

計畫編號：DOH89-TD-1044

行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度

科技研究發展計畫

市售幾丁質類保健食品之安全性評估

研究報告

執行機構：國立台灣海洋大學食品科學系

計畫主持人：黃登福

研究人員：黃登福、蔡玉霞、鐘秋燕

執行期間：88年7月1日至89年6月30日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目錄

中文摘要	1
英文摘要	2
前言	3
材料與方法	6
結果	12
討論	14
結論與建議	16
參考文獻	17
圖表	20

中文摘要

市售幾丁質類產品之標示，經調查顯示尚有部份產品未符合食品衛生法之規定。產品中重金屬之殘留量並無問題。而且產品隨著去乙醯度之提高，其單體葡萄糖胺含量就增加。另外，以鹽酸鹽和硫酸鹽兩種不同型態之葡萄糖胺 0, 0.25, 0.5, 和 1.0%劑量餵食老鼠八週，檢測老鼠成長、血球和肝、腎臟功能之生化指標，顯示任何劑量對上述指標均無不良影響。但即使 0.25%葡萄糖胺之劑量，對老鼠之活動性亦會產生抑制作用，經探討其原因，可能係葡萄糖胺抑制胰島素之分泌而降低血糖值所致，或抑制肌酸磷酸激酶之活性，使肌酸磷酸鹽之能量無法正常代謝運用所致。因此建議消費者每人每天之食用安全量為 150 mg。而幾丁質類產品中之葡萄糖胺含量，假若每日食用一粒時，建議應低於 10%。

關鍵字：幾丁質產品，幾丁聚糖，葡萄糖胺，食用安全性。

英文摘要 (Abstract)

Recently, the chitinous products have been accepted by consumer as healthy products. To know the quality and label of these products, 21 samples were collected from common markets. It was found that a few samples had no label for manufacture date or expense date or functional expound. The level of heavy metals inducing Cu, Pb and Cd was not detected in these chitinous samples. The degree of deacetylation was quite different depending on different products. It was found that the level of glucosamine was increased in increasing the deacetylation degree in the chitinous products, except for glucosamine product. To certify again the edible safety of glucosamine for human, the animal test was carried out. The male Wistar rats were fed diets with different levels (0, 0.25, 0.5 and 1.0%) of glucosamine for 8 weeks. The results indicated that glucosamine showed no harmful effects on the growth, functions of liver and kidney, and characteristics of blood cells in the rats. However, even 0.25% glucosamine reduced the behavior activity, the levels of plasma glucose and plasma creatinine, and the activity of plasma creatine phosphate kinase in the rats. The daily edible dose of glucosamine for human was supposed as 150mg. The limit of glucosamine in the chitinous products was supposed as below 10%.

Key words: chitinous products, chitosan, glucosamine, food safety

前言

幾丁質類產品如幾丁質(chitin)、幾丁聚醣(chitosan)和幾丁寡醣(oligo chitosan)為多功能之天然素材，取自於甲殼類，昆蟲類和菌類如靈芝等天然物中，目前為全世界各國積極研究之產品，這類產品已被開發應用於紡織業、環保業、醫藥業、食品業、農業和化妝業等各項產業中[7, 8]，在 1995 年亞太幾丁質、幾丁聚醣會議中，即有人估計世界產量約為 83 萬公噸，產值約 20 億美元。幾丁質類之功能，已知幾丁質和幾丁聚醣在體外具有吸附蛋白質、重金屬和有機毒物之作用[1, 12, 21]，亦具有抗菌之作用[10]，其次其在老鼠體內具有降低三甘油脂和膽固醇之作用[14, 15]，因此被視為食品機能性成分。另外，幾丁聚醣和幾丁寡醣特別是六醣，已知具有非特異性之免疫效果[9, 17, 19]。因此幾丁質類產品，在市面上被傳銷公司宣傳成具有神效之健康食品，然而幾丁質類產品之食用安全性，歷年來學者諸說紛紜，有人指出 10%幾丁聚醣之添加量對老鼠成長並不造成不良影響[4]，但 Sugano et al. [15]指出 10%幾丁聚醣會使老鼠成長降低，而 Vahouny [20]指出 5%之幾丁聚醣亦會使老鼠成長受到不良影響。最近我們探討不同去乙醯度之幾丁質類產品之食用安全性，才發現幾丁質(一般去乙醯度約為 50%以下)之食用安全性，即使 10%之使用量，對老鼠之成長、血液特性和肝腎功能皆不會造成不良之影響，但去乙醯度提高為 75%之幾丁聚醣(一般

而言，去乙醯程度大於 50%以上者謂之幾丁聚醣，以下者謂之幾丁質)，則其 10%含量者對老鼠之血液特性會造成不良影響，故建議其食用安全劑量為 5%。而去乙醯度為 92%之幾丁聚醣，則 5%以上含量則對老鼠之血液特性、肝功能和腎功能皆有不利之影響，因此建議其食用安全劑量為 2.5% [6]。顯示幾丁聚醣產品，隨著去乙醯度之提高，其食用安全性越須加以規範。因此對於市售食用性之幾丁聚醣產品，其去乙醯度須做檢測評估。其次，幾丁質類產品之製造，通常使用酸鹼來處理，因此產品中重金屬之殘留量值得注意，研究室前曾分析幾丁質類產品在不同製造階段之成品中重金屬含量，發現其間變異性很大，尤其從 Sigma 公司購買之幾丁質，更發現其含有高量之 Fe 成分（產品甚至含有鐵粉似的），推測其可能來源為研磨幾丁質產品時，因機械磨損殘留所致。因此幾丁質類產品除本身具有吸附重金屬之功能外，其在製造過程中，亦可能有重金屬污染之可能性，所以對於食用化幾丁質類產品的重金屬含量，則須加以檢測。

另外，幾丁質類產品多數係使用酸鹼處理，少數使用微生物酵素法，但不管何種方法，產品都會有單體葡萄糖胺(glucosamine)產生。最近我們發現，葡萄糖胺之食用安全性值有顧慮，在初步的實驗中，發現在 2.5%以上添加量時，對老鼠之血液特性和肝腎功能均會產生傷害，而且老鼠一旦攝食了葡萄糖胺，其行動就顯現緩慢遲鈍。因此為建立市售食用幾丁質類產

品之安全性，其中葡萄糖胺之殘留量則有待加以檢測。由於幾丁質類產品之食用安全性，以葡萄糖胺為最被顧慮，因此擬近一步探討葡萄糖胺引起老鼠行動緩慢之機制，及葡萄糖胺在生體內可能引起之生化學障礙，以做為重新評估其食用安全性之依據，以及政府規範幾丁質類保健食品之依據用。

材料與方法

(一) 材料

1. 幾丁質類保健食品之採集：自民國 88 年 7 月至 10 月透過傳銷公司和經銷商（如屈臣氏）系統組織採購幾丁質類保健食品，每一公司採樣 2-3 件（瓶），共計 21 件。
2. Glucosamine HCl 購自 Sigma 公司(U.S.A.)，純度為 99 % 以上。
3. Glucosamine sulfate 購自信東公司(Taiwan)，純度為 99 % 以上。
4. Glucosamine 及 Acetylglucosamine 標準品，均購自 Sigma 公司(U.S.A.)。
5. LiChrospher 100 RP-18 reverse-phase column (5 μ m, 125 x 4 mm i.d.)購自 Merck 公司(Germany)。

(二) 方法

(1) 產品檢測：

1. 標示檢查

檢查每件檢體其品名、製造廠、生產日期、使用期限、食用方法、機能說明和材料組成等項目之標示與否。

2. 重金屬之測定[11]

取 0.5g 樣品置入 LDV(lined digestion vessels)消化瓶中，加 20 倍濃硝酸以 MDS-2000 型微波消化爐消化分解至分解呈無色或淡黃色，然後冷卻以去離子水定容至 50ml，於原子吸光儀(Hitachi Z-8100 Polarized Zeeman Atomic Meter)測定重金屬之含量。

3. 去乙醯度之測定

依紅外線光譜法測定[3]，即將樣品粉末與 KBr 以 1:100 之比例均勻混合，充分乾燥後，製成錠片，再以紅外線光譜儀 (FTIR spectrometer, Model FTS-155, Bio-Rad, U.S.A.) 進行測試，並以下列方程式計算去乙醯度：

$$\text{去乙醯度 (\%)} = 100 - (A_{1655}/A_{3450}) \times 115$$

A_{1655} : Amide I 在 1655cm^{-1} 之吸收值

A_{3450} : O-H bond 在 3450cm^{-1} 之吸收值

4. Glucosamine 殘留量之檢測

樣品細碎後，以二次去離水抽出 glucosamine，依生物胺之衍生法將之衍生化後，再以高效能液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC)，進行分析[5]。

HPLC 之分析條件：

Pump: model L-6200 pump

注射器：rheodyne model 7125 syringe loading sample injector

層析管柱：LiChrospher 100 RP-18 reverse-phase column ($5\mu\text{m}$, $125 \times 4\text{mm}$ i.d.)。

移動相：甲醇-水之比例為 50:50(v/v)。

流速：0.8ml/min

偵測器：model L-4000 UV-VIS detector(波長設在 254nm)。

積分器：model D-2500 chromato-intergrator

(2) 動物實驗

實驗用動物老鼠依體重隨機分組，每組 6 隻，分別飼養於不銹鋼籠中。動物室內溫度維持在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，50-60 % 相對溼度，以自動定時器控制光照週：0700-1900 為光照期 (light period)，1900-0700 為黑暗期 (dark period)，保持 12 小時的日夜照明循環。飼料與飲水 (蒸餾水)採自由攝取方式，每天給予新鮮飼料 (表 4, 5)，飼養期共計八週。實驗期間每隔 2 週秤重，並在 2、4 和 6 週後將老鼠禁食 10 小時，以乙醚麻醉，利用尾巴靜脈抽血分析 (針筒以抗凝血劑潤濕，heparin 500 IU/ml saline, Sigma)，經給飼料八週後，禁食 12 小時，禁食期間仍照常飲水，隔天稱重後以乙醚麻醉解剖，由腹大動脈抽血做以下分析。

1. 血液樣品之前處理

抽出之血液分別放入試管 A (含少量 heparin)和試管 B (不含任何物質)。試管 A 立即緩慢搖勻後，以血球分析儀 (Cell Hematology Analyzer, DYN 500, Sequoia-Turner, U.S.A.)測定 red blood cell (RBC)、hemoglobin (Hgb)、white blood cell (WBC)和 hematocrit (Hct)。試管 B 立即以離心機於 $3000 \times g$ 下離心 10 分鐘，離心後取上層液，即血漿，供作下列分析。

2. 飼料轉換率(feed conversion ratio, FCR)

實驗期間，老鼠每增加一克體重，所攝食的飼料乾物重。計算公式如下：

$$\text{FCR} = \text{Feed intake(g)} / [\text{Final body weight(g)} - \text{Initial body weight(g)}]$$

3. 血漿之分析

(1) Aspartate transaminase (AST)之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 AST 的活性。原理是利用 2-oxaloacetate 與 l-aspartate 在 AST 的催化下，會形成 glutamate 和 oxaloacetate，而 oxaloacetate 與 $\text{NADH}+\text{H}^+$ 在 malate dehydrogenase (MDH) 之氧化作用下形成 malate 和 NAD^+ 。NADH 在 340nm 有較高的吸光值，經酵素變成 NAD^+ 後吸光值降低，在 340nm 波長下測定吸光值降低速度即可算出 AST 的活性。

(2) Alanine transaminase (ALT)之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 ALT 的活性。原理是利用 l-alanine 與 α -keto-glutarate 在 ALT 的催化下，會形成 glutamate 和 pyruvate，而 pyruvate 與 $\text{NADH}+\text{H}^+$ 在 lactate dehydrogenase (LDH) 之氧化作用下形成 lactate 和 NAD^+ 。NADH 在 340 nm 有較高的吸光值，經酵素變成 NAD^+ 後吸光值降低，在 340 nm 波長下測定吸光值降低速度即可算出 ALT 的活性。

(3) Alkaline phosphatase (ALP)之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 alkaline phosphatase 的活性。原理是利用 4-nitrophenyl phosphate 和 H_2O 在 alkaline phosphatase 作用下水解成 4-nitrophenol 和 phosphate，4-nitrophenol 在 405 nm 下有特定之吸光。

(4) Blood urea nitrogen (BUN)之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 BUN 的活性。原理是利用 urea 和 H_2O 在 urease 作用下，會形成 NH_4^+ 和 CO_2 ，而 NH_4^+ 與 2-oxaloacetate、 $\text{NADH}+\text{H}^+$ 在 glutamate dehydrogenase 催化下形成 l-glutamate 和 $\text{NAD}^++\text{H}_2\text{O}$ 。在 340nm 波長下測 $\text{NADH}+\text{H}^+$ 之吸光值衰變程度，即可換

算出 BUN 之含量。

(5) Creatine-phosphate kinase (CK)之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定的含量 creatine-phosphate kinase。原理是利用 phosphocreatin 與 ADP 在 CK 的催化下，會形成 creatin 和 ATP，而 ATP 與 D-glucose 在 hexokinase (HK) 之催化下形成 ADP 和 D-glucose-6-phosphate (D-G-6-P)。G-6-PDH 進一步催化 D-G-6-P 及 NADP^+ 形成 D-G-6-P、 H^+ 與 NADPH。 NADP^+ 在 340nm 有較低的吸收值，經酵素轉變成 NADPH 後吸收值增加，在 340nm 波長下測定吸收值增加速度，即可算出 CK 的活性。

(6) Creatinine 之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 creatinine 的含量。原理是利用 creatine 和 picric acid 在鹼性環境下，會形成橘黃色之 creatine-picrate 之錯化合物，此物質在 510 nm 下有特定之吸光。

(7) Glucose 之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 glucose 的含量。原理是利用 β -D-glucose 與 NAD^+ 經由 glucose-DH 作用生成 D-gluconolacton、NADH 與 H^+ 。 NAD^+ 在 340nm 有較低的吸收值，經酵素轉變成 NADH 後吸收值增加，在 340nm 波長下測定吸收度增加量，即可算出 glucose 的量。

(8) Plasma iron 之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 plasma iron 的含量。原理是在酸性下，使血清含 transferrin 的 Fe 游離出，再以還原劑維生素 C 還原 Fe^{3+} 成 Fe^{2+} ，最後 Fe^{2+} 與呈色劑 ferrozine 結合產生複合物，以 560nm 比色。

(9) Plasma calcium 之測定

採用 Merck 藥品公司配製的 enzymatic kit，測定 plasma calcium 的含量。原理是：血清鈣在鹼性液下與 OCPC(ortho-cresolphthalein complexon) 作用形成紫色的複合物，以 575nm 波長比色。試劑加入 8-hydroxyquinoline 可防止鎂的干擾。

4. 統計分析:

實驗數據以變異數分析 (analysis of variance procedure) 測試各實驗組間是否有差異，若有差異再以鄧肯式多變域測驗 (Duncan's new multiple range test) 做進一步分析[13]。

結果

市售幾丁質類產品之標示如表 1 所示，21 件產品均有標示產品名稱、製造者、使用法和組成，但製造日期和功能說明尚有多件產品未予以標示，其中一件則製造日期和可使用日期同時未予以標示，顯示市售幾丁質類產品，尚有少數部分產品未符合衛生管理法中之產品標示規定。

市售幾丁質類產品之重金屬含量如表 2 所示，顯示產品中之鋅(Zn)和鐵(Fe)含量較高外，其他重金屬銅(Cu)，鉛(Pb)和鎘(Cd)都在檢出量(10ppb)以下，顯示市售幾丁質類產品中，並無重金屬殘留之疑慮。

市售幾丁質類產品之去乙醯度和單體葡萄糖胺含量如表 3 所示，顯示第 10 號樣品之去乙醯度未達 50%及第 7 號樣品檢不出去乙醯度以外，其它產品之去乙醯度均達 50%以上，屬幾丁聚醣(Chitosan)產品，第 10 件產品應屬於幾丁質(Chitin)產品，而第 7 件產品因標示為葡萄糖胺產品，故未檢出去乙醯度。其次，葡萄糖胺含量則因樣品之不同而差異很大，其中第 7 號產品因標示為葡萄糖胺產品，故其含量特別高 86.4%，其它產品之葡萄糖胺含量，則似乎有隨去乙醯度越高而含量越多之趨勢，顯示高去乙醯度之幾丁聚醣，其去乙醯度越高，其單體葡萄糖胺被解離就越多。

給予老鼠不同比例的葡萄糖胺飼料，經過八週的飼養後，各組老鼠的成長顯示均無差異，顯示 1%以下之葡萄糖胺，不管是鹽酸鹽或硫酸鹽，對老鼠成長並無不利之影響。肝體比(hepatosomatic index)、腎體比和飼料轉換率等指標，亦顯示不同比例的葡萄糖胺飼料餵予老鼠八週，各組葡萄糖胺添加組亦均與控制組者無明顯差異(表 7)。其次，葡萄糖胺對大鼠血液中紅血球、白血球、血比容和血紅素等指標如表 8-11 所示，其中紅血球和血比容在老鼠養前四週，添加葡萄糖胺者均較控制組者高，第 6 週後即

回復正常，另外，白血球和血紅素之變化不定，因此整體而言，不同型態之葡萄糖胺對老鼠之血球特性並無顯著影響。然而由老鼠之行動顯示，餵食葡萄糖胺組者均變得遲鈍而沒有活動性。

其次，不同型態葡萄糖胺對血漿中鐵(Fe)和鈣(Ca)濃度之影響如圖 1, 2 所示，顯示不同型態之葡萄糖胺對血漿中之鐵和鈣濃度均無影響。但另一方面，血漿中之葡萄糖濃度則顯著被葡萄糖胺所影響（圖 3），同時不同型態之葡萄糖胺，其影響尚有差異。

另一方面，在臨床生化檢驗中，血漿之 AST、ALT 和 ALP 的酵素活性，為肝臟功能之重要指標。不同型態之葡萄糖胺對老鼠血漿中 AST、ALT 和 ALP 之影響如表 12-14 所示，顯示葡萄糖胺對老鼠之肝功能並無顯著之影響。

葡萄糖胺對老鼠之腎功能的影響如表 15 和圖 4 所示，發現老鼠血漿中之尿素氮並未受葡萄糖胺顯著的影響，但血漿中之肌酸酐 creatinine 顯著下降。另外，血漿中肌酸磷酸激酶(creatine kinase)之活性亦顯著受到葡萄糖胺之抑制（表 16），但不同型態之葡萄糖胺對肌酸磷酸激酶活性之抑制性差異不大。

綜合上述成果，不同型態之葡萄糖胺對老鼠成長、肝和腎功能、血球特性等均無顯著影響，為對老鼠之活動性會顯著降低，對血漿中之 glucose 和 creatinine 含量和肌酸磷酸激酶活性會降低。顯示即使少量(0.25%)食用葡萄糖胺，老鼠亦會降低活動性，其原因可能是葡萄糖胺抑制了胰臟中 insulin 之排放，因而降低血糖含量，或因葡萄糖胺抑制了肌酸磷酸激酶之活性，因而降低能量之消耗代謝所致。

討論

前報[6, 16]指出，幾丁質（去乙醯度 50%以下）產品之食用安全建議劑量在 10%以下，幾丁聚醣去乙醯度 75%以上產品者為 5.0%，但去乙醯度 75%以上者為 2.5%。另外，葡萄糖胺之食用安全建議量，在另一前報[8]指出，在不影響血液特性和肝腎功能指標之劑量為 1%以下，但老鼠即使餵食 1%之葡萄糖胺，其外觀行動亦顯現遲鈍。因此才繼續進行本研究，以探討 1%葡萄糖胺之食用安全性。經上述以上二種不同型態（鹽酸鹽和硫酸鹽）之葡萄糖胺飼養老鼠八週，仍發現即使 0.25%之葡萄糖胺劑量，對老鼠之行動產生抑制作用，經一併分析各項指標，發現 1%以下之葡萄糖胺對老鼠肝腎功能、成長和血球特性等並無不良影響，唯發現即使 0.25%之葡萄糖胺，即會對血漿中葡萄糖和肌酸酐之含量，以及肌酸磷酸激酶之活性產生抑制作用，因此推測葡萄糖胺所引起之老鼠不活動性現象，可能係葡萄糖胺抑制了胰島素分泌而產生低血糖症狀，另一方面則是葡萄糖胺抑制了肌酸磷酸激酶之活性，使肌肉中能量之來源肌酸磷酸鹽無法進行正常代謝，導致能量供給降低而產生不活動性化作用。因此嚴格而言，葡萄糖胺不應視為保健食品。雖然葡萄糖胺已被應用於關節炎和關節痛之治療藥，唯正常人攝食後會有導致活動性降低之可能性，因此建議葡萄糖胺應列入醫藥品管理，而不應列入保健食品管理。

其次，由市售幾丁質類產品之分析發現，隨著去乙醯度高之幾丁聚醣，其葡萄糖胺之含量亦增加。由上述動物實驗可知，0.25%葡萄糖胺即會使動物之活動性降低，因此推估老鼠之食用安全劑量為 $25\text{g} \times 0.25\% \times 1000\text{g}/250\text{g} = 250\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{day}$ ，人類之食用安全劑量為 $250\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{day} \times 60\text{kg} \times 1/100 = 150\text{mg}/\text{day}$ 。即每人每天最大攝食量為 150mg。市售幾丁質類產品通常以錠劑或膠囊販賣，每粒 1.5g，假若廠商建議消費者每日吃一粒，

因此產品中含葡萄糖胺量最好不超過 10% ($150\text{mg}/1.5\text{g} = 10\%$)。因此對於幾丁質類產品，建議其葡萄糖胺含量在 10% 以下，否則應標示“對消費者之活動性會有降低作用”之警告語。

結果與建議

1. 市售幾丁質類產品之標示尚有部分未符合食品衛生法之規定。
2. 市售幾丁質類產品目前無重金屬殘留問題，但其去乙醯度差異很大，同時去乙醯度高之產品，其葡萄糖胺含量就高。
3. 經由動物之食用安全性試驗發現，葡萄糖胺之食用安全性須重新檢討，因為少量之葡萄糖胺，對老鼠之活動性即產生抑制作用。
4. 建議人類食用葡萄糖胺之安全劑量為每天每人 150mg，另幾丁質類產品中之葡萄糖胺含量，假若每日食用一粒，建議應低於 10%。

參考文獻

1. 方紹威，1990. 幾丁質與幾丁聚醣在廢水處理、生化、食品和醫藥上之研究發展現況。藥物食品檢驗局調查研究年報，8，20-30。
2. 張玉權，1987. 草蝦類中幾丁質類產品的製備方法、理化性質及應用。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
3. Baxter A., M. Dillon, K.D.A. Taylor and G.A.F. Roberts, 1992. Improved method for IR determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 14, 166-169.
4. Furda I., 1983. Aminopolysaccharides : Their potential as dietary fiber. In : ALS Symposium series : unconventional sources of dietary fiber, physiological and functional properties. ALS Symposium series, American Chemical Society, Washington, DC, 105-122.
5. 陳福智，1999. 幾丁寡醣之高效能液相層析分離及葡萄糖胺苯甲醯化之探討。國立台灣海洋大學碩士論文，基隆。
6. Hwang D.F., M.Y. Lin and C.Y. Chung, 1998. Evaluation of food safety for chitin and chitosan. In " Advances in Chitin Science Vol. III " (eds. by Chen R. H. and C. C. Hsing), Rita Advertising Co. LTD, Taipei, pp. 356-361.
7. Knorr D., 1984. Use of chitinous polymers in food-A challenge for food research and development. *Food Tech.*, 38, 85-97.
8. 黃登福，1998. 幾丁質類產品之食用安全性檢測及其對生物體解毒能力之影響-III。國科會 87 年度專題研究計畫成果報告，台北。
9. Lehou J.G and F. Grondin, 1993. Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology*, 132, 1078-1084.
10. Leuba J.L. and P. Stossel, 1986. Chitosan and other polyamines : Antifungal

- activity and interaction with biological membranes. In : Chitin in Nature and Technology (ed. By Muzzarelli, R.A.A. et al.) ,Plenum Press, New York, pp.215 – 222.
- 11.Liang W. P., D.F. Hwang, S.S. Chou and S.S. Jeng, 1998. Levels of heavy metals in the small abalone (*Haliotis diversicolor*) and its feed red algae (*Gracilaria uerrucosa*) . Food Science, 25, 117-127.
 - 12.Muzzarelli R.A.A., M. Weckex, O. Filippini and F. Sigon, 1989. Removal of trace metal ions from industrial waters, nuclear effluents and drinking water, with the aid of cross-linked N-carboxymethyl chitosan. Carbohydr. Polym., 11, 293-306.
 - 13.Puri S.C. and K. Mullen, 1980. Multiple comparisons. In : Applied Statistics for Food and Agricultural Scientists (ed. By Hall, G.K.) , Medcal Publishers, Boston, MA, pp.146-162.
 - 14.Sugano M., T. Fujikawa, Y. Hiratsuji and Y. Hasegawa, 1978. Hypocholesterolemic effects of chitosan in cholesterol-fed rats. Nutr. Rep. Int., 18, 531-537.
 - 15.Sugano M., T. Fujikawa, Y. Hiratsuji, R. Nashima, N. Furuda and Y. Hasegawa, 1980. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. Am. J. Chin. Nutr., 33, 387-793.
 - 16.林美芸，1996。幾丁質與幾丁聚糖之食用安全性及幾丁聚糖對銅在大白鼠毒作用之影響。國立台灣海洋大學碩士論文，基隆。
 - 17.Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki and K. Suzuki, 1986. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexose. Carbohydr. Res., 151, 403-408.
 - 18.Thome J. P., J.L. Hugla and M. Weltrowski, 1992. Affinity of chitosan (ed. by L.J. Brine and P.A. Sandford) , Elsevier Science Publishers, London,

pp.639-647.

19. Tokura S., I. Saiki, J. Murada, T. Malabe, Y. Tsuta and I. Azumu, 1992. Inhibition of tumor-induced angiogenesis by sulfonated chitin derivatives. In : *Advances in Chitin and Chitosan* (ed. by C.J. Brine and P. A. sandford), Elsevier Science Publishers, London, pp.87-95.
20. Vahouny G.V., S. Satchithanandam, M.M. Cassidy, F. B. Lightfoot and I. Furda, 1983. Comparative effect of chitosan and cholestyramine on lymphatic absorption of lipids in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.*, 38, 278-284.
21. Uraki Y., T. Fuji, T. Matsuoka, Y. Miura and S. Tokura, 1993. Site specific binding of calcium ions to anionic chitin derivatives. *Carbohydr. Polym.*, 20, 139-143.

Table 1. Labeling in chitinous products

Sample No.	Product name	Producer or saler	Date of manufacture	Date of expense	Suggested using method	Functional expound	Composition of ingredient
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	+	+	+
3	+	+	-	+	+	+	+
4	+	+	-	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	-	+
6	+	+	+	+	+	-	+
7	+	+	-	+	+	+	+
8	+	+	-	-	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	-	+
11	+	+	+	+	+	-	+
12	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	-	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	-	+	+	-	+
16	+	+	-	+	+	+	+
17	+	+	-	+	+	+	+
18	+	+	-	+	+	-	+
19	+	+	-	+	+	+	+
20	+	+	-	+	+	+	+
21	+	+	-	+	+	+	+

+: Label; -: Non-label.

Table 2. The level of heavy metals of chitinous products

Sample NO.	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Pb (ppm)	Fe (ppm)	Cd (ppm)
1	100.82	ND* ¹	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	362	ND
3	15.03	ND	ND	ND	ND
4	15.26	ND	ND	ND	ND
5	23.47	ND	ND	1020	ND
6	16.44	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	87	ND
9	ND	ND	ND	59	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	68	ND
12	ND	ND	ND	43	ND
13	ND	ND	ND	249	ND
14	ND	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	ND	262	ND
16	ND	ND	ND	308	ND
17	68.26	ND	ND	135	ND
18	10.77	ND	ND	313	ND
19	20.24	ND	ND	492	ND
20	64.74	ND	ND	ND	ND
21	ND	ND	ND	ND	ND

*¹:ND : Not detectable and less than 10ppb.

Table 3. Composition of Degree of deacetylation and Content of glucosamine for chitinous products

Sample No.	Degree of deacetylation (%)	Content of glucosamine (mg/g)
1	73	0.27
2	79	339.28
3	70	0.22
4	71	1.03
5	74	0.49
6	92	9.09
7	ND* ¹	863.64
8	98	1.39
9	61	0.31
10	43	0.81
11	94	0.27
12	87	0.54
13	94	318.93
14	74	1.44
15	98	158.3
16	86	0.94
17	60	0.40
18	96	302.27
19	84	2.56
20	54	191.36
21	92	0.72

*¹:The product of glucosamine.

Table 4. Composition of the experimental diet in each group for test of glucosamine

Ingredient	Diets (%)						
	A* ¹	B	C	D	E	F	G
Casein	20	20	20	20	20	20	20
Sucrose	35	35	35	35	35	35	35
Corn starch	25	25	25	25	25	25	25
Corn oil	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
AIN-Mineral mix. * ²	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-Vitamin mix. * ³	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Cellulose	10	10	10	10	10	10	10
Glucosamine HCl	0	0.25	0.5	1.0	0	0	0
Glucosamine sulfate	0	0	0	0	0.25	0.5	1.0

*¹ A: control

B: 0.25 % glucosamine HCl

C: 0.5% glucosamine HCl

D: 1.0% glucosamine HCl

E: 0.25% glucosamine sulfate

F: 0.5% glucosamine sulfate

G: 1.0% glucosamine sulfate

*^{2,3} Mineral and vitamin mixtures shown in Table 5.

Table 5. Composition of mineral and vitamin mixtures for rat diets

Mineral mixture		Vitamin mixture	
Ingredient	contents (g / kg)	Ingredient	contents (mg / kg)
Calcium phosphate dibasic	500.00	Thiamine hydrochloride	600.0
Sodium chloride	74.00	Riboflavin	600.0
Potassium sulfate	220.00	Pyridoxine hydrochloride	700.0
Potassium citrate monohydrate	52.00	Nicotinic acid	3.0
Magnesium oxide	24.00	D-Calcium pantothenate	1.6
Manganous carbonate	3.50	Folic acid	200.0
Ferric citrate	6.00	D-Biotin	20.0
Zinc carbonate	1.60	Cynaocobalamin	1.0
Cupric carbonate	0.30	Retinyl palmitate	1.6
Potassium iodate	0.01	DL-alpha-Tocopherol acetate	20.0
Sodium selenite	0.01	Cholecalciferol	250.0
Chromium potassium sulfate	0.55	Menaquinone	5.0
Sucrose (finely powdered) up to 1 kg		Sucrose (finely powdered) up to 1 kg	

Table 6. Effect of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the growth of rats *¹

Weeks	Body weight (g)				
	0	2	4	6	8
glucosamine HCl					
A* ²	182±19	274±22	342±20	376±23	404±22
B	183±20	263±27	326±27	358±23	391±29
C	184±18	267±24	320±28	361±25	404±25
D	183±14	264±20	331±24	362±26	398±20
glucosamine sulfate					
A	182±19	274±22	342±20	376±23	404±22
E	182±12	271±14	339±21	371±19	401±18
F	182±15	263±12	331±13	365±9	393±15
G	183±13	269±9	342±18	377±21	401±23

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between different diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: See Table 4.

Table 7. Effect of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the hepatosomatic index and relative kidney weight and feed coefficient ratio (FCR) in rats fed with diet for eight weeks*¹

Group	Hepatosomatic Index (%)	Kidney wt/Body wt (%)	FCR
glucosamine HCl			
A* ²	2.74±0.18	0.70±0.05	5.74±0.79
B	2.93±0.13	0.76±0.05	6.34±0.68
C	2.99±0.37	0.75±0.05	5.70±0.42
D	3.01±0.32	0.74±0.03	6.15±0.74
glucosamine sulfate			
A	2.74±0.18	0.70±0.05	5.74±0.79
E	2.91±0.28	0.72±0.05	5.75±0.36
F	3.04±0.50	0.74±0.06	6.06±0.59
G	3.05±0.31	0.73±0.08	5.70±0.36

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between different diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: See Table 4.

Table 8. Effect of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the red blood cells (RBC) of rats *¹

Weeks	RBC (10^6 cell/ μ l)			
	2	4	6	8
glucosamine HCl				
A* ²	4.06±0.50 ^{bx}	6.98±0.40 ^{bx}	5.66±0.81 ^{bx}	9.25±0.36 ^{ax}
B	5.29±1.12 ^{ax}	8.09±0.80 ^{ax}	7.04±1.02 ^{ax}	9.57±0.34 ^{ax}
C	5.49±0.81 ^{ax}	8.83±0.50 ^{ax}	6.10±0.78 ^{abx}	8.97±0.46 ^{ax}
D	5.35±0.44 ^{ax}	8.72±0.62 ^{ax}	6.08±0.99 ^{abx}	9.10±0.90 ^{ax}
glucosamine sulfate				
A	4.06±0.50 ^{bx}	6.98±0.40 ^{bx}	5.66±0.81 ^{ax}	9.25±0.36 ^{ax}
E	6.21±0.90 ^{ax}	8.43±0.52 ^{ax}	6.12±1.01 ^{ax}	8.59±0.79 ^{ay}
F	5.85±0.65 ^{ax}	8.21±0.80 ^{ax}	5.86±0.68 ^{ax}	9.07±0.51 ^{ax}
G	6.18±0.60 ^{ax}	8.22±0.57 ^{ax}	6.09±0.86 ^{ax}	9.34±0.38 ^{ax}

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between different diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: See Table 4.

Table 9. Effect of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the white blood cells (WBC) of rats *¹

Weeks	WBC (10^3 cell/ μ l)			
	2	4	6	8
glucosamine HCl				
A* ²	6.3±1.2 ^{ax}	7.6±1.6 ^{ax}	7.3±0.4 ^{ax}	4.7±1.2 ^{ax}
B	4.8±1.4 ^{bx}	7.8±1.6 ^{ax}	5.8±1.7 ^{ay}	3.1±1.1 ^{by}
C	4.5±0.9 ^{by}	6.2±1.3 ^{ax}	7.0±1.8 ^{ax}	5.1±1.0 ^{ax}
D	7.1±1.4 ^{ax}	7.0±0.5 ^{ax}	7.4±1.3 ^{ax}	3.9±1.4 ^{abx}
glucosamine sulfate				
A	6.3±1.2 ^{ax}	7.6±1.6 ^{abx}	7.3±0.4 ^{ax}	4.7±1.2 ^{abx}
E	4.4±0.5 ^{cx}	9.0±1.4 ^{ax}	7.9±0.7 ^{ax}	5.1±0.7 ^{ax}
F	6.0±1.0 ^{abx}	7.8±0.9 ^{abx}	6.4±1.4 ^{ax}	3.5±0.9 ^{by}
G	4.7±1.1 ^{bey}	6.3±1.4 ^{bx}	6.4±1.1 ^{ax}	4.3±1.1 ^{abx}

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between different diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: See Table 4.

Table 10. Effect of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the hematocrit (HCT) of rats
*1

Weeks	HCT (%)			
	2	4	6	8
glucosamine HCl				
A*2	22.7±3.7 ^{bx}	36.4±2.0 ^{bx}	25.5±2.2 ^{bx}	45.4±3.3 ^{abx}
B	28.2±5.8 ^{ax}	37.5±1.2 ^{by}	33.0±3.8 ^{ax}	41.3±2.5 ^{bx}
C	28.9±4.6 ^{ax}	41.8±1.2 ^{ax}	29.1±3.4 ^{abx}	47.3±2.8 ^{ax}
D	28.2±2.1 ^{ax}	42.7±2.8 ^{ax}	28.8±2.8 ^{abx}	44.6±5.4 ^{abx}
glucosamine sulfate				
A	22.7±3.7 ^{bx}	36.4±2.0 ^{bx}	25.5±2.2 ^{bx}	45.4±3.3 ^{ax}
E	33.0±4.3 ^{ax}	41.8±2.8 ^{ax}	27.4±2.8 ^{aby}	28.1±6.5 ^{by}
F	31.9±3.1 ^{ax}	42.6±2.6 ^{ax}	30.1±3.7 ^{ax}	46.3±4.0 ^{ax}
G	30.9±4.1 ^{ax}	41.0±3.0 ^{ax}	29.6±1.9 ^{abx}	44.8±2.5 ^{ax}

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between different diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: See Table 4.

Table 11. Effect of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the hemoglobin (HGB) of rats *1

Weeks	HGB (g/dl)			
	2	4	6	8
glucosamine HCl				
A*2	12.6±0.7 ^{ax}	13.8±0.4 ^{bx}	15.7±0.8	18.7±0.6 ^{bcx}
B	12.8±0.9 ^{ax}	15.8±1.6 ^{ax}	16.4±1.1	17.9±0.9 ^{cx}
C	12.7±0.5 ^{ax}	15.6±1.2 ^{ax}	16.4±1.0	19.8±0.5 ^{ax}
D	11.6±0.7 ^{by}	16.5±1.0 ^{ax}	16.0±1.3	19.3±0.7 ^{aby}
glucosamine sulfate				
A	12.6±0.7 ^{ax}	13.8±0.4 ^{bx}	15.7±0.8	18.7±0.6 ^{bcx}
E	12.4±0.7 ^{ax}	16.3±0.6 ^{ax}	15.6±1.2	17.8±0.9 ^{cx}
F	11.9±0.6 ^{ax}	16.2±0.9 ^{ax}	15.9±1.0	19.3±0.9 ^{bx}
G	12.5±0.7 ^{ax}	15.9±0.6 ^{ax}	16.5±0.9	20.2±0.4 ^{ax}

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between different diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: See Table 4.

Table 12. Effect of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the activity of aspartate transaminase (AST) in the plasma of rats *¹

Weeks	Activity of AST (U/l)			
	2	4	6	8
glucosamine HCl				
A* ²	79±7	64±3 ^{bx}	74±6 ^{ax}	79±10
B	86±10	66±4 ^{bx}	72±8 ^{ax}	78±9
C	92±15	82±6 ^{ax}	71±12 ^{ax}	74±7
D	83±10	78±5 ^{ax}	72±7 ^{ax}	78±9
glucosamine sulfate				
A	79±7	64±3 ^{ax}	74±6 ^{ax}	79±10
E	80±9	63±6 ^{ax}	69±6 ^{abx}	73±8
F	83±5	67±6 ^{ay}	72±7 ^{ax}	74±8
G	82±10	69±7 ^{ay}	61±5 ^{by}	73±6

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between different diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: See Table 4.

Table 13. Effect of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the activity of alanine transaminase (ALT) in the plasma of rats *¹

Weeks	Activity of ALT (U/l)			
	2	4	6	8
glucosamine HCl				
A* ²	27±4	20±3	22±3	31±2 ^{ax}
B	25±3	20±4	21±5	27±4 ^{ax}
C	26±5	23±4	23±4	32±8 ^{ax}
D	26±6	21±1	21±4	32±7 ^{ax}
glucosamine sulfate				
A	27±4	20±3	22±3	31±2 ^{ax}
E	22±2	18±3	19±4	28±6 ^{ax}
F	22±5	20±3	20±2	23±4 ^{by}
G	24±6	20±4	19±6	24±7 ^{aby}

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between different diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: See Table 4.

Table 14. Effect of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the activity of alkaline phosphatase (ALP) in the plasma of rats *¹

Weeks	Activity of ALP (U/l)			
	2	4	6	8
glucosamine HCl				
A* ²	215±33	215±33	175±35	164±33
B	215±39	212±45	161±39	151±47
C	244±33	244±33	194±32	175±26
D	251±26	252±26	185±22	156±46
glucosamine sulfate				
A	215±33	215±33	175±35	164±33
E	211±38	210±38	186±48	173±31
F	221±33	221±33	180±22	173±23
G	237±42	237±42	171±40	157±39

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between different diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: See Table 4.

Table 15. Effect of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the activity of blood urea nitrogen (BUN) in the plasma of rats *¹

Weeks	Activity of BUN (mg/dl)			
	2	4	6	8
glucosamine HCl				
A* ²	14.65±1.15	13.72±0.98 ^{bx}	15.31±1.28 ^{abx}	18.53±1.55
B	14.64±1.66	14.64±1.93 ^{abx}	17.50±2.02 ^{ax}	19.04±2.49
C	15.70±1.48	15.89±1.29 ^{ax}	15.71±2.22 ^{abx}	20.96±1.47
D	15.30±2.26	12.96±1.23 ^{bx}	12.98±2.11 ^{bx}	18.03±2.01
glucosamine sulfate				
A	14.65±1.15	13.72±0.98 ^{ax}	15.31±1.28 ^{ax}	18.53±1.55
E	12.65±2.32	13.12±1.99 ^{ax}	12.26±1.98 ^{by}	18.81±1.22
F	15.03±2.89	13.54±1.57 ^{ax}	14.95±2.54 ^{abx}	22.48±2.37
G	13.79±2.63	13.83±1.01 ^{ax}	13.26±2.58 ^{abx}	18.92±2.45

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between different diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: See Table 4.

Table 16. Effect of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the activity of creatine-phosphate kinase (CK) in the plasma of rats *¹

Weeks	Activity of CK (U/l)			
	2	4	6	8
glucosamine HCl				
A* ²	364±10 ^{ax}	261±16 ^{ax}	234±21 ^{ax}	295±22 ^{ax}
B	283±19 ^{cx}	237±16 ^{bx}	177±16 ^{bx}	252±21 ^{bx}
C	330±19 ^{bx}	240±26 ^{abx}	185±16 ^{bx}	262±14 ^{bx}
D	326±23 ^{bx}	225±22 ^{bx}	175±28 ^{bx}	246±25 ^{bx}
glucosamine sulfate				
A	364±10 ^{ax}	261±16 ^{ax}	234±21 ^{ax}	295±22 ^{ax}
E	319±27 ^{bx}	224±14 ^{bx}	187±16 ^{bx}	256±17 ^{bx}
F	320±24 ^{bx}	215±22 ^{by}	183±15 ^{bx}	239±55 ^{bx}
G	258±20 ^{cy}	194±19 ^{bx}	151±13 ^{cx}	229±21 ^{bx}

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between different diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: See Table 4.

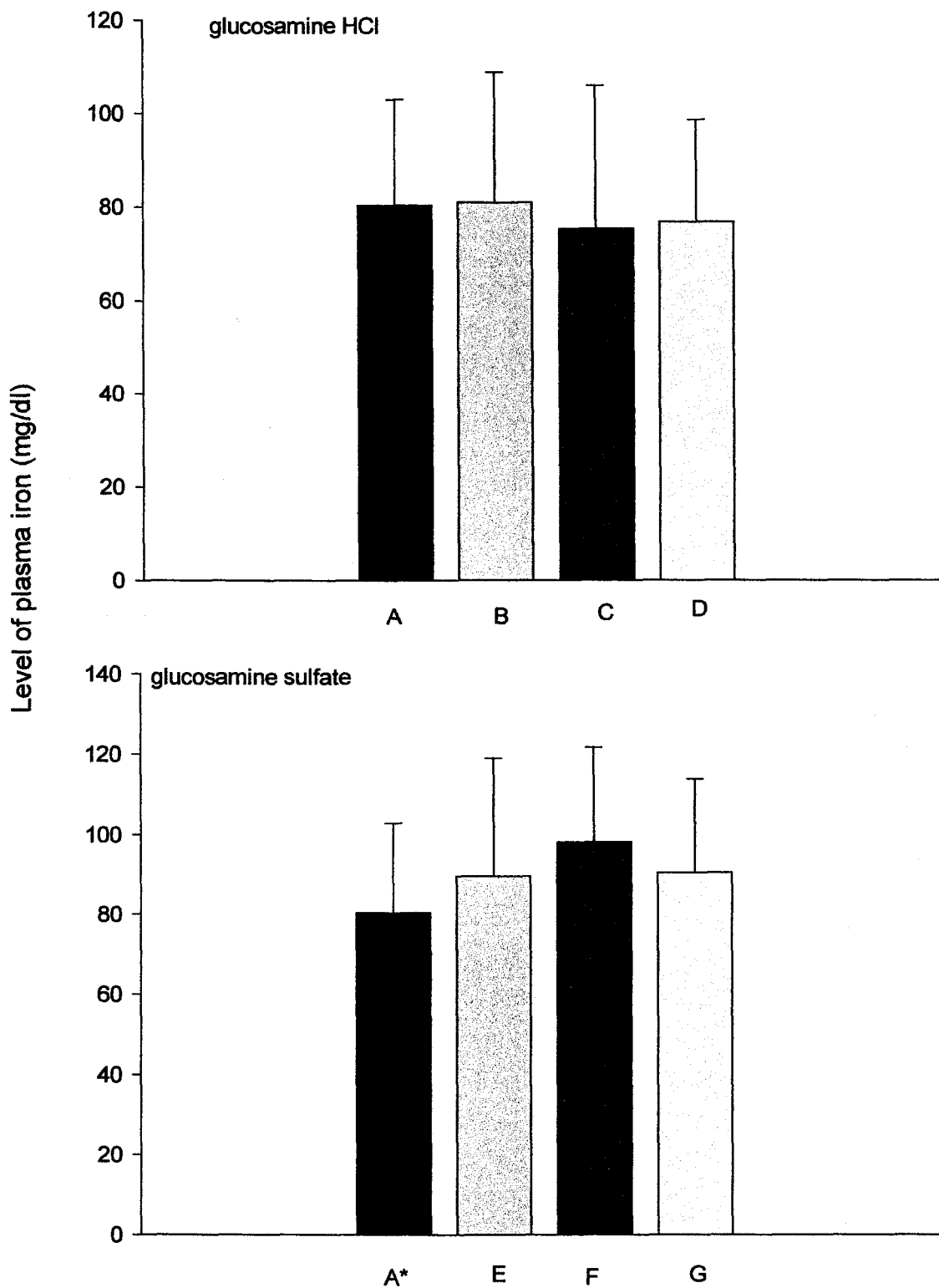


Fig. 1. Effects of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the level of iron in the plasma of rats fed diets after 8 weeks.
 *: Diets A-G were shown in Table 4.

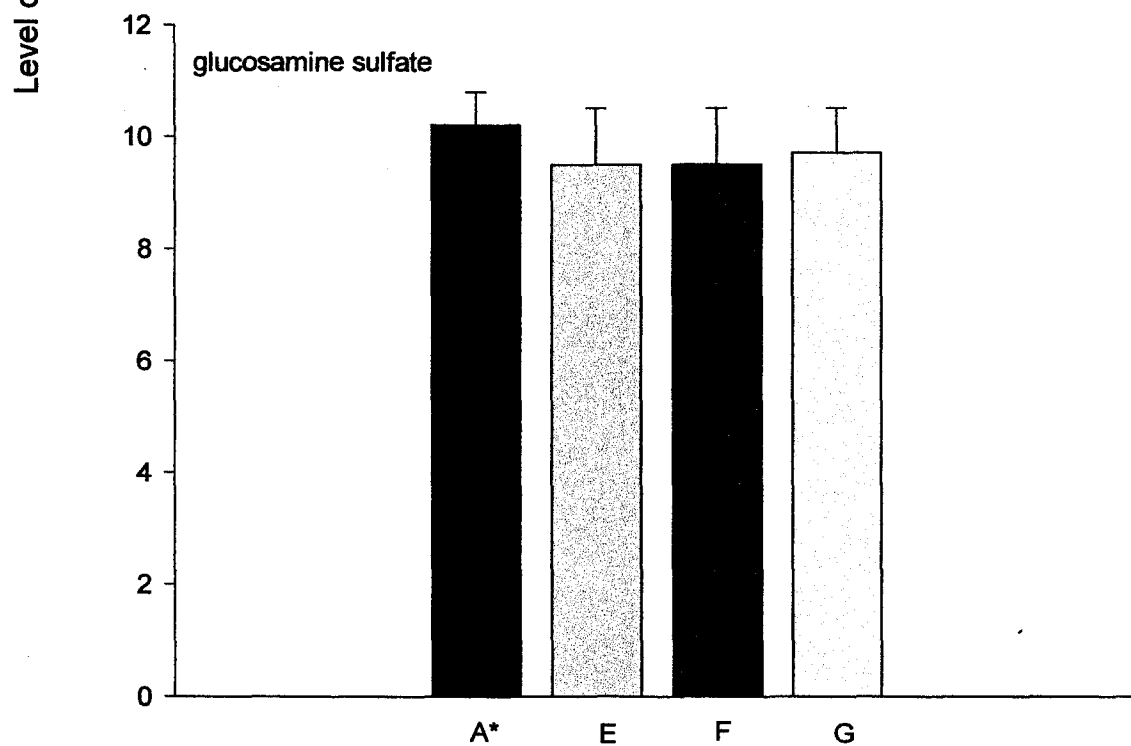
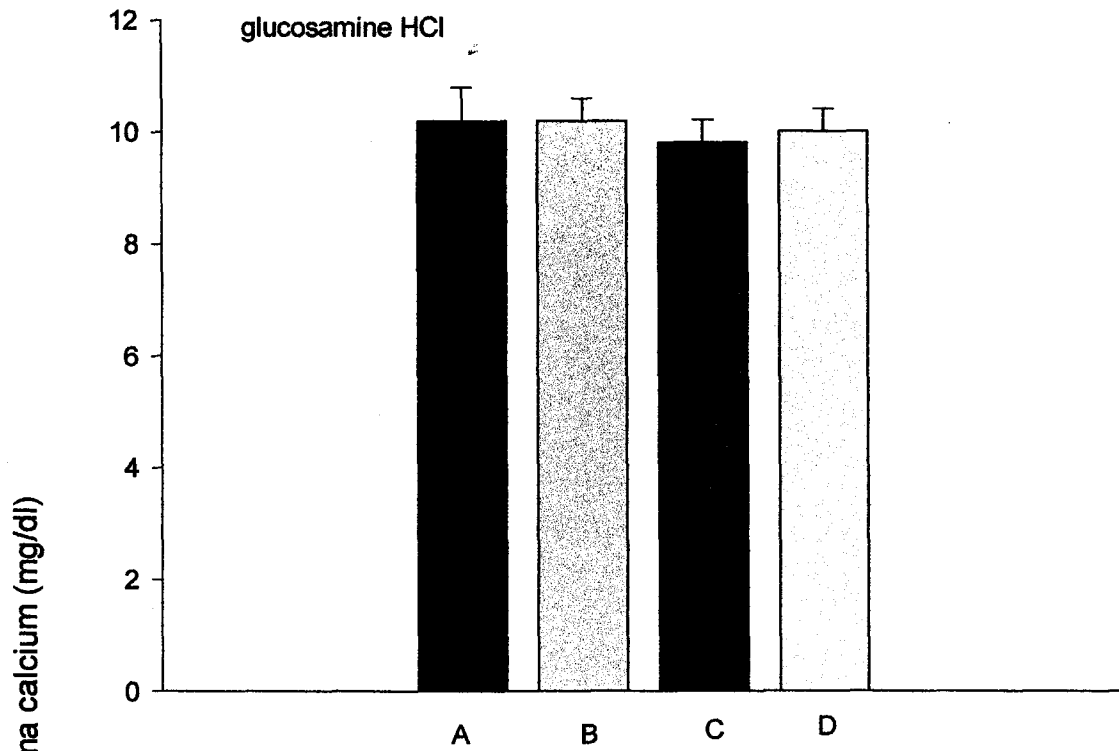


Fig. 2. Effects of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the level of calcium in the plasma of rats fed diets after 8 weeks.

*:Dites A-G were shown in Table 4.

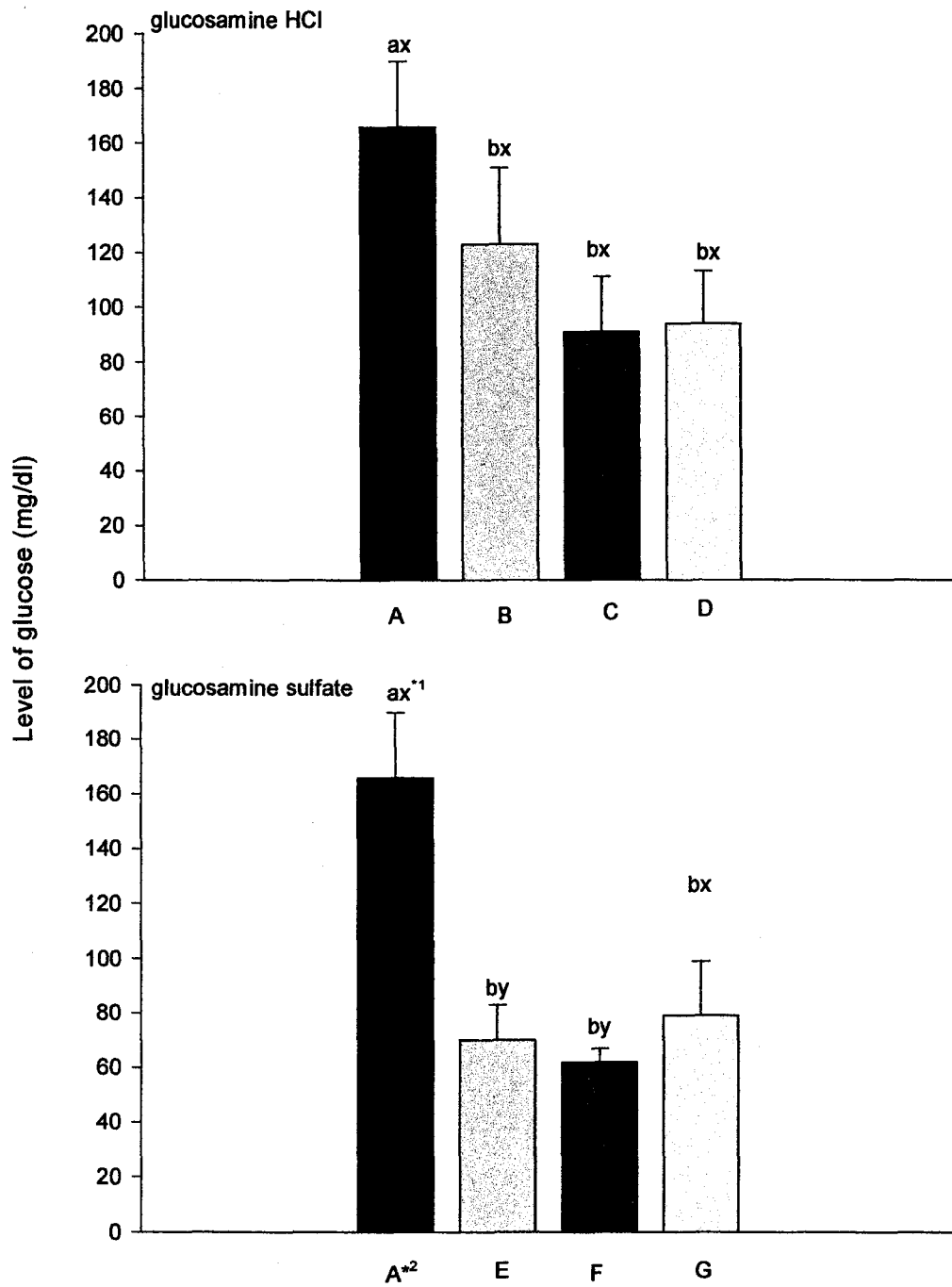


Fig. 3. Effects of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the level of glucose in the plasma of rats fed diets after 8 weeks.

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: Diets A-G were shown in Table 4.

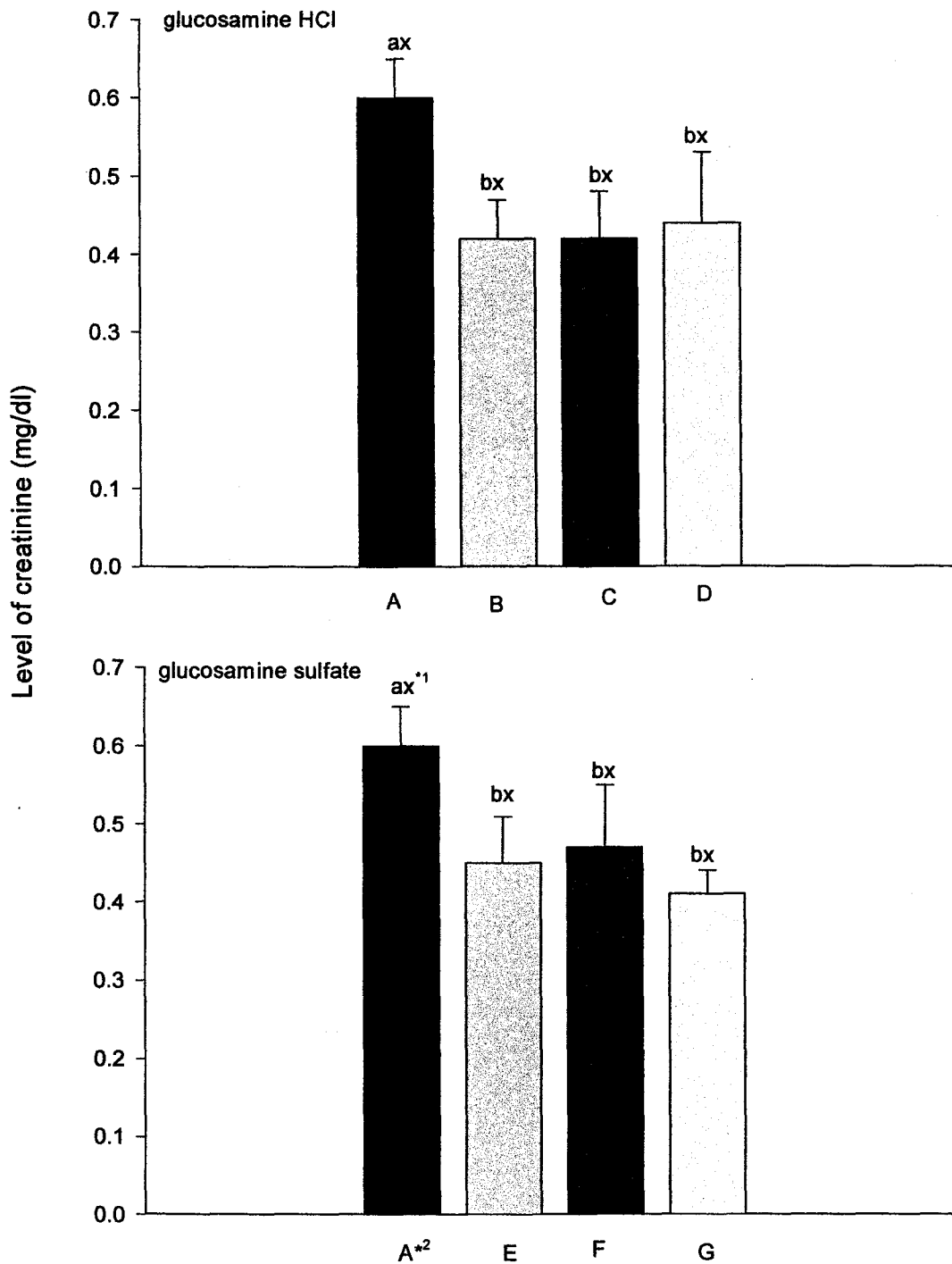


Fig. 4. Effects of glucosamine HCl and glucosamine sulfate on the level of creatinine in the plasma of rats fed diets after 8 weeks.

*1: Different superscripts ab indicate significant difference ($p < 0.05$) between diets within glucosamine; xy indicate significant differences ($p < 0.05$) between different glucosamine forms within different diets as ranked by least square means.

*2: Diets A-G were shown in Table 4.