



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I814462 B

(45) 公告日：中華民國 112 (2023) 年 09 月 01 日

(21) 申請案號：111124196

(22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 06 月 29 日

(51) Int. Cl. : A61L24/00 (2006.01)

A61L24/08 (2006.01)

A61L24/10 (2006.01)

A61K31/5415 (2006.01)

A61K41/00 (2020.01)

(30) 優先權：2021/08/24 美國

63/236415

(71) 申請人：國立臺灣大學 (中華民國) NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY (TW)

臺北市大安區羅斯福路四段一號

(72) 發明人：游佳欣 YU, JIA-SHING (TW)；盧韋帆 LU, WEI-FAN (TW)；盧廷瑜 LU, TING-YU

(TW)；劉倚辰 LIU, YI-CHEN (TW)

(74) 代理人：林義傑；劉彥宏

(56) 參考文獻：

CN 104411255A

US 5292362A

審查人員：黃詩淳

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：11 共 26 頁

(54) 名稱

止血材料的製備方法及其所製備的止血材料

(57) 摘要

本發明有關於一種止血材料的製備方法，主要包括將一角蛋白與一海藻酸鹽混合，藉由冷凍凝膠法以獲得一角蛋白-海藻酸鹽複合支架，並進行乾燥以獲得一止血材料，此外，可進一步將亞甲基藍摻雜於該止血材料中，使得該止血材料具有抗菌光動力能力。

A preparation method of a hemostatic material is provided, wherein the method mainly includes mixing a keratin and an alginate; obtaining a keratin-alginate composite scaffold by a freeze-gelation method; and drying the keratin-alginate composite scaffold to obtain a hemostatic material. Further, a methylene blue can be loaded into the hemostatic material so that the hemostatic material has the antimicrobial photodynamic ability

指定代表圖：

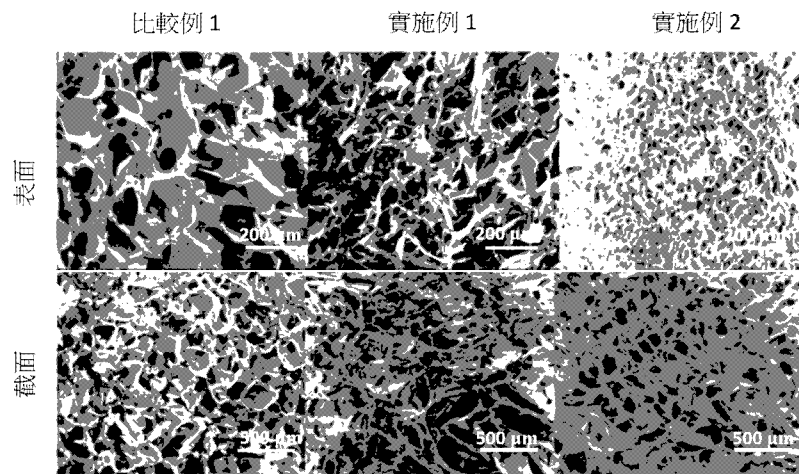


圖 1



I814462

【發明摘要】**【中文發明名稱】** 止血材料的製備方法及其所製備的止血材料**【英文發明名稱】** Manufacturing method of hemostatic material and hemostatic material prepared thereby**【中文】**

本發明有關於一種止血材料的製備方法，主要包括將一角蛋白與一海藻酸鹽混合，藉由冷凍凝膠法以獲得一角蛋白-海藻酸鹽複合支架，並進行乾燥以獲得一止血材料，此外，可進一步將亞甲基藍摻雜於該止血材料中，使得該止血材料具有抗菌光動力能力。

【英文】

A preparation method of a hemostatic material is provided, wherein the method mainly includes mixing a keratin and an alginate; obtaining a keratin-alginate composite scaffold by a freeze-gelation method; and drying the keratin-alginate composite scaffold to obtain a hemostatic material. Further, a methylene blue can be loaded into the hemostatic material so that the hemostatic material has the antimicrobial photodynamic ability

【指定代表圖】 圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 止血材料的製備方法及其所製備的止血材料

【英文發明名稱】 Manufacturing method of hemostatic material and hemostatic material prepared thereby

【技術領域】

【0001】 本發明係有關於一種止血材料及其製備方法，尤指一種包含角蛋白-海藻酸鹽複合支架，並摻雜有亞甲基藍的一種止血材料及其製備方法。

【先前技術】

【0002】 目前，分離自人類頭髮的角蛋白具有優異的生物相容性、非免疫原性、以及生物降解性，故作為生物材料被大量的應用，例如應用於藥物釋放、組織工程、促進傷口癒合、以及誘導細胞生長及分化等。人類頭髮角蛋白的來源豐富，成本低廉。

【0003】 由於人類頭髮角蛋白具有良好的液體吸收特性，加上其無細胞毒性以及生物降解性，且角蛋白有增強血小板結合和活化促進纖維蛋白原聚合的功能，故被認為是用於傷口止血及修復的潛在生物材料。

【發明內容】

【0004】 本發明提供了一種止血材料的製備方法以及其所製備的止血材料。

【0005】 本發明所提供的止血材料的製備方法主要包括以下步驟：(1) 將一角蛋白溶液與一海藻酸鹽溶液混合以形成一混合物溶液；(2) 於低溫下添加一交聯劑溶液於該混合物溶液中，並藉由冷凍凝膠法使得該混合物溶液凝膠化以獲得一角蛋白-海藻酸鹽複合支架；(3) 將該角蛋白-海藻酸鹽複合支架乾燥以獲得一止血材料。

【0006】 於本發明一實施態樣中，更包括一步驟(4)：將一亞甲基藍參雜於該止血材料中。

【0007】 於本發明一實施態樣中，步驟(1)中的該角蛋白溶液的濃度為1至10 % (w/v)；該海藻酸鹽溶液的濃度為1至10 % (w/v)，且該角蛋白溶液與該海藻酸鹽溶液以1：1至10：1的比例混合。

【0008】 於本發明一實施態樣中，該亞甲基藍於每克止血材料的摻雜量為100~500 μg 。

【0009】 於本發明一實施態樣中，步驟(1)中的該角蛋白係萃取於動物毛髮或指甲。

【0010】 於本發明一實施態樣中，步驟(2)中的該交聯劑為5~10% (w/v)的氯化鈣溶液，其係以乙醇做為溶劑。

【0011】 於本發明一實施態樣中，步驟(2)中的該冷凍凝膠法係於 -10°C 以下的溫度冷凍至少24小時。

【0012】 本發明所提供的止血材料係藉由以上方法所製備而成，該止血材料主要包括一角蛋白-海藻酸鹽複合物。

【0013】 於本發明一實施態樣中，該角蛋白-海藻酸鹽複合物係由一角蛋白與一海藻酸鹽藉由一鈣離子交聯而成。

【0014】於本發明一實施態樣中，該止血材料更包括一亞甲基藍。

【0015】於本發明一實施態樣中，該止血材料的孔隙度為60~70%。

【0016】於本發明一實施態樣中，該止血材料的液體吸收度為1500~3000%。

【圖式簡單說明】

【0017】

圖1係本發明實施例之止血材料的SEM的掃描結果圖。

圖2係本發明實施例之止血材料的液體吸收度示意圖。

圖3係本發明實施例之止血材料的壓縮模量示意圖。

圖4係本發明實施例之止血材料的降解曲線示意圖。

圖5係本發明實施例之止血材料的亞甲基藍釋放曲線示意圖。

圖6係本發明實施例之止血材料的UV-Vis吸收光譜圖。

圖7係本發明實施例之止血材料的相對細胞活性分析圖。

圖8係本發明實施例之止血材料的培養液的菌落圖像。

圖9係本發明實施例之止血材料的培養液的菌落圖像。

圖10係本發明實施例之止血材料的抑菌率分析圖。

圖11係本發明實施例之止血材料的菌落圖像。

【實施方式】

【0018】 [角蛋白的萃取]

【0019】 本發明中的角蛋白係由人類頭髮中萃取，使用二次水清洗頭髮後風乾，再浸泡於氯仿/甲醇(2：1，v/v)溶劑中12小時將溶劑蒸發，以去除頭髮上殘留的油脂。接著將頭髮(5 g)浸泡於包含25 mM 三經甲基氨基甲烷、2.6 M硫脲、5M尿素、以及5%的2-巰基乙醇的混合溶液中，並維持在50°C，浸泡三天。接著，取出萃取溶液，再利用MWCO 1kDa的透析盒於1公升的水中透析36小時，且每12小時換一次水，以取得角蛋白。

【0020】 [角蛋白-海藻酸鹽複合支架的製備]

【0021】 本實施態樣使用冷凍凝膠法以製備帶有亞甲基藍的角蛋白-海藻酸鹽複合支架。其製備步驟包括提供4%(w/v)的海藻酸鈉溶液，以及1%(w/v)的角蛋白溶液，接著將該海藻酸鈉溶液與該角蛋白溶液以1：4的體積比在室溫下進行混合，以形成一角蛋白/海藻酸鹽混合物溶液，接著將均值的混合溶液轉移到塑膠容器中，並於-20°C下冷凍72小時，使得聚合物(角蛋白及海藻酸鹽)與溶劑分離。接著，將冷凍的混合溶液浸入預冷-20°C的氯化鈣溶液中(8%(w/v))，該氯化鈣溶液係以99.5%的乙醇做為溶劑，以誘導該角蛋白與海藻酸鹽進行凝膠化，接著，將凝膠化的支架從溶液中取出，並在室溫下浸入99.5%的乙醇中24小時，使得交聯而得的角蛋白-海藻酸鹽複合支架進一步沉積，並去除殘留的未反應的氯化鈣。最後，將凝膠化後的複合支架於室溫下風乾，以獲得一止血材料，並保存在防潮箱中備用。

【0022】 接著，為了使得止血材料具有抗菌光動力活性，將亞甲基藍摻雜於該角蛋白-海藻酸鹽複合支架中，其摻雜的量為400 μ g/每克角

蛋白-海藻酸鹽複合支架，以獲得經摻雜亞甲基藍摻雜的角蛋白-海藻酸鹽止血材料。

【0023】 而於以下測試例中，依上述方法所製備的角蛋白-海藻酸鹽止血材料為實施例1、經亞甲基藍摻雜的角蛋白-海藻酸鹽止血材料為實施例2、以純海藻酸鹽製成的止血材料作為比較例1。

【0024】 [角蛋白-海藻酸鹽止血材料的特性評估]

【0025】 上述所製備實施例1、實施例2、及比較例1的止血材料的表面係藉由掃描電子顯微鏡(SEM)進行觀察，並對其進行孔隙度以及於不同時間的液體吸收度進行測試，其SEM的掃描結果係如圖1所示，而孔隙度係如表1所示、及對去離子水及對磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffered saline, PBS)的液體吸收度的測試結果如圖2所示：

表1

	實施例1	實施例2	比較例1
孔隙度 (%)	67.48 ± 3.06	63.34 ± 1.63%	67.35 ± 3.06

【0026】 [角蛋白-海藻酸鹽止血材料的壓縮力學測試]

【0027】 本壓縮力學測試是使用材料測試系統對實施例1、實施例2、及比較例3進行測試。為了分析三個材料於乾燥狀態下的抗壓強度，取橫截面積為0.000484 m²、高度為5.7 mm的材料，並壓縮至原厚度的30%；而對於濕潤狀態下的測試，則是將三個材料在去離子水中浸泡1小時，接著，再以10 mm/min的應變速度進行分析，以記錄材料壓縮的力及位移，並進一步繪製應力-應變曲線以計算壓縮模量。該應力-應變

曲線係藉由線性擬合($R^2 > 0.98$)確定，以獲得壓縮模量(初始線性斜率)，結果如圖3所示。

【0028】 乾燥條件下的三個材料中，相較於比較例1中海藻酸鹽止血材料的壓縮模量，實施例1、實施例2的止血材料的抗壓強度因角蛋白的添加而降低。而在潮濕條件下，三個止血材料之間的壓縮模量並無顯著差異，且由於止血材料需與皮膚表面緊密的接觸，故力學性能不能過硬。且由於人體皮膚的壓縮模量小於35 kPa，因此實施例1、實施例2、及比較例1的止血材料皆適合應用於皮膚傷口的止血。

【0029】 [角蛋白-海藻酸鹽複合止血材料的降解分析]

【0030】 本降解分析方法係將實施例1、實施例2、及比較例1的止血材料分別浸入 50 mL 離心管內的 20 mL 酶溶液中，該酶溶液為溶於 PBS 中 0.2 mg/mL 的胰蛋白酶，並在 37 °C 下在 200 rpm 的搖動培養箱中培養2週。接著，在預定的時間間隔 “t”，從酶溶液中取出止血材料，使用去離子水徹底清洗後進行凍乾法以去除水分。凍乾後記錄剩餘材料的重量(W_r)，每組別分別測試三次。材料的重量損失百分比 (%) 按下式計算：

$$\text{重量損失 (\%)} = [(W_{\text{dry}} - W_r) / W_{\text{dry}}] \times 100\%。$$

【0031】 由於止血材料需要有適當降解特性，才能避免止血後對傷口造成二次損傷，而透過上述的降解測試，實施例1、實施例2、以及比較例1的止血材料在酶溶液中培養一天後即失去了大約60%的初始重量，其降解曲線如圖4所示，三個止血材料的降解曲線並無顯著的差異，由於實施例1及實施例2的止血材料並沒有化學交聯的結構，因此可能會

導致較大的質量損失。而液體吸收加速了水解過程。此外，其結果還間接推測，所有包裹於血凝塊中的止血材料都可能被有效地分解和吸收，且在止血材料的降解過程中，鈣離子的緩慢釋放可進一步幫助止血，角蛋白在其降解過程中不會引起炎症。因此，角蛋白/海藻酸鹽複合止血材料在實際生理環境中的生物降解率相當適合傷口癒合，並且降解過程不會引起炎症等繼發性傷口損傷。

【0032】 [角蛋白-海藻酸鹽複合止血材料的體外光敏劑釋放評估]

【0033】 本評估係將實施例2中摻雜亞甲基藍的角蛋白-海藻酸鹽複合止血材料浸入容置於50 mL離心管的20 mL PBS溶液內，在37 °C的環境下，於200 rpm的搖動培養箱中培養，達預定的時間點蒐集離心管內的液體樣品後，立即補充新的PBS。透過UV-Vis分光光度計以測量提取的液體樣品中的亞甲基藍的含量以製備亞甲基藍的校正曲線，本次實驗皆至少進行3次。

【0034】 上述實施例2的支架的亞甲基藍釋放曲線係如圖5所示，亞甲基藍的負載能力(*loading capacity*)及包裹效率(*encapsulation efficiency*)分別為 $0.03092 \pm 0.001256\%$ ($309.2 \pm 12.6 \mu\text{g}$ 亞甲基藍/g 材料)和 $77.30 \pm 3.14\%$ 。且如圖X所示，在第一小時期間觀察到快速的藥物釋放曲線，此期間大約釋放了 $27.25 \pm 3.99\%$ 的亞甲基藍，接著在之後的52小時期間持續緩慢釋放，亞甲基藍累積的釋放效率為 $37.62 \pm 4.18\%$ 。由此可見，實施例2的複合止血材料在傷口癒合初期可透過吸收傷口滲出液來實現亞甲基藍的高釋放率，以提供抗菌功能，預防感染。

【0035】 [角蛋白-海藻酸鹽複合止血材料的活性氧測試]

【0036】 本測試係將實施例1、實施例2、及比較例1的複合止血材料取大約0.1克，並分別浸入6孔板中15 mL的反應溶液中，該反應溶液是由0.025 mM N,N-二甲基-4-亞硝基苯胺(RNO)和 0.25 mM 咪唑組成，接著使用650 mW/cm² 的 660 nm 的雷射光於樣品上方8.5 cm的距離照射支架 30 分鐘。接著使用1.5 mL水稀釋該溶液，並透過UV-Vis分光光度計測定440 nm波長的吸光度。若單態氧與咪唑反應生成咪唑內過氧化物，會導致RNO漂白，而RNO在440 nm處有明顯的吸收峰，但如果RNO經漂白，則該峰值會降低。

【0037】 其測試結果係如圖6所示，經660 nm的雷射光照射後，實施例2的複合止血材料在440 nm處的吸收度下降，表示實施例2的複合止血材料可誘導活性氧(ROS)的產生，從而成為一種潛在的抗菌光動力止血材料。

【0038】 [角蛋白-海藻酸鹽複合止血材料的生物相容性測試]

【0039】 生物相容性的測試是基於ISO 10993-5、ISO 10993-12所訂定的測試方式進行。在進行細胞實驗之前，將實施例1、實施例2、及比較例1的止血材料用紫外光滅菌24小時，並分別於DMEM-HG培養液中於37 ± 1 °C 孵育 24 ± 2 h，培養後的培養基稱為提取培養基，並以未含有材料的培養基於相同培養條件下培養作為對照組。第19代的NIH3T3細胞以每孔7500個細胞的密度植於96孔盤中，並培養過夜，接著，除去培養基並使用PBS洗滌後，將200 µL的提取培養液處理96孔盤中的細胞，並培養24小時，培養結束後，將200 µL的MTT溶液(5 mg/mL)添加至孔中，並在37 °C 下再培養4小時，接著去除MTT溶液，加入200

μL 的二甲基亞砷(DMSO)以溶解甲臍晶體，使用定軌搖床 30 分鐘以徹底混合該混合物。最後，通過酶標儀(ELISA plate reader)在 570 nm 波長處測定光密度，記錄結果並通過與對照比較進行統計分析。其結果如圖7所示。

【0040】 上述測試結果顯示，未摻有亞甲基藍的實施例1及比較例1的止血材料，對於細胞沒有任何毒性，然而，摻有亞甲基藍的實施例2的止血材料則表現出較低的細胞活力，然其細胞毒性依舊是在可接受的範圍內，且實施例1、實施例2、及比較例1的細胞活性均超過90%，表示所有止血材料皆具有生物相容性。

【0041】 [角蛋白-海藻酸鹽複合止血材料的體外抗菌光滅活測試]

【0042】 本測試係將革蘭氏陽性金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)和革蘭氏陰性大腸桿菌(*E. coli*)在37 °C的有氧條件下於200 rpm 的搖動培養箱中，以 LB培養基進行24小時的培養。接著，以去離子水稀釋培養物以達到約 10^5 CFU/mL 的密度來獲得細菌懸浮液。接著將實施例1、實施例2、及比較例1的止血材料用紫外線輻射消毒30分鐘，再將止血材料轉移到含有細菌懸浮液的 24 孔盤中，大約 10 mg的止血材料與1 mL的細菌懸浮液一起進行培養。接著將止血材料於黑暗中培養或用 660 nm 雷射光以 $650 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 的強度照射 30 分鐘，燈被放置在樣品上方 8.5 cm 的距離處，以避免過熱。之後，將 100 μL 處理過的菌液(未稀釋及連續稀釋至 $\sim 10^4$ 或 $\sim 10^3$ CFU/mL)，以及未經處理的菌液作為對照組均勻接種在 LB 瓊脂中，並在 37°C 下培養24小時，接著計數菌落數，並根據菌落數來評估止血材料的相對抗菌率，相對抗菌率的計算如下式所示：

$$\text{相對抑菌率(\%)} = (N_{\text{Control}} - N_{\text{Sample}}) / N_{\text{Control}} \times 100\%$$

【0043】 上式中， N_{Control} 為暗處細胞組的平均菌落數， N_{Sample} 為樣品組的菌落數，實驗分三次進行。而透過在LB 培養基中培養過夜培養物以獲得密度約為 10^6 CFU/mL的細菌懸浮液，使用無菌拭子將該細菌懸浮液接種到LB瓊脂上，再將實施例1及實施例2的止血材料置於LB(Lysogeny broth)瓊脂上，用660 nm雷射光以強度為 650 mW/cm^2 進行暗溫培養或照射30分鐘。在 37°C 過夜培養後，移除止血材料並控制細菌生長。

【0044】 相對抗菌率直接由LB瓊脂上的活菌菌落數計算而得，經雷射光照射及於黑暗環境培養的菌落圖像如圖8(*S. aureus*)及圖9(*E. coli*)所示。

【0045】 由圖8及圖9可以發現，有雷射光照射或於黑暗環境培養30分鐘後皆顯示出有許多菌落，代表雷射光照射對於細菌活力沒有影響，而所有組別的止血材料在黑暗中培養的均未顯示明顯的抗菌作用。請參照圖10的抑菌率分析，實施例1中未摻雜亞甲基藍的止血材料在照射雷射光後仍未顯示其抗菌能力，然而，實施例2中摻雜有亞甲基藍的止血材料在660 nm光照下照射30分鐘後表現出優異的抗菌能力，其對於金黃葡萄球菌及大腸桿菌的相對抑菌率分別為 $99.95 \pm 0.05\%$ 及 $99.68 \pm 0.55\%$ ，此結果顯示，實施例2的止血材料於照光下可觸發其抗菌光動力。

【0046】 而貼附止血材料的抑菌率是模擬當止血材料應用作為止血貼片時的抑菌情況，其結果如圖11所示，實施例1的止血材料在黑暗裝或光照下對於大腸桿菌生長並無顯著的抑制作用，而實施例2的止血材

料在黑暗中培養時無法確定其抑菌效果，然而於光照之下，明顯地抑制了接種在LB瓊脂上的菌落生長。

【0047】 綜合以上實驗結果，可了解到本發明所提供的止血材料係以冷凍凝膠法所製備，其具有高液體吸收率、優異的生物相容性、且為可生物降解的材料，此外，當該止血材料摻雜有亞甲基藍時及具有抗菌光動能效應，亞甲基藍經光照後會被釋放，並提供抗菌效果，故本案的止血材料貼附於受傷出血處時，可吸收大量的血液及滲出液，並提供抗菌光動能功能，達到止血以及抗菌的效果，且其生物降解特性，可避免自傷口移除止血材料時造成傷口處的二次傷害。

【符號說明】

【0048】

無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種止血材料的製備方法，包括以下步驟：(1) 將一角蛋白溶液與一海藻酸鹽溶液混合以形成一混合物溶液；(2) 於低溫下添加一交聯劑溶液於該混合物溶液中，並藉由冷凍凝膠法使得該混合物溶液凝膠化以獲得一角蛋白-海藻酸鹽複合支架；(3) 將該角蛋白-海藻酸鹽複合支架乾燥以獲得一止血材料；以及(4)中，將一亞甲基藍摻雜於該止血材料中。

【請求項2】 如申請專利範圍第1項所述的製備方法，於步驟(1)中，該角蛋白溶液的濃度為1至10 % (w/v)；該海藻酸鹽溶液的濃度為1至10 % (w/v)，且該角蛋白溶液與該海藻酸鹽溶液以1：1至10：1的比例混合。

【請求項3】 如申請專利範圍第1項所述的製備方法，其中，該亞甲基藍於每克止血材料的摻雜量為100~500 μg 。

【請求項4】 如申請專利範圍第1項所述的製備方法，於步驟(1)中，該角蛋白係萃取於動物毛髮或指甲。

【請求項5】 如申請專利範圍第1項所述的製備方法，於步驟(2)中，該交聯劑為5~10% (w/v)的氯化鈣溶液，其係以乙醇做為溶劑。

【請求項6】 如申請專利範圍第1項所述的製備方法，於步驟(2)中，該冷凍凝膠法係於 -10°C 以下的溫度冷凍至少24小時。

【請求項7】 一種止血材料，由申請專利範圍第1項至第6項中任一項所述之製備方法所製成，該止血材料包括：

一角蛋白-海藻酸鹽複合物；

其中，該角蛋白-海藻酸鹽複合物係由一角蛋白與一海藻酸鹽藉由一鈣離子交聯而成。

【請求項8】 如申請專利範圍第7項所述的止血材料，更包括一亞甲基藍。

【請求項9】 如申請專利範圍第7項所述的止血材料，其中，該止血材料的孔隙度為60~70 %。

【請求項10】 如申請專利範圍第7項所述的止血材料，其中，該止血材料的液體吸收度為1500~3000 %。

【發明圖式】

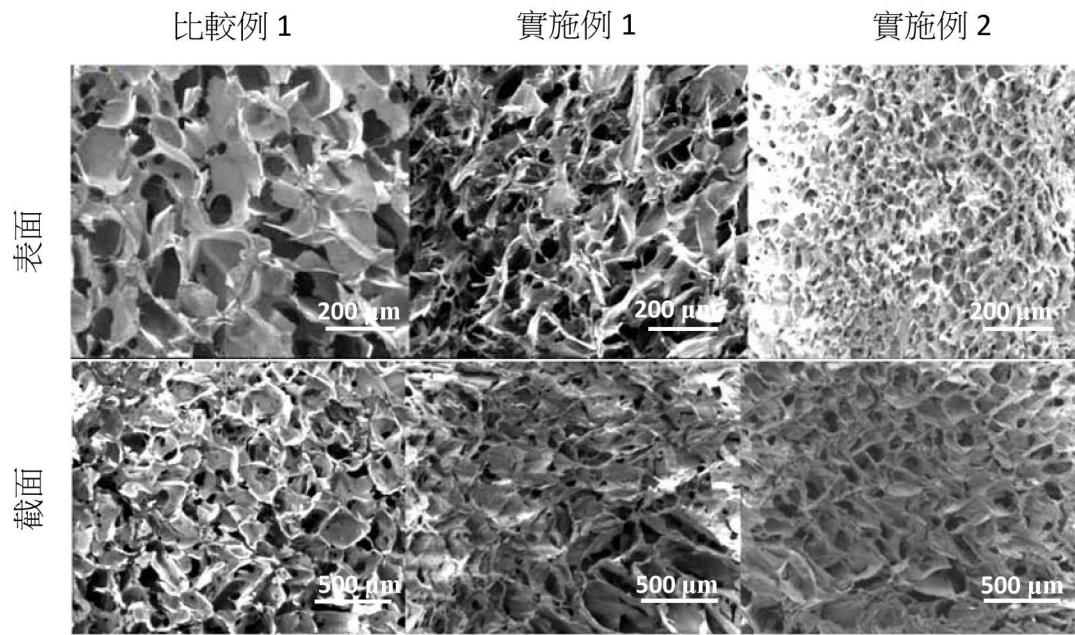


圖 1

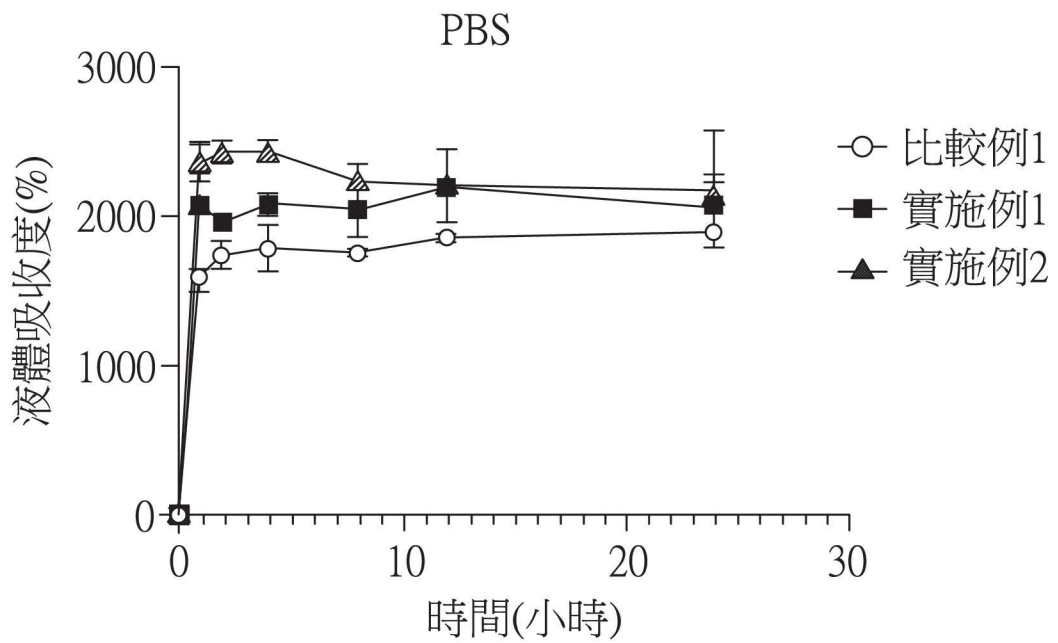
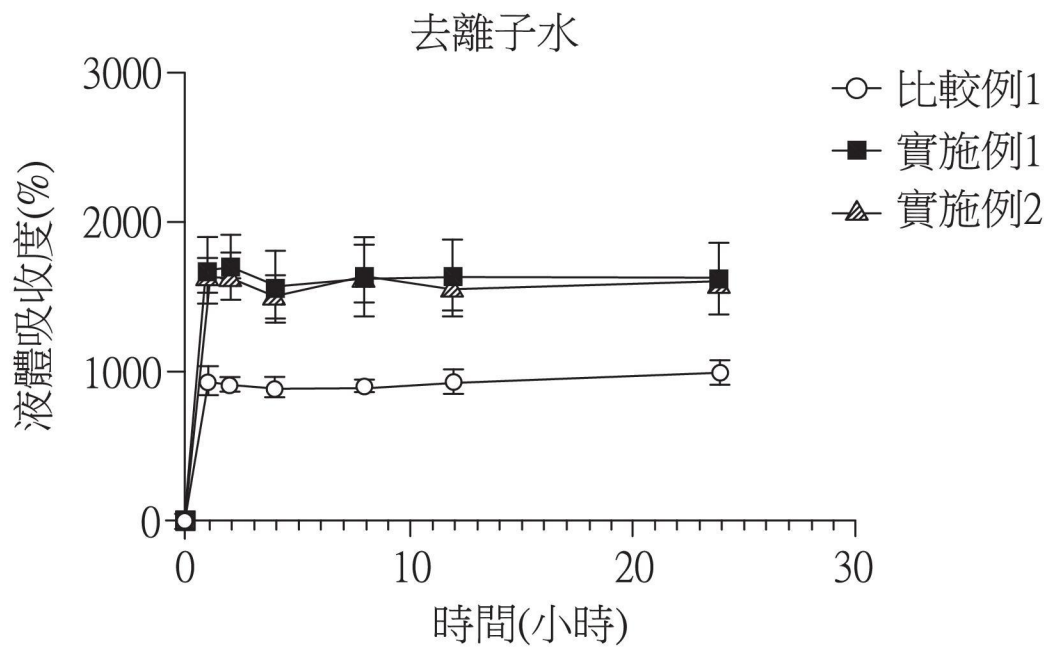


圖2

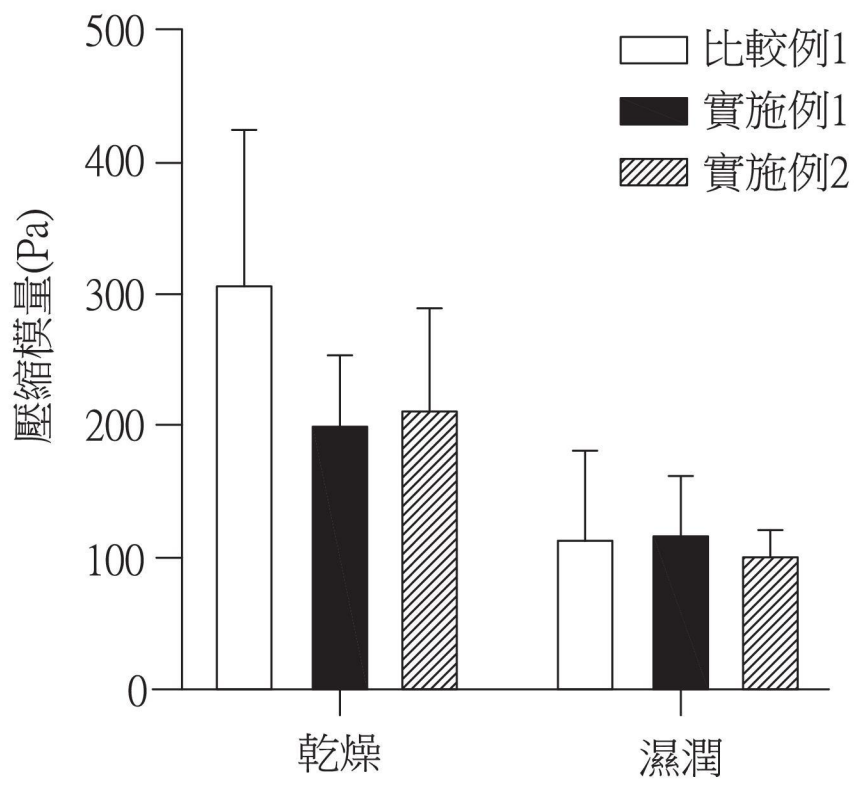


圖3

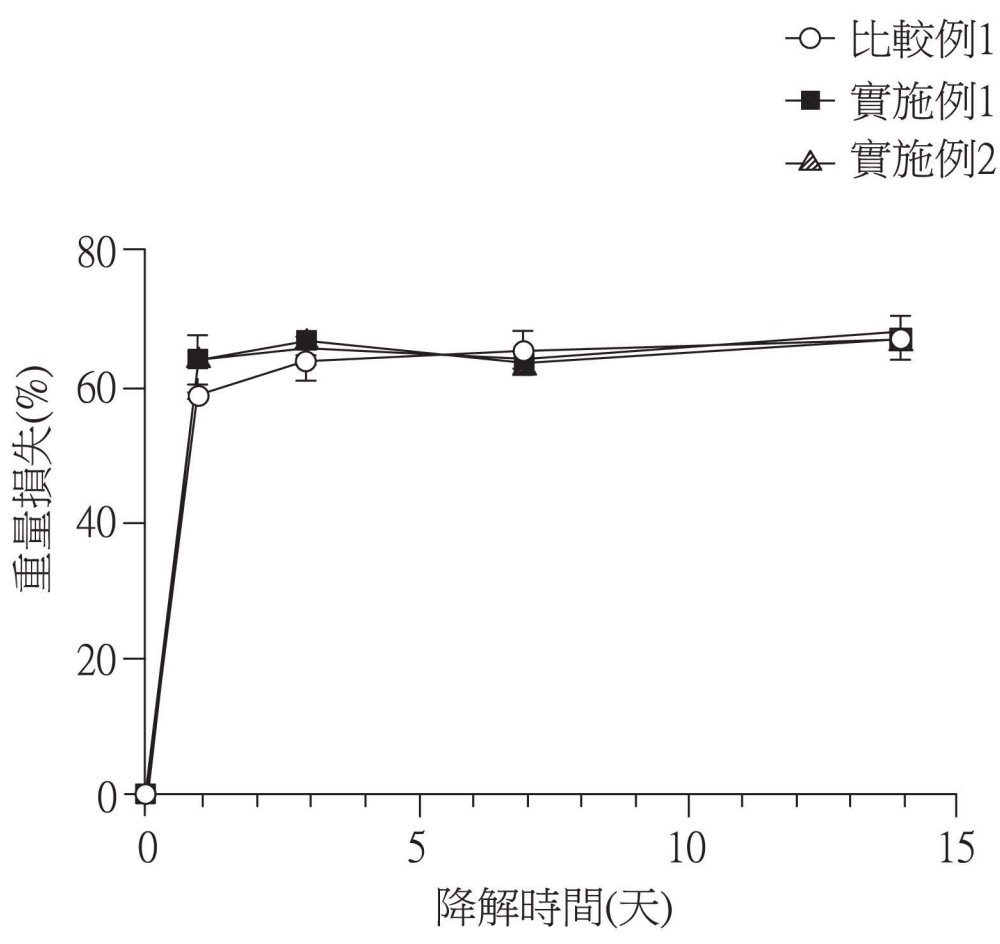


圖4

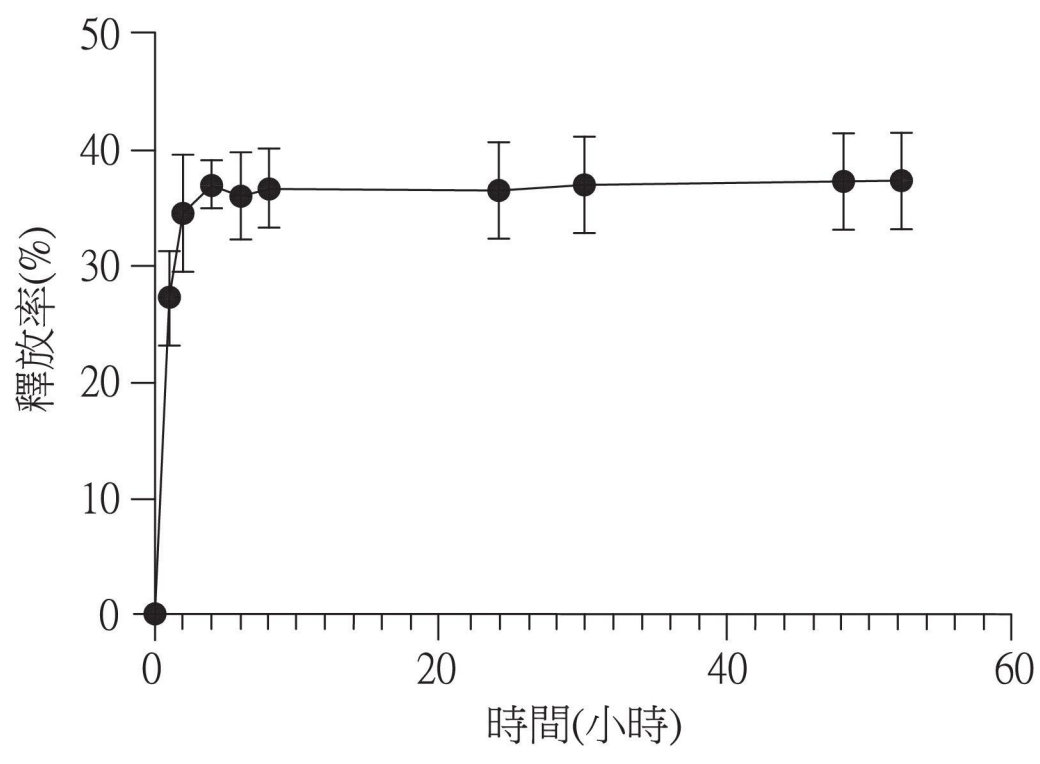


圖5

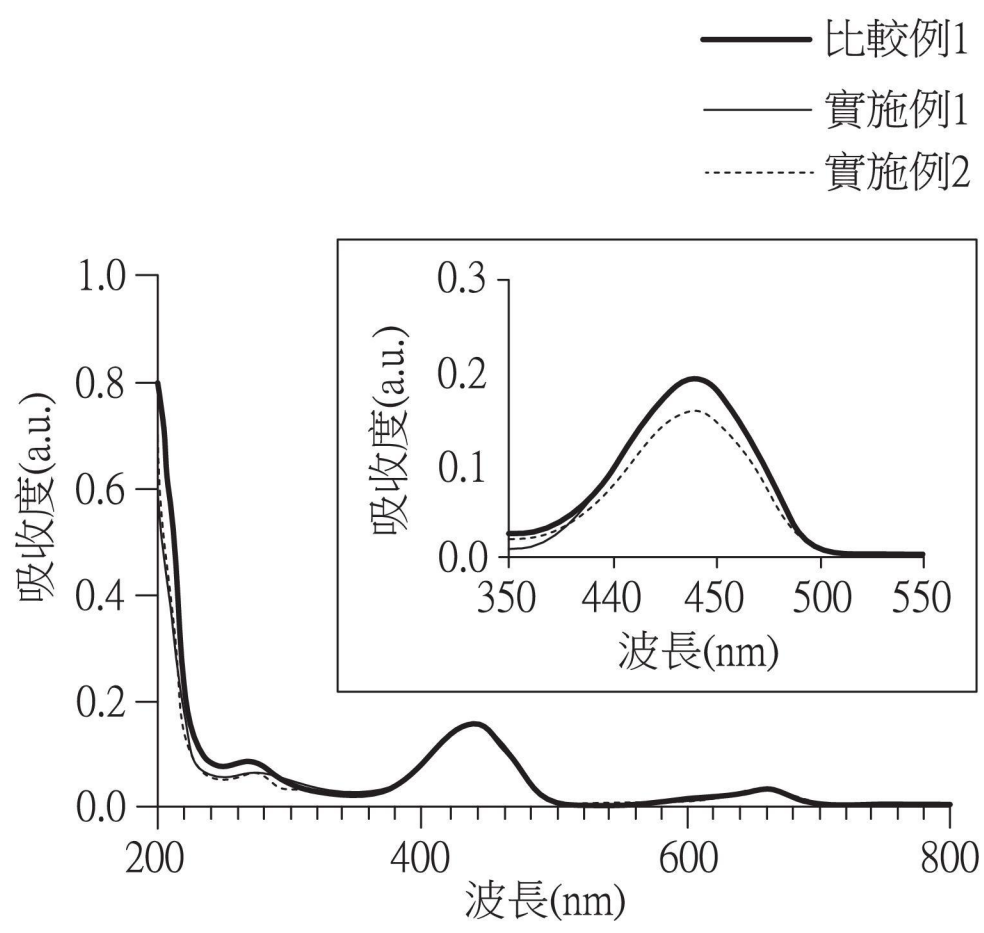


圖6

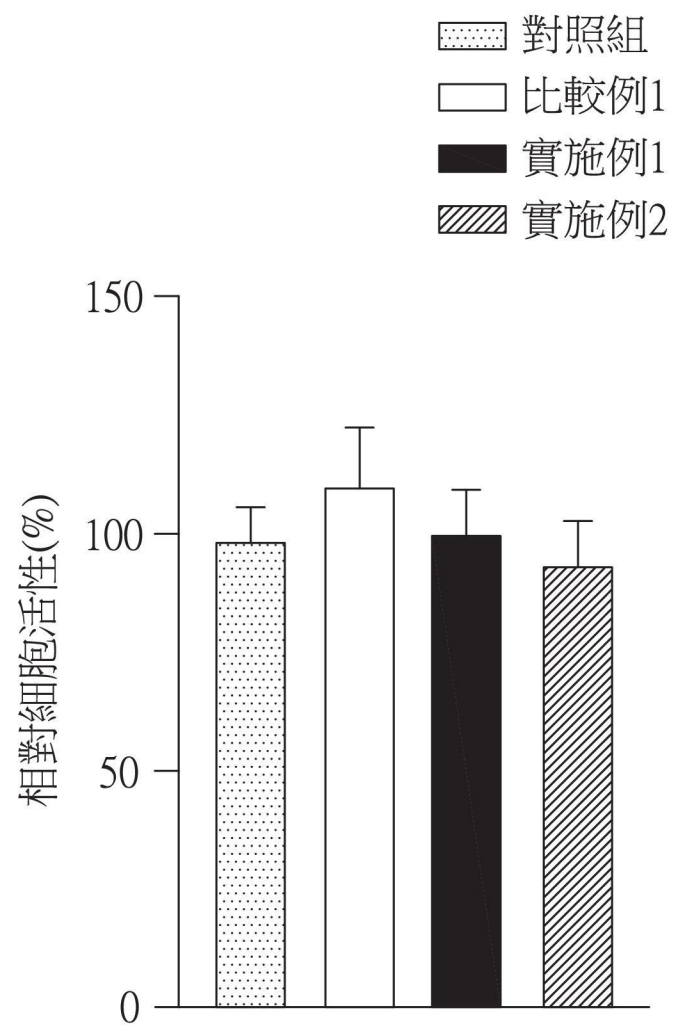


圖7

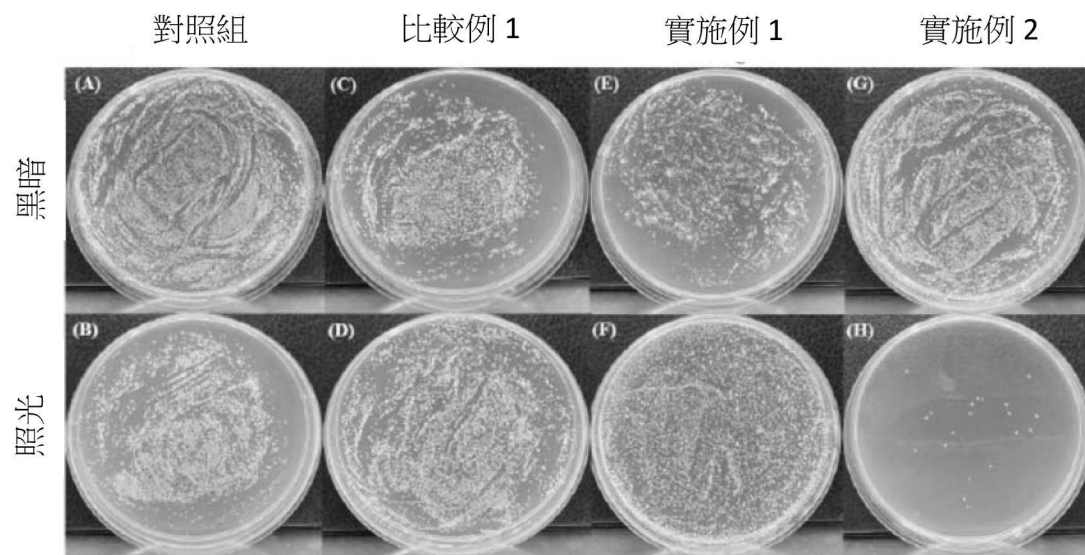


圖 8

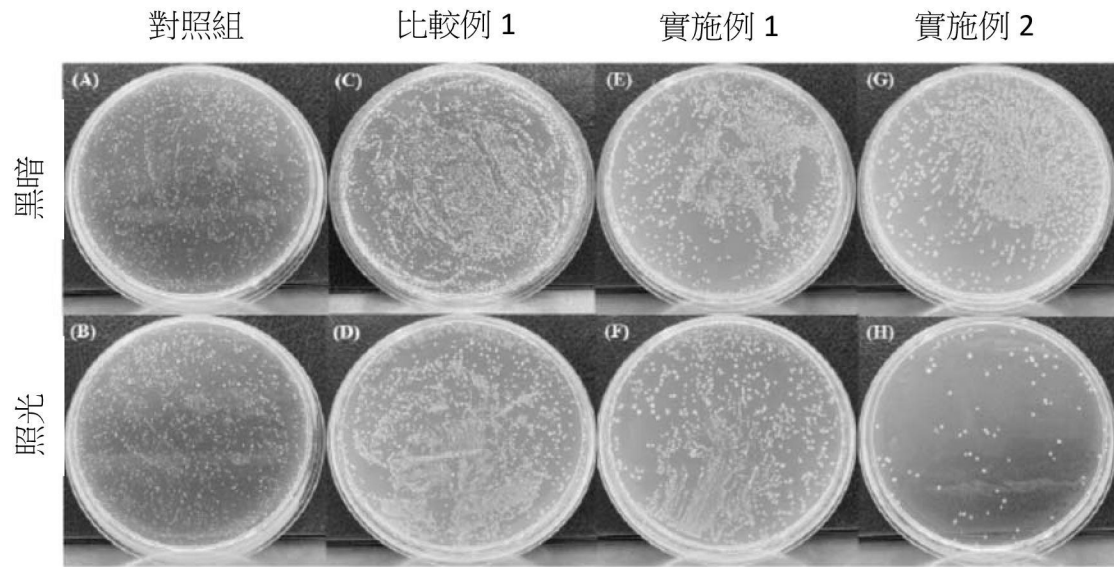


圖 9

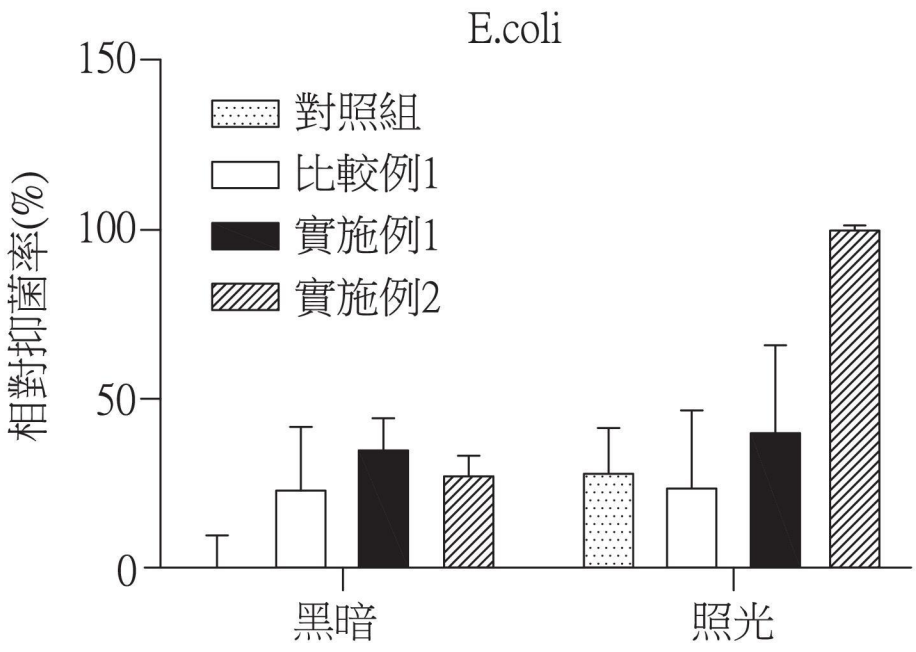
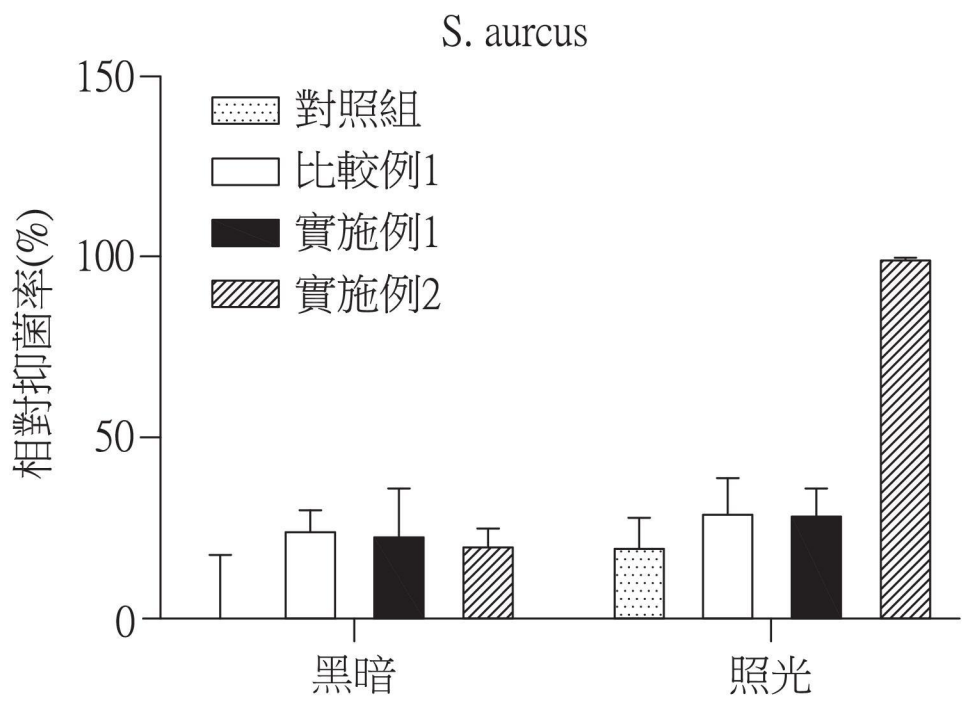


圖10

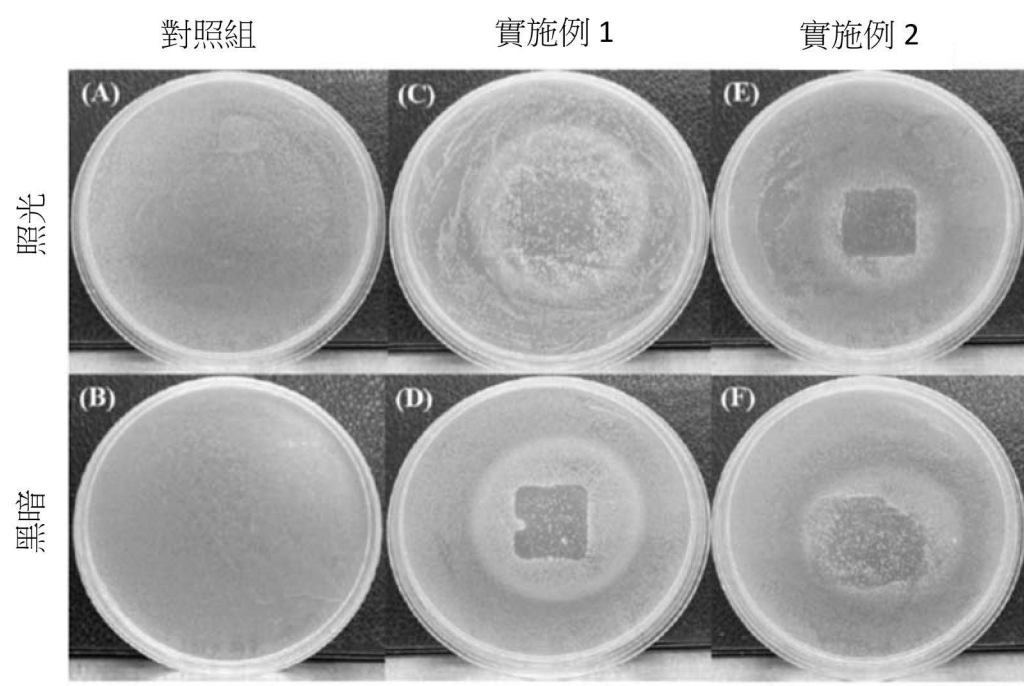


圖 11