

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告 台大一號心室輔助器長期動物實驗及生物控制器的研發 —聚胺脂與幾丁聚醣之生醫材料合成與左心室輔助器之 改良製備

計畫編號：NSC 89-2320-B-002-139-M08

執行期限：88 年 08 月 01 日至 89 年 07 月 31 日

主持人：謝國煌教授 執行機構：國立台灣大學化學工程學系

Abstract

Polyurethane grafted chitosan was prepared in this study. The polyurethane was synthesized from 4,4-diphenylmethane diisocyanate(MDI), poly(butylene adipate) glycol(PBA), and chain extender N-methyldiethanolamine (MDEA) or 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). The MDEA provided tertiary amine groups to make the polyurethane be able to dissolve in the acetic acid solution. The HEMA provided double bond to make polyurethane react with degraded chitosan radical. The radical was attacked by the potassium persulfate (KPS).

The mechanical properties of the polyurethane or chitosan can be enhanced through the copolymerization or blending technique. The water absorption and contact angle of the polyurethane /chitosan polymers increase with increasing the content of chitosan. The glass transition temperature (Tg) was measured by differential scanning calorimetry (DSC) and dynamic mechanical analyzer (DMA). The Tg of the polymers increases with increasing chitosan content. The polymers were characterized by DSC and DMA. The result shows that polyurethanes are partial miscible with chitosan. From the X-ray Diffraction Spectroscopy, the crystallinity occurred

in the polyurethane/ chitosan copolymer at a high content of chitosan.

The cell attachment and proliferation increase with increasing the content of chitosan in the film of polyurethane/ chitosan copolymer.

摘要

本實驗為聚胺酯與幾丁聚醣共聚合。聚胺酯，以甲基二乙醇胺 (MDEA) 和甲基丙烯酸-2-羥基乙酯 (HEMA) 為鏈延長劑，因其在組成中導入三級胺基，使聚胺酯能溶於醋酸水溶液，有 HEMA 存在於組成中，使聚胺酯帶有雙鍵。聚胺酯與幾丁聚醣的共聚物是以過硫酸鉀切斷幾丁聚醣的分子鏈，後來再與聚胺酯共聚合。摻合部分是直接以乳化合合法合成水性聚胺酯 (water-borne polyurethane)，再以不同比例和幾丁聚醣摻合。

在共聚物中，隨幾丁聚醣的量增加，會有較高的抗張強度、較低的伸長率、較高的吸水率和較大的接觸角。由 DSC 及 DMA 可測得玻璃轉移溫度和材料的熱性質變化，幾丁聚醣含量增加可以增加材料的玻璃轉移溫度，且可以得知共聚物是部分相容性的。由 X 光繞射可得知高幾丁聚醣含量的共聚物會有結晶產生。

在細胞培養方面，細胞貼附和增生都是隨著材料幾丁聚醣含量的增加而增加。

簡介

本研究合成之材料希望作為骨細胞生長的基質，希望能在骨骼組織受到損傷時，作為替代性的植入體，而此一植入體在體內除了會漸漸裂解外，還能夠引導骨母細胞生長，幫助骨骼再生。

離體內培養的細胞用於無法自行修復的傷口是最有效且具有極大醫用潛力，無論生體內(in vivo)或離體內(in vitro)，已經有許多生醫材料被拿來做為骨母細胞的培養測試，希望能藉著在材料上種植骨母細胞，貼附在破壞的骨頭上，經由細胞在材料上的增生，來達到修復組織的目的。

聚胺酯(PU)是被廣泛應用作生醫材料的高分子，PU有適當的機械強度，PU除了具有高抗張強度、抗摩擦及加工容易之特性，且其物性、化性不應隨所在環境而產生變化。近年來，鏈節式聚胺脂(segmented polyurethane)是很優異的生醫材料，尤其是人工心血管材料方面⁽¹⁻³⁾；同時在延緩血栓產生上有一定效果，在生物相容性上也有優異表現⁽⁴⁻⁶⁾。有許多針對生醫材料表面進行改質，例如在材料中引進磺酸鹽、羧酸等官能基以增進其生物相容性^(7,8)。

幾丁質是一種在海洋中分佈很廣、含量豐富的生物聚合物；不論在蝦類、貝類、蟹類，甚至是小型節肢與軟體等無脊椎動物的上表組織中，均富含幾丁質。幾丁質加工性較差，常將其去乙酰化而改質成幾丁聚醣，或以幾丁聚醣摻合其它高分子聚合物，以求增加其應用性。幾丁聚醣(chitosan)是一種粘多醣結構特性和葡萄糖相似⁽⁹⁾。

幾丁聚醣(chitosan, 簡寫CS), 也是近幾年新興的生醫材料，因其具有良好的生物相容性，和生物裂解性及無毒性，而且其取得容易、價格便宜，所以本實驗希望結合兩種材料優點，以共聚合的方式把幾丁聚醣接在聚胺脂上作出一種

新的生醫材料，並評估其生物適合性。⁽¹⁰⁾

幾丁聚醣被認為是保持個體恆常性(homeostatic)^(11,12)和有抑制細菌生長的功能⁽¹³⁾。幾丁聚醣在調節細胞(cell regulation)和骨接觸活性上扮演很重要的角色⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。Muzzarelli RAA⁽¹¹⁾也曾發表幾丁質和幾丁聚醣可以增進傷口的愈合。將幾丁聚醣磨成粉末可促進傷口的癒合⁽¹⁷⁾，同時在血管中注入幾丁聚醣溶液也可以作為破裂血管癒合之促進劑，Matletle⁽¹⁸⁾等人又於1985年分別以幾丁聚醣溶液及其製成之纖維編織品覆蓋在傷口上可成功的抑制疤痕產生，其後許多研究均證實其具有抑制纖維蛋白形成之效果⁽¹⁹⁾。

關於各種合成高分子與幾丁聚醣的結合，也有許多探討：Taravel M.N.也指出膠原蛋白摻合了百分之十的幾丁聚醣之後，能改善其機械強度和生物性質⁽²⁰⁾。Jo A.R.也作了聚醣胺和幾丁聚醣摻合的研究，發現加了聚醣胺的幾丁聚醣，其機械性質、含水率、以及去毒性功能都有增加⁽²¹⁾。Tomoe Koyano 等人以PVA和幾丁聚醣摻合成水凝膠，發現水凝膠的水含量可很高，且水凝膠的幾丁聚醣含量多過15%，貼附的細胞不但能保持存活且細胞會增值⁽²²⁾。P.C.Lee等曾發表過以膠原蛋白接枝上聚胺脂，其可增加生物相容性，比純幾丁聚醣更適合骨細胞的生長。⁽²³⁾

實驗以甲·二乙醇胺(MDEA)及甲基丙烯酸-2-羧基乙酯(HEMA)為鏈延長劑合成PU，因PU在組成中導入了三級胺基，其可以溶在醋酸水溶液。另一方面，實驗以過硫酸鉀(KPS)先把幾丁聚醣裂解成帶自由基的鏈，後再讓其與PU以不同的比例進行共聚合，共聚合後馬上澆濤成膜。

實驗方法

一、 實驗材料

1. 二苯基甲苯二氰酸鹽

- (4,4'-Diphenylmethane diisocyanate, MDI), TCI, 試藥級
2. 聚己二酸丁二酯二醇(poly(butylene adipate) glycol, PBA, Mw=1000, 700,500) 景明化工, 工業級
 3. 甲·二乙醇胺(N-methyldiethanolamine, MDEA), P&B, American, 99%, 試藥級
 4. 甲基丙烯酸-2-羧基乙酯(2-hydroxyethyl methacrylate, HEMA), ACROS Chemical, 試藥級
 5. DBDT(Dibutyl dilaurate(catalyst Sn=18%), T-12) Aldrich Chemical
 6. 二甲基甲醯胺(Dimethyl formamide, DMF), Merck Co, ACS grade
 7. 幾丁聚醣(chitosan), TCI
 8. 過硫酸鉀(Potassium Persulfate, $K_2S_2O_8$, KPS) Wako Pure Chemical Industries.LTD., 和光一級
 9. 醋酸(CH_3COOH) ACROS, 試藥級
 10. 二甲亞(dimethyl sulfoxide, DMSO), TCI, 試藥級
 11. 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), Gibco
 12. 無鈣鎂磷酸鹽緩衝液(phosphate buffer saline, PBS)
 13. 乳米胰蛋白酶(trypsin), Gibco
 14. 戊二醇(glutaraldehyde), 林純藥
 15. 乙醇(ethanol), 昭和化學
 16. DMEM:Dulbecco's Minimum Essential Media, Gibco
 17. 抗生素(streptomycin/ penicillin), Gibco
 18. Trypan blue, 0.4% in normal saline, Gibco

二、實驗方法

1. PU 的合成

將異氰酸鹽 MDI 和聚醇 PBA700 依適量莫耳比, 在 $70^{\circ}C$, 200rpm 的轉速下通氮氣進行反應, 以正二丁胺反滴定法來確定 NCO 殘餘量, 當 NCO 含量達理論值時, 即終止反應。鏈延長劑 MDEA 和 HEMA 以正確莫耳比溶於適量的 DMF 中, 逐滴加入預聚合物的溶液中, 溫度控制在 $65^{\circ}C$ 、200 rpm 下進行反應, 以避免丙烯基雙鍵反應, 並加入 T-12 加速反應, 反應以傅立葉光譜分析儀(FT-IR)分析, 當 NCO 峰在 $2270^{-1}cm$ 處消失時, 即為反應終止, 此反應約歷時 1.5 小時。將此聚胺脂溶液倒入模具在 $50^{\circ}C$ 進行澆鑄(casting), 成膜之後再將膜放入 $85^{\circ}C$ 真空烘箱 3 天, 以確實除去 DMF 溶劑。

2. 把 PU 膜溶于醋酸水溶液, 攪拌兩天後至 PU 完全溶解, 放在陰涼處以備用。
3. CS 溶于醋酸水溶液, 加入溶于去離子水的 KPS, 反應 10 分鐘後, CS 會被裂解成較小分子量的自由基。
4. 把 PU 和 CS 依不同的比例混合, 快速攪拌反應均勻後倒入模具烘乾約一星期後成膜。
5. 成膜以後, 再將膜放到真空烘 3 天以確實除去醋酸。

三、測試項目

1. 抗張強度和伸長率:
萬能拉力測試機(universal tensile testing instrument), 台大化工所
2. 吸水性:
把樣品裁成 $2cm*2cm$ 的大小, 把樣品浸在 $25^{\circ}C$ 的水中, 每隔數小時稱重一次, 直到試重量不再變化為止。

吸水率 = $\frac{[(\text{濕膜重} - \text{乾膜重}) / (\text{乾膜重})] * 100\%}{}$

3.TGA：觀察熱安定性

熱重分析儀 (thermal gravity analyzer),
台大共同儀器室

4.DSC：觀察熱性質

微差掃描卡計儀 (differential scanning
calorimeter), 台大共同儀器室

5.DMA：觀察兩種高分子的相容性

6.X 光繞射：觀察材料的結晶度

7.接觸角測試

8.掃描式電子顯微鏡(SEM)

9.細胞培養測試

10.血液適合性測試

結果與討論

一、PU 的合成

聚胺酯原為油溶性，一般溶劑為二甲基甲醯胺(DMF)，幾丁聚醣為水溶性，標準溶劑為醋酸水溶液，此兩系統並無法互溶。所以我們合成以甲基二乙醇胺(MDEA)為鏈延長劑的PU，因其在組成中導入三級胺基，使聚胺酯變成水溶性，能溶於醋酸水溶液，進而能將PU與幾丁聚醣混合。又我們也加入少量的甲基丙烯酸-2-羥基乙酯(HEMA)當鏈延長劑，其帶有雙鍵，可與裂解後的幾丁聚醣共聚合。

進行MDEA鏈延長劑反應時，由於本身亦為催化劑，故會增快反應之進行，在加入預聚物時會有大量的熱量釋出，造成膠化反應(gel effect)，解決的方法即在加入MDEA時，伴隨加入大量的溶劑將熱量釋放，但溶劑的量不可加太多，因為溶劑的量太多合成出來的聚胺酯分子量會不夠大，導致不能成膜。為確保反應過程中丙烯基雙鍵不因長時間加熱而斷裂，於加入鏈延長劑時滴入約

0.1wt%(base on polymer) T-12則發現反應時間可縮短，大約1.5小時後反應即可完成。

聚胺酯的 HEMA 含量過多 (即 MDEA 的量變少)，合成出的聚胺酯不易成膜，且若 HEMA 含量多於 10%，聚胺酯不易溶解於醋酸水溶液，故在實驗中只應用到 HEMA 含量最多只有 10%的聚胺酯。

二、機械性質測試

對於一作為生醫用途之材料，其機械性質之要求隨著應用範圍而異，但至少可承受受手術操作之外力或環境改變所造成之破壞。聚胺酯是彈性體(elastomer)，具有高伸長率，但是抗張強度因為鏈延長劑選擇 MDEA(同樣軟硬鏈比之下，鏈延長劑用 1,4-butadiol 會比 MDEA 的抗張強度大的多)和 HEMA 而會比較低。幾丁聚醣是脆性 (fragile) 物質，不易加工，故希望混合聚胺酯可以改善其機械性質。

由圖 1 可以看出，膜片隨著 CS 的含量增加抗張強度增加；但伸長率則相反，隨著 CS 的含量增加伸長率降低。以上都是材料在乾燥狀態下的機械性質探討，如因考慮材料在濕潤的狀態，結果完全不一樣。在濕潤的狀態，PU 的抗張強度比 CS 來得好，且共 PU/CS 聚合物因界面有化學鍵結存在，所以共聚合物有比較好的抗張強度。

三、吸水性

幾丁聚醣 (簡寫成 CS) 是水溶性物質，結構上又有 $-NH_2$ 親水基，吸水率約高達 170% (w/w)。PU 是油溶性物質，雖然加入了親水基 MDEA 和 HEMA，但其主鏈上大部份還是疏水性結構，所以比吸水性 CS 低很多，約 10% 左右而已。

PU/CS 的共聚物的吸水性介於 PU、

CS 二者之間，隨著 CS 含量增加，吸水性也跟著提高，結果如圖 3 所示。

四、TGA 結果

圖 4 是各種不同形態幾丁聚醣的 TGA 結果，純 CS 粉末的裂解溫度是 300°C 左右，經過溶解在醋酸水溶液的 CS，約在 270°C 就開始裂解，其 char yield 很高。而經過 KPS 處理過的 CS，其裂解溫度更低，在 240°C 左右就開始裂解。圖 5 是聚胺酯(PU)、幾丁聚醣(CS)、與不同比例的兩者共聚物之 TGA 結果。由圖中可看出，PU 的起始裂解溫度約為 220~240°C 左右。因為經過 KPS 裂解過的 CS 和 PU 的裂解溫度差異不大，所以各種比例 PU/CS 共聚物的裂解溫度都很靠近。

五、DSC 結果

將樣品經過真空抽氣兩天後，確保所有殘存的溶劑已去除，進行熱分析掃描實驗，以探討不同組成對 Tg 所造成的變化。把樣品由 -100°C 開始升溫到 200°C 後，再冷卻至 -100°C，進行第二次升溫動作，由第二次升溫可將以前的熱歷史 (thermal history) 消除，故在此主要探討第二次掃描結果。

圖 6 是 DSC 的結果，圖裡可以看出 PU 在 -10°C 左右有一轉折，此溫度應該是 Tg。而 CS 在 200°C 之前都沒有看出有明顯的轉折，相信其 Tg 是很高的，而 PU 與 CS 的共聚物的 Tg 隨著 CS 的含量增加而上升。

六、DMA 結果分析

完全不相容(incompatible)的兩種物質他們的 T_g 轉移峰應該相互分離，不會重疊；部分相容的 T_g 轉移峰會部分重疊成一個比較寬的轉移峰；完全相容(compatible)的 T_g 轉移峰則

會完全重疊成一個尖銳的轉移峰。我們觀察到 CS/PU 共聚物 T_g 轉移峰移轉的現象，PU 的轉移峰右移和 CS 的轉移峰融合成一個比較寬的轉移峰，所以 PU 與 CS 應該是部分相容 (semi-compatible) 的。且由圖 7 可看出，共聚物的 T_g 隨 CS 的含量增加而增加。

七、X 光繞射

由圖 8 可以看出 PU 是不會結晶的材料，沒有經過處理的 CS 也是沒有結晶的材料，但經過 KPS 處理的 CS，因其被裂解成較小的分子而可以形成結晶。在 PU/CS 的共聚物中，低 CS 含量的材料也不會結晶，但 CS 含量高時，PU/CS=5/5 材料會結晶。

八、接觸角的測試

由於生醫材料直接與人體接觸，故其表面性質之優劣會直接對人體產生極大之影響，接觸角測試用來判定薄膜表面之親疏水性大小。以液態-固態系統為例，當界面張力極大時，固體與液體之間的接觸角為 180°C，即材料為疏水性；當兩物體之間之界面力極低時，接觸角為 0°C，即材料非常親水性。

接觸角小表示材料較親水性，PU 的接觸角約 89°，CS 的接觸角約 98°，PU 的接觸角比 CS 的來得小，而其共聚物的接觸角介于二者之間，如圖 9。

九、生物適合性的探討

細胞培養以 MTT 測試分別以 4 小時、1 天、2 天、4 天觀察之，實驗植入 1×10^5 /well 細胞數目在實驗材料。細胞貼附結果，如圖 10 中，細胞對 PU 的貼附率最低，CS 的貼附率最高，5/5 次之，再次之 8.5/1.5 是然後 7/3。圖 11 是細胞經過 1 天、2 天、4 天之後

增生的結果，細胞數目隨著天數的增加而小幅增加，由此可知其表面不具有毒性，且細胞增生的結果也是隨 CS 含量增加，UV 吸收值高。CS 和 PU/CS 共聚合物的細胞增生結果都有 control 組 80% 以上。

CS 和 PU/CS 共聚合物的細胞貼附量和增生比純 PU 高，得知細胞的生長隨著材料的可濕性的增加而下降，即疏水性的表面較親水性的表面利於細胞的生長。也可能是因為 CS 和 PU/CS 共聚合物具有高吸水率，能將培養液與和已貼附細胞分泌的蛋白質等物質吸附在材料表面，所以 CS 含量高的材料，細胞生長得較好。由 SEM 照片(圖 4-35)中可發現 PU/CS 的共聚合物的表面比純的 PU 來得粗糙，這也可能是造成共聚合物的細胞貼附量和增生比純 PU 高。

PU 和 CS 共聚合後，由圖片可以看出其表面結構明顯有類似交錯區域存在，造成表面較不平滑，產生一些非規則性的空隙，形成一非均勻的表面，且隨著 CS 含量的增加區域會更大，如圖 13(b),(c)所示，也可能因為如此，PU/CS 共聚合物的血小板吸附很嚴重。純的 CS (圖 13(d)) 表面有很多小顆粒存在。

十、血液適合性的探討

在此實驗中，由於玻璃的血小板吸附性良好，故一般以玻璃作為對照組進行實驗，共聚合物或摻合物之 RIPA 值隨 CS 量增加而增加，但純 CS 的 RIPA 值比共聚合物或摻合物來得低一些，如圖 12，例如 PU/CS=5/5 的共聚合物的 RIPA 值大於 1，但 CS 的 RIPA 值約在 0.9 左右，這可能是因為共聚合物或摻合物在浸泡生理食鹽水後，樣品會變得比純 CS 或 PU 來得皺摺，造成表面粗糙度增加，所以其 RIPA 值比較高。

十一、表面型態觀察

藉由溶劑揮發進行相轉換以改變薄膜結構，當溶劑剩餘量越少，薄膜結構越緻密，由掃描式電子顯微鏡 SEM 圖片(圖 13)看出材料表面是緻密的。材料表面的結構，純的 PU(圖 13(a))表面是光滑的，但將

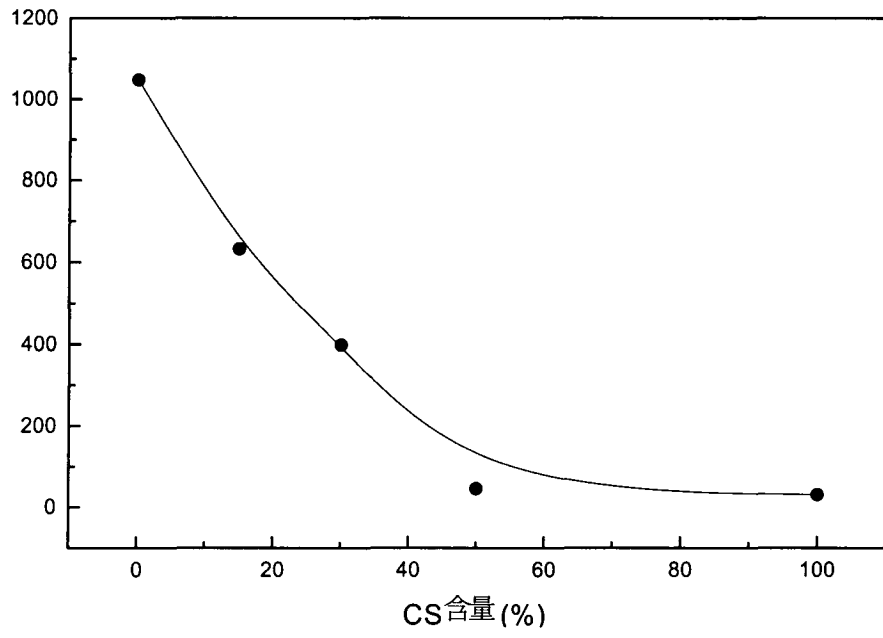
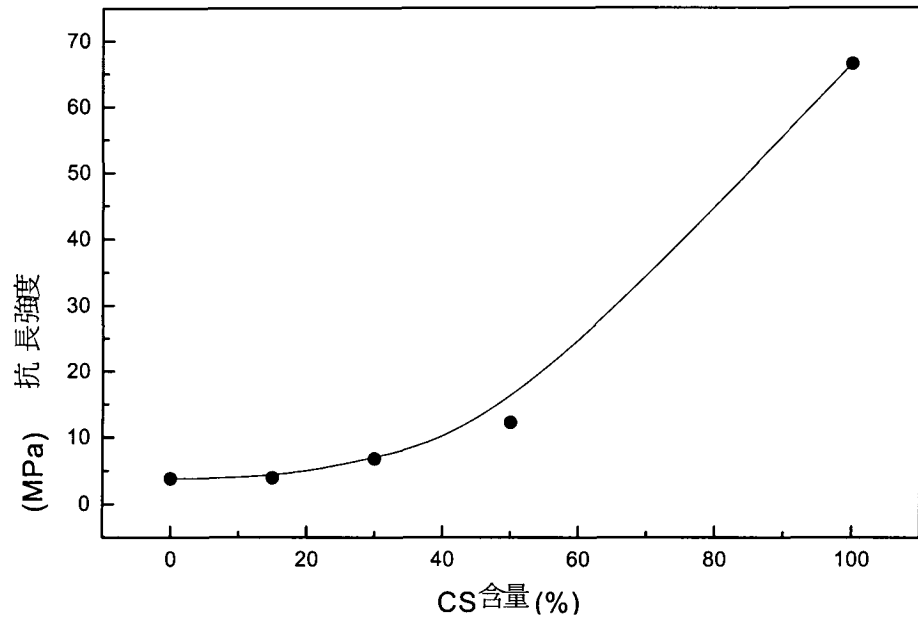


圖 1 PU/CS 共聚物在乾燥狀態下的機械強度圖

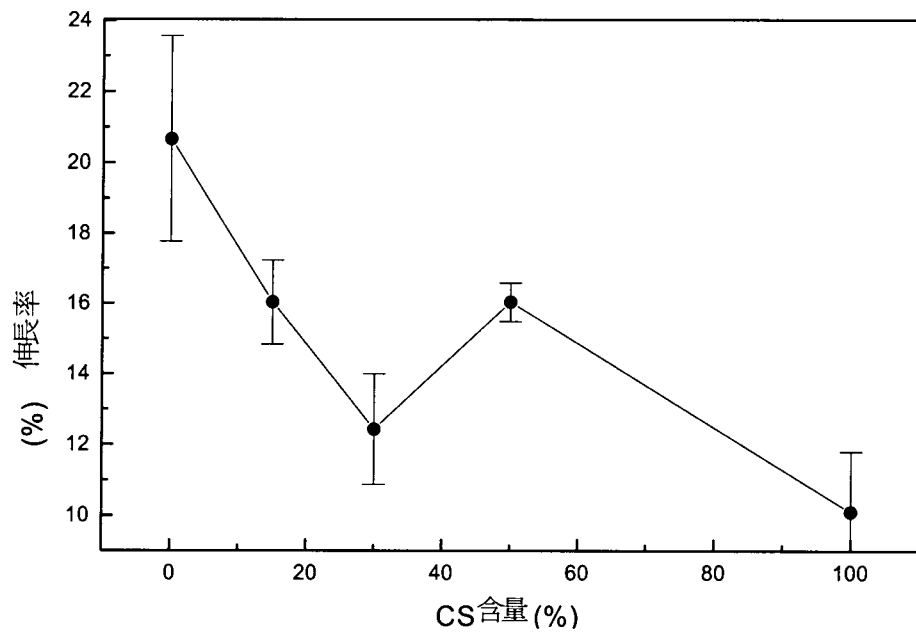
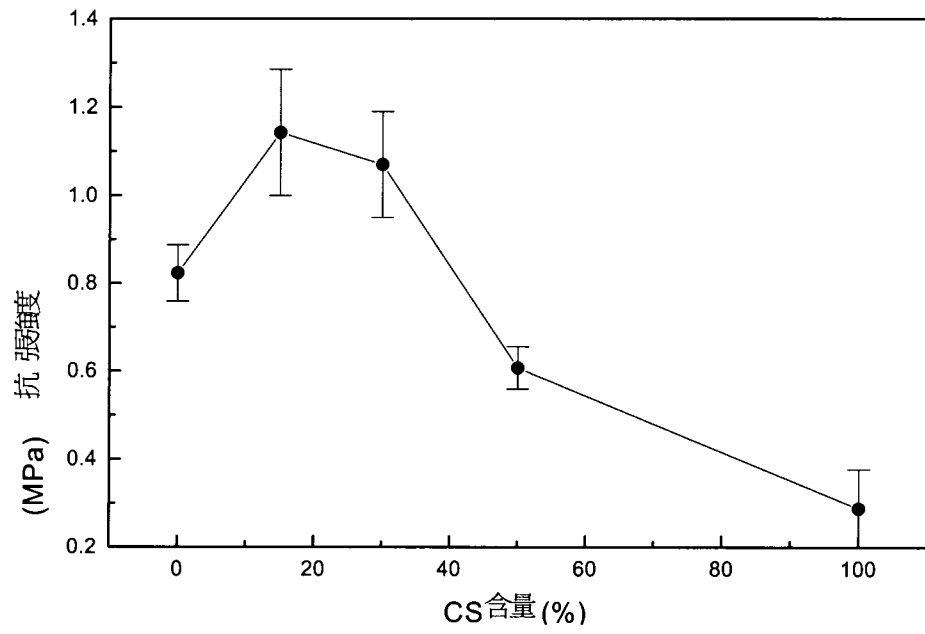


圖 2 PU/CS 共聚物在濕潤的狀態的機械強度圖

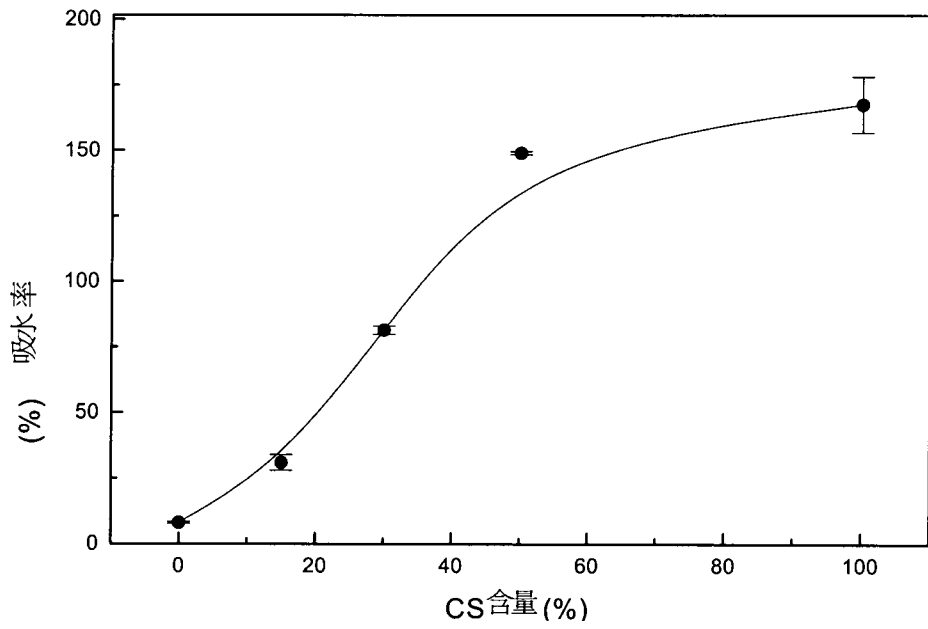


圖 3 PU/CS 共聚物的吸水率圖

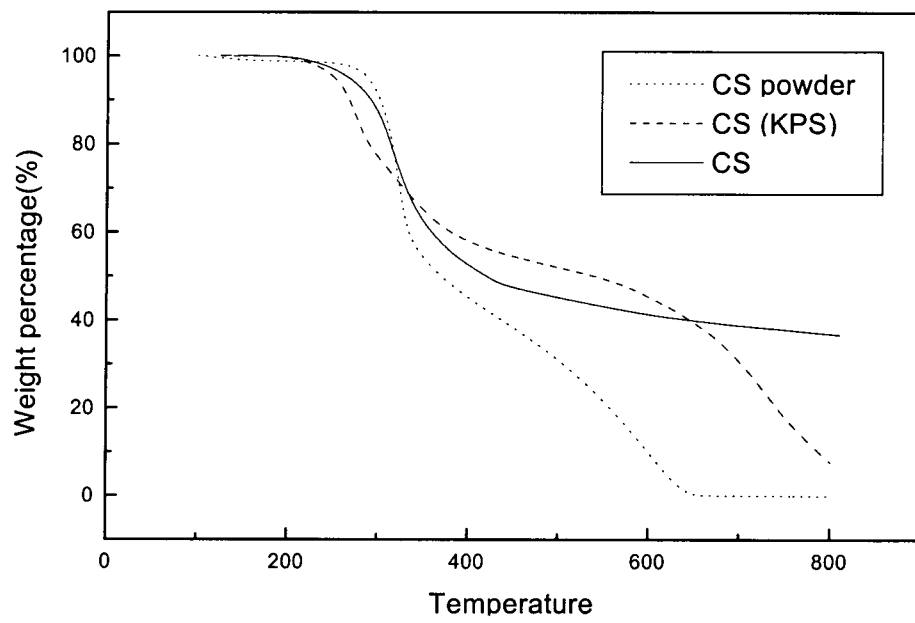


圖 4 不同形態幾丁聚糖的 TGA 圖

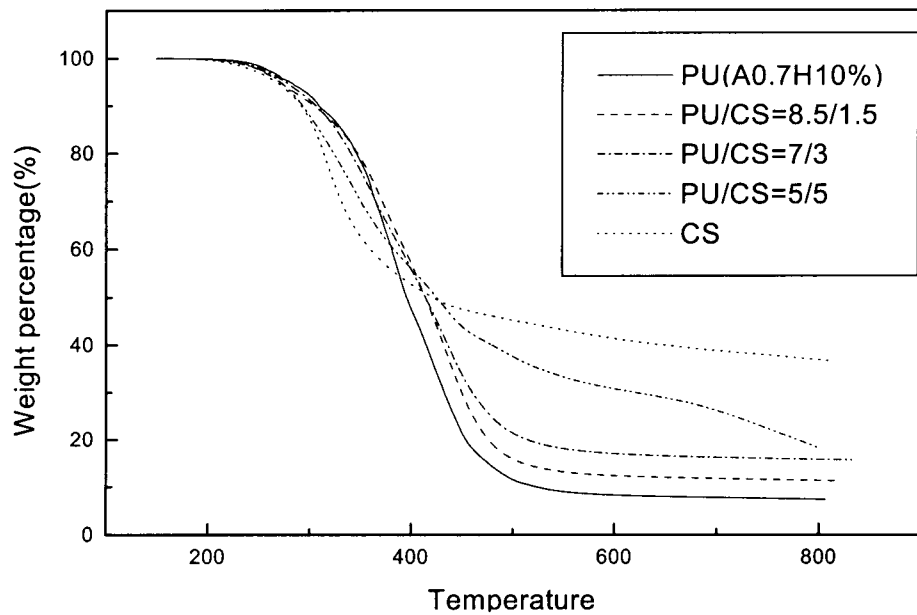


圖 5 PU/CS 共聚合物的 TGA 圖

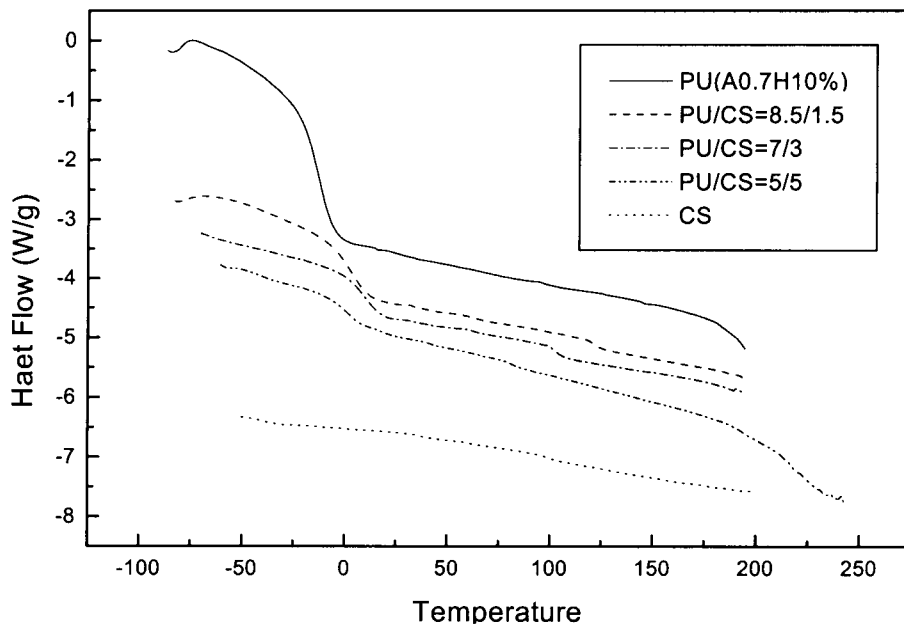


圖 6 PU/CS 共聚合物的 DSC

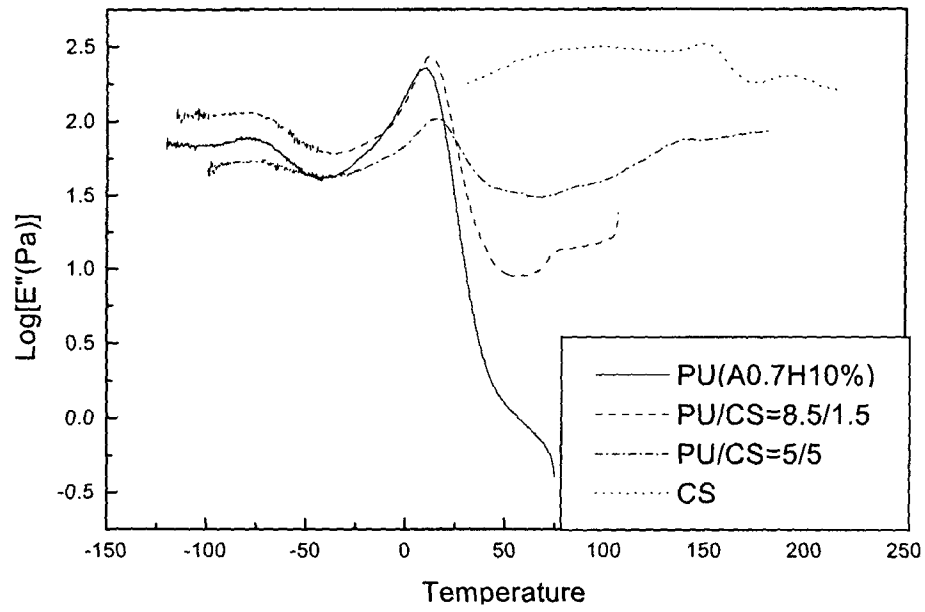


圖 7 PU/CS 共聚合物的 DMA 圖

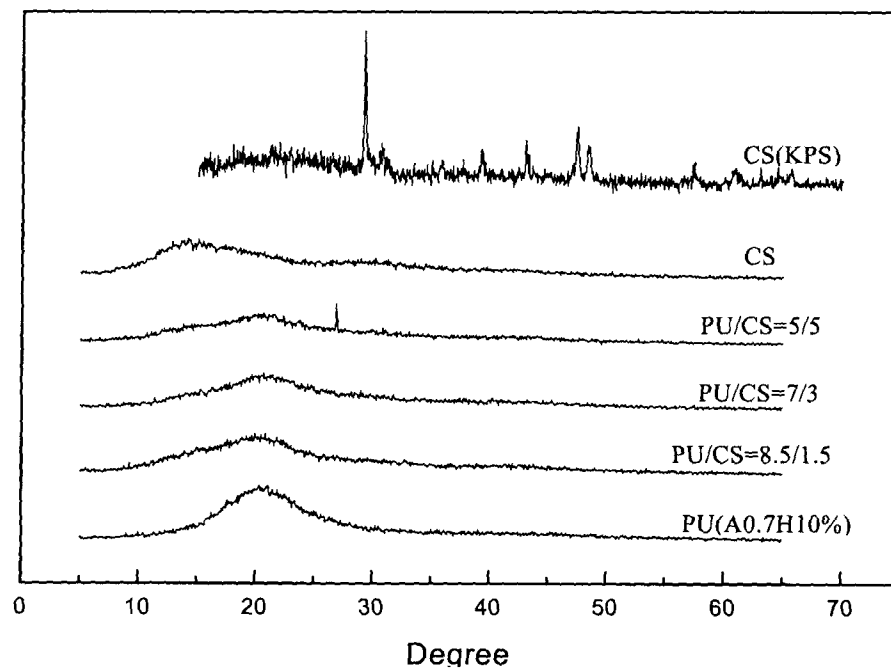


圖 8 PU/CS 共聚合物的 X 光繞射圖