

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

以分散聚合法合成具有生物分解性的接枝共聚合體 以及其應用

計畫類別：√ 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC-89-2216-E-002-035 -

執行期間： 89 年 08 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

計畫主持人：邱文英 教授

共同主持人：董崇民 副教授

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學材料科學與工程學研究所

中 華 民 國 90 年 8 月 25 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以分散聚合法合成具有生物分解性的接枝共聚體及其應用(III)

The Synthesis and Their Applications of Biodegradable, Graft Copolymers by Dispersion Polymerization

計畫編號：NSC-89-2216-E-002-035 -

執行期限：89年08月01日至90年07月31日

主持人：邱文英 台灣大學材料科學與工程學研究所

共同主持人：董崇民 明志技術學院化工系

計畫參與人員：金家鳳 台灣大學化學工程研究所

一、中文摘要

本研究主要是以分散相聚合法獲得幾丁聚醣與聚醋酸乙烯酯接枝共聚物，其分散相水溶液再經醇化獲得幾丁聚醣與聚乙醇接枝共聚物。將水溶液直接烘乾成膜，結果得到的是顆粒膜，且在顆粒表面富含幾丁聚醣。將此材料應用於銅離子吸附上，其吸附過程是擴散模式控制，而其擴散係數會隨幾丁聚醣含量增加而增加。以戊二醛進行交聯過後的材料，其機械性質有明顯的改善，但吸水度與銅離子吸附總量均下降。幾丁聚醣與聚乙醇接枝共聚物在細胞培養上，發現幾丁聚醣的加入明顯改善了細胞在材料上的貼附，使得細胞活性增加。應用在血液適合性方面，發現有一最適合的組成，其材料吸附血小板的量為最低。在生物分解性測試上，幾丁聚醣與聚乙醇接枝共聚物在48小時後會完全分解。

關鍵詞：幾丁聚醣，接枝共聚體，聚醋酸乙烯酯，聚乙醇。

Abstract

Chitosan/vinyl acetate graft copolymers were prepared by using a redox initiator. With further alcoholysis, chitosan/vinyl alcohol copolymers were obtained. During the adsorption of copper ion, two-stage behavior was observed. In the first stage, the adsorption was governed by both the

diffusion and reaction; whereas only diffusion controlled the second stage. The diffusion coefficient increased with the amount of chitosan content. If cross-linked with the glutaraldehyde, both of the degree of swelling and adsorption quantity of copper decreased with the extent of cross-linking. In the cell culture of osteoblast, the addition of chitosan improves the adhesion of cells. An optimum composition was found for the chitosan/vinyl alcohol copolymers in the blood compatibility. After 48 hours, the copolymers were degraded completely.

Keywords: chitosan, graft copolymer, poly(vinyl acetate), poly(vinyl alcohol).

二、緣由與目的

幾丁聚醣是由 N-乙醯葡萄糖胺及葡萄糖胺糖，以 β -1,4 鍵結而成直鏈狀的多醣高分子。幾丁聚醣在工業上應用廣泛，舉凡醫藥、生醫材料、保健食品、廢水處理、化妝品、食品添加劑、抗菌纖維等方面，都可利用其不同的特性來製成所需的產品¹⁻⁵。雖然幾丁聚醣具有種種之優點，但是也具有昂貴、溶解性不好、加工困難等缺點。為了改善這些缺點，本研究以硝酸銨銻微起始劑，合成出幾丁聚醣/聚醋酸乙烯酯共聚體，再利用醇解反應，轉化成幾丁聚醣/聚乙醇共聚體。探討不同幾丁聚醣含量對材料吸水性、金屬螯合性、生物相容性及生物分解性質的影響。

三、實驗方法

1. 幾丁聚醣接枝共聚合體的合成

幾丁聚醣(CS, TCI)的去乙酰度為 86%，黏度平均分子量為 615,900。將一定量的 CS 溶解在醋酸水溶液中，並升溫至 60 °C。將硝酸銨銻、醋酸乙烯酯單體(VAc)加入反應器中，反應兩小時後，即得到幾丁聚醣與聚醋酸乙烯酯接枝共聚合體之分散水溶液。將分散水溶液慢慢滴入 40 的氫氧化鈉/甲醇溶液，所得之不溶物即為幾丁聚醣/聚乙烯醇接枝共聚合體。

2. 戊二醛交聯反應

將幾丁聚醣/醋酸乙烯酯共聚合物薄膜，浸泡到 0.25%的戊二醛水溶液中，到達一定時間，將膜自戊二醛水溶液中取出，並用去離子水沖洗過後，放入循環烘箱烘乾。

3. 銅離子吸附實驗

將共聚合薄膜放入銅離子水溶液中進行吸附，銅離子水溶液的濃度為 2000ppm，並將系統放入恆溫水槽中以維持在 25 。

4. 幾丁聚醣/聚乙烯醇共聚合體的生物適合性及血液相容性

利用細胞培養方式來評估薄膜的生物適合性。所培養的細胞為 MG-63 骨母細胞細胞株。將薄膜放入培養盤中，並加以固定。加入 1ml 的細胞培養液，再將培養盤放入 37 °C，含 5%CO₂ 的 incubater 中，進行細胞培養。利用 MTT 試驗來測定細胞的活性，選定波長為 570nm，以 ELISA 顯示儀讀取吸光值。血小板吸附測試方法有許多種，在此依照 Woodhouse⁶ 所提出的方法，將材料澆鑄在玻璃管內壁進行實驗。在每根試管中加入 1ml 的全血，置於 37 °C 的恆溫槽中，以 120rpm 的速率震盪 1 小時，模擬動態凝血測試。再以血小板計數器計算各試管中血液所殘留的血小板數目，以空玻璃試管作為參考值，求出相對血小板吸附量(relative index of platelet adhesion, RIPA)。

5. 生物分解測試

利用溶菌酶來進行生物分解，先配製 0.025M Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 的緩衝溶

液，並利用 0.1M 稀鹽酸將溶液 pH 值調整為 7(30 °C)以利於酵素活性之維持。將試片(約 0.1g)置於盛裝 30ml 上述溶液的燒杯中，加入 0.01g 的溶菌酶，以 100rpm 的轉速攪拌。適當時間後取出試片，並用去離子水反覆清洗試片數次後，將試片烘乾並稱重，測量試片之重量損失率。

表一 反應系統的組成及其產物代號

CS-g-PVAc	SE101	SE105	SE110	SE115
CS-g-PVA	PVA101	PVA105	PVA110	PVA115
CS (g)	1	5	10	15
VAc (g)	100	100	100	100
H ₂ O (g)	1000	1000	1000	1000
Temp. (°C)	60	60	60	60

四、結果與討論

1. 幾丁聚醣接枝共聚合體的合成

本研究是以硝酸銨銻作為起始劑，對天然高分子進行接枝聚合反應。由於銻離子是強氧化劑，會直接氧化幾丁聚醣，進而在幾丁聚醣環上產生自由基，乙烯類單體因而鍵結到自由基上，開始成長而產生接枝。聚合反應兩小時後，經由測定發現不同組成系統的轉化率均在 70~80% 之間。實驗中也發現反應系統為穩定的分散水溶液，經 zeta(ξ)電位測量發現其顆粒表面帶正電，並隨幾丁聚醣量的增加而增加。因此顆粒的核心是疏水性的高分子接枝段，其殼層則是親水性的高分子主鏈。意即幾丁聚醣在此系統中，不但參與接枝聚合，並扮演界面活性劑的角色。

2. 接枝共聚合體的機械性質和吸水性

幾丁聚醣既硬且脆，並不適合加工，而聚醋酸乙烯酯韌性相當好，但抗張強度較差。測試不同幾丁聚醣含量下之接枝共聚合體在乾燥狀態下的機械性質。結果顯示，幾丁聚醣明顯的加強了聚醋酸乙烯酯的抗張強度，提升了楊氏模數，但伸長量也下降的非常快。影響幾丁聚醣吸水度的因素相當多，包括酸鹼值及離子強度等。文獻指出，幾丁聚醣的 pKa=6.3，若浸泡環境的 pH 值低於 2，幾丁聚醣會有溶解現象發生。其吸水度在 pH 值 2~6 之間，隨 pH 值上升而下降；另外，離子強度的增加，

。首解

也會造成其吸水度的下降⁷。幾丁聚醣有親水的胺基，其吸水度相當高，澎潤程度可高達 14 倍左右；聚醋酸乙酯是一疏水性高分子，幾乎不吸水。圖一顯示在 pH 值為 6 的情況下，接枝共聚合體的吸水度會隨幾丁聚醣含量的提升而增加。

3. 幾丁聚醣共聚合體膜的表面形態

由電子顯微鏡圖發現 SE101 濕式膜的表面形態是緻密的，但隨幾丁聚醣的含量增加，薄膜表面成為具有孔洞結構的形態，而且孔洞隨幾丁聚醣增加而增加。SE 系統是一粒粒顆粒所組成的顆粒膜，這是由於顆粒表面的幾丁聚醣分子鏈非常剛硬，在烘乾過程中不容易融合，使乳膠顆粒維持其形態，形成顆粒膜。將乾式膜浸泡水中，使其吸水飽和，再進行冷凍乾燥以製備濕式膜的過程中，則由於顆粒表面的幾丁聚醣吸水性強，可以有高度的澎潤，因此在冷凍乾燥後，形成許多孔洞的顆粒膜，同時，孔洞也會隨著幾丁聚醣含量的增加而變大。由 ESCA 作薄膜的表面分析發現，表面氮原子含量比例遠較內部為高，證明了表面富含幾丁聚醣的論點。

4. 銅離子吸附

幾丁聚醣吸附過渡金屬離子的影響因素很多，包括幾丁聚醣上胺基的質子化程度、金屬離子在溶液中的狀態，溫度及濃度等因素⁸⁻⁹。本實驗將酸鹼值固定在 pH=4 左右，溫度固定在 25^o。圖二為 Log(Q) 對 Log(t) 作圖，結果發現，以六小時作分割點所求得前後兩段的線性迴歸所得到的相關係數值為最大，即吸附過程呈現兩階段行為。前段的 n 值約為 0.7 左右，後段 n 值約為 0.5 左右。若 n 值越接近 0.5，代表吸附過程為吸附劑內的擴散控制。由於顆粒間隙遠大於顆粒內的孔洞，因此初期的吸附均發生在顆粒表面，此時擴散速率較快，因此 n 值看到的關係為擴散及反應共同影響，但經過一段時間後，銅離子會擴散至顆粒內，因顆粒內孔洞非常狹小，因此 n 值看到的關係為擴散單獨影響。

5. 以戊二醛交聯接枝共聚物

幾丁聚醣與聚醋酸乙酯接枝共聚物在吸

水達飽和狀態下的機械性質非常差，而且若長時間泡在水中，接枝共聚誤會崩解為顆粒，而無法維持其薄膜的完整性，故加入交聯劑以其改善其機械性質及抗酸性。選擇幾丁聚醣含量最高的組成 SE115 做為交聯的反應物，所選用的交聯劑是被廣泛使用的戊二醛。戊二醛與幾丁聚醣的胺基反應，形成鏈與鏈之間的亞胺基(-C=N-)交聯。試片浸泡於戊二醛溶液的時間越長，交聯程度越高。交聯程度越高，吸水度也越差；浸泡時間超過 5 分鐘後，吸水度已不再變化，可反應的官能基均已交聯，故交聯度不再上升。機械性質測試結果顯示，交聯程度越高，楊氏模數和抗張強度提升，但伸長量下降。另外，銅離子吸附量也隨著交聯程度之增加而下降。

6. 幾丁聚醣/聚乙烯醇共聚合體的生物適合性及血液相容性

材料的生物毒性常以細胞在材料表面的貼附與生長來測定；本實驗以 MTT 測試骨母細胞在薄膜表面的活性做為細胞毒性的指標。測出 PVA 系列材料上的細胞與 MTT 作用後，相對於控制組的吸收值。幾丁聚醣薄膜上的細胞活性相對於控制組均維持 80% 以上的活性，但純聚乙烯醇薄膜上的細胞活性只有幾丁聚醣薄膜上的一半。許多文獻指出，幾丁聚醣因具有活性基，吸附蛋白質的速率非常快，在與血漿接觸的 1 小時後，在材料表面即吸附一層蛋白質，由於蛋白質的影響，使得細胞在幾丁聚醣薄膜上更容易貼附及伸展。而聚乙烯醇對蛋白質的吸附較差。另外，純聚乙烯醇的表面是非常緻密平滑的，但添加了幾丁聚醣後，表面會出現許多孔洞，增加材料的表面粗糙度。表面粗糙度可活化許多骨母細胞的反應，進而促進細胞的貼附與生長¹⁰。幾丁聚醣為一帶正電荷之高分子，文獻指出，細胞在表面含正電荷的材料上較容易平鋪，在含負電荷的材料上則否。聚乙烯醇本身是不帶電的高分子，引進幾丁聚醣後在表面的胺基有些質子化成為氨基(-NH₃⁺)，材料表面帶正電使細胞更易平鋪。由於上述的幾種因素，使得幾丁聚醣/聚乙烯醇接枝共聚合體的細胞活性均較純聚乙烯醇為高。

使用在生物體中的材料，除了要具備生物適合性外，血液相容性也是非常重要的，但許多生物適合性佳的材料，大部分是因為其容易吸附蛋白質，但相對來說，此種材料也因為容易吸附蛋白質及血小板而產生血栓，例如：幾丁聚醣具有良好的生物適合性，但其血液相容性較差，容易產生血栓，聚乙烯醇的生物適合性較差，但其血液相容性較好，不易產生血栓。本實驗是以計算 RIPA 值來評估血小板的吸附情形。RIPA 值是指與玻璃比較，材料在固定時間所吸附的血小板相對數目比值，RIPA 值越低，表示血小板的貼附量越少，即不易產生血栓。血小板容易與正電荷相吸，與負電荷相斥¹¹，因幾丁聚醣胺基的離子化程度會受酸鹼值的影響，故配製不同酸鹼值的 PVA110 醋酸水溶液來進行測試，圖三為不同酸鹼值 PVA110 的 RIPA 值。隨 pH 值的升高，幾丁聚醣的質子化程度降低，表面的正電荷數目減少，故其 RIPA 值也跟著降低。

另外，文獻指出，聚乙烯醇的吸水性對血小板的吸附會有一最適合值¹⁰，由於增加了幾丁聚醣的含量，會使材料的吸水性增加，因此預測 RIPA 值會下降。但是當含水量超過某一程度後，表面產生孔洞，表面的粗糙度提高，使血小板吸附量再度上升。由於上述這些相反因素的影響；幾丁聚醣含量會對 RIPA 值有一最適合值，如表二所示。

表二、幾丁聚醣、聚乙烯醇和其接枝共聚合體薄膜的 RIPA 值

Sample	PVA	PVA101	PVA105
RIPA	0.418 ±0.021	0.311 ±0.051	0.139 ±0.050
Sample	PVA110	PVA115	CS
RIPA	0.266 ±0.070	0.533 ±0.067	0.731 ±0.059

*Standard deviation

7. 生物分解測試

利用溶菌來進測行共聚合試，結果如表三所示。其中 SE105 和 SE115 樣品的重量損失率在 48 小時已經達到一個穩定值，而且隨著幾丁聚醣含量的增加而

增加。至於 PVA105 和 PVA115 樣品在 48 小時，已經完全分解。

表三 溶菌作用量下的重

Wt (%)	SE105	SE115	PVA105	PVA115
48 h	5.3	26.5	100	100
96 h	6.7	28.0	100	100

五、計畫成果自評

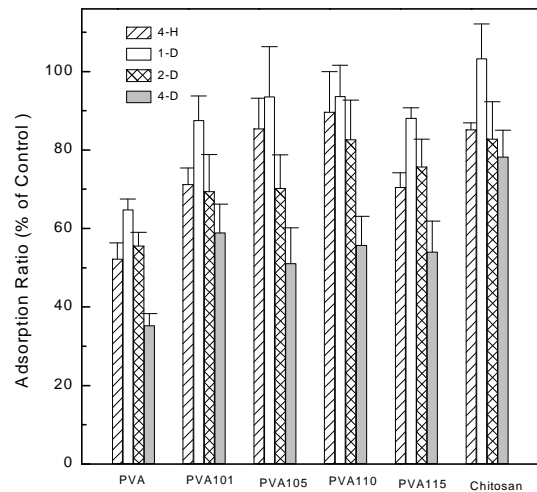
本研究主要是利用鈰離子起始劑將聚醋酸乙烯酯接枝到幾丁聚醣鏈上。反應系統為一穩定的分散水溶液。幾丁聚醣不僅參與反應，也充當著界面活性劑的角色。將水溶液直接烘乾成膜，結果得到的是顆粒膜，且在顆粒表面富含幾丁聚醣。將此材料應用於銅離子吸附上，其吸附過程是擴散模式控制，而其擴散係數會隨幾丁聚醣含量增加而增加。以戊二醛進行交聯過後的材料，其機械性質有明顯的改善，但吸水度與銅離子吸附總量均下降。將分散相水溶液醇化，可以獲得幾丁聚醣與聚乙烯醇接枝共聚物。將其應用在細胞培養上，發現幾丁聚醣的加入明顯改善了細胞在材料上的貼附，使得細胞活性增加。在血液適合性方面，發現有一最適合的組成，其材料吸附血小板的量為最低。在生物分解性測試上，幾丁聚醣與聚乙烯醇接枝共聚物在 48 小時後會完全分解。本計畫完成了(1)幾丁聚醣/聚醋酸乙烯酯接枝共聚合體的合成；(2)幾丁聚醣/聚醋酸乙烯酯共聚合體的結構分析；(3)幾丁聚醣/聚醋酸乙烯酯共聚合體的機械性質、吸水性和銅離子吸附性；(4)幾丁聚醣/聚醋酸乙烯酯共聚合體的交聯及其機械性質、吸水性和銅離子吸附性；(5)幾丁聚醣/聚乙烯醇接枝共聚合體的製備；(6)幾丁聚醣/聚乙烯醇接枝共聚合體的骨母細胞培養；(7)幾丁聚醣/聚乙烯醇接枝共聚合體的血液適合性；(8)幾丁聚醣接枝共聚合體的生物分解性測試。大致符合了計畫的預期目標。本研究甚具學術與應用價值，已向國際有名期刊提出五篇文章，準備發表。

合

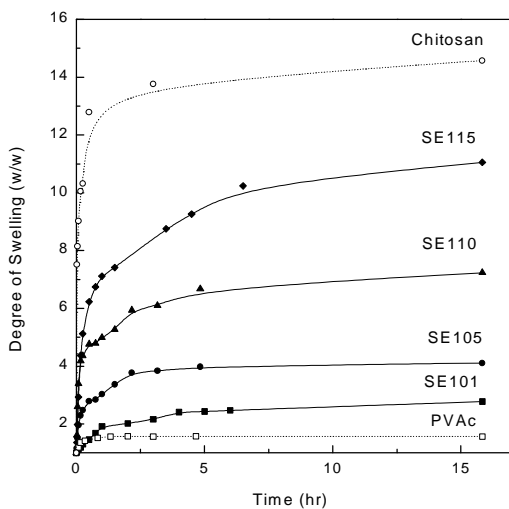
解物分體

六、參考文獻

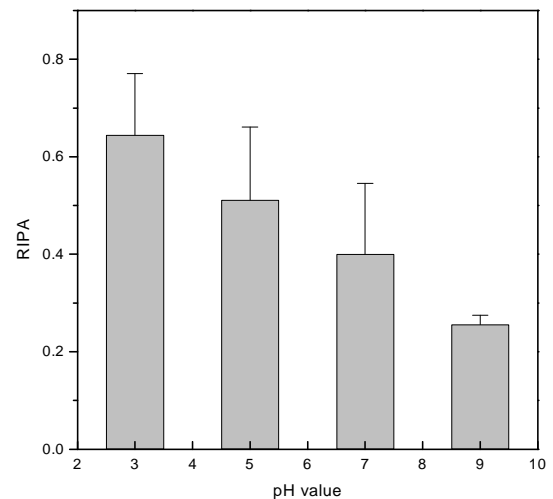
1. Brine, C. J.; Sanford, P. A.; Zikakis, J. P. (Eds.), *Advances in Chitin and Chitosan*, 1992, Elsevier Applied Science, London.
2. Muzzarelli, R. A. A.; *Chitin*, 1977, Pergamon Press, Oxford.
3. Skjak-Braek, G.; Anthonsen, T.; P. Sanford (Eds.), *Chitin and Chitosan*, 1992, Elsevier Applied Science, London.
4. Stevens, W. F.; Rao, M. S.; Chandkrachang, S. (Eds.), *Chitin and Chitosan*, 1996, Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand.
5. Chen, R. H.; Chen, H. C. (Eds.), *Advances in Chitin Science*, 1998, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan.
6. Woodhouse K. A., Brash J. L., 1992, *Biomaterials*, 13, 1103.
7. Kubota N., 1997, *J. Appl. Polym. Sci.*, 64, 819.
8. Inoue K., Baba Y. and Yoshizuka K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 66, 2915 (1993)
9. Onsoyen E. and Skaugrud Q., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 49, 396 (1990)
10. Boyan B. D., Batzer R. and Kieswetter K., 1998, *J. Biomed. Mater. Res.*, 39, 77.
11. Kulik E. and Ikada Y., 1996, *J. Biomed. Mat. Res.*, 30, 295



圖二 幾丁聚醣/聚醋酸乙烯酯接枝共聚合體銅離子吸附量與時間的關係。



圖一 幾丁聚醣和接枝共聚合體的吸水度與時間的關係。



圖三 幾丁聚醣/聚乙醇薄膜進行細胞培養後的 MTT 測試結果。