophage function. *Biomaterials*. 15, 1215-1220.
- Rubin, E., Farber, J. L. (1988). *Pathology*. Philadelphia, J. B. Lippincott Co., P77-89
- Rao SB, Sharma CP. (1997). Use of chitosan as a biomaterial studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res*. 34(1):21-8
- Roller, S. and N. Covill (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*. 47(1-2): 67-77.
- Schilling, J. A. (1976). Wound healing. *Surgical Clinics of North America*. 56:859-874
- Stompro, B. E., J. F. Hansbrough, et al. (1989). Attachment of peptide growth factors to implantable collagen. *Journal of Surgical Research*. 46(5): 413-21.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., and Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*. 6:257-272.
- Sarrihalho-Kere, UK., Kovacs, SO., Pentland, AP., et al. (1993) Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes activity involved in wound healing. *J. Clin. Invest.* 92, 2858-2866.
- Stricklin, GP., Nanney, LB. (1994). Immunolocalization of collagenase and TIMP in healing human burn wound. *J. Invest. Dermatol.* 103, 488-492
- Su, C. H., Sun, C.H., Juan, S. W., Hu, C. H., Ke, W. T., Sheu, M. T. (1997). Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes. *Biomaterials*. 18, 1169-1174.
- Su, C. H., Sun, C.S., Wei, J. S., Ho, H. O, Hu, C. H., Sheu, M. T. (1999). Development of fungal mycelia as skin substitutes: Effects on wound healing and fibroblast. *Biomaterials*. 20, 61-68.
- Shyu, S. S., Mi, F.L., Wu, Y. B., Lee, S. T., Shyong, J.Y., Huang, R. N. (2001). Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*. 22, 165-173.
- Ueno H, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T, Fujinaga T. (2001). Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterials*. 22(12):1667-73.
- Vallamo, M., Weckeroth, M., Puolakkainen, P., Kere, T., Saarinen P, Lauharanta., J., Sarrihalho-Kere, UK. (1996). Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing cutaneous wound. *British J. of Dermatology*. 135, 52-59.
- Wahl, S. M., Wong, H., McCartney-Francis N. (1989) Role of growth Factor in inflammation and repair. *J. Cellular Biochem*. 40, 193-199.
- Wen-Fu Lee, Ying-Jou Chen, (2001). Studies on Preparation and Swelling Properties of the N-isopropylacrylamide/Chitosan Semi-IPN and IPN Hydrogels, *Journal of*

Applied Polymer Science, Vol. 82, PP.2487-2496

Wysocki, AB., (1993). Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest. Dermatol.* *101*, 64-68.

Young, PK., Grinnell F. (1994). Metalloproteinase activation cascade after burn injury: a longitudinal analysis of the human wound environment. *J. Inv. Derma.* *103*, 660-664

Yager, DR., Zhang, LY., Liang, HX., Diegelmann, RF., Cohen, IK., (1996) wound fluid from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J. invest. Dermatol.* *107*, 743-748.