

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : Gellan gum 共價偶合迷迭香酸之釋放動力學研究
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 阮筠珍
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-029-E
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授： 李明偉

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 100年03月30日

計畫名稱：Gellan gum 共價偶合迷迭香酸之釋放動力學研究

研究計畫內容：

(一)摘要

(二)研究動機與研究問題

(三)文獻回顧與探討

1. Gellan gum 來源和結構
2. Gellan gum 作為生醫材料的優點
3. Gellan gum 生化和物化特性
4. Gellan gum 當藥物載體的特性
5. 迷迭香酸(**Rosmarinic acid**，**Ros A**)的來源和結構
6. 抗氧化劑與傷口癒合的關係

(四)研究方法及步驟

1. 合成 Gellan gum-ADH
2. 合成 Gellan gum-ADH-RA
3. 膜的製備
4. 釋放動力
 - 4.1 溫度
 - 4.2 PH 值
5. Cell culture
6. Animal model
7. SEM
8. NO test

(五)初步結果

(六)參考文獻

(七)需要指導教授指導內容

(八)結果

1. 合成 Gellan gum-ADH
2. 合成 Gellan gum-ADH-RA
 1. 釋放動力
 - 1.1 溫度
 - 1.2 PH 值
 2. NO test
 3. Animal model

(九)討論

(一) 摘要

Gellan gum 是 FDA 認可的食品添加物，具有好的生物安全性和生物相容性。近年來除了在食品工業的應用外，亦可被作為藥物傳遞的載體以及組織工程的細胞載體。Gellan gum 不論是流動行為、結構或傳輸能力都已證實可以穩定的攜帶藥物並延遲其釋放速率。為發展抗氧化基材在生醫上的利用，本研究選擇以 Gellan gum 為基材共價偶合天然抗氧化分子-迷迭香酸。迷迭香酸具有高能力清除自由基的活性，其抗氧化活性強於咖啡酸、綠原酸、葉酸等，並可藉由消滅單重氧以達到保護細胞膜的結構和減緩人體衰老。將迷迭香酸共價鍵結於 Gellan gum，希望能達到藥效發揮的持久性和保護迷迭香酸抗氧化能力的活性。經過初步 NMR 的分析，本研究已確認 Gellan gum 可和迷迭香酸進行共價接枝，未來將繼續研究其釋放動力行為以及生醫上應用。

(二) 研究動機與研究問題

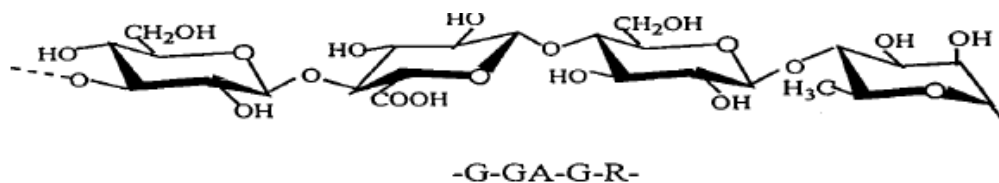
Gellan gum 是一種三維交聯網狀結構的高分子聚合物，能吸收大量的水分和生物體液使其膨脹溶解，發生溶液-凝膠(sol-to-gel)相變化，由於其黏滯性高，可以和上皮細胞黏附的較緊密，就不會因為重力的影響而從傷口流下，而增加滯留時間，停留在細胞表面，則可以使釋放出來的藥，讓細胞膜吸收，也可在傷口復原的後期提供一個濕潤的環境，作為藥物載體還能保護藥物不被酶解或胃酸破壞，又可以通過改變自身結構^[1]，和迷迭香酸做共價鍵結，使其額外擁有清除自由基和抗氧化的作用，另外迷迭香酸也會藉由與 C3b 結合而抑制補體系統，也就是說迷迭香酸含有抗炎的作用，因此將 Gellan gum 以共價鍵與迷迭香酸結合，而不是以一般混合的方式，來控制迷迭香酸釋放速率，並在體外模擬體內環境，觀察此聚合物對溫度、PH 值的影響，接著看迷迭香酸釋放出的量，在細胞中是否達到抗炎作用。

(三) 文獻回顧與探討

1. Gellan gum 來源和結構

Gellan gum 中文稱為結蘭膠或是結冷膠，是一種經由合成後附著在細胞表面或分泌到胞外溶液中的無定形黏液，叫作微生物胞外多醣(Exopolysaccharide, EPS)^[2]，又稱微生物代謝膠。Gellan gum 為 *Sphingomonas elodea* 所分泌的膠狀直鍊式多糖物質，如要形成膠狀物質需要一價或是二價陽離子存在之下才能形成膠狀物值，其中以二價陽離子行成膠狀物值的能力優於一價陽離子，所凝固的膠狀物體類似於洋菜膠。

Gellan gum 成品為白色粉末狀，分子量為 5×10^5 ，Gellan gum 屬於一種高分子聚合物，又 Gellan gum 單體結構為 β -D-1,3-glucose, β -D-1,4-glucuronic acid, β -D-1,4 -glucose, 和 α L-1,4-rhamnose^[3,4]。Gellan gum 可藉著廣泛且多樣化的陽離子形成凝膠，也可與酸中的氫離子(H⁺)作用，和陽離子結合形成聚合物分子並形成凝膠。其中兩個葡萄糖個別接有乙酯和甘油酯基。Gellan gum 自然形式中，以每單位約有 1.5 個 O-醯基基團，其中單體結構中有 O-乙醯取代基和 O-甘油醯取代基，後者多於前者，甘油醯基位於 3-連接成鍵的葡萄糖殘基的 2 位，乙醯基則在 6 位上。O-醯基很容易被鹼脫除，從而由自然形式的 Gellan gum 得到脫醯基形式^[4]。Gellan gum 的單體結構當中，其中兩個葡萄糖個別接有乙酯和甘油酯基。而葡萄糖醛酸會被中和而被 K、Na、Ca、Mg 等的鹽類，且還原端的羥基可能與官油酸或是乙酸的羥基形成糖苷酯^[5]。



(G= β -D-1,3-glucose, GA= β -D-1,4-glucuronic acid, R= α -L-1,4-rhamnose)

Fig 1 Gellan gum 之單體結構圖

2. Gellan gum 作為生醫材料的優點^[6]

以 Gellan gum 作為生醫材料具有以下之優點：

編號	特性	功效
1	在低濃度(0.05-0.25%)下就可形成優質凝膠	結蘭膠是一種非常有效的膠凝劑
2	加熱和低 pH 條件下都非常穩定	1) 加熱殺菌對凝膠的影響很小 2) 酸性凝膠的貨架期相當長
3	由鈉或鉀離子形成的凝膠，加熱後可以復原，而鎂或鈣鹽的凝膠無法復原	可分別製成熱可逆的和熱不可逆的凝膠
4	與其它膠類可順利搭配，如澱粉、黃原膠、刺槐豆膠、卡拉膠的混合物	組織結構可從脆的到有彈性的任意轉變
5	良好的相容性	可廣泛地適用於各種用途
6	結蘭膠在 pH3.5-7.0 之間均能形成凝膠	在酸性至中性食品配方中都能獲得優質凝膠和預期的凝膠強度
7	不容易導致酶解	為食品加工提供了很好的靈活性, 在微生物培養基和植物組織培養中也有優良的特性

3. Gellan gum 生化和物化特性

結蘭膠(Gellan gum)本身是屬於一種線性聚合物，有 Shear-thinning 現象被歸於多醣體僵直較有次序的分子構形，並產生聚集或結構鬆散的弱凝膠(Weak gels)。相較於以雜亂分子構形所形成的凝膠，這類由僵直較有次序的分子構形所形成的凝膠，分子間的結合力較弱，原因是構形本身較為固定，形成網狀結構時熵的損失並不大，僅需較弱的分子間吸引力^[7]。可藉著廣泛且多樣化的陽離子形成凝膠，也可與酸中的氫離子(H⁺)作用，這些陽離子導致聚合物分子結合並行成凝膠。Gellan gum 對溫度、酸、酶都有很強的抗性，溫度上升時 Gellan gum 粘度迅速下降，但冷卻後粘度又能完全恢復，當溫度降低到凝膠溫度後迅速形成凝膠，高於凝膠溫度時，結蘭膠溶解在水溶液中是無序的捲曲，冷卻到某一特定的溫度時，轉變成大致協調的雙螺旋構象。結蘭膠的凝膠溫度和融化溫度相差很大，凝膠溫度在 30-40 °C 左右，而融化溫度高達 120 °C，這對於 Gellan gum 的應用非常有利。冷卻速度對凝膠也有影響，較低保溫溫度(0 °C ~ 4 °C) 形成彈性凝膠，成膠速度快，而較高保溫溫度(10 °C) 形成的凝膠彈性較小，而且凝膠

的延遲期很長，一般形成凝膠後放置幾小時才會達到最大的強度。Gellan gum水溶液粘度隨濃度的升高增大，溫度升高而減小，pH 值影響很小。流變學角度而言Gellan gum在 0.01% ~0.04% 的範圍呈假塑性流體特性，當結蘭膠含量大於 0.05%時，則基本上呈凝膠狀液體。低質量分數的Gellan gum的流變學類型接近Cross模型，該體系具有剪切稀化性、觸變性及屈服應力，三者均隨Gellan gum質量分數的增大而增大。Gellan gum流變學特性依賴於膠體濃度，溶液溫度，45 °C，1.5%的體系中呈現牛頓特性；5~20 °C，0.5%的溶液呈非牛頓特性。不添加鹽離子的Gellan gum溶液表現出牛頓特性，添加單價和二價鹽離子，有很強的非牛頓特性，如表現出屈服應力、觸變性和高度的剪切稀釋特徵，這些是典型的“流體凝膠”特徵。天然Gellan gum的主鏈上因為連接有醯基，也會因醯基比率差異不同而不同，醯基的目的是使得所形成的凝膠能比較柔軟，富有彈性而且粘著力強。脫醯基的Gellan gum (Fig.2) 由於主鏈上的醯基部分或全部被除去，使得分子間空間阻礙作用明顯減弱，形成凝膠能力增強，具有強度大、易脆裂的特點。雖然高醯基Gellan gum體比低醯基Gellan gum膠體柔軟，但是在高溫下高醯基結冷膠比低醯基Gellan gum在構象上更有次序，因此高醯基Gellan gum的結構本質卻更穩定。兩者混合時，高醯基Gellan gum含量越多保水性、彈性越好，混合膠可形變能力可比低醯基Gellan gum大為兩好，凝膠溫度也高於低醯基Gellan gum，從而可見高醯基/低醯基的比例對膠體性質的影響比較大。

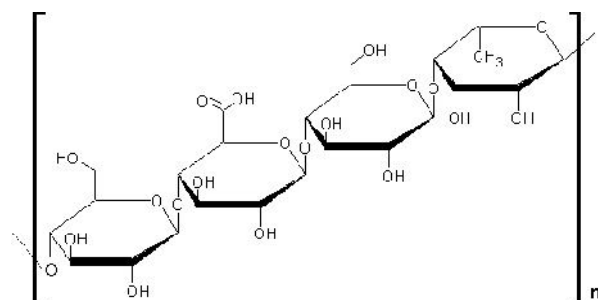


Fig.2 去乙醯的 gellan gum

4. Gellan gum 當藥物載體的特性

一般黏附型聚合物作為藥物載體，對於各式各樣不同親水性或分子大小的藥物接受度很廣，但是依需求不同，所選擇的載體不同，主要看的是其流動行為、結構、傳遞能力。首先由流動行為來看Gellan gum，Gellan gum由於其黏滯性高，可以和上皮細胞黏附的較緊密，就不會因為重力的影響而從傷口流下，而增加滯留時間，停留在細胞表面，則可以使釋放出來的藥，讓細胞膜吸收，也可在傷口復原的後期提供一個濕潤的環境。再來以結構來看Gellan gum，Gellan gum是一種三維交聯網狀結構的高分子聚合物，能吸收大量的水分和生物體液使其膨脹溶解，發生溶液-凝膠(sol-to-gel)相變化，既能保護藥物不被酶解或胃酸破壞，又可以改變自身結構。最後看的是Gellan gum的傳遞能力，Gellan gum對於一價陽離子很敏感，也就是說，Gellan gum在鉀和鈉的鹽類溶液內，會形成非自由流動但易脆的水膠，依據此敏感度，Gellan gum可以依皮膚的狀態來改變他的特性。根據實驗顯示，Gellan gum在0.95%NaCl下降解的較慢，推測Gellan gum在人體環境中，不會快速的被降解掉，直到被溶解，或是被黏蛋白取代後，才可以將藥物緩慢釋放出來，作用治療在特定部位，進而改善其生物相容性。Gellan gum當藥物載體還有其他優點，就是不用額外的佐劑來輔佐，而且所承擔的費用是可以負擔的起的。有多項研究就是利用Gellan gum為藥物載體來進行治療，像是角膜雷射手術後傷口復原用藥，就是利用antisense oligonucleotide (AsON)來重組connexin proteins，包覆在Gellan gum內，並在眼藥水內加入陽離子，根據藥物載體Gellan gum的特性，可

以緊密的黏附在角膜的傷口上面，緩慢釋出藥物到受傷的組織，減少發炎反應^[8]。另外也有為了治療第二型糖尿病患者慢性傷口，而改善過去長期的治療方法，發展較快速的治療方式，首先製成2.0% hydroxyethyl cellulose : 1.0% Gellan gum來形成穩定的藥物載體，攜帶 α 1-antichymotrypsin，在開放性的傷口釋放出藥物來治療，根據研究顯示，將此藥物載體加入磷酸緩衝液可突顯出Gellan gum的彈性，在非鹽類溶液內，也可以有hydroxyethyl cellulose的特性去形成有黏性可自由流動的物質^[9]。

5. 迷迭香酸(Rosmarinic acid, Ros A)的來源和結構

迷迭香(rosemary, *Rosmarinus officinalis*)，屬唇形花科，常綠多年生灌木最早由Ellis自迷迭香中發現，故而得名，為原生於地中海地區，其精油及乾燥後產物常用在食品及香料業。迷迭香酸別名又叫羅丹酚酸，英文名稱rosmarinic acid，簡寫成Ros A。迷迭香酸有一種生物活性的酚酸類化合物。1955年Ostic-Matijasevic首先提出以迷迭香萃取物中作為抗氧化劑。此後，也出現許多關於利用迷迭香萃取物延遲脂質氧化的研究。迷迭香之抗氧化力主要來自三種酚類物質：鼠尾草酸 (carnosic acid)、鼠尾草苦內酯 (carnosol)、以及迷迭香酸 (rosmarinic acid)。主要探討是迷迭香酸(又稱 α -o-Caffeoyl-3,4-dihydroxyphenyl lactic acid)分子式： $C_{18}H_{16}O_8$ 、分子量：360.33。迷迭香酸是咖啡酸和3,4-二羥苯基乳酸形成的酯類，屬於咖啡酸的一種衍生物。迷迭香酸的生物合成從L-phenylalanine和L-tyrosine開始。在八種酶的參與下，咖啡酸從苯丙胺酸上獲得酚環，二羥苯基乳酸從酪胺酸上獲得酚環，再經過一系列化學過程而合成迷迭香酸。

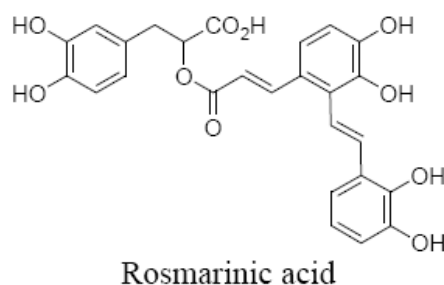


Fig 2 迷迭香酸之結構圖

6. 抗氧化劑與傷口癒合的關係

迷迭香酸具有極強的清除體內自由基的活性。其抗氧化活性強於咖啡酸、綠原酸、葉酸等，其抗氧化活性還能抑制內皮細胞調節的低密度脂蛋白的氧化。又因迷迭香酸具有很強的抗病毒活性，很強的抗氧化活性，因此國際上迷迭香酸用於化妝品已有多項專利。迷迭香酸能抑制透明質酸酶的活性，可保持透明質酸在表皮細胞長時間存在，一起抗感染、去色斑、抗氧化、增加彈性，去疤痕等作用。迷迭香酸能抗氧化、延緩衰老可以消除人體內產生過多的自由基，消滅單重氧，保護細胞膜的結構，減緩人體衰老。

迷迭香酸的清除自由基和抗氧化作用被認為是主要抗炎作用機制之一。迷迭香酸能抑制中性粒細胞超氧陰離子和過氧化氫以及脂質過氧化產物丙二醛(MDA)的產生，還能減少溶菌酶及 β -葡萄糖醛酸苷酶的釋放，結果表明迷迭香酸能抑制中性粒細胞呼吸爆發和脂質過氧化及通過降低細胞內鈣離子濃度而抑制溶酶體的釋放。具有多種藥理作用，特別是它對心肌細胞損傷的保護作用，抗神經細胞凋亡，誘導T細胞凋亡，

抗癌，及對阿茲海默氏症的 β -sheet型澱粉樣原纖維有很強的抗澱粉樣產生的作用。迷迭香酸與脂質過氧基結合，以終止脂質過氧化的連鎖反應。迷迭香酸有極強的清除體內自由基的活性，可消除自由基作用而氧化成醌式，能捕獲I·52自由基，在 β -tocopherol和迷迭香酸間存在協同作用，其抗氧化活性強於咖啡酸、綠原酸等；迷迭香酸能抑制內皮細胞調節的低密度脂蛋白的氧化^[10]、抑制C3/C5 convertase的活性，同樣地也會抑制C3b，推測其原因為迷迭香酸是具有多酚氧基的苯環(polyhydroxylated phenyl ring)容易與C3b以雙硫鍵的方式鍵結，因此迷迭香酸會藉由與C3b結合而抑制補體系統^[11]。迷迭香酸抑制TNF- α 表現的分子機制，當發炎現象誘發時NF-kB受到活化，進而使CCL11、CCR3基因表現增加，此二者基因表現量和TNF- α 分泌量成正比。若迷迭香酸存在下會透過抑制IKK- β 的活性使NF-kB的訊息傳遞減弱，再抑制CCL11、CCR3基因的表現，降低TNF- α 分泌量達到抗發炎的效果^[12]。迷迭香酸除了抗發炎另一個和傷口癒合相關的功能就是抗血管增生，血管增生指的是在原有的血管周圍形成更多的微血管網，此過程主要是因為內皮細胞受到生長因子的刺激而被活化，當基底膜受到酵素分解時，內皮細胞就會從基底膜去貼附，移行到血管周圍並進行增生形成新血管。此機制也是腹腔手術後加速組織沾黏的原因之一。上述所提的生長因子主要是VEGF、bFGF、TNF- α 和IL-8^[13]。

(四)研究方法及步驟

1. 合成 Gellan gum-ADH

取去乙酰化的 gellan gum 完全溶在二次水內，待降至室溫後，再加入 ADH 混合 10 分鐘後，以 HCl 將 PH 值調至 4.8，然後加入 EDC，並使其 PH 值維持在 4.8，反應 2 小時，反應完後，用 NaOH 將 PH 值調至 7.0 來終止反應，以 MWCO14000 透析膜在室溫下透析，除去未結合上的 ADH、EDC。

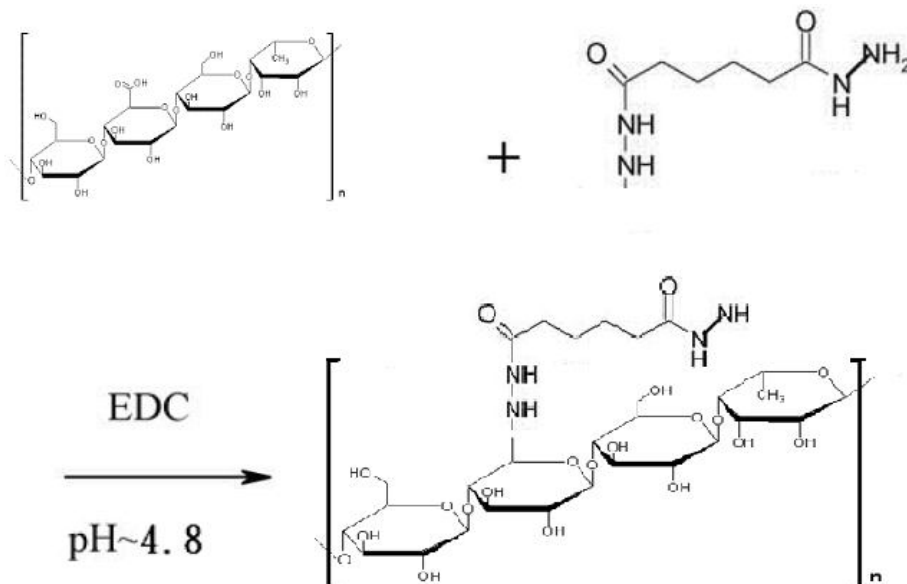


Fig 3 Gellan gum 共價鍵結 ADH 機制圖

2. 合成 Gellan gum-ADH-RA

透析後之產物 Gellan gum-ADH，加入 RA 在室溫下混合 10 分鐘，混合完後用 HCl 將 PH 值調至 4.8，然後加入 EDC，並使其 PH 值維持在 4.8，反應 2 小時，反應完後，用 NaOH 將 PH 值調至 7.0 來終止反應，以 MWCO14000 透析膜在室溫下透析，除去未結合上的 RA。

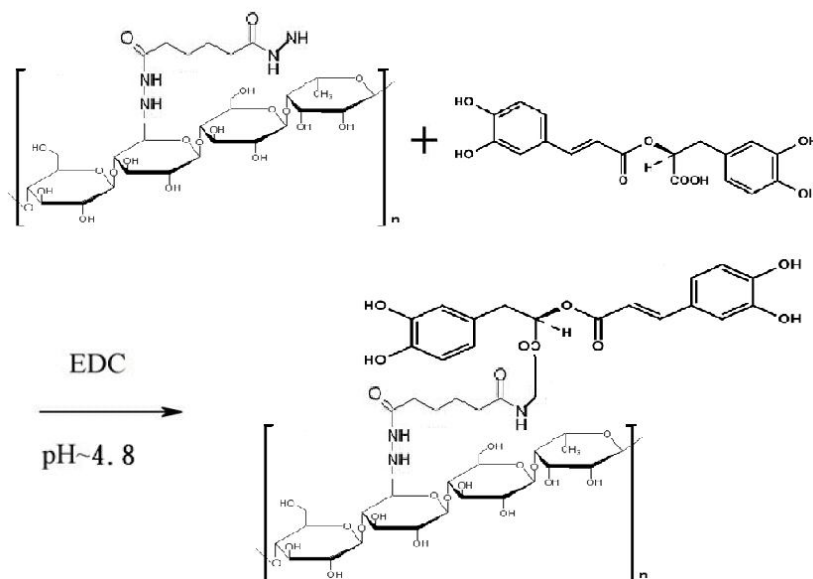


Fig 4 Gellan gum-ADH 共價鍵結迷迭香酸機制圖

3. Gellan gum-ADH-RA 膜的製備

將產物 Gellan gum-ADH-RA 0.3g 溶解在 30 ml 二次水中，倒入 15 公分的培養皿，放進烘箱烘乾，脫膜後備用。

4. 釋放動力研究

4.1 溫度

將膜裁成適當大小，放入 25°C、37°C、38°C 的 PBS (PH7.4) 中，每隔 1、3、6、12、18、24、48、72 小時取上清液出來，以 327nm 吸光值測量 RA 的釋放量及釋放速率。

4.2 PH 值

將膜裁成適當大小，在 37°C 下，分別放入 PH 值為 1、6.8、7.4 的溶液內，每隔 1、3、6、12、18、24、48、72 小時取上清液出來，以 327nm 吸光值測量 RA 的釋放量及釋放速率。

5. Cell culture

利用上皮細胞，以 37°C、5% CO₂ 的細胞培養箱中培養，放入 Gellan gum-ADH-RA 製成的膜磨成粉末，觀察 Gellan gum-ADH-RA 對細胞的毒性效應。

6. Animal model

從樂斯科公司購入 300gm 的 rat (品種: SD) 將製作好的 gellan gum 和迷迭香酸混合而成的膜，裁成 1.5cm X 1.5cm 的大小，移植入老鼠表面共 15 隻，在 3, 10, 30 天觀

察老鼠傷口表面發炎情況及傷口表面癒合情況的改變，並畫下傷口癒合情況以利於比較各個時間點的差異，於各個時間點取出老鼠組織做病理切片染H-E stain 觀察組織發炎情況和上皮細胞生長情況，在作AgNOR(nucleolar organizer regions NORs)Staining，利用鍍銀法將核仁部位染色，光學顯微鏡下觀察到染出之黑點及計算PMNL (polymorphonuclear leukocyte)數目值。

7. SEM

將gellan gum 和迷迭香酸所合成好的膜裁成1cmX 1cm 的大小，以雙面膠固定於固定盤上，以真空蒸鍍機在膜的表面鍍上一層金的薄膜，然後將鍍好的材料放入高真空掃描式電子顯微鏡，利用電子來撞擊膜的表面後，經接收器接收後轉換成訊號顯示在螢幕中，以利觀察。

8. NO test

將gellan gum 和迷迭香酸所合成好的膜裁成1cmX 1cm 的大小，浸泡在不含phenol red的H-DMEM培養基中，浸泡24小時後將培養基取出，再加入新的培養基，連續2次，將膜浸泡過的培養基加入到裝有老鼠巨噬細胞的24孔盤中，再加入lipopolysaccharide(LPS)進行誘導，使其反應24小時，將反應過後的培養基裝到96孔盤中。配製1% sulfanilamide和0.1% α - naphthylenediamine dihydrochloride分別溶入5% phosphoric acid中。將1% sulfanilamide加入到96孔盤中，反應10分鐘，再加入0.1% α -naphthylenediamine dihydrochloride，反應10分鐘，以550nm波長測吸光值。

(五)初步結果

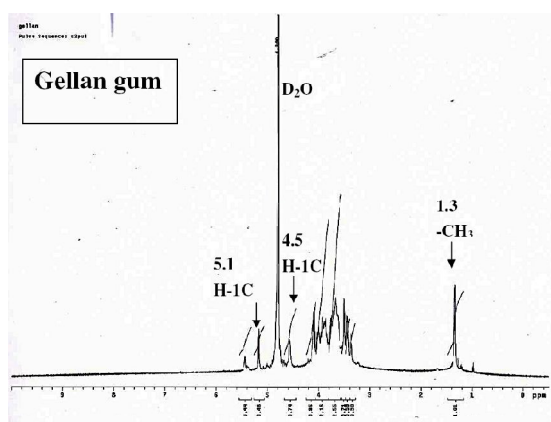


Fig 4 Gellan gum 溶於 D_2O 之 1H 液相 NMR 圖譜:5.1(H-1C),4.5(H-1C),1.3(- CH_3) [14]

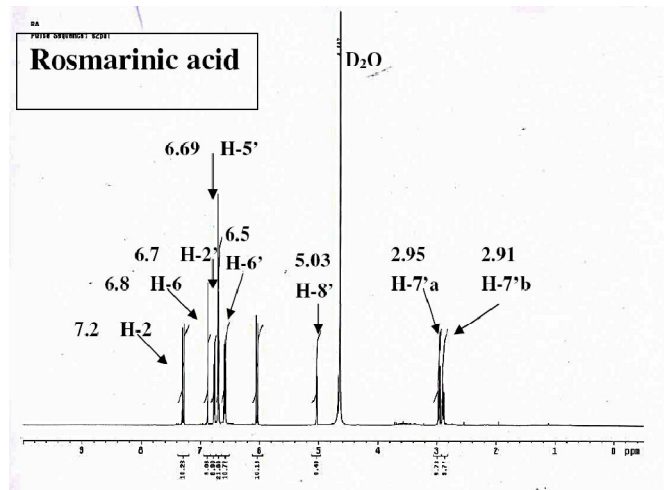


Fig 5 Rosmarinic acid 溶於 D_2O 之 1H 液相 NMR 圖譜:7.2 (H-2) , 6.8 (H-6) , 6.7 (H-2) , 6.69 (H-5') , 6.5 (H-6') , 5.03 (H-8') , 2.95 (H-7'a) , 2.91 (H-7'b) [15]

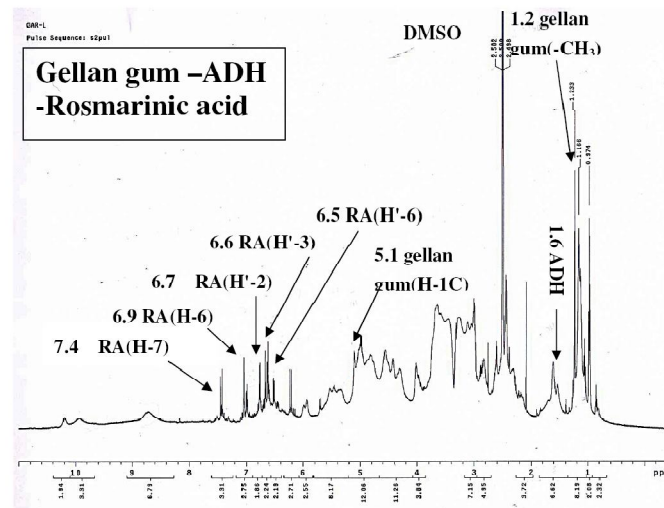


Fig 6 Gellan gum-ADH-Rosmarinic 溶於 DMSO 之 1H 液相 NMR 圖譜:7.4 RA(H-7) , 6.9 RA(H-6) , 6.7 RA(H'-2) , 6.6 RA(H'-3) , 6.5 RA(H'-6) , 5.1 gellan gum(H-1C) , 1.6 methylenes of ADH^[16] , 1.2 gellan gum(-CH₃)

(六)參考文獻

- [1] 郝堂娜等，嵌段共聚物 OSM1-PCLA-PEG-PCLA-OSM1 的 pH 和溫度敏感性質及體外釋藥特性考察，瀋陽藥科大學學報，第 5 期，2009 年。
- [2] K.S. Kang, G.T. Colegrove, G.T. Veeder. *Deacetylated polysaccharide S-60*. US patent 4326052.
- [3] P.E. Jansson, B. Lindberg, and P.A. Sandford. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate research*,1983;124(1):135-139.
- [4] A. J. Jay, et al. Analysis of structure and function of gellans with different substitution patterns.*Carbohydrate Polymers*, 1998;35(3-4):179-188.
- [5] J. Tang, M A. Tung, and Y Zeng. Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono-and divalent cations. *Carbohydrate Polymer*, 1996; 29(1):11-16.

- [6] A M. Fialho, et al. Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008;79(6):889-900.
- [7] M. Rinaudo. Role of Substituents on the Properties of Some Polysaccharides. *Biomacromolecules-Washington*, 2004;5(4): 1155-1165.
- [8] Rupenthal, Ilva Dana. Ocular delivery of antisense oligonucleotides using colloidal Carriers: improving the wound repair after corneal surgery. *The University of Auckland*, 2008.
- [9] Schmidt, Roland. Topical delivery of α 1-Antichymotrypsin for wound healing. *Ludwig Maximilians University of München*, 2005
- [10] 乃海燕，迷迭香酸的研究進展，美國中華臨床醫學雜誌，第7期，2005年，183頁
- [11] A. Sahu, N. Rawal and M K. Pangburn. Inhibition of complement by covalent attachment of Rosmarinic Acid to activated C3b. *Biochemical Pharmacology*, 1999;57:1439-1446.
- [12] J Lee, et al. Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK- β in TNF- α -induced upregulation of CCL11 and CCR3. *British Journal of Pharmacology*, 2006;148: 366-375.
- [13] N. Osakabe, A. Yasuda, M. Natsume and T. Yoshikawa. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of Perilla frutescens extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, 2004;25(4):549-557
- [14] M. Hamcerencu, J. Desbrieres, A. Khoukh, M. Popa, G. Riess. Synthesis and characterization of new unsaturated esters of Gellan Gum. *Carbohydrate Polymers*, 2008 ;71: 92-100.
- [15] Y. Abdullah, B. Schneider, M. Petersen. Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species, *Phytochemistry Letters* 2008 ;1:199-203.
- [16] S.K. Hahna, E.J. Oha, H. Miyamoto, T. Shimobouji. Sustained release formulation of erythropoietin using hyaluronic acid hydrogels crosslinked by Michael addition. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006 ;322: 44-51.

(七) 需要指導教授指導內容

對於書本上的知識必須要實際操作，這是我現在必須要努力的方向，所學的生物技術和所做的生醫材料領域差異很大，老師從旁教導我實驗上的技術，思考的流程，生醫材料相關的專業知識，資料的處理，這些都是在課堂上無法學到的，最重要的一點就是，在這知識大爆炸的時代，廣泛的蒐集知識，選擇知識，學習知識，運用知識，我都一步步的向老師學習，老師也告訴我們他的社會經驗，以及對於未來的想法，做為我們指點迷津的燈塔，讓我們見識更廣，也能在未來的道路上找到所要走的方向，使自己能依自己的能力、興趣來發揮。

(八) 結果

1. 合成 Gellan gum-ADH

利用核磁共振光譜學(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)，是在4-600MHz之無線電波區的電磁輻射吸收下所量測的。與紫外光、可見光及紅外線吸收相比的話，NMR是涉及原子核吸收的過程。因為對某些原子核而言，具有自旋和磁矩的性質。因此，若暴露於強磁場中原子核會吸收電磁輻射，這是由磁場誘導而發生能階分裂的結果。科學家並發現，分子環境會影響在磁場中原子核的無線電波的吸收，利用這種特性來分析分子的結構。在Fig7 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜中，adipic acid dihydrazide

(ADH)的代表性peak，在氮原子旁的氫出現在 $\sigma = 2.253$ ppm，烷基則在 $\sigma = 1.610$ ppm有吸收峰，和Gellan相接後，分別向右移至 $\sigma = 1.989$ 跟 $\sigma = 1.416$ 。但是除了Gellan和ADH的代表性peak外，還有其他雜peak，推測 $\sigma = 2.651$ 、 $\sigma = 1.012$ 、 $\sigma = 0.714$ 是利用丙酮沉澱來純化產物所殘留下來的溶劑peak。

2.合成 Gellan gum-ADH-RA

將Gellan gum-ADH和RA進行反應，ADH上的胺基會跟RA上的羧基進行脫水反應而形成共價鍵結。在Fig8 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜中，有出現非這三種物質的雜peak，有極大的可能是利用丙酮沉澱來純化產物所殘留下來的溶劑peak。RA peak的高度比Gellan gum peak的高度高出許多，這個現象很不合理，會接上Gellan gum的RA應該是和Gellan gum的量差不多，出現這樣的結果推測RA並沒有共價鍵結上Gellan gum，而是混在裡面。

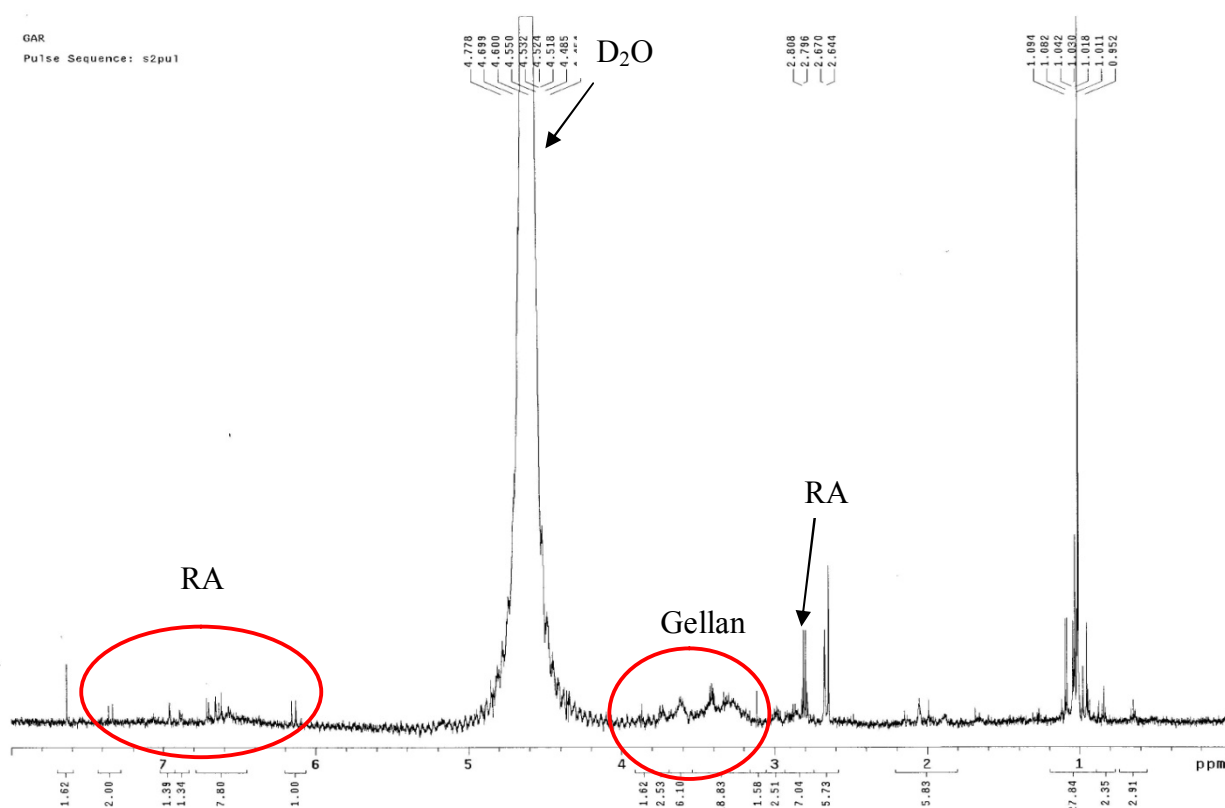


Fig8 Gellan gum-ADH-RA溶於 D_2O 之 ^1H 液相NMR 圖譜

放大合成Gellan gum-ADH的量，並且改用對 ddH_2O 透析，以免其他溶劑殘留。以Gellan gum單體莫耳數2倍的RA進行合成後，純化後的終產物卻分成上清液及沉澱物，都有顯著的RA顏色。經NMR分析(Fig 9)上清液及沉澱物後，以量來說上清液中合成的成分較多，才是終產物，而不是沉澱物。為了準確得知終產物上清液中的Gellan gum-ADH-RA有多少量，用酚-硫酸法來定量醣類-Gellan gum。酞酐(phthalic anhydride)經由硫酸(H_2SO_4)觸媒供應質子後所生成的酞酐之共軛酸是反應的親電子試劑，因為反應過程有硫酸存在，所以產物是以酚的結構存在。加入酸時反應時，變回無色的酸。經過計算，上清液的合成率只有30%，非常的低。沉澱物由NMR分析(Fig 10)出來，

反應物中的各成份都比上清液還少，並不是終產物。

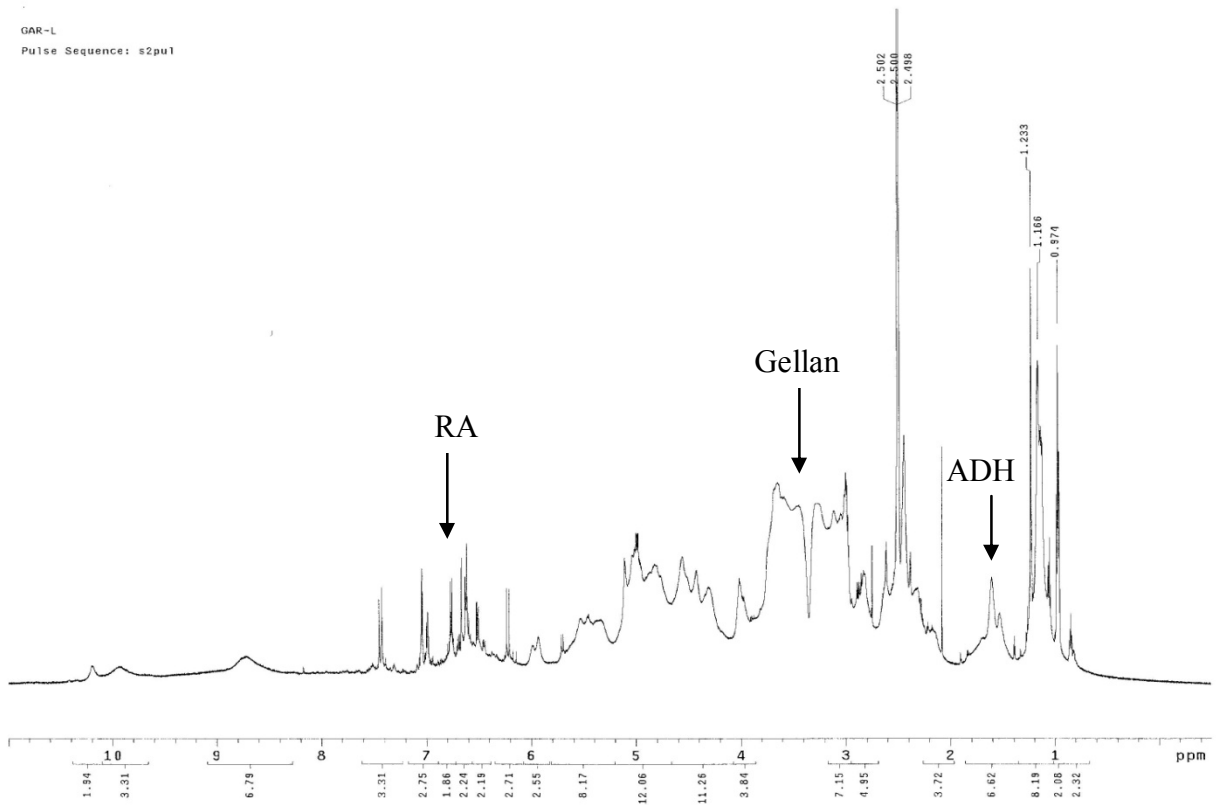


Fig9 Gellan gum-ADH-RA終產物之上清液溶於DMSO 之¹H 液相NMR 圖譜

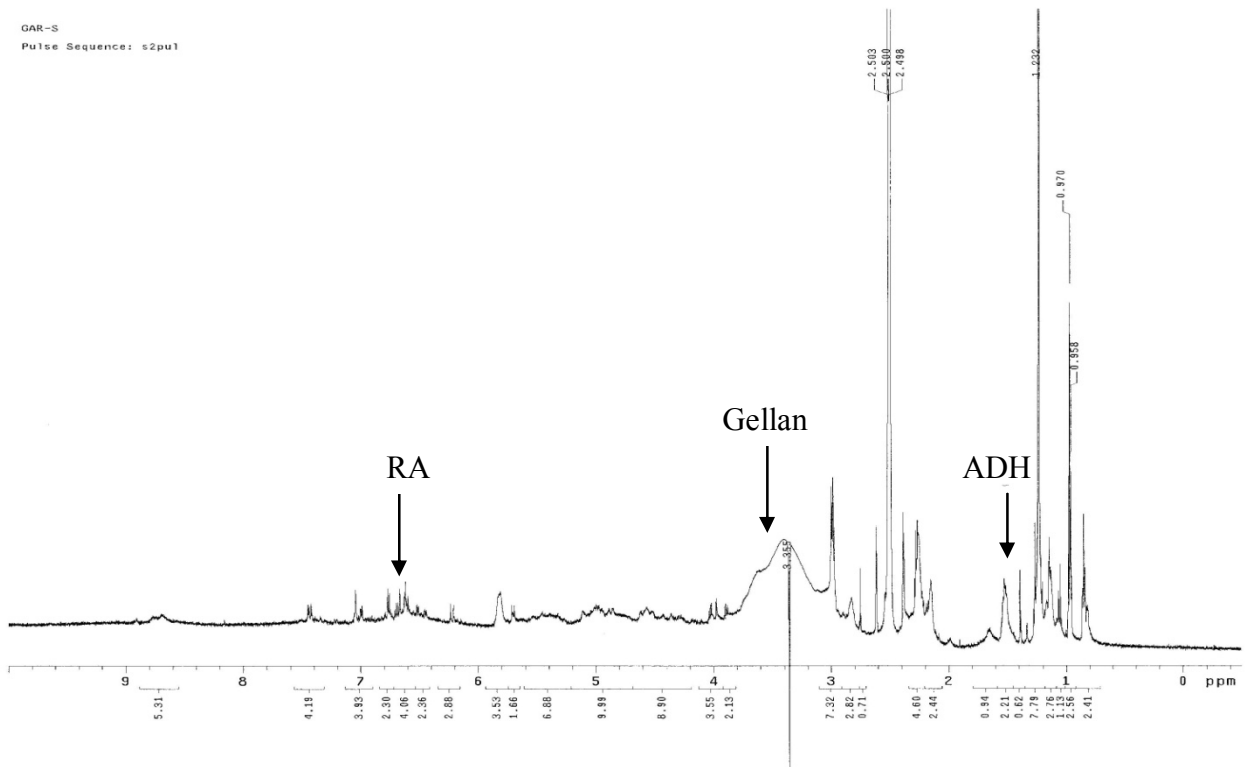


Fig10 Gellan gum-ADH-RA終產物之沉澱物溶於DMSO 之¹H 液相NMR 圖譜

為了增加合成率，RA降低為Gellan gum單體莫耳數的1倍，以避免過多RA沉澱。但是NMR分析結果顯示(Fig11)合成後仍有ADH的peak存在，照理說合成之後ADH這個架橋應該在合成物內了，這個現象有可能是其實沒合成成功，也有可能是未純化乾淨。而且和Gellan混合RA的NMR圖(Fig 12)相比，其實和合成的圖peak差異不大。

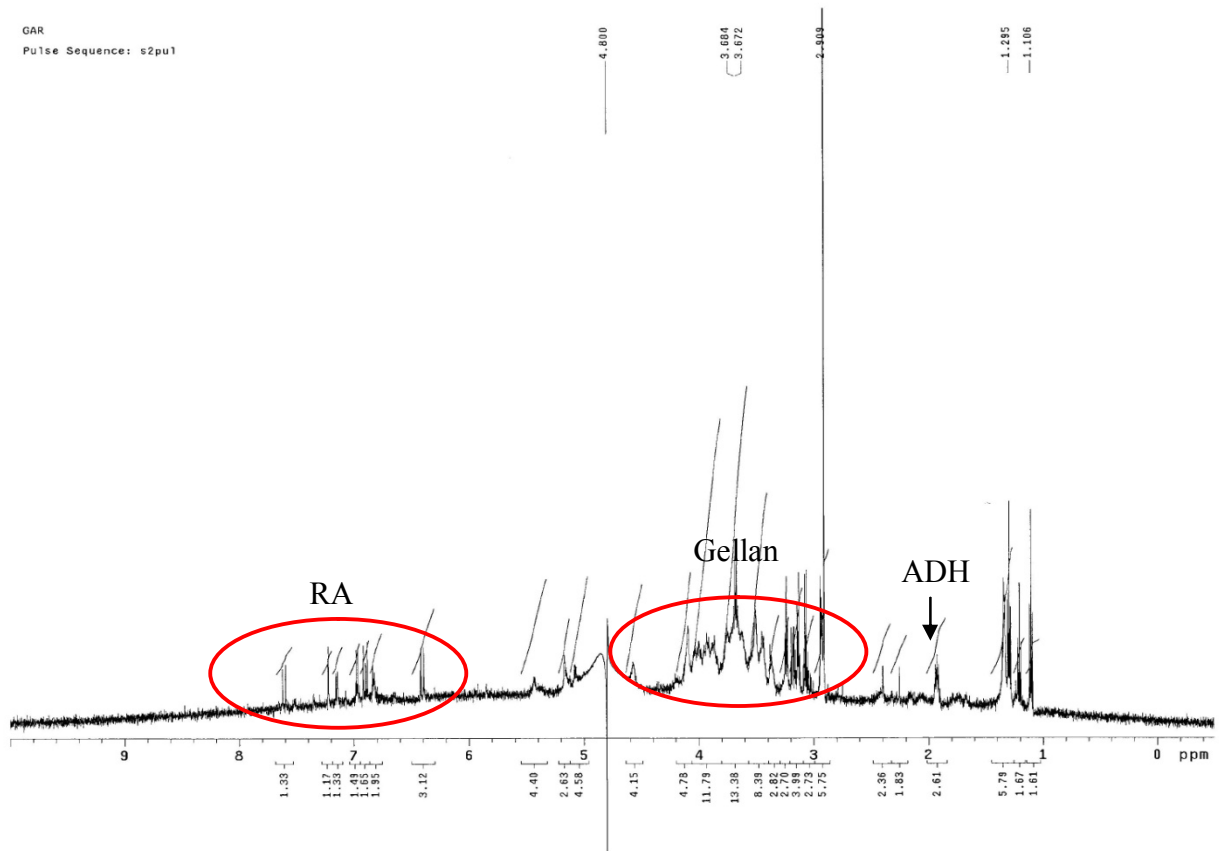


Fig11 Gellan gum-ADH-RA終產物之上清液溶於D₂O之¹H 液相NMR 圖譜

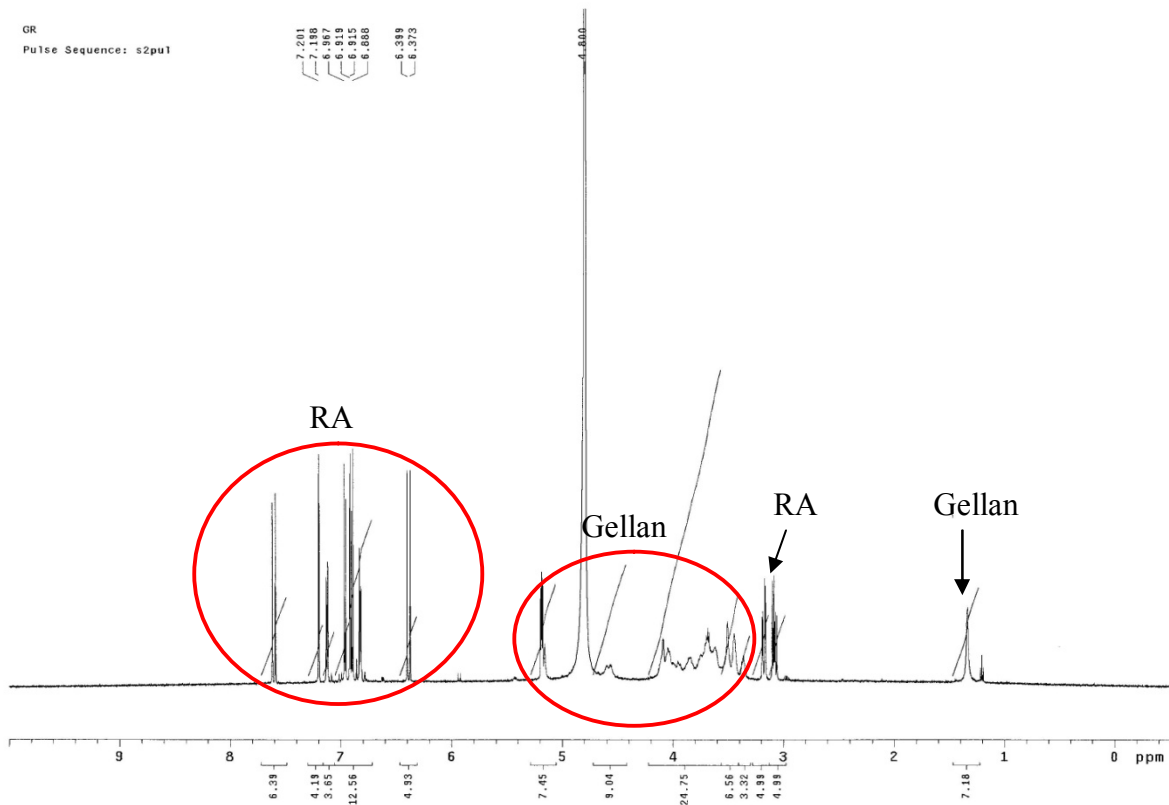


Fig12 Gellan gum混RA溶於D₂O之¹H 液相NMR 圖譜

換另一種方式來合成，先將Gellan混RA製成膜後再以交聯劑EDC交聯，不過交聯劑需在40%酒精下才有較好的交聯程度，但是RA會溶於乙醇水溶液，所以當交聯完後大部分的RA也從膜釋放出來了。EDC的peak出現並不合理，因為EDC是交聯劑，經過反應並清洗後，產物不應該有此peak，所以應該是未純化乾淨所殘留。

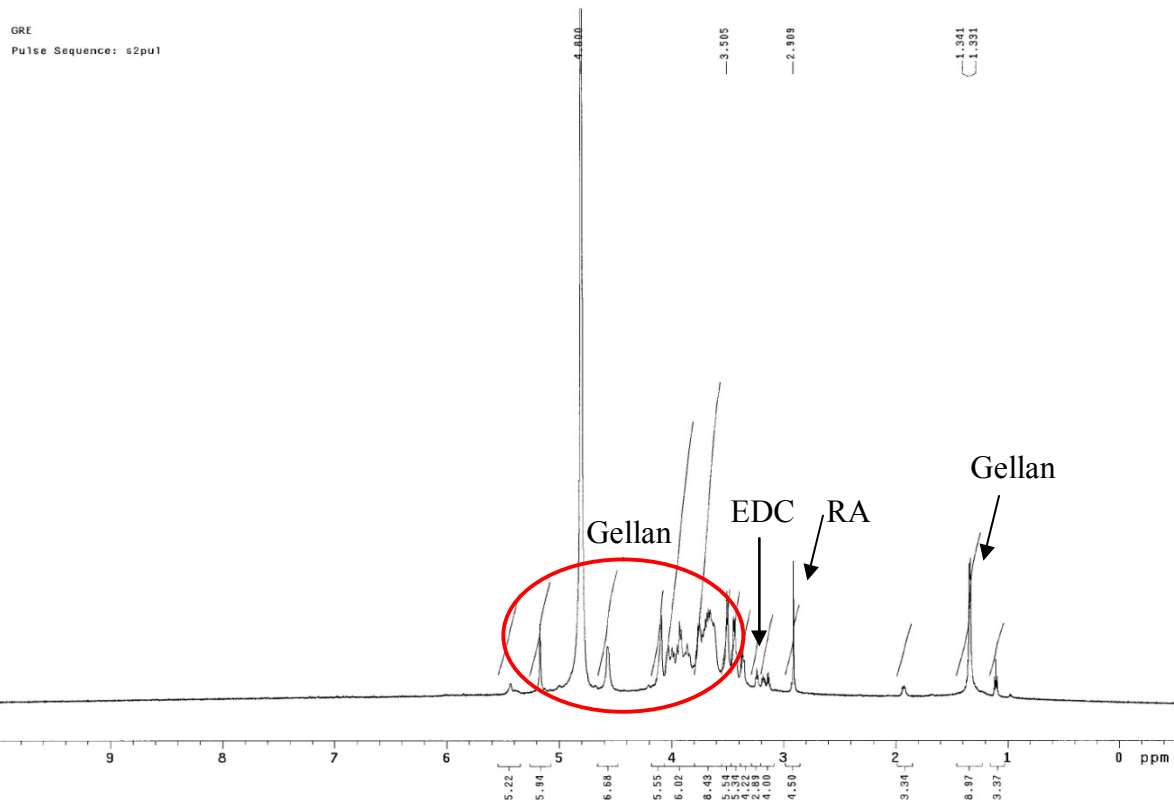


Fig13 Gellan gum/RA膜EDC交聯後溶於D₂O之¹H 液相NMR 圖譜

3. 釋放動力研究

3.1 PH值

為了模擬體內胃、腸環境，對Gellan gum混入RA經交聯後的膜做釋放，將交聯好的膜裁成適當大小，泡在用檸檬酸、檸檬酸鈉調出不同PH值PH=3、4、5、6、7的溶液，每天取出1ml上清液，測量RA之特定吸光值326nm，推算其釋放率。根據下圖(Fig14)在酸性條件下RA的釋放較穩定，推測其也能穩定通過胃酸的環境，到了小腸或利用在其他組織上的環境，就能大量的釋放出來。但是釋放率明顯的過低，這是由於用40%酒精交聯時酒精把RA也溶出來了，但卻是用原始膜重的2%RA來計算，所以釋放量才會這麼低。PH=7的環境下可能是檸檬酸或檸檬酸鈉中的離子穩定了膜對RA的釋放。圖Fig15一樣顯示在酸與條件下的釋放較為穩定，這次是使用HCl來調成不同PH值的溶液，可以減少離子對釋放的影響。PH=6的釋放量超過100%，這是由於在測量吸光值時，為了測得準確值而把溶液稀釋，也相對把誤差放大了，才會造成釋放量超過100%。

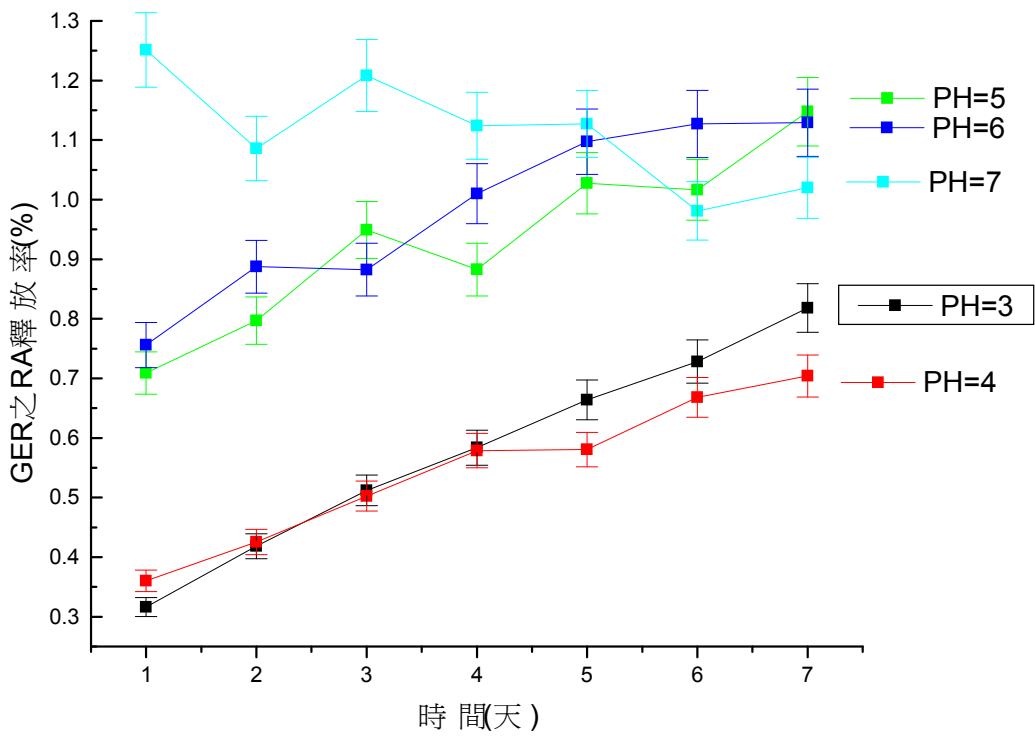


Fig14 Gellan gum/RA經EDC交聯後在不同PH=3、4、5、6、7的溶液下之釋放

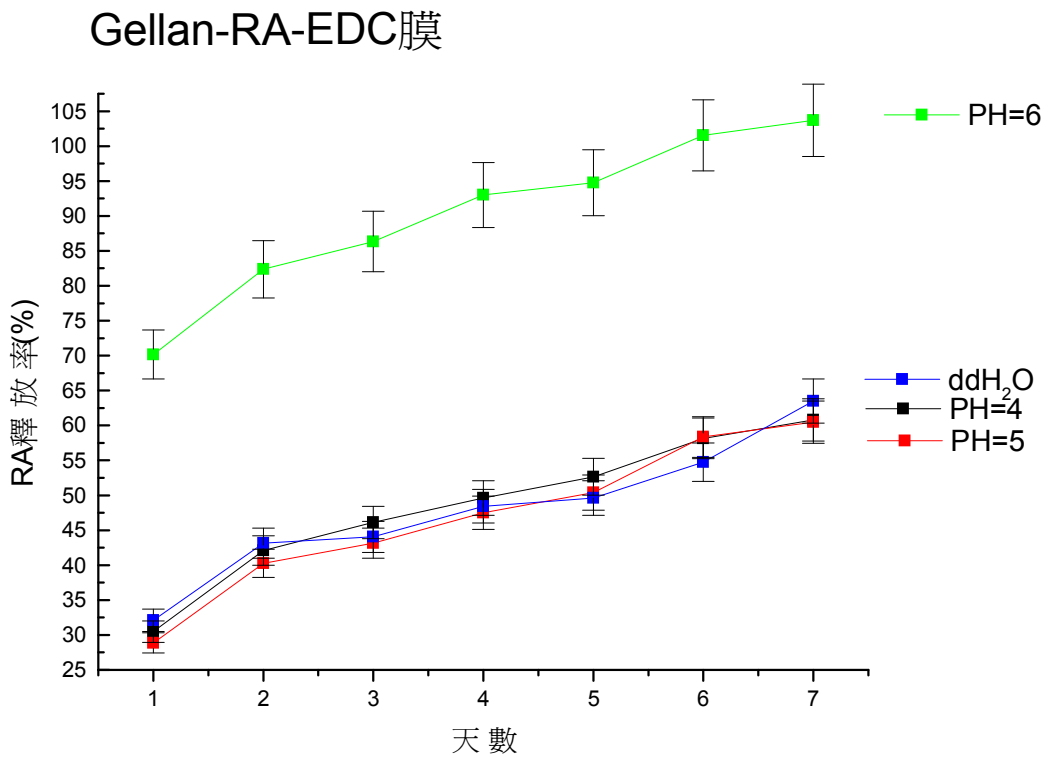


Fig15 Gellan gum/RA經EDC交聯後在不同PH=4、5、6的溶液下之釋放
3.2溫度

針對體內溫度37°C對RA釋放量的探討。Fig16可以明顯得知在37°C下RA的釋放量大增，也就是說若置放於體內釋放量增多，其RA的效用或許也會增加。

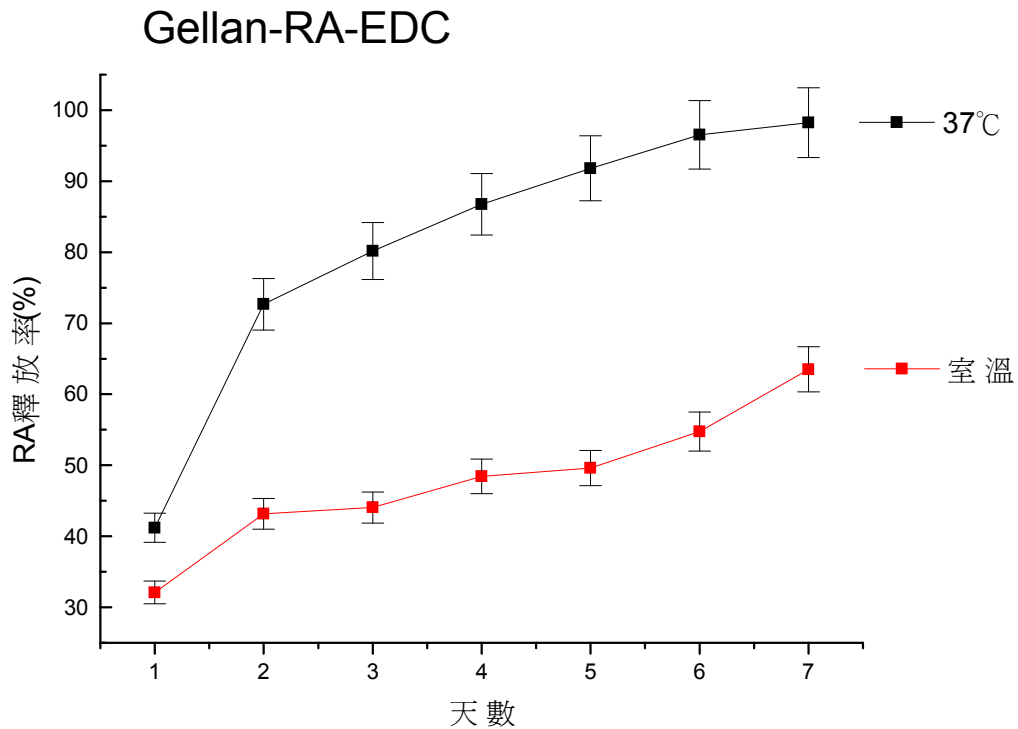


Fig16 Gellan gum/RA經EDC交聯後在37°C及室溫下之釋放

4.NO test

一氧化氮是受細菌內毒素（LPS）感染時重要之發炎媒介物質，為瞭解測試物質gellan gum混迷迭香酸的膜是否可以抑制巨噬細胞釋放此等發炎媒介物質而進行此測試。將gellan gum混迷迭香酸的膜分別以無phenol red的培養液浸泡6、12、24、48小時後，取其萃取液加入LPS至巨噬細胞內培養一天，用Griess method測量一氧化氮量。Fig17中黑色曲線是對巨噬細胞加入內毒素後，給予gellan gum的萃取液，由整個趨勢來看，一氧化氮量呈現直線成長的趨勢，由此可知gellan gum這個control組無法抑制細胞發炎。紅色曲線是gellan gum膜混入0.5%迷迭香酸，一開始的NO量很高，經過浸泡24、48小時後的膜釋放出的迷迭香酸，能夠有效的降低巨噬細胞所釋出的NO。綠色曲線則是gellan gum膜混入0.1%迷迭香酸，也有明顯抑制NO的量。但是膜在6、12小時浸泡測到的NO量並沒有應有的趨勢，可能是浸泡的時間過短，迷迭香酸還未釋放出來，另外一種可能就是萃取液和LPS一起加入時，LPS無法起作用使巨噬細胞發炎就被迷迭香酸抑制掉了。

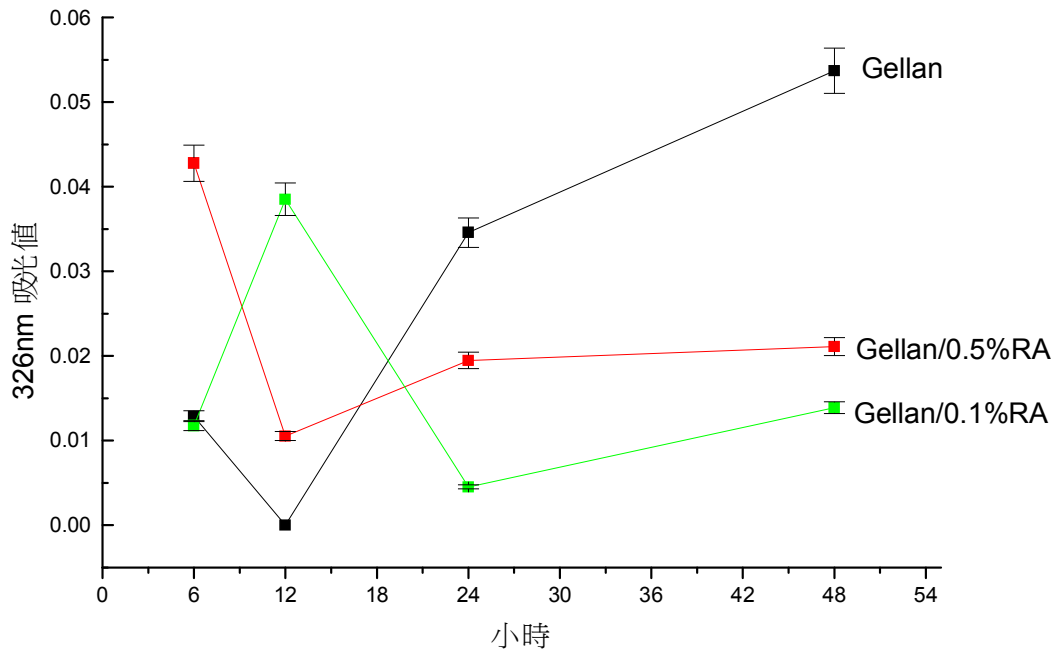


Fig17 內毒素合併迷迭香酸處理的巨噬細胞之一氧化氮生成量

5. IR

經由紅外線光譜儀來確認gellan和迷迭香酸是否經縮合反應形成共價鍵結，將膜材成1cm X 1cm以單點式ATR-用ZnSe晶體當背景來測試。Fig 18是gellan gum混迷迭香酸和Fig 19gellan gum混迷迭香酸經EDC交聯相比，在N-H基團的吸收峰有變化，gellan gum混迷迭香酸的吸收峰為 3341.7 cm^{-1} ，gellan gum混迷迭香酸經EDC交聯的吸收峰為 3330.9 cm^{-1} ，但是並沒有C-N形成，所以gellan gum跟迷迭香酸並沒有共價鍵結的形成。

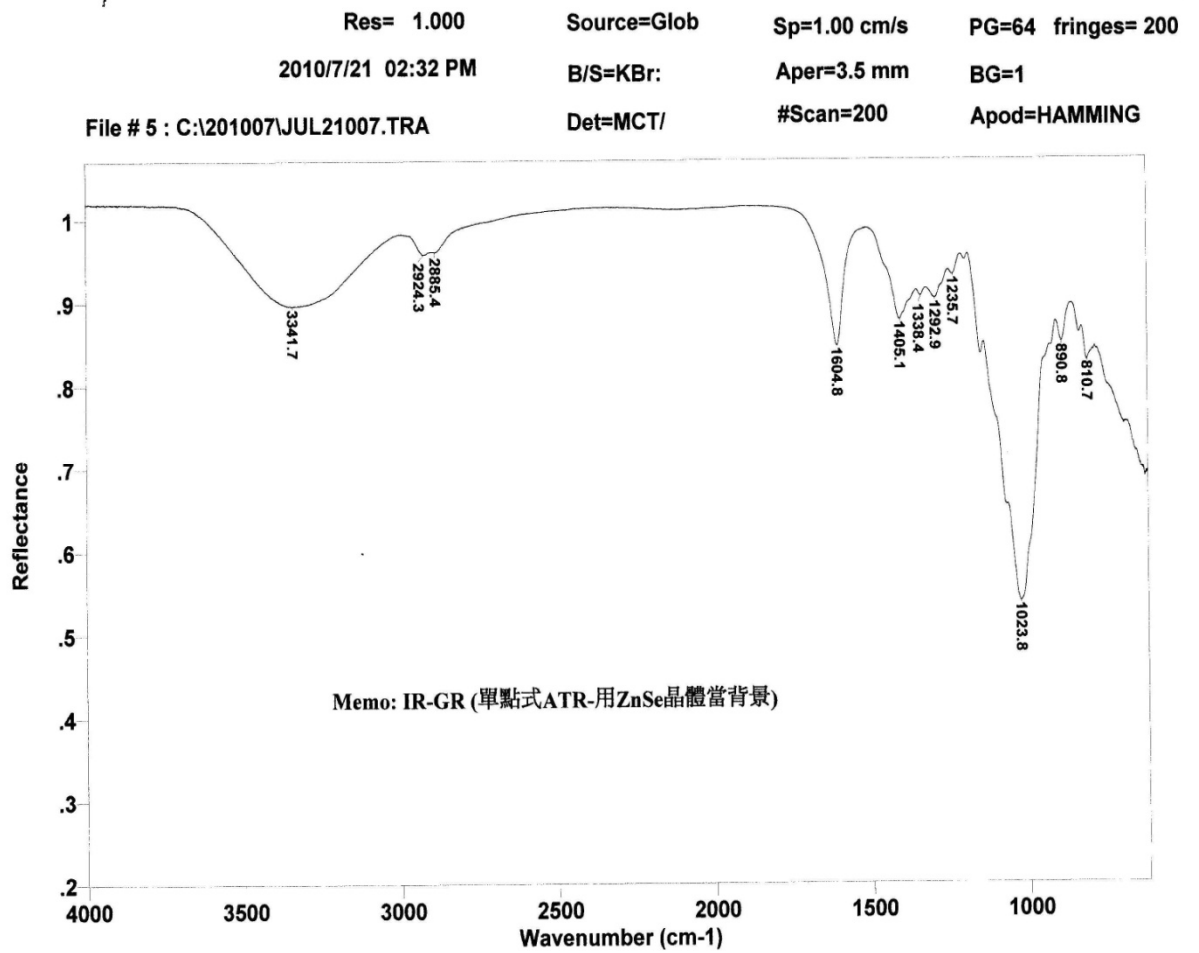


Fig18 gellan gum混迷迭香酸之IR圖

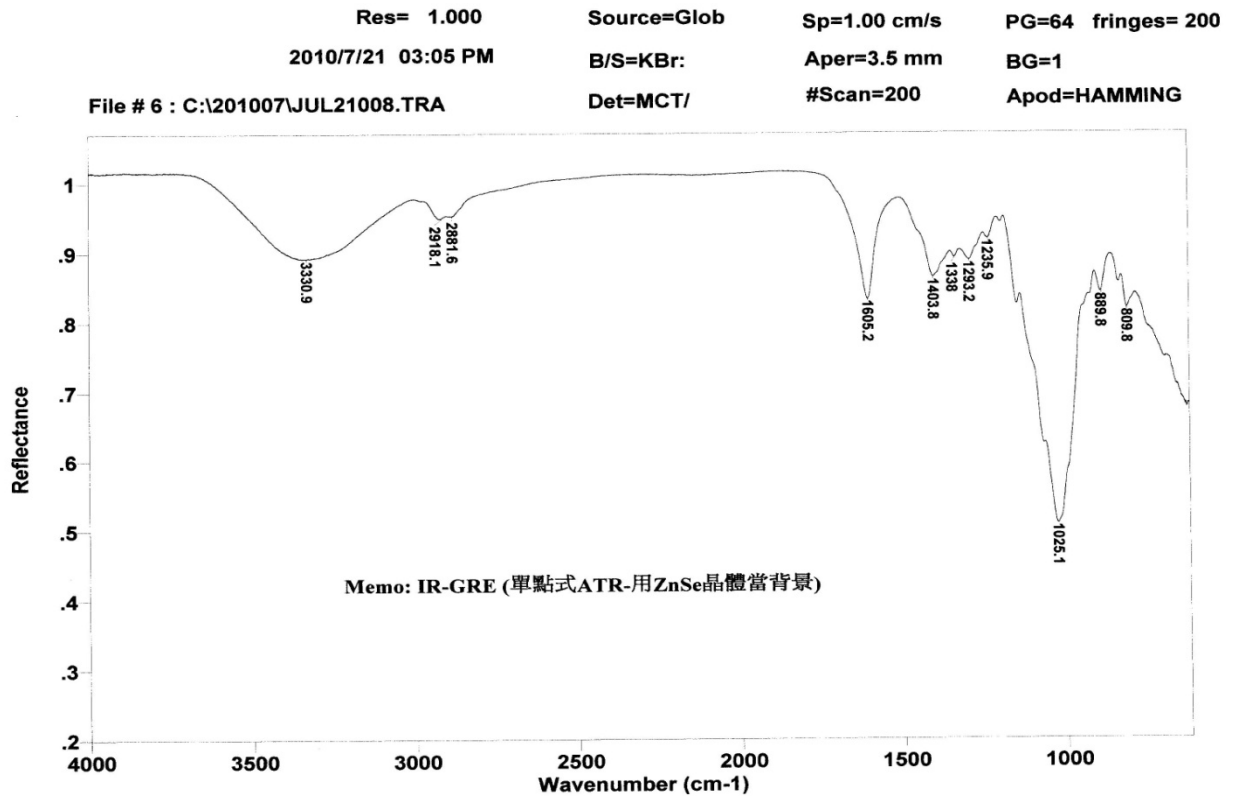


Fig19 gellan gum混迷迭香酸經EDC交聯之IR圖

(九)結論

一開始由NMR圖看到了gellan gum跟迷迭香酸的peak以為反應是順利進行的，圖中出現的交聯劑或連接劑也被認為是未純化乾淨所造成的。IR圖無法證實有共價鍵結，所以嘗試了不同種的架接方式。最後想藉由釋放實驗來驗證有交聯上跟未交聯後迷迭香酸的釋放量是有差異的，確實在釋放量有差異，但在未交聯的釋放量過大，而有交聯的釋放量低，無法做出符合理論值的釋放。NO測試是可以證實gellan gum混迷迭香酸是可以抑制巨噬細胞釋出發炎媒介物。因此，從這些實驗並無法得證gellan gum有共價偶合迷迭香酸，但是從錯誤中我們發現了其他解決方案，原本交聯劑所用的溶劑會使迷迭香酸從gellan gum膜中釋放出來，現在我們正在嘗試利用無法使gellan gum膜中釋放出迷迭香酸的溶劑，也就是100%酒精來做交聯，以期能成功將gellan gum共價鍵結上迷迭香酸。