

私立東海大學化學工程研究所

碩士論文

指導教授：王 曄 博士

生分解性高分子聚己內酯混摻  
幾丁聚醣微粒應用於生醫材料之研究

The Application of PCL/CS Nanoparticle Composite Membrans  
as Biomedical Materials .

研究生：洪蕙豐 撰

中華民國九十九年七月

## 誌謝

於碩士的兩年間，首先想由衷的感謝恩師 王曄教授這兩年來悉心的指導，老師嚴謹的實驗態度、實事求是、對研究的認真與執著使學生蒔豐從中除了學習到知識與經驗外，也使我養成對每件事情負責的態度、越挫越勇與忍耐寬恕之精神。

特別感謝生科系 鄭葳教授與學弟柏翰於細胞培養給予幫助與指導，使學生能順利完成論文；同時感謝交通大學吳建興教授、塑膠發展中心沈曉復博士及東海大學喬緒明教授撥冗費心審查,並提供精闢之批評和建議,使本論文更臻完善。

同時感謝在研究所兩年中，郭舜盈學長、楊淨斐學姊、賴助昇學長於實驗上之指導，也感謝威吉同學、及學弟懷彬、偉倫、永承實驗上的協助、生活上的鼓勵與照顧，使得蒔豐能順利畢業，謝謝你們。

最後感謝我的家人爸爸、媽媽、妹妹這些日子裡來對我的付出栽培與鼓勵，使我於學業上能無慮的專心向學，在此謹以此篇論文獻給我最愛的家人與關心我的親友們，謝謝你們。

## 摘要

本研究是利用離子凝膠法來製備幾丁聚醣微粒，再利用溶液法分別以冰醋酸、THF 為溶劑將幾丁聚醣微粒與聚己內酯均勻混摻。添加幾丁聚醣的目的主要是促進 PCL 的分解速率；而讓幾丁聚醣成微粒的原因是要讓微粒於 PCL 當中呈非連續相狀態，藉此改善複材之脆性，保有 PCL 之韌性。聚己內酯本身為疏水性材料，而幾丁聚醣則具親水性，兩成份相容性不佳，因此本研究添加了 PCL-g-AA 改善 PCL 跟 CS 之間的相容性，使得 CS 微粒能更均勻分散其中以達到複材機械性質的再補強。進一步的藉由 SEM、OM 微結構分析、DSC、拉伸測試、FTIR 來觀察複材相容性與其物性。

接著將複材置入溶菌酶酵素環境中來觀察複材的分解情況。之後更利用醋酸與鹽酸的混合溶液來將複材表面的幾丁聚醣微粒酸洗後形成微孔洞複材，藉由細胞培養來觀察細胞對於微孔洞複材之生長情況。

# 目 錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目 錄.....	III
表 目 錄.....	VIII
圖 目 錄.....	X
<b>壹、緒論.....</b>	<b>1</b>
1-1 研究背景與動機 .....	1
1-2 研究方法與目的 .....	2
<b>貳、文獻回顧.....</b>	<b>3</b>
2-1 生物可降解性高分子材料簡介.....	3
2-1-1 生物可降解性高分子之分類 .....	5
2-1-2 生物可降解性高分子材料應用 .....	6
2-1-3 生醫材料之簡介.....	7
2-2 PCL/CS 複合膜 .....	8
2-2-1 聚己內酯 .....	10
2-2-2 幾丁聚醣 .....	12
2-2-3 聚己內酯與幾丁聚醣複合膜的製備方式 .....	15
2-2-4 溶液法製備聚己內酯與幾丁聚醣複合膜特性 .....	18

2-3 幾丁聚醣奈米微粒製備方式 .....	19
2-4 材料表面型態對生物相容性/細胞貼附之影響 .....	22
<b>參、實驗方法與原理.....</b>	<b>27</b>
3-1 實驗材料 .....	27
3-1-1 摻合物製備之材料 .....	27
3-1-2 生物分解培養液之成分材料 .....	29
3-2 高分子摻合物之製備 .....	30
3-2-1 PCL-g-AA 之製備與接枝率測定 .....	30
3-2-2 離子凝膠法製備幾丁聚醣微粒 .....	31
3-2-3 溶液法製備 PCL/CS 與 PCL/PCL-g-AA/CS 奈米顆 粒複合膜 .....	32
3-3 熱差掃描式分析(DSC).....	33
3-4 傅立葉轉換紅外線光譜儀分析.....	33
3-5 微結構分析 .....	34
3-5-1 光學顯微鏡 .....	34
3-5-2 熱場發射掃描式電子顯微鏡 .....	35
3-6 粒徑分析儀 .....	35
3-7 拉伸測試.....	36
3-8 生物分解培養液的製備 <sup>[32]</sup> .....	36

3-9 細胞培養.....	37
<b>肆、結果與討論.....</b>	<b>39</b>
4-1 傅立葉轉換紅外線光譜儀(FTIR) .....	39
4-2 幾丁聚醣微粒 .....	45
4-2-1 幾丁聚醣微粒粒徑 .....	45
4-2-2 幾丁聚醣界面電位 .....	51
4-3 PCL/CS 與 PCL/PCL-g-AA/CS 複合膜微結構分析 .....	51
4-3-1 複合膜中幾丁聚醣微粒的分散狀況 .....	52
4-3-2 複合膜表面微結構 .....	56
4-4 拉伸測試.....	60
4-4-1 不同溶劑對聚己內酯拉伸性質之影響 .....	60
4-4-2 以醋酸為溶劑製備複材之拉伸性質 .....	60
4-4-3 以 THF 為溶劑製備複材之拉伸性質 .....	61
4-5 熱差掃描式分析(DSC) .....	65
4-6 複材於酵素分解液中之生物降解性 .....	68
4-7 細胞對於表面微孔洞複材之生長情況 .....	74
4-7-1 PCL/CS 與 PCL/PCL-g-AA/CS 微孔洞複材 .....	74
4-7-2 細胞培養 .....	78
<b>伍、結論.....</b>	<b>85</b>

陸、未來研究方向.....	87
柒、參考文獻.....	88

## 表目錄

表 2-1 分解性高分子的分解形式 .....	4
表 2-2 生物可降解性高分子主要用途 .....	6
表 2-3 幾丁聚醣/幾丁質的加工特性及其在生醫材料上之應用 .....	15
表 4-1 幾丁聚醣於FT-IR中之特徵吸收峰 .....	41
表 4-2 PCL於FT-IR中之特徵吸收峰 .....	42
表 4-3 幾丁聚醣微粒粒徑分析 .....	46
表 4-4 幾丁聚醣微粒界面電位分析(0.1 wt% CS) .....	51
表 4-5 摻合物拉伸試驗之各項數據 .....	63
表 4-6 摻合物拉伸試驗之各項數據 .....	65
表 4-7 複合膜之DSC分析結果數據 .....	67
表 4-8 不同濃度複材酸洗後的表面孔洞孔徑 .....	78



## 圖目錄

圖 2-1 生物分解性塑膠之分解流程.....	3
圖 2-2 聚己內酯之結構示意圖.....	11
圖 2-3 幾丁質及幾丁聚醣結構式示意圖.....	13
圖 2-4 PCL/CS(75/25) 於 100°C 下OM圖.....	17
圖 2-5 PCL/CS(75/25) 溶於二氯甲烷下OM圖.....	17
圖 2-6 幾丁聚醣與三聚磷酸鈉水溶液的離子交互作用機制.....	21
圖 2-7 幾丁聚醣與三聚磷酸鈉交聯成微粒示意圖.....	22
圖 3-1 塑譜儀全貌圖及轉子零件示意圖.....	30
圖 3-2 PCL-g-AA 結構示意圖.....	30
圖 4-1 PCL 與 PCL/CS 之 FT-IR 分析光譜圖.....	43
圖 4-2 PCL 與 PCL/PCL-g-AA/CS 之 FT-IR 分析光譜圖.....	44
圖 4-3 PCL-g-AA 與 CS 間的化學鍵結.....	45
圖 4-4 CS=0.1 wt% 下 CS 微粒粒徑分佈.....	47
圖 4-5 CS/TPP=5.3 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 FESEM 圖.....	48
圖 4-6 CS/TPP=4 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 FESEM 圖.....	48
圖 4-7 CS/TPP=2.7 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 FESEM 圖.....	49
圖 4-8 CS/TPP=5.3 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 OM 圖.....	49
圖 4-9 CS/TPP=4 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 OM 圖.....	50

圖 4-10 CS/TPP=2.7 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 OM 圖 .....	50
圖 4-11 PCL/CS(90/10)複材 OM 圖 .....	53
圖 4-12 PCL/CS(90/20)複材 OM 圖 .....	53
圖 4-13 PCL/CS(70/30)複材 OM 圖 .....	54
圖 4-14 PCL/PCL-g-AA/CS(85/5/10)複材 OM 圖 .....	54
圖 4-15 PCL/PCL-g-AA/CS(70/10/20)複材 OM .....	55
圖 4-16 PCL/PCL-g-AA/CS(55/15/30)複材 OM .....	55
圖 4-17 以醋酸為溶劑製備複材之 FESEM 圖 .....	58
圖 4-18 以 THF 為溶劑製備複材之 FESEM 圖 .....	59
圖 4-19 PCL 與 PCL/CS 摻合物拉伸試驗之應力-應變圖 .....	62
圖 4-20 PCL 與 PCL/PCL-g-AA/CS 摻合物拉伸試驗之應力-應變圖 .....	63
圖 4-21 PCL 與 PCL/CS 摻合物拉伸試驗之應力-應變圖 .....	64
圖 4-22 PCL 與 PCL/PCL-g-AA/CS 摻合物拉伸試驗之應力-應變圖 .....	64
圖 4-23 PCL 與 PCL/CS 摻合物於升溫過程之 DSC 分析圖 .....	66
圖 4-24 PCL 與 PCL/PCL-g-AA/CS 摻合物於升溫過程之 DSC 分析圖 .....	67
圖 4-25 PCL/CS(90/10)與 PCL/PCL-g-AA/CS(85/5/10)酵素降解 .....	70
圖 4-26 PCL/CS(80/20)與 PCL/PCL-g-AA/CS(70/10/20)酵素降解 .....	71
圖 4-27 PCL/CS(70/30)與 PCL/PCL-g-AA/CS(55/15/30)酵素降解 .....	72
圖 4-28 PCL/CS 複材酵素重量損失曲線圖 .....	73

圖 4-29 PCL/PCL-g-AA/CS 複材酵素重量損失曲線圖.....	73
圖 4-30 製備孔洞複材示意圖 .....	74
圖 4-31 PCL/CS 微孔洞複材 FESEM 圖 .....	76
圖 4-32 PCL/PCL-g-AA/CS 微孔洞複材 FESEM 圖 .....	77
圖 4-33 PCL/CS 複材細胞培養後以螢光複式顯微鏡觀察 .....	80
圖 4-34 PCL/CS 複材細胞培養後以螢光複式顯微鏡觀察 .....	81
圖 4-35 PCL/PCL-g-AA/CS 複材細胞培養後以螢光複式顯微鏡觀察 .....	83
圖 4-36 於細胞培養盤上酸洗後複材 SEM (magnification : 5000X).	84

# 壹、緒論

## 1-1 研究背景與動機

近年來，隨著醫療的進步，對於生醫材料的研究也愈形廣泛。生醫材料為製造體內或體外使用的醫學器材料，由於這些生醫材料會直接或間接的與人體組織、體液或血液等接觸，因此除了必須考慮材料的物理機械、化學性質之外，還需考慮材料與人體間的體內穩定性、無毒(nontoxicity)、生物降解性、生物相容性(biocompatibility)<sup>[1]</sup>。目前被應用的生醫材料可分成兩類：合成材料及天然材料。其中在合成材料中以易於加工、具有生物分解性(biobioegradable)、可吸收性(bioresorbable)的高分子材料為作主流。

所謂的高分子複合材料，即是透過不同性能材料的複合，來達到取長補短的效果，有效的來補強材料的強度、韌性及生體相容性等性質。本研究所探討的聚己內酯為一具有良好的生物相容性與韌性之高分子，但其本身的疏水性質使其生物分解速率較慢，因此可添加天然可分解性高分子來做補強。本研究是將幾丁聚醣與聚己內酯來做混摻，其目的主要是由於幾丁聚醣具有(1)低成本(2)容易獲得(為自然界可得高分子含量第二高，僅次於纖維素)(3)較高的生物分解性(4)生物相容性(5)抗菌性的特性<sup>[2]</sup>，將兩材料摻合可讓複材達到再補強之效果。

## 1-2 研究方法與目的

本研究首先以離子凝膠法的方式來製備幾丁聚醣微粒，接著再利用溶劑澆鑄法(casting from solvent)，以冰醋酸、THF 為溶劑將幾丁聚醣微粒與聚己內酯均勻混合，再澆鑄於鐵氟龍盤上烘乾即可製得不同比例之薄膜複材。

讓幾丁聚醣呈微粒狀態再做混摻的主要目的為(1)由於幾丁聚醣相較於聚己內酯有較差的韌性，因此讓幾丁聚醣以微粒的分散相狀態混摻入聚己內酯中，並進一步的探討其複材機械性質之補強效果(2)由於材料的表面型態對於細胞的生長有重大的影響，因此想利用表面酸降解程序將複材表面的幾丁聚醣微粒洗去形成微孔洞複材，再進一步的藉由細胞培養對於材料的表面性質反應，進而了解材料表面之生物相容性(3)幾丁聚醣微粒粒徑小於足以在溶劑中呈懸浮狀態，因此在溶劑上的選擇便可只考慮與聚己內酯間的相容性，本研究方法分別以醋酸、THF 為溶劑來製備複材，並進一步探討不同溶劑對複材性質的影響，藉此來尋找一最適溶劑。

高分子複合材料可透過不同特性材料之結合來改善材料的強度、韌性、生物相容性等，其中提高複材界面之間的相容性為高分子複合材料研究之重要課題。本研究中聚己內酯的疏水性質與幾丁聚醣的親水性質使得兩材料間的相容性不佳，所以將聚己內酯用混煉的方式接枝丙烯酸所得 PCL-g-AA 共聚物添加入複材之間做為相容劑，以此改善複材之均勻性。

## 貳、文獻回顧

### 2-1 生物可降解性高分子材料簡介

所謂生物可降解性高分子(biodegradable polymers)即是可經由某種機制而在合適的自然環境中被分解之高分子，分解機制可能是物理壓力、化學反應、光化學作用或生物分解等。在分解過程中，材料的理化特性逐漸轉弱而變脆，並經過風吹雨打等自然力量，使製品分裂瓦解成微小碎片，混入土壤中，再經由水解、溶解或微生物分解成簡單分子(二氧化碳、水、和腐植質)而消失無形，其分解過程如圖 2-1 所示<sup>[3]</sup>。此類材料通常具有以下特點 1. 含有可水解的鏈結，如酯基、醯胺基、尿素基等且不具苯環 2. 親水性 3. 低結晶性。

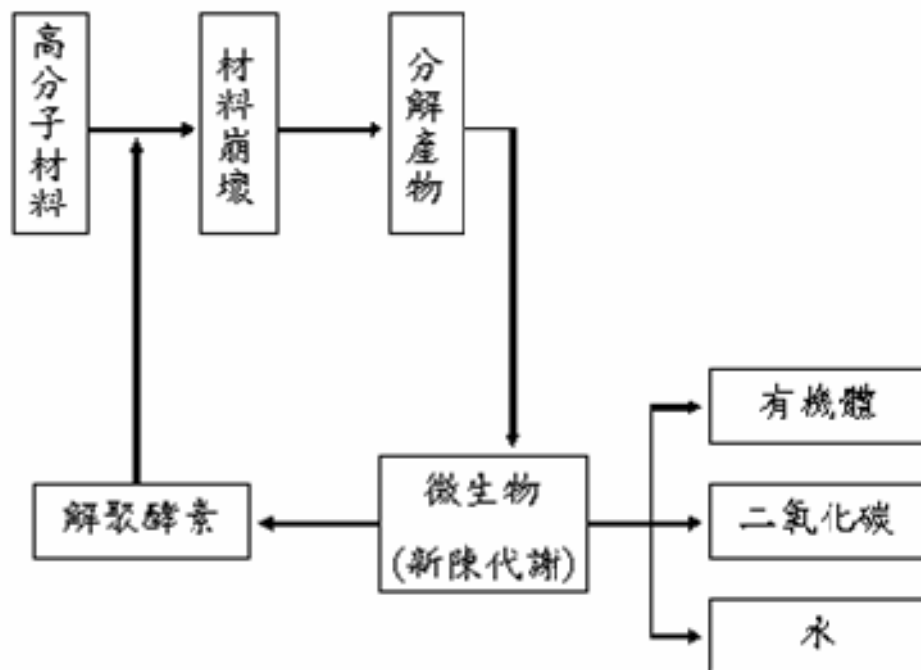


圖 2-1 生物分解性塑膠之分解流程

分解性主要可由下列三種方式引發，包括光分解性、生物分解性、化學分解性，上述三種分解性可單獨或合併進行，如表 2-1。

- (1) 光分解性：光分解性是指高分子材料暴露在陽光下所造成之分解。有數種技術可被應用來製造光分解性塑膠，將對陽光敏感之成份添加到高分子中是最被常採用之方式。
- (2) 生物分解性：生物分解性是指高分子材料暴露在微生物活性作用下所造成之分解，生物分解性會受許多環境條件之影響，包括溫度、溼度、微生物之種類、及數量等。經由此極為複雜之生物分解作用後，將導致材料之性質改變，甚至分裂成碳、氫、氧等分子。
- (3) 化學分解性：化學分解性是指材料高分子鏈中之化學成分作用所造成之分解，此化學成分自高分子長鏈中斷裂脫離造成材料性質之改變。

表 2-1 分解性高分子的分解形式

分解性塑膠	光分解性塑膠	聚合型
		添加型
	生物分解性塑膠	完全生物分解性塑膠
		崩壞性生物分解性塑膠
	化學分解性塑膠	氧化分解性塑膠
		水解分解性塑膠
	上述三類組合的分解性塑膠	光/生物分解性塑膠
		生物/氧化分解性塑膠
		生物/水解分解性塑膠
		光/氧/生物分解性塑膠

可生物降解性高分子的分解過程大概可分為三個階段：

- (1) 高分子材料的表面被微生物黏附以及材料本身的水分吸收。
- (2) 高分子材料在微生物所分泌的酵素作用下，透過水解和氧化等反應發生酯鍵(ester bond)的斷裂(cleavage)，成為較低分子量的寡聚物(oligomer)。
- (3) 微生物吸收或消耗低分子量的寡聚物，再經由代謝，最終轉換形成CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O。

生物可降解性材料主要可分為天然和化學合成高分子兩大類，天然的生物可分解性材料如：膠原蛋白(collagen)、褐藻酸鹽(Alginate)、透明質酸(Hyaluronic acid)、明膠(gelatin)、幾丁質(chitin)、幾丁聚醣(chitosan)。天然材料生物相容性好，具有細胞識別訊號，有利於細胞吸附增殖和分化，但材料本身的機械強度較差，分解速度不易控制，所以通常此類材料會被作為添加劑加入其他聚合物中，以此增加聚合物之分解性與生物相容性。

### 2-1-1 生物可降解性高分子之分類

人工合成的材料以合成方式又可分類為微生物生產高分子與化學合成高分子材料；微生物高分子是利用自然界中的微生物，會於體內形成聚醣作為儲存能量之物質，使用生物合成方法，這些微生物可在最佳條件下有效地發酵形成聚醣；這類產品不僅具有較高的生物分解性，亦具有熱塑性，但因價格昂貴，故降低其生產成本是今後發展的方向，此類材料如：PHA(Polyhydroxyalkanoate，聚羥基烷酯)。化學合成高分子材料其合成方式有縮合聚合法及開環聚合法，縮合聚合



法是指具有不同官能基團的單體之間通過脫水酯化得到聚酯的過程，反應條件容易控制，生產成本較低；開環聚合法主要包括交酯類和內酯類的開環聚合，所得的產物相對分子質量較高，此類材料如：聚己內酯(PCL)、聚乳酸(PLA)。其中如聚乳酸為半發酵半合成高分子，從玉米中的澱粉經糖化發酵獲得乳酸單體，將乳酸直接縮聚為寡聚體再降解製成丙交酯，最後將丙交酯開環聚合得到聚乳酸。或是直接經由乳酸縮聚合成。

## 2-1-2 生物可降解性高分子材料應用

生物可降解性高分子因其本身的生物分解性，具高附加價值，用途極為廣泛，其主要用途如見表 2-2<sup>[4]</sup>。

表 2-2 生物可降解性高分子主要用途

領域		用途說明
利用於室外環境	農漁業用資材	多層薄膜、育苗用容器、魚網、釣魚線
	土木建築用資材	隔熱材料、土木工程用鑄型、水土保持用布材、護土網
	野外休閒用品	高爾夫球運動用品、釣具、登山用品、海洋運動用品
使用後難以回	食品包裝用薄	生鮮食品的包裝托盤、速食店用容

收或再利用的 部分(堆肥處理 最有效)	膜・容器	器、便當盒
	衛生用品	紙尿布、生理用品
	事務用品	鉛筆盒、牙刷、垃圾袋、免洗衣服
特殊機能用品	緩解性	醫藥品、農藥、肥料、種子等的被 覆材料
	保水性・吸水性	砂漠或荒地的育林用素材
	生體內分解・ 吸收	手術縫合線、飲料用包裝材的內部 塗佈材料
	低透氧性・非 吸著性	食品包裝薄膜、飲料用包裝材的內 部塗佈材料
	低融點	包裝、製本、製袋時採用的接著劑

### 2-1-3 生醫材料之簡介

生醫材料的定義是指一類具有特定性能、特種功能，用於人工器官、外科修復、理療康復、診斷、檢查、治療疾患等醫療保健領域的材料。臨床上所使用的生醫材料主要可以分為四大類，分別為：金屬與合金材料(metals and alloys)、陶瓷材料(ceramics)、高分子材料(polymers)與生物組織材料(biological materials)。

生醫材料由於會直接的或間接的與人體的組織、體液或血液等接觸。因此在製造這些醫學器材時除了一般材料的物理、化學性質外，還需考量其與人體組織、體液或血液等接觸時的生物相容性質 (biocompatibility)、生物可吸收性，以及促進組織再生的功能性。所謂的生物相容性質涵蓋了當材料與人體組織、體液或血液等接觸時，其界面或各自所發生的一切現象，例如：蛋白質的吸附、血栓的產生、免疫反應、材料的分解速率等等。適用於在人體內理想的生醫材料必須符合以下的條件：

- (1) 材料需具有無毒性(non-toxicity)，不會引發溶血、免疫、發炎等反應。
- (2) 材料需具有基本的功能性(functionality)，才可作為受損器官組織的替代或修補物。
- (3) 材料需具有可消毒性(sterilizability)，可使用壓力鍋、E.O.、電漿、臭氧、 $\gamma$  射線等技術進行消毒。
- (4) 材料需具有生物相容性(biocompatibility)。
- (5) 材料需具適當的機械性質，足以來承擔環境中所受的強度，且其材料的性質也必須與其替代宿主組織所擔任的工作儘可能的匹配。
- (6) 材料需具有可分解性(degradability)，以提高生物相容性。
- (7) 材料必須容易獲得且成本便宜。

## 2-2 PCL/CS 複合膜

高分子摻合(polymer blend)是指將兩種或兩種以上的高分子，利用熱熔融法或利用溶劑澆鑄法(casting from solvent) 輔以機械方式均

勻摻混，形成一種擁有綜合各高分子特定物理或化學性質的新高分子複合膜

，以達到取長補短之效果，有效的來補強材料的強度、韌性及生體相容性等性質。

高分子摻合是採用物理方式來進行混摻，其分子間的作用力主要來自於分子跟分子間的二級作用力(secodary force)來結合，如：凡得瓦爾力(Van der Walls force)、離子－離子力(ion-ion force)、離子－偶極力(ion-dipole force)、偶極－偶極力(dipole-dipole force)、電子轉移(charge-transfer complexes)或是分子間氫鍵(hydrogen bonding)，以上這些二級鍵結力的交互作用，為高分子複合膜混合效果或相容程度之主要關鍵，這也正是影響高分子複合膜物性優劣的重要因素之一。高分子摻合體依據其相容性的型態可以分為下列三種類型：

- (1) 相容高分子摻合體(miscible polymer blend)此類型高分子摻合物系統由熱力學的觀點來看，混合時自由能的變化量( $\Delta G$ )為負值，一般具有單一的玻璃轉移溫度，高分子摻合物在任何溫度與組成下均呈現單一相行為(single phase)，高分子間能完全均勻混合，無明顯的界面存在。
- (2) 部分相容高分子摻合體(partially miscible polymer blend)此類型高分子摻合物系統可能只在特定的溫度與組成比例下才呈現單一相行為，其在某些組成條件下呈現均勻混合，但又在某些組成條件時呈現相分離狀態，其特性介於相容與不相容摻合體之間。
- (3) 不相容高分子摻合體(immiscible polymer blend)此類型高分子摻合物系統以熱力學的觀點來看，混合時其混合自由能(free energy)為正值；無論在哪一種溫度與組成的配比下，高分子摻合體均呈

現兩種以上相形態者，各高分子成份皆以相分離狀態呈現，故其性質及形態不具有均一性。此高分子摻合體內組成成份含量較多者以連續相(continuous phase)稱之，反之組成成份含量較少者稱之為分散相(dispersed phase)。

摻合體依據其預摻合高分子成份的種類不同可以分為下列三種情況：

- (1) 同系高分子摻合體(homologous polymer blend)由不同分子量的同一種高分子進行摻合而產生的高分子摻合體。
- (2) 相容化高分子摻合體(compatible polymer blend)指藉由第三成分(通稱為相容化劑)改善原本不相容高分子摻合體的界面性質，而得到擁有良好特性的高分子摻合體。
- (3) 互穿網狀高分子(interpenetrating polymer network, IPN)構成高分子摻合體的成分至少有一成分在另一成分存在的情況下被合成(synthesized)出來或發生交聯(crosslinked)反應，並且高分子摻合體中各成分皆必需為連續相。

高分子摻合體中的各種高分子間，或多或少勢必存有某種交互作用，而會造成彼此牽制或影響，例如若於組成中有一高分子具有結晶性，其結晶行為與相形態必然會因其他高分子的加入，而與故有的高分子展現出顯著差異，結晶程度的高低對於高分子的物理化學與機械性質有著極大的影響，故高分子摻合體在摻合前後對結晶行為的影響為探討的要素之一。不同化學結構的高分子，也可能於分子間產生化學鍵結，如接枝上丙烯酸酯的聚己內酯，其結構上的-COOH會與幾丁聚糖的-NH產生共價鍵結；因此比起聚己內酯，接枝上丙烯酸酯後的聚己

內酯與幾丁聚醣之間會有較佳的相容性<sup>[38-39]</sup>。

### 2-2-1 聚己內酯

聚己內酯(polycaprolactone, PCL)為脂肪族類的聚酯高分子(aliphatic polyester)，是經由單體己內酯開環聚合反應所提煉出來的一種熱塑性生物可分解性高分子，此材料具有良好的柔韌性、加工性、生物相容性、降解性、疏水性與藥物滲透性，於醫用材料、藥物遞送系統、和組織工程生醫支架等方面受到廣泛的研究<sup>[5,6,7]</sup>。但其結晶性質、疏水性、細胞不容易於材料上附著、降解速度緩慢限制了其材料的應用範圍。因此常藉由添加親水性天然高分子材料(如幾丁聚醣、澱粉)<sup>[8,9,10]</sup>或與其它分解速率較快的聚酯共混(如聚乳酸、聚乙二醇)<sup>[11,12]</sup>來提高聚己內酯的親水性加速材料的降解速率。

結構式：

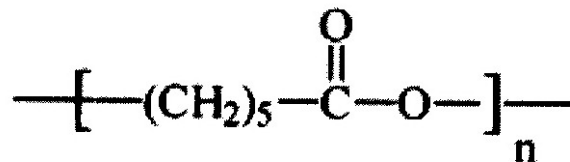


圖 2-2 聚己內酯之結構示意圖

性質：

聚己內酯為一半結晶性的聚合物，依結晶程度的不同，熔點(Tm)範圍在 59~64°C 間，玻璃轉移溫度(Tg)為-60°C，裂解溫度可達 350°C，溶解參數(solubility parameter)為 20.4J<sup>1/2</sup>cm<sup>-3/2</sup>，結晶程度可由 100%結

晶度聚己內酯的融熔熱(142J/g)推算<sup>[13]</sup>；PCL 具有類似聚乙烯的斜方晶系(orthorhobic)晶體結構，在 2003 年，E. T. H. Vink 等人<sup>[14]</sup>提到 PCL 的 X-ray 特徵繞射峰  $2\theta=21.2^\circ$ 、 $21.8^\circ$ 、 $23.6^\circ$ ，所對應的繞射晶面為(110)、(111)、(200)；材料柔韌性良好，溶於氯仿中成膜其延伸率可達 1000%以上<sup>[15]</sup>，因此可作為增塑劑、脫膜劑、色料分散劑、及熱熔性黏著劑使用。

生物降解性：

由動物實驗得知，聚己內酯的降解機制包含兩個階段：第一階段是聚合物長鏈上的酯鍵(ester linkages)經水解而在隨機的部位發生斷鏈。在此階段中聚合物分子量的降低，但重量並無改變；第一階段經水解後產生的碎片在第二階段時會被水解地更徹底，且其水解後所形成的小粒子會被巨噬細胞吞噬，因此在第二階段時有重量減少的現象。被吞噬後主要的代謝物是 $\epsilon$ -羧基己酸( $\epsilon$ -hydroxycaproic acid)。

生物相容性和毒性：

聚己內酯的毒性探討通常都以Capronor®作為代表，它是一種含左諾杰垂(levonorgesterl)的長效型避孕藥。在為期兩年的動物實驗中，評估的項目有：驗尿、糞便、眼睛及組織切片的檢查，發現實驗組和對照組在這些項目中的評估並無明顯差異，因此一般認為聚己內酯在體內的相容性很好，且幾乎沒有毒性。

## 2-2-2 幾丁聚醣

幾丁質(Chitin)為一天然高分子聚合物，以N-乙醯葡萄糖胺

(N-acetyl-D-Glucosamine)為聚合單位，再以 $\beta$ -1,4 鍵聚合成堅硬的高分子。其普遍存在於節足動物的外殼及真菌、褐藻細胞外壁，在自然界中的含量豐富，僅次於纖維素，來源不虞匱乏。Hoppe-Seyler於1894年發現<sup>[16]</sup>，將幾丁質與氫氧化鉀在180°C下混合溶解，經處理後得到了乙醯化降低的產物，他將之稱為幾丁聚醣(chitosan)。現在，幾丁聚醣也常經由熱鹼液處理，並在高溫下進行去乙醯化，其製備方法，如Broussignac等所提出<sup>[17]</sup>，或以幾丁質的脫乙醯酶之處理法製備<sup>[18]</sup>。

幾丁聚醣 (Chitosan)是由一種(1,4)-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan所聚合的多醣體，其結構與幾丁質及纖維素(cellulose)相似。由於幾丁聚醣的結構上含有胺基及氫氧基兩種不同的官能基團，使幾丁聚醣易以化學方式作修飾改質，產生不同的衍生物。而不同去乙醯化程度及不同分子量的特徵左右了幾丁聚醣的功能表現，無論在溶解度或機械強度上都有所差異性，故可依使用目的的不同，以相對應特性的幾丁聚醣作為應用。

結構式：

幾丁聚醣 $[y/(x+y)] \leq 40\%$ 及幾丁質 $[y/(x+y)] \geq 60\%$ 的化學結構如下圖 2-3。

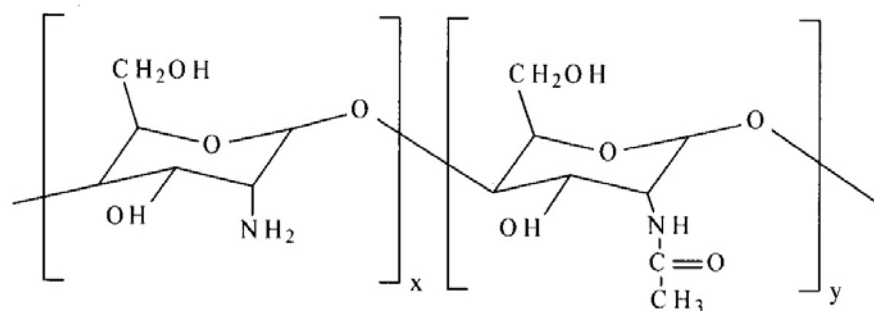


圖 2-3 幾丁質及幾丁聚醣結構式示意圖



特性：

- (1) 為天然的高分子物質，其物理及化學性質穩定。
- (2) 為生物可降解性高分子，在自然界中可被生物體中之溶菌酵素 (lysozyme) 等稱為 Chitinase 所代謝分解，即 enzyme catalyzed hydrolysis，最後可得去乙酰化葡萄糖胺 (N-acetyl glucosamine)，為人體常見的一種胺糖。另外，由 Rao 與 Sharma<sup>[19]</sup> 經組織內的測試中可驗證幾丁聚糖不具毒性，且動物體液會從此種半結晶性高分子中的不定型區域透而入，進行水解並破壞其結晶性質，進而加速代謝分解作用。
- (3) 幾丁聚糖溶液對於多種細菌及真菌之生長有顯著的抑制作用<sup>[20]</sup>，經溶解於弱酸中所成之薄膜亦有抗菌的特性<sup>[21]</sup>，有文獻指出其主要是由於幾丁聚糖為稍呈弱鹼性 (pka=6.3) 的陽離子性聚合電解質，易與其細胞膜表面之負電荷分子作用 (如 N-acetylmuramic acid, sialic acid 和 neuraminic acid 等)，影響其對物質的通透性而抑制細菌生長<sup>[22]</sup>。
- (4) 幾丁聚糖不溶於水、鹼液或普通的有機溶劑，對於某些無機酸，也只能在特定的條件下 (如 PH 值、攪拌及加熱等) 才能溶解，而由文獻上得知<sup>[23]</sup>，幾丁聚糖可溶於甲酸 (formic acid)、醋酸 (acetic acid)、10% 檸檬酸 (citric acid)、丙酮酸 (pyruvic acid)、及乳酸 (lactic acid) 等。經溶解後幾丁聚糖可具弱鹼性的陽離子電解質特性；另一方面，因幾丁聚糖含一級胺基 (amino group) 與一級及二級羥基 (hydroxyl group)，因此幾丁聚糖化學改值的特性優於其他同屬糖類材料。
- (5) 具有良好的成膜、成纖性質。

應用：

以上這些特性使得幾丁聚醣於生醫材料上之研究越來越受重視，其發展也日趨快速，其應用相當廣泛，如下表 2-3。

表 2-3 幾丁聚醣/幾丁質的加工特性及其在生醫材料上之應用

生體適應性對生物體之作用	主要加工特性	用途
無毒性	粉末	人工皮膚、人工骨骼
生物分解性	糊狀/軟膏	繃帶
天然高分子化合物	溶液/膠	隱形眼鏡
促進傷口癒合、縮小傷痕	膜	手術縫合線
止血、吸收滲出液	纖維、不織布	傷口保護用粉劑、軟膏
刺激免疫系統、防止感染	粉末、溶液	食物纖維、噴霧劑
降低血液中膽固醇量	粉末、膠囊	食物纖維

### 2-2-3 聚己內酯與幾丁聚醣複合膜的製備方式

幾丁聚醣具有良好的生物降解性、生物相容性與抗菌性，但因具有較高的玻璃轉移溫度、高結晶度，使得材料本身有較高的彈性模數，因此較具脆硬性；而聚己內酯則具有良好的柔韌性、加工性，但因其疏水性質，使得材料本身不易讓細胞附著、降解速率較慢。因此許多研究中結合了聚己內酯與幾丁聚醣之優點，取長補短製備出同時具有良好的生物相容性與機械性質之複材。

高分子摻合可依據材料本身的特性與應用範圍的不同，於製備高分子摻合物時，搭配加工適宜性及價格因素來選用適當的摻合製備方

式讓高分子可以達到均勻混摻之目的，聚己內酯/幾丁聚醣常用的混摻方式主要有以下兩種：

- (1) 機械式熔融摻合(mechanical melt blending)<sup>[1]</sup>：藉由在高溫熔融狀態下利用高剪切速率將聚己內酯與幾丁聚醣混合，其最大的優點是除了必需要加工的主材料外不需要再添加其他成分(如溶劑)，免除去雜質的步驟，其混合程序簡便、迅速，因此具有較低成本的優勢。圖2-4為以融熔摻合法製備PCL/CS摻合體於100°C下的光學顯微鏡圖(OM)，圖2-5則為共溶劑摻合法下PCL/CS複材經二氯甲烷洗去PCL後的OM圖，由圖中可看出以融熔法下所製備出的摻合體雖然混合方法較為簡便成本費用較低，但分散性比起共溶劑摻合法所製備出的摻合體較為不佳。由文獻中也提及，利用此方法摻合雖然可改善材料間彼此的性質，但以融熔法來製備摻合體會使兩材料間的分散性不佳，且也會有著相分離的問題存在，一次生產所需的原物料量也較大。
- (2) 共溶劑摻合(solution casting)<sup>[43,44]</sup>：選擇一種可以同時溶解欲混合各高分子的溶劑，此溶劑稱為共溶劑；根據文獻資料，可作為聚己內酯與幾丁聚醣的共溶劑主要有醋酸水溶液與六氟異丙醇(Hexafluoroisopropanol, HFIP)兩種；將各高分子置於共溶劑中，加熱溶解製成均勻的溶液，注鑄於模具中，再以持續加熱的方式將共溶劑去除，即可得到高分子摻合體。此種方法很適用於實驗室中進行小量的製備摻合體，因為只需小量的材料即可執行，況且可以在低溫下進行摻合，進而避免裂解現象產生。要尋找到適當的高分子共溶劑並不容易，因為並非每一種高分子對溶劑的吸附力都很低，也無法確保共溶劑不會與各成分起作用，或是溶劑本身的沸點較高不易揮發。

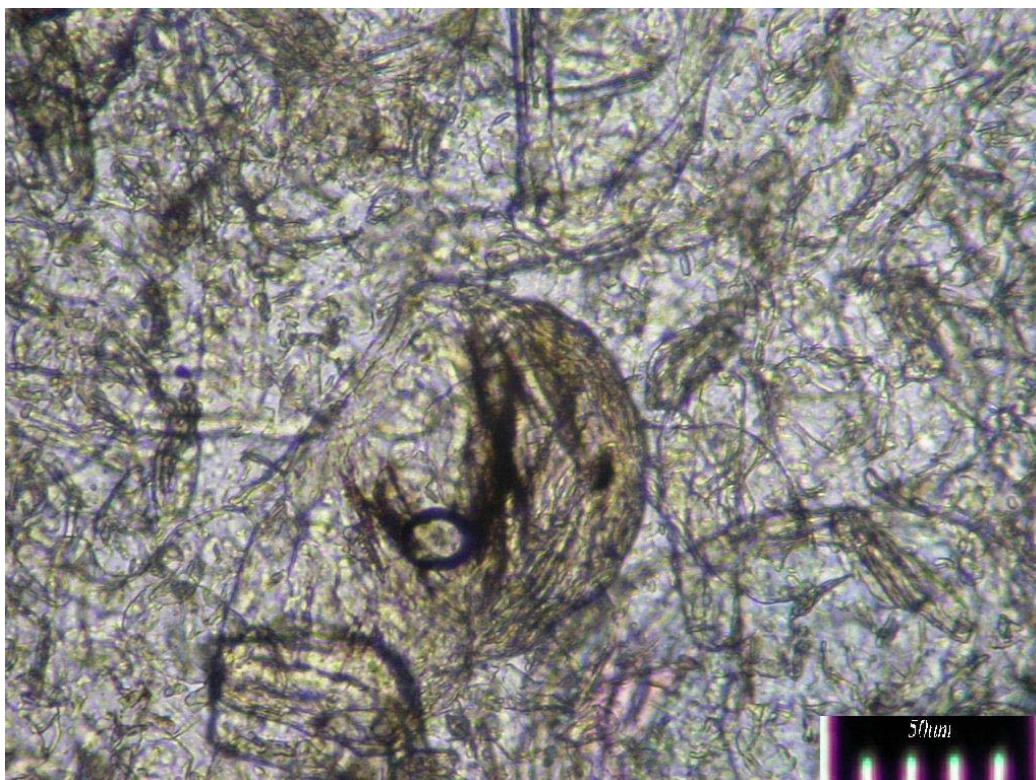


圖 2-4 PCL/CS(75/25) 於 100°C 下 OM 圖

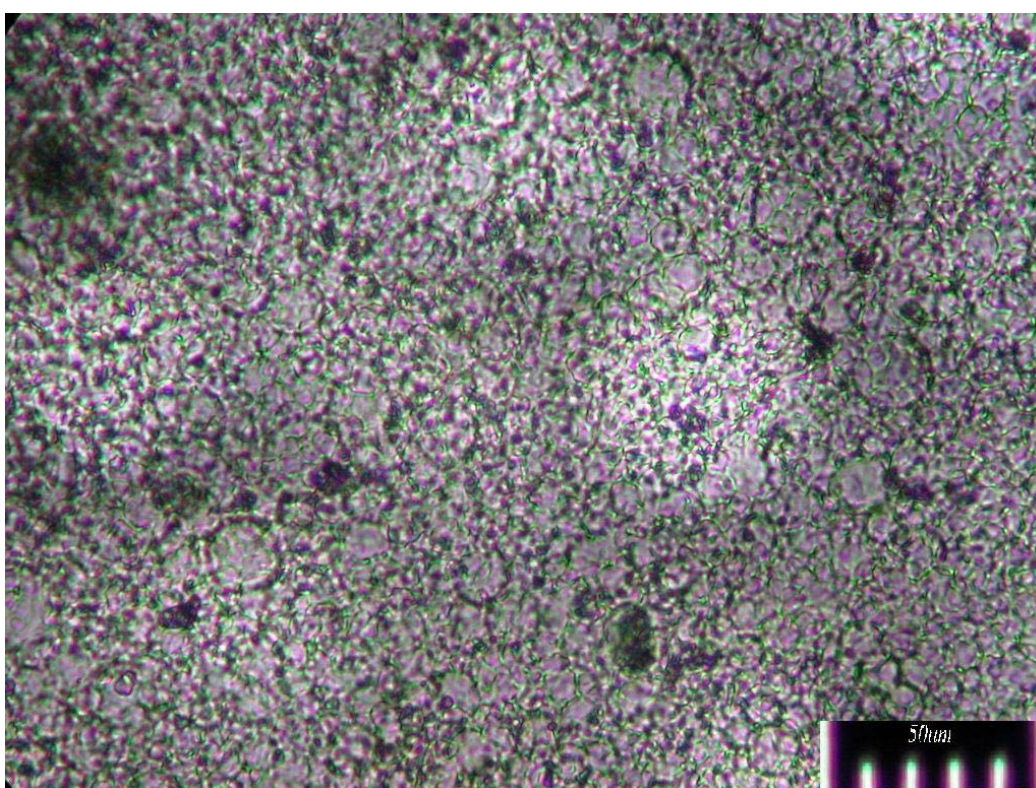


圖 2-5 PCL/CS(75/25) 以二氯甲烷洗去 PCL 後 OM 圖

#### 2-2-4 溶液法製備聚己內酯與幾丁聚醣複合膜特性

藉由共溶劑摻合法所製備的薄膜，於幾丁聚醣在低濃度下幾丁聚醣於摻合體中呈非連續相狀態，聚己內酯則為連續相狀態，而當幾丁聚醣濃度高於 40% 時，此時聚己內酯與幾丁聚醣會呈共連續相狀態<sup>[40]</sup>。添加幾丁聚醣過後的複材，可有效的增加複材的吸濕性、抑制聚己內酯的結晶，進而達到促進複材之降解速率<sup>[41]</sup>，除此之外也可讓複材擁有抗菌的特性<sup>[42]</sup>。複材的機械性質會因幾丁聚醣的添加進而提升複材之拉伸模數與拉伸強度，藉此達到補強材料機械性質的效果。藉由細胞活性測試結果發現，當 PCL 濃度為 50% 以及 75% 時會有較佳的細胞活性，尤其於 50% 時，其機械性質與細胞活性改善最為顯著<sup>[42]</sup>。

根據文獻資料，可作為聚己內酯與幾丁聚醣的共溶劑主要有醋酸水溶液與六氟異丙醇兩種；使用醋酸水溶液來製備 PCL/CS 摻合物，由於聚己內酯難溶於醋酸水溶液，因此在混摻與烘乾過程中，必須於溫度 55°C 條件下來製備才不至於產生相分離的現象。而 HFIP 也可用來作為 PCL/CS 摻合物的共溶劑，但聚己內酯與幾丁聚醣對於溶劑 HFIP 的親合性皆不理想，因此製備出的摻合物會產生部分的相分離。

本研究所使用的混摻方式為溶液法，同樣的將兩材料溶於一溶劑中，注鑄於模具中，再烘乾將溶劑去除製得複材薄膜。不同的是本研究先利用離子凝膠法讓幾丁聚醣呈微粒狀態，其微粒粒徑小於足以讓幾丁聚醣微粒均勻的懸浮於溶劑當中，如此在溶劑的選擇上，無需再共溶之溶劑，只需考慮聚己內酯之溶劑即可。

## 2-3 幾丁聚醣奈米微粒製備方式

幾丁聚醣奈米微粒的製備方式主要有沉澱析出法、乳化合聯法、噴霧乾燥法和離子凝膠法等，不同的製備方法具有各自的優點和不足。

### 沉澱析出法：

沉澱析出法即溶劑揮發法，該法利用幾丁聚醣不溶於鹼性介質的特點，用壓縮空氣將幾丁聚醣醋酸溶液噴入氫氧化鈉溶液形成凝聚微粒。另外，還可以在攪拌條件下逐漸滴加硫酸鈉溶液於含表面活性劑的幾丁聚醣溶液中，利用硫酸鈉的去溶劑化作用而使微球析出。超聲處理後，得到粒徑較均一的微粒。

雖然沉澱析出法製備的微球粒徑、表面狀態、溶漲性質可控，但該方法需在較苛刻的製備條件，如必須存在乳化劑、有機溶劑和超音波振盪下進行，且用這種方法製備的微球的交聯度不高<sup>[8]</sup>。

### 乳化合聯法：

乳化合聯法是利用幾丁聚醣分子鏈上的氨基或羥基能夠與某些化學交聯劑反應的特性製備載藥微球的一種方法。此法首先製備出穩定的W/O型幾丁聚醣微乳液，然後於高速攪拌條件下加入交聯劑，形成微球後再固化分離。

### 噴霧乾燥法：

噴霧乾燥法是指在高溫的氣流中，將藥液或浸膏霧化成微細的液

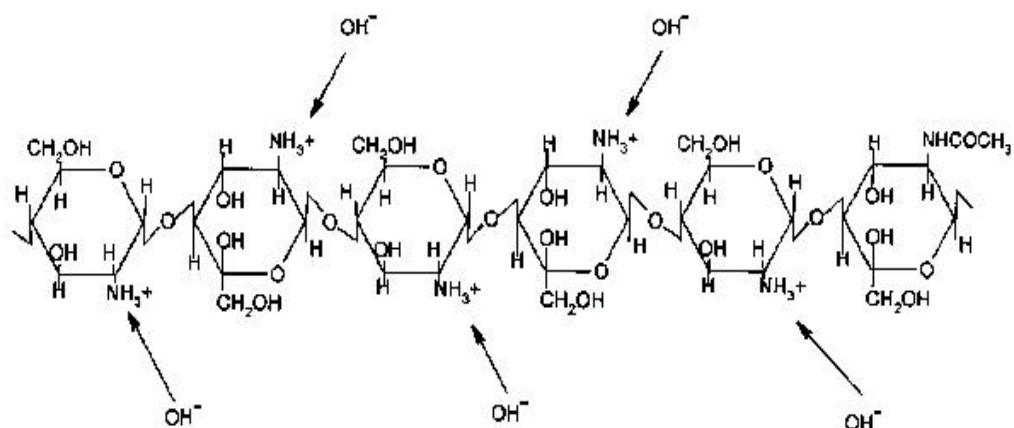
滴進行瞬間乾燥的方法，此法自19世紀發明以來，已廣泛用於食品、藥品、化工原料等粉末的生產。根據這個原理，幾丁聚醣載藥微球通常是將藥物溶入加有交聯劑的幾丁聚醣溶液，通過噴霧乾燥機制得微球，然後經有機溶劑洗滌、離心純化得到。儘管噴霧乾燥法是目前工業制藥中常用的方法，但它對設備的要求高，所得微球的交聯度也不高。

#### 以離子凝膠法製備幾丁聚醣微粒：

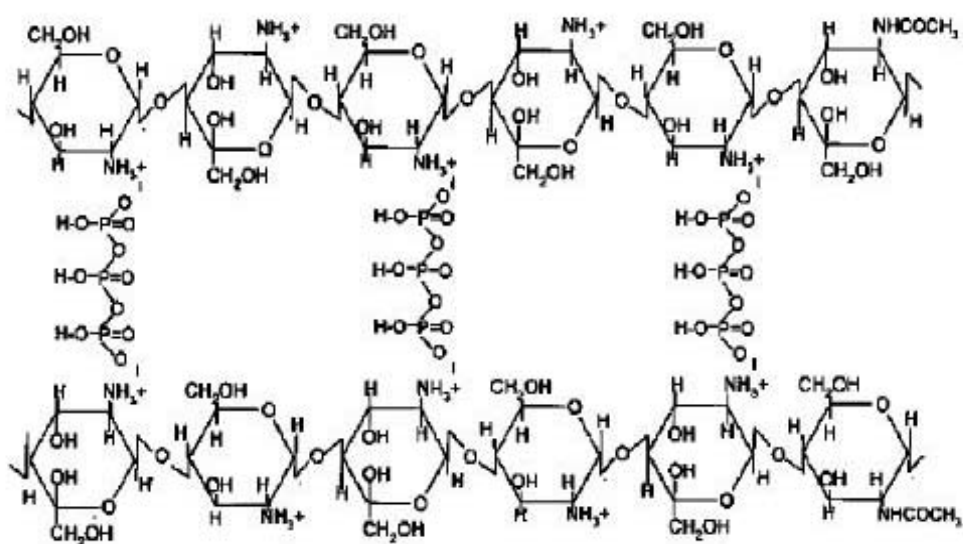
Bodmeier 等學者<sup>[24]</sup>首先提出了以離子凝膠法來製備幾丁聚醣微粒；1997年 Calvo 等學者<sup>[25]</sup>對離子凝膠法提出了改進，研究中利用高分子陰電荷的三聚磷酸鈉和聚氧化乙烯-聚氧化丙烯的嵌段共聚物交聯製備出幾丁聚醣微粒，該微粒可以經由成分比例的改變而使微粒尺寸達 200~1000nm 之間，及 zeta 電位則會介於 20mv~60mv。2001年 Janes 等學者<sup>[26]</sup>指出幾丁聚醣微粒粒徑會隨著幾丁聚醣分子量增加而增大，而在分子量大於 20kDa 時，分子量變因的影響較不顯著。於 2004年 Zhang 等學者<sup>[27]</sup>提出去乙酰度越高的幾丁聚醣可製備出較小粒徑之幾丁聚醣微粒粒，且其微粒的粒徑分散也較為均一，除此之外，幾丁聚醣微粒粒徑也會深受 PH 值影響，該研究指出於 PH=3 時會有最小粒徑，當 PH 值大於或小於此值時微粒粒徑皆會因此而增加。

本研究以三聚磷酸鈉作為幾丁聚醣的凝膠試劑。幾丁聚醣與三聚磷酸鈉(tripolyphosphate, TPP)之離子凝膠作用機制如圖2-4；三聚磷酸鈉溶水時釋放出磷酸根離子( $P_3O_{10}^{5-}$ )，會與幾丁聚醣溶於醋酸水溶液後的陽離子電荷胺基( $NH_3^+$ )反應；而水溶液中的氫氧根離子也會競爭胺基離子形成去質子反應，其中磷酸根離子能與胺基離子產生離子交

聯反應，使得幾丁聚醣分子鏈彼此間產生鏈結而形成了幾丁聚醣微粒，幾丁聚醣成微粒的機制於如圖2-5<sup>[35]</sup>。



(a) 去質子 (Deprotonation)



(b) 離子交聯 (ionic crosslinking)

圖 2-6 幾丁聚醣與三聚磷酸鈉水溶液的離子交互作用機制





圖 2-7 幾丁聚醣與三聚磷酸鈉交聯成微粒示意圖

## 2-4 材料表面型態對生物相容性/細胞貼附之影響

生物相容性是指材料直接或間接與人體接觸後，與生體之間的各种交互作用，亦即生物體對外來體的防衛系統及修復過程之運作情形；生物相容性可經由細胞培養來觀察細胞對這些材料表面的貼附情況，進而瞭解材料表面之生物相容性。其中材料表面的粗糙度、孔隙度、分子量、降解程度、結晶性、微相分離所造成的親-疏水性區域的平衡、表面電荷、表面微觀結構、分子鏈的規則性等均會影響材料的細胞貼附性質<sup>[28]</sup>。

所謂細胞貼附(adhesion)<sup>[29]</sup>可分為短期與長期；短期貼附與細胞及材料間的物理化學作用有關，例如：離子間作用力及凡得瓦力等；長期來說，為蛋白質與蛋白質之間訊息傳遞及轉譯有關。這些蛋白質包含：extracellular matrix (ECM)proteins、cell membrane proteins及 cytoskeleton proteins 等。細胞在材料上貼附生長可分為四個步驟：貼

附(attachment)、長出絲狀偽足(growth of filopodia)、細胞質成網狀(cytoplasmic webbing)及平鋪(flattening)。

不同的細胞對材料有不同的適應性，其中，細胞在材料表面上的貼附及生長情形是研究的主要重點之一，因為讓培養的細胞能充分貼附在材料表面上，才能促進細胞後續的生長。因此，許多生醫材料或組織工程的研究學者會專門針對材料表面的性質，做更深入的探討。其中改變材料表面的各種性質，例如製造奈米表面、表面孔洞與孔道、接枝細胞活化因子，皆能有效地增進細胞的貼附與生長；關於材料表面的型態改質，主要有以下四種方法。

- (1) 噴霧造粒：利用噴霧方式把奈米粒子均勻噴灑在材料表面上，以形成具有均勻分布的奈米粒子的表面。Lampin et al.<sup>[44]</sup> 是將雞胚胎血管組織培養在，利用不同顆粒大小的鋁砂及不同壓力噴在聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethyl methacrylate)，PMMA) 材料表面上，所製成不同粗糙度之PMMA 材料表面上；其實驗結果發現，當表面粗糙度增加時，細胞的貼附量亦會增加，且細胞遷移量 (migration) 也會比較大；其原因是：EMC 在較大粗糙度之表面上有較多的生成量，故細胞貼附量亦會增加。Kieswetter et al.<sup>[45]</sup> 以骨母細胞 (osteoblast) 在鈦 (Titanium, Ti) 膜上做細胞培養，發現表面粗糙度增加，會增加 prostaglandin E2 (PEG2) 及 transforming growth factor $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) 的生成量，以提高細胞的活性，而使細胞更易貼附。

(2) 高分子接枝表面改質：化學接枝表面改質就是把不同分子量或鏈長的高分子接枝在材料表面上，形成奈米級的表面結構。由 Chunmei Li等相關學者指出<sup>[36]</sup>，當聚胺酯材料表面接枝不同分子量的聚乙二醇，而形成有粗糙度的奈米表面時，表面的奈米粗糙度會大於接枝單一分子量的聚乙二醇。使用原子力顯微鏡觀察後發現，利用不同分子量的聚乙二醇接枝的表面的平均粗糙度，比接枝單一分子量的聚乙二醇的平均粗糙度，要多出 19.7 奈米。血管內皮細胞實驗也顯示，細胞生長在接枝不同分子量的聚乙二醇的聚胺酯表面上，數量會比在接枝單一分子量的聚乙二醇的聚胺酯表面上多出35%。如果在奈米表面上接枝一個可以促進細胞貼附的胺基酸序列，像是甘胺酸—精胺酸—甘胺酸—天門冬胺酸，相較於接枝在未經改質的表面上，細胞的生長可以增加大約30%。不過，不論在材料表面是否有接枝胺基酸序列，奈米表面都對細胞的生長有正面的影響。2004 年Miller et al.研究，利用 NaOH 對PLGA 材料表面進行化學處理，再利用矽膠為模具，拓印製備PLGA(502nm)奈米表面，並於材料上培養血管平滑肌細胞與內皮細胞，實驗結果顯示，上述兩種細胞於奈米表面皆有較好的貼附與生長效果<sup>[46]</sup>。

(3) 化學蝕刻表面加工：除了以接枝方法製造奈米表面外，也可以利用簡易的蝕刻方式，藉由控制蝕刻溶劑的揮發速率，製造不同的奈米表面<sup>[37]</sup>。例如，使用丙酮把一種高生物相容性、生物可吸收性，稱作聚己內醯胺的生物醫學材料，蝕刻形成奈米表面鑄模，再利用這一個鑄模拓印出需要的奈米表面。如果再加入一種由蝦蟹殼經酸鹼處理加工後得到的多醣類—幾丁聚醣溶液，便可以得

到具有奈米表面的幾丁聚醣薄膜。成人的皮膚細胞實驗顯示，把細胞培養在材料上，經過 7 天以後，細胞生長在幾丁聚醣薄膜的奈米表面上的細胞數目及活性，比在沒有奈米表面加工的幾丁聚醣薄膜上增加了 25%。

(4) 接枝細胞活性生長因子：Pierschbacher et al.<sup>[46]</sup>發現具有

Arg-Gly-Asp (RGD) peptide 為可供細胞辨識並與之黏著的最小序列蛋白質結構；所以，接枝上GRGD peptides 的材料表面，細胞生長情形較好。明膠(gelatin)與膠原蛋白(collagen)都具有促進細胞生長的RGD 片段，近年來有許多研究致力於使用膠原蛋白與明膠來做生醫材料的活化。另外有許多細胞貼附實驗中利用如：GRGD<sup>[47]</sup>、REDV<sup>[48]</sup>可以促進內皮細胞之貼附；RGDS<sup>[47]</sup>促進骨細胞、平滑肌細胞的貼附；YI GSR<sup>[49]</sup>增加肺動脈細胞貼附生長...等，這些peptides 是可以促進細胞貼附。但有些peptide，如：RGES 並不會影響骨母細胞貼附<sup>[47]</sup>；不會影響纖維母細胞貼附的peptide 有 REDV<sup>[49]</sup>、GRGDSP<sup>[47]</sup>。

本研究中所使用的聚己內酯因材料本身特性，不易讓細胞附著，為了增加於聚己內酯材料上的生物活性，有學者製備具孔洞的聚己內酯基材，並混合氫氧化磷灰石(hydroxyapatite)顆粒，以促進造骨細胞

的生長<sup>[30-32]</sup>。2002年，Gao et al.<sup>[33]</sup>則利用了UV光使PMMA接枝於聚己內酯材料表面，之後固定明膠(gelatin)於材料表面，以促進內皮細胞的貼附與生長。2004年，Teoh et al.<sup>[34]</sup> 利用UV光使acrylic acid(AAc)接枝於PCL材料表面，並使膠原蛋白固定於材料表面，以促進纖維母細胞的貼附與生長。2004年，Dai et al.<sup>[35]</sup>以膠原蛋白製備具孔洞的支架，並於表面披覆PCL以減緩膠原蛋白的崩解，並增加材料的機械性質，以促進纖維母細胞的影響。2005年Sarasam<sup>[42]</sup>等人藉由共溶劑摻合法製備PCL/CS，並進一步由細胞活性測試結果發現，當添加幾丁聚醣濃度為50%以及25%時會有較佳的細胞活性，尤其於50%時，其機械性質與細胞活性改善最為顯著。

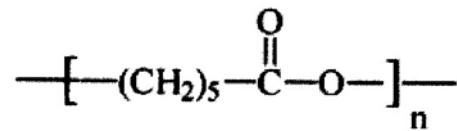
## 參、實驗方法與原理

### 3-1 實驗材料

#### 3-1-1 摻合物製備之材料

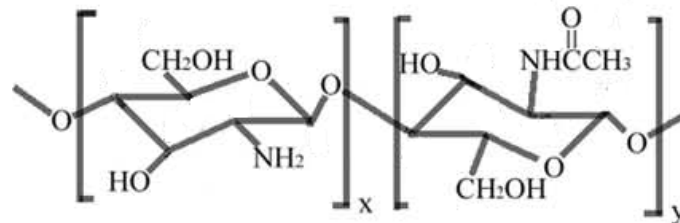
##### 基材：

熱塑性工業用聚己內酯(polycaprolactone)，由 Solvay 化學公司提供，批號 CAPA 650，平均分子量 50000g/mole，熔點 58~60°C，含水率小於 1wt.%，溶解參數(solubility parameter) $\delta=9.34\sim 9.43(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$ 。



##### 天然生物可分解性高分子：

幾丁聚醣(chitosan,CS)，食品級，製造商為青島金園生物製品有限公司，去乙醯度為 86.20%，含水率 7.8%，不溶物小於 0.2%，粒徑為 80mesh。



##### 丙烯酸(Acrylic acid)：

由 Acros Organics 公司提供為 EP 級，stabilized 99.5%，閃火點為

48°C，沸點為 139°C，密度為 1.050g/cm<sup>3</sup>。

#### 交聯劑：

三聚磷酸鈉(Sodium tripolyphosphate,TPP)：由昭和化學所提供，分子量為 367.86，熔點 622°C，含水率<1wt%。

#### 接枝起始劑：

過氧化二苯甲醯(Benzoyl peroxide, BPO)，由Alfa Aesar公司提供，純度為75%，熔點為104~106°C。

#### 溶劑：

1. 二甲苯(Xylene)，ACS 級，由景明化工有限公司(Echo Chemical Co., Ltd.)提供，純度為 98.5%，沸點為 137~144°C，密度為 0.860g/ml。
2. 丙酮(Acetone)，工業級，由景明化工有限公司(Echo Chemical Co., Ltd.)提供，純度為 99%，沸點為 56°C，密度為 0.79 g/cm<sup>3</sup>。
3. 乙醇(Ethanol)由美商 Tedia 公司提供，純度為 95%，沸點為 78°C，密度為 0.78 g/cm<sup>3</sup>。
4. 冰醋酸(Acetic acid)，ACS 級，由聯工化學廠股份有限公司(Union Chemical Works Ltd.) 提供，純度 99.7%，沸點為 118°C，密度為 1.05 g/ml。

#### 鹼性滴定液：

KOH-乙醇溶液，氫氧化鉀(Potassium hydroxide)，EP 級(一級)，由聯工化學廠股份有限公司(Union Chemical Works Ltd.)提供，熔點為 360°C，密度為 2.04 g/cm<sup>3</sup>。

### 鹼液標定劑：

鄰苯二甲酸氫鉀(Potassium hydrogen phthalate, KHP)，試藥級，提供廠商-林純藥工業株式會社(Hayashi, Pure Chemical Industries Ltd.)。

### 酸鹼滴定指示劑：

酚酞(Phenolphthalein)，試藥級，由片山化學工業株式會社(KATAYAMA)提供，變色範圍 pH=8.3~10(無色~紅色)。

### 3-1-2 生物分解培養液之成分材料

#### 生物分解酵素：

溶菌酶(Lysozyme, Egg White)由 Bionovas, USA 提供，活性(activity)為 50000U/mg，純度 $\geq 90\%$ ，分子量~14.7KD。

#### PBS(Phosphate buffer saline)：

1. 氯化鈉(Sodium chloride)，試藥級由 MERCK 公司提供，純度 $\geq 99.5\%$ 。
2. 氯化鉀(Potassium chloride)，試藥級由 MERCK 公司提供，純度 $\geq 99.5\%$ 。
3. 磷酸氫二鈉(Disodium hydrogenphosphate)，試藥級由關東化學株式會社(Kanto Chemical Co., Inc.)提供，purity min. 99.0%。
4. 磷酸二氫鉀(Potassium dihydrogenphosphate)，試藥級由關東化學株式會社(Kanto Chemical Co., Inc.)提供，purity min. 99.0%。



## 3-2 高分子摻合物之製備

### 3-2-1 PCL-g-AA 之製備與接枝率測定

製備 PCL-g-AA 共聚物(copolymer)所使用之設備為塑譜儀(廠牌：Brabender Plasti-corder)，驅動單元為 Plastograph EC，混煉轉子型號為 W 50 EHT)，電腦參數設定為實驗進料總重 50g、混煉溫度 85°C、轉子轉速為 60RPM 與反應時間 6 小時。首先進料 PCL(44.85g)，待塑料完全熔融且扭力(torque)圖譜趨於穩定後，再將 10wt.%之丙烯酸(AA，5g)與 0.3wt.%之接枝起始劑(BPO，0.15g)的混合液倒入塑譜儀中，完成接枝反應後取出混料進行純化與接枝率的測定，圖 3-2 為 PCL 接枝丙烯酸之結構式。



圖 3-1 塑譜儀全貌圖及轉子零件示意圖

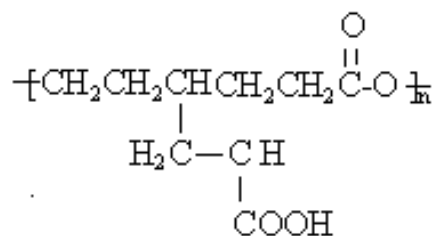


圖 3-2 PCL-g-AA 結構示意圖

純化過程中將 10g 的 PCL-g-AA 溶入 200ml 的二甲苯溶劑中，於 85°C 熱水浴均勻攪拌兩小時，待冷卻後加入 300ml 的丙酮混合均勻使未反應的丙烯酸溶於丙酮，再倒入玻璃盤中於抽氣櫃下風乾並置入 80°C 的真空烘箱 24 小時做乾燥處理。

測定接枝率程序中先將 1g 共聚物溶於 100ml 的二甲苯中，在 85°C 的熱水浴均勻攪拌兩小時後，以 KOH-乙醇溶液做酸鹼滴定(實際濃度先以 KHP 為標定劑，酚酞為指示劑來標定之)量測 PCL-g-AA 之接枝率，其計算方程式如下：

$$(AA\%) = \frac{C_{KOH}(N) \times V_{KOH}(ml) \times 72}{polymer(g)} \times 100\%$$

實驗過程中所製備出的 PCL-g-AA 取三次平均算出其接枝率約為 4.3%。

### 3-2-2 離子凝膠法製備幾丁聚醣微粒

將幾丁聚醣溶於 1wt% 的醋酸水溶液當中，再加入 8wt% 的氫氧化鈉水溶液直至沉澱產生後以濾紙過濾烘乾；再將濾得上層物反覆水洗即可獲得純化後的幾丁聚醣。

接著將幾丁聚醣溶於 0.175wt% 醋酸水溶液製得 0.1wt% 的幾丁聚醣溶液，再配置 1.25 mg/mL 的三聚磷酸鈉水溶液；將上述的兩杯溶液以體積比 5:1 室溫下混合攪拌 10 分鐘，此時 CS:TPP 重量比 4:1，再以 0.1  $\mu$ m 之濾紙過濾，濾膜上即可獲得幾丁聚醣微粒。

### 3-2-3 溶液法製備 PCL/CS 與 PCL/PCL-g-AA/CS 奈米顆粒複合膜

以冰醋酸為共溶劑製備 PCL/CS 複合膜：

1. 將幾丁聚醣微粒分別加入 80mL 的冰醋酸中，並做超音波震盪兩小時使得微粒均勻分散於冰醋酸中。
2. 再將聚己內酯加入上述溶液中，並於 50°C 水浴中加熱溶解，依據以上步驟配製成不同濃度複材的重量比：PCL/CS(90/10)、(0.216g/24mg)、PCL/CS(80/20)(0.192g/48mg)、PCL/CS(70/30)、(0.168g/72mg)。
3. 將混合溶液傾倒至直徑 8cm 鐵氟龍盤中，在 45°C 的熱風循環式烘箱下抽乾 6 小時後再放入真空烘箱 24 小時即可製得 PCL/CS 薄膜複材。
4. 將 PCL 在 55°C 的冰醋酸溶劑中使之溶解後，置入 55°C 烘箱中乾燥，再放入 45°C 真空烘箱 48 小時，即可製得薄膜成品。

以 THF 為溶劑製備 PCL/CS 複合膜：

將上述 1、2 步驟換成以 THF 作為共溶劑，接著同樣的傾倒至鐵氟龍盤中，於室溫下烘乾 4 小時後再放入真空烘箱 24 小時即可製得 PCL/CS 薄膜複材。

以冰醋酸為共溶劑製備 PCL/PCL-g-AA/CS：

先將 PCLgAA 溶於 2mL 的冰醋酸中(50°C 熱水浴)，再將此溶液與上述製備幾丁聚醣微粒的溶液混合攪拌後，同樣的以 0.1  $\mu$ m 之濾紙過濾得 PCLgAA 與 CS 微粒。

接著便同上述製備 PCL/CS 步驟配置成不同濃度複材的重量比：  
PCL/PCLgAA/CS(85/5/10)(0.204g/12mg/24mg)、  
PCL/PCLgAA/CS(70/10/20)(0.168g/24mg/48mg)、  
PCL/PCLgAA/CS(55/15/30)(0.132g/36mg/72mg)。

**以 THF 為共溶劑製備 PCL/PCLgAA/CS：**

同上述步驟換成以 THF 作為共溶劑，接著同樣的傾倒至鐵氟龍盤中，於室溫下烘乾 4 小時後再放入真空烘箱 24 小時即可製得 PCL/PCLgAA/CS 薄膜複材。

### **3-3 熱差掃描式分析(DSC)**

混摻物之熔點( $T_m$ )與結晶行為藉由示差掃描熱量分析儀(DSC，廠牌為 Perkin Elmer，型號為 Pyris 1)測量，待測樣品稱取 2~5mg，掃描溫度範圍為 $-60^{\circ}\text{C}$ ~ $150^{\circ}\text{C}$ ，升降溫速度為  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。以此觀察添加幾丁聚醣對摻合物熔點與結晶性質之影響。

### **3-4 傅立葉轉換紅外線光譜儀(Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, FT-IR)分析**

紅外線是比可見光能量稍低的射線，其光譜分析是研究物質分子對紅外線輻射的吸收特性，其基本原理係利用紅外光將分子激發後，使有機分子吸收紅外光輻射，並將其轉換成分子轉動動能或振動能，此原理常被應用於鑑定有機化合物及物質定性與定量的分析。近年來 FTIR 在生物醫學科技、化學分析及工業上的應用相當普遍，例如：

人類癌症組織成份的分析、化學物品的化學性質分析、量測各種材料的熱物理性質等<sup>[17,18]</sup>。

本研究所使用的紅外線光譜儀(廠牌：SHIMADZU，型號：IR Prestige 21)，波數範圍為  $4000\sim 400\text{cm}^{-1}$ ，掃描次數為 16 次，解析度為  $4\text{ cm}^{-1}$ 。樣品分析前先以空氣做背景掃描後，將摻合物厚度為  $0.05\pm 0.02\text{mm}$  的薄膜剪成小塊進行掃描分析，所得之吸收光譜再進一步比較特徵峰的變化情形。

### 3-5 微結構分析

#### 3-5-1 光學顯微鏡(OM)

光學顯微鏡的儀器裝置很簡便，其成像原理是利用可見光照射在試片表面造成局部散射或反射來形成不同的對比，然而因為可見光的波長高達  $4000\sim 7000\text{Å}$ ，在解析度(或謂鑑別率、解像能，係指兩點能被分辨的最近距離)的考量上自然是最差的。在一般的操作下，由於肉眼的鑑別率僅有  $0.2\text{mm}$ ，當光學顯微鏡的最佳解析度只有  $0.2\mu\text{m}$  時，理論上的最高放大倍率只有  $1000\text{X}$ ，放大倍率有限，但視野卻反而是各種成像系統中最大的，這說明了光學顯微鏡的觀察事實上仍具有提供許多初步的結構資料。

將摻合物薄膜置於載玻片與蓋玻片之間，再以光學顯微鏡(廠牌：Nikon E400)來觀察複材之表面結構及結晶型態。

### 3-5-2 熱場發射掃描式電子顯微鏡(Field Emission Scanning Electron Microscope, FESEM)

電子顯微鏡的原理為利用特有的掃描線圈讓電子束對固態試片做二度空間的掃描，再藉由偵測器對電子束與試片因交互作用而激發出的二次電子或背向散射電子作訊號收集，經由 CRT 的放大，即可清楚地觀察試片在微小區域的表面形貌與影像<sup>[20]</sup>。

觀察表面型態所使用之 FESEM(製造廠商：JEOL Co.,Japan，機型：JSM-7000F)操作條件為：(1)真空鍍金：30mA，60 秒 (2)加速電壓：2~15kV (3)放大倍率：400~2000 倍。

### 3-6 粒徑分析儀(Dynamic light scattering, DLS)

含有粒子的溶液中，當小顆粒碰撞小顆粒時，會造成粒子行布朗運動(Brownian motion)。當一光束撞擊移動的粒子時，靜止的觀察者會發現相對於入射光束的頻率，散射光束的頻率產生變化。隨粒子是朝向或遠離觀察者，頻率會些微上升或下降，這現象稱為都卜勒變寬效應(Doppler broadening)。頻率的變化量正比於布朗擴散係數，所以我們可以從動態光散射實驗決定粒子擴散係數。透過Stokes-Einstein方程式我們可以進一步得到粒子的粒徑：

$$D = kT / 3\pi\eta R_h$$

其中  $R_h$  = 顆粒直徑(m)  $D$  = 擴散係數(m<sup>2</sup>/sec)

$k$  = 波茲曼常數(J/K)  $T$  = 絕對溫度(K)

$\eta$  = 溶液黏度(cp)

介面電位測量的基本原理為利用左右兩邊通以直流電之電泳

室，一端帶正電另一端帶負電，當待測水樣置入電泳室後，帶電粒子因電性相互吸引作用，開始往相反電性之一端移動，並經於軟體直接精算出其界面電位質。且於測定中需確定石英槽內無氣泡存在，避免造成干擾。

首先將粒徑分析儀開機暖機1 小時，使雷射光的光源穩定後，將幾丁聚醣奈米微粒溶液加入石英管中後開始量測，每個樣品以每次2 分鐘進行量測，並量測3次取其平均值。介面電位分析則是將幾丁聚醣奈米微粒注入石英槽中，避免氣泡產生便開始量測，同樣的亦須量測3次取其平均值。

### 3-7 拉伸測試(Tensile Test)

拉伸強度測試是機械測試中常見的一種，一般來說是以力量拉扯試片的兩端，形成試片之單軸延伸變形直至斷裂。對大部分高分子材料而言，彈性形變定義於應變的 0.3%以內，因此藉由應力與應變關係曲線圖之起始直線部分，取其斜率即為此材料的彈性模數或楊氏模數(Young's modulus)，公式如下：

$$E = \sigma / \varepsilon \dots\dots\dots(3-7-1)$$

其中，E 表示楊氏模數， $\sigma$  表示正向應力， $\varepsilon$  表示正向應變。

將混摻物薄膜裁為寬 10mm、長 40mm(拉伸長度為 20mm)，厚度為  $0.04 \pm 0.02$ mm，溫度為 27°C 下進行拉伸測試，所使用萬能拉力試驗機(廠牌：Instron，型號為 4467)，使用的 load cell 為 100N(最大拉伸荷重)，拉伸速率設定為 15mm/min；每組不同濃度之樣品均測 5 次以上，再取 3 組有效斷裂試樣的測試進行算術平均作為最後結果。

### 3-8 生物分解培養液的製備<sup>[32]</sup>

1. 秤取 8g 氯化鈉、0.2g 氯化鉀、1.44g 磷酸氫二鈉、0.24g 磷酸二氫鉀與去離子水配成 1L 的 1X PBS 緩衝溶液(PH = 7.4)。
2. 將 100mg 溶菌酶酵素(50000U/mg)加入配好的 1 L 緩衝溶液中，均勻攪拌，再將溶液分別取 100ml 裝入三角錐形瓶中。
3. 將厚度為  $0.05\pm 0.02\text{mm}$  面積為  $10\times 10\text{mm}^2$  的 PCL、PCL-g-AA、CS、PCL/CS、PCL-g-AA/CS 摻合物薄膜分別置入錐形瓶中，在溫度  $37^\circ\text{C}$  的培養箱中進行酵素環境分解實驗。
4. 每三天自酵素培養液中取出摻合物，經去離子水、無水酒精沖洗後再放入真空烘箱 72 小時做乾燥處理的程序。取出後將薄膜秤重，計算重量分解率以及利用 SEM 觀察薄膜分解後的微結構變化。重量損失比率公式如下：

$$\text{Weight Ratio(degraded/initial)} = W_t / W_0$$

$$W_0 = \text{薄膜分解前之重量(g)}$$

$$W_t = \text{薄膜分解後之重量(g)}$$

### 3-9 細胞培養

實驗中使用的動物模式為豬，採用一般的食用豬。將豬的主動脈以 phosphate buffered saline(PBS)清洗乾淨，並去除多餘的結締組織。將血管剪開，內面朝下，於 0.25% trypsin(Hyclone, 美國)在  $37^\circ\text{C}$  下作用 15 分鐘，此時內皮細胞(Human Umbilical Vein



Endothelial Cells)可以利用解剖刀刮下，並將細胞置於 M199 培養基(Gibco，美國)中，重複刮下的動作五次，以確保所有的內皮細胞都被刮下。培養基內含 10%胎牛血清(Gibco，美國)、150U/mL 盤尼西林、150  $\mu$ g/mL 鏈黴素(streptomycin)、2.5  $\mu$ g/mL 牛腦下垂體萃取液(Sigma-Aldrich，美國)、0.25  $\mu$ g/mL amphotericin B 及 25  $\mu$ g/mL gentamicin(Gibco，美國)。將細胞置於 37°C、二氧化碳濃度為 5% 的培養箱中進行培養，每兩天換一次培養基，等細胞長滿後利用 0.25% trypsin 將細胞取下，進行繼代培養，經過 3 至 5 次繼代培養後可將培養基換成 M199 內含 10%胎牛血清、50U/mL 盤尼西林、50  $\mu$ g/mL 鏈黴素、及 2.5  $\mu$ g/mL 牛腦下垂體萃取液。再依據下列步驟進行細胞培養：

1. 於 6-well(內徑 48mm)中製備 PCL/CS、PCL/PCL-g-AA/CS 複材與酸洗過後的孔洞複材，於 UV 光下滅菌 24 小時，之後再以 75%酒精滅菌。
2. 內皮細胞繼代培養後，以  $10^5$ /well 的細胞密度於材料上進行細胞貼附生長實驗，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和 90%相對濕度下進行培養。
3. 內皮細胞於材料上經過 40 小時培養後，再將 6-well 取出冰浴。
4. 以冰浴過後的 PBS 清洗後，再加入冰甲醇 5 分鐘讓細胞固定。
5. 倒出甲醇風乾後再以 PBS 做清洗，再加入染劑 DAPI

(DAPI : PBS=1:1000)十分鐘並作避光處理。

6. 以 PBS 清洗接著便以螢光顯微鏡觀察細胞的生長情況。

## 肆、結果與討論

### 4-1 傅立葉轉換紅外線光譜儀(FTIR)

以傅立葉轉換紅外線光譜儀(FTIR)觀察高分子於某些振動模式下產生的振動或振動-轉動能量的變化，檢測範圍 $400\sim 4000\text{cm}^{-1}$ 。由獲得的特徵鋒數據進一步的來探討聚己內酯接枝與否、複材的結晶行為分析、聚己內酯與幾丁聚醣之間的相互作用力。

幾丁聚糖是幾丁質去乙醯後的衍生物，分子結構中的乙醯基減少，使得分子間的氫鍵更強；其結構中的胺基與羥基會與分子內與分子間形成氫鍵，容易和含有羰基(carbonyl group)的高分子形成氫鍵作用，因此可藉由FTIR的光譜圖進一步的來判斷CS於複材間的鍵結作用，表4-1為幾丁聚醣所對應之特徵吸收峰位置。

圖4-1之PCL光譜圖上可觀察到在 $1725\text{cm}^{-1}$ 處有一極為明顯的羰基(carbonyl group,  $-\text{C}=\text{O}$ )伸縮振動特徵吸收峰產生、 $2800\sim 3000\text{cm}^{-1}$ 為 $\text{CH}_2$ 對稱和不對稱的伸縮帶、 $730\text{cm}^{-1}$ 為在結晶相中 $\text{CH}_2$ 長鏈擺動運動的震動帶、 $1294\text{cm}^{-1}$ 為PCL主鏈上C-C與C-O在結晶相中伸縮模式、 $1450\text{cm}^{-1}$ 與 $1380\text{cm}^{-1}$ 為 $\text{CH}_2$ 、CH彎曲震動(bending vibration)之吸收峰，表4-2為PCL所對應之特徵吸收峰位置。

由圖4-1與圖4-2可觀察出PCL-g-AA與PCL除了皆在 $1725\text{cm}^{-1}$ 有明顯的 $-\text{C}=\text{O}$ 羰基伸縮振動外，PCL-g-AA於 $1710\text{cm}^{-1}$ 有清楚的羧酸基( $-\text{COOH}$ )特徵吸收峰產生，且位於 $3200\sim 3700\text{cm}^{-1}$ 的 $-\text{OH}$ 伸展特性鋒帶，

相對於PCL的-OH伸展特性鋒帶較寬(3300~3700)，強度也較強，由此結果可定性判斷丙烯酸已穩定的接枝在PCL上。之後更藉由鹼性滴定液(KOH溶於乙醇)來滴定位於PCL-g-AA結構上的-COOH，計算當到達滴定終點後所需的滴定體積進而定量的來推算出接枝率之多寡。本研究所製備出的PCL-g-AA滴定三次的實驗平均接枝率為4.3%，其平均數據如表。

由圖4-1可觀察， $3200\sim 3700\text{cm}^{-1}$ 為幾丁聚醣N-H的伸縮振動鋒與聚己內酯的O-H的伸縮振動特性鋒重疊帶，因此PCL/CS複材會隨著CS濃度的增加此處的特性鋒強度會因此而隨之增強；在 $1294\text{cm}^{-1}$ 、 $730\text{cm}^{-1}$ 為聚己內酯結晶有關的特徵吸收鋒<sup>[50]</sup>，此特徵鋒隨著聚己內酯濃度的減少而減弱，此趨勢可與DSC的結果判斷，為複合材料的總結晶度減少所致；從幾丁聚醣光譜圖中在 $1644\text{cm}^{-1}$ 為醯氨基中C=O之伸縮振動特徵鋒，隨著複材中幾丁聚醣濃度的減少，此處吸收鋒會因此而減弱，波長也會偏移至較低波長的位置，由此結果研判為聚己內酯與幾丁聚醣之間具有氫鍵作用力的存在。

PCL/PCL-g-AA/CS在 $3200\sim 3700\text{cm}^{-1}$ 的幾丁聚醣N-H的伸縮振動鋒與聚己內酯的O-H的伸縮振動特性鋒重疊帶隨著幾丁聚醣濃度的增加而增強； $1294\text{cm}^{-1}$ 、 $730\text{cm}^{-1}$ 的聚己內酯結晶相關的特徵吸收鋒隨著幾丁聚醣濃度的增加而減弱；幾丁聚醣在醯氨基中的-C=O特性峰位置( $1644\text{cm}^{-1}$ )會隨著幾丁聚醣濃度的減少而減弱並偏移至較低波長的位置，但相對於PCL/CS複材減弱效應較不明顯，此結果是由於CS與PCL-g-AA間產生化學鍵結，幾丁聚醣胺基之濃度效應較不顯著；除此之外在PCL/PCL-g-AA/CS的複材中可發現，相對於PCL/CS複材位於

1717 $\text{cm}^{-1}$ 會有一額外的吸收峰產生，此吸收峰為PCL-g-AA的-C=O與幾丁聚醣的 $\text{N}(\text{COR})_2$ 產生鏈結所形成的特徵鋒；在1745 $\text{cm}^{-1}$ 也有另一額外的吸收峰，此吸收峰則為PCL-g-AA的-C=O與幾丁聚醣的OCOR產生鏈結所形成的特徵鋒，其鏈結如圖4-3；由以上結果可得知，PCL-g-AA比起PCL與幾丁聚醣之間會有更多的鏈結與較佳的相容性，因此添加PCL-g-AA於複材間可作為聚己內酯與幾丁聚醣之間的相溶劑，使得複材的分散更均勻。

表 4-1 幾丁聚醣於 FT-IR 中之特徵吸收峰

Wavenumber, $\nu(\text{cm}^{-1})$	Assignments
3450	-OH hydroxyl group
3360	-NH group-stretching vibration
2925,2880	asymmetric or symmetric $\text{CH}_2$ stretching vibration
1644	Symmetric stretch of C=O in the amide group
1560	Stretch of C-N and bend of N-H in the amide group
1380	$\text{CH}_3$ in amide group
1165	C-O group
1064	-C-O-C- group

表 4-2 PCL 於 FT-IR 中之特徵吸收峰<sup>[28,33]</sup>

Wavenumber, $\nu(\text{cm}^{-1})$	Assignments
2949	Asymmetric CH <sub>2</sub> stretching
2865	Symmetric CH <sub>2</sub> stretching
1725	Carbonyl stretching
1450	CH <sub>2</sub> and CH bending vibrations
1380	CH <sub>2</sub> and CH bending vibrations
1294	C-O and C-C stretching in the crystalline phase
1240	Asymmetric COC stretching
1190	OC-O stretching
1170	Symmetric COC stretching
1157	C-O and C-C stretching in the amorphous phase
730	CH <sub>2</sub> long chain rocking motion vibrations

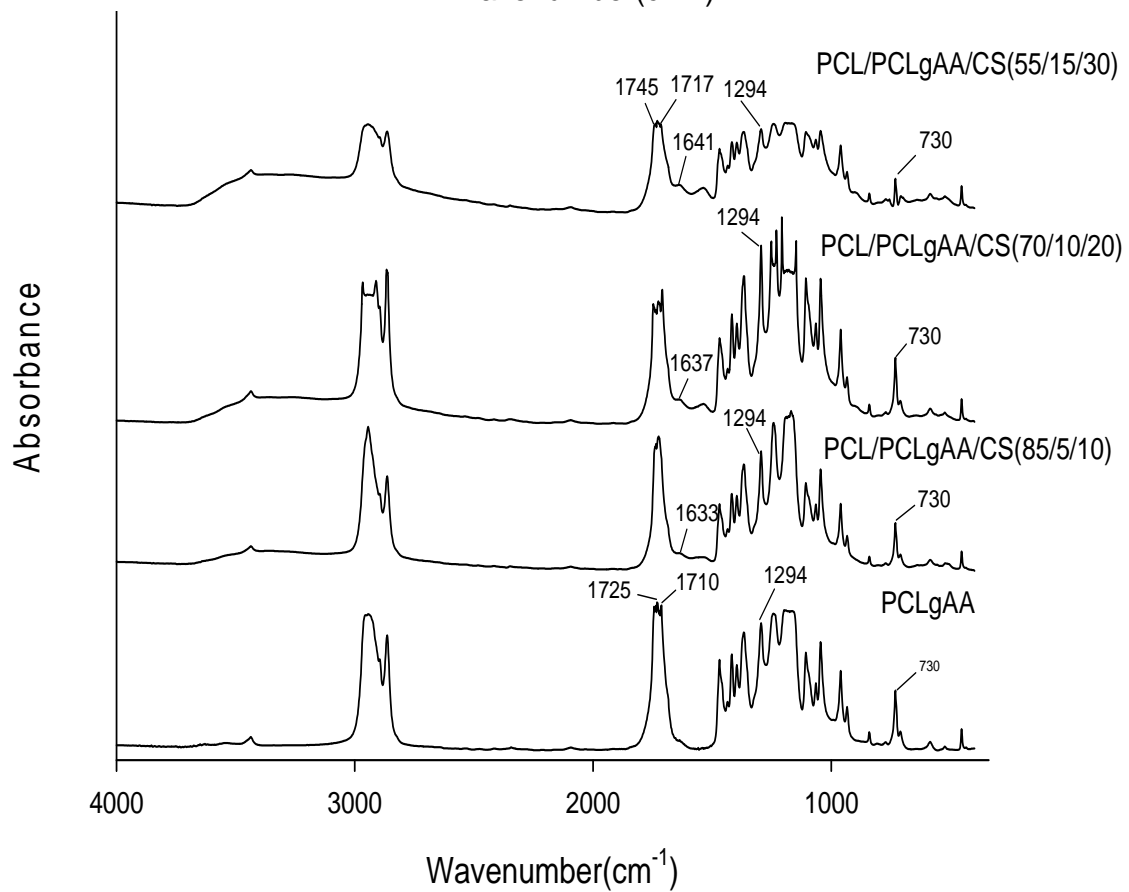
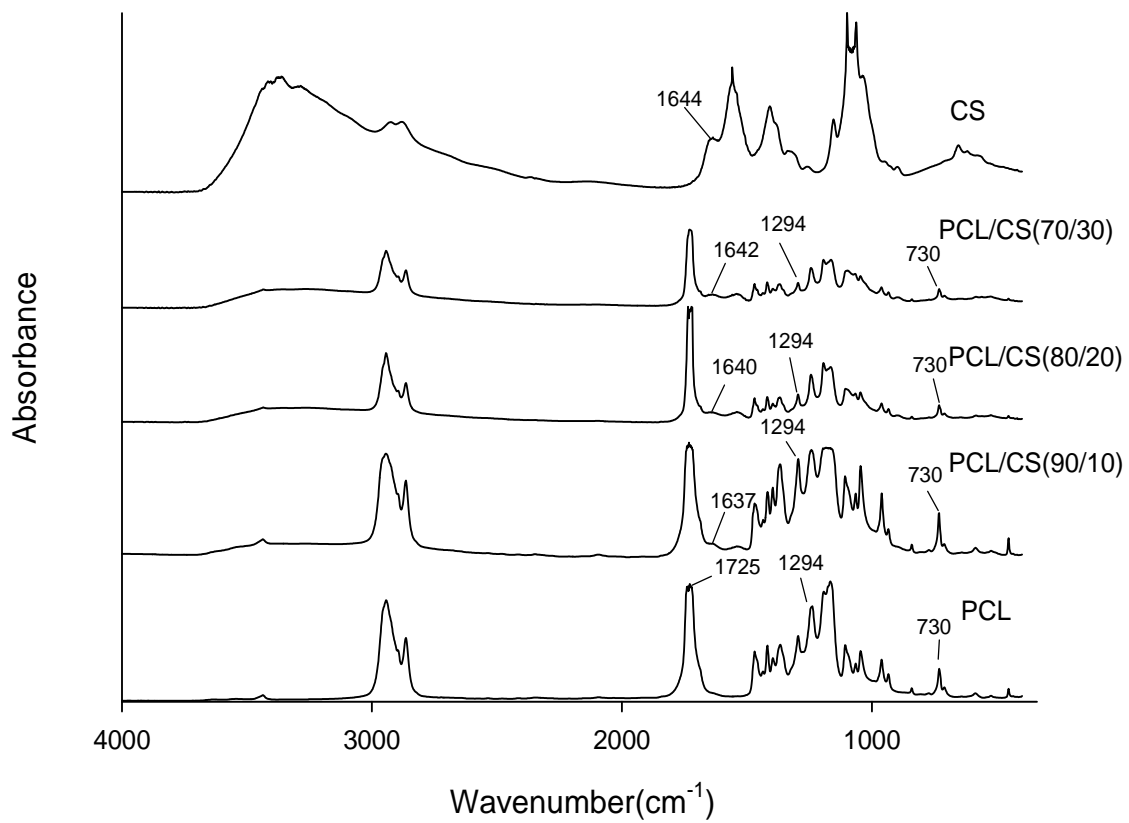


圖 4-1 複材之 FT-IR 分析光譜圖

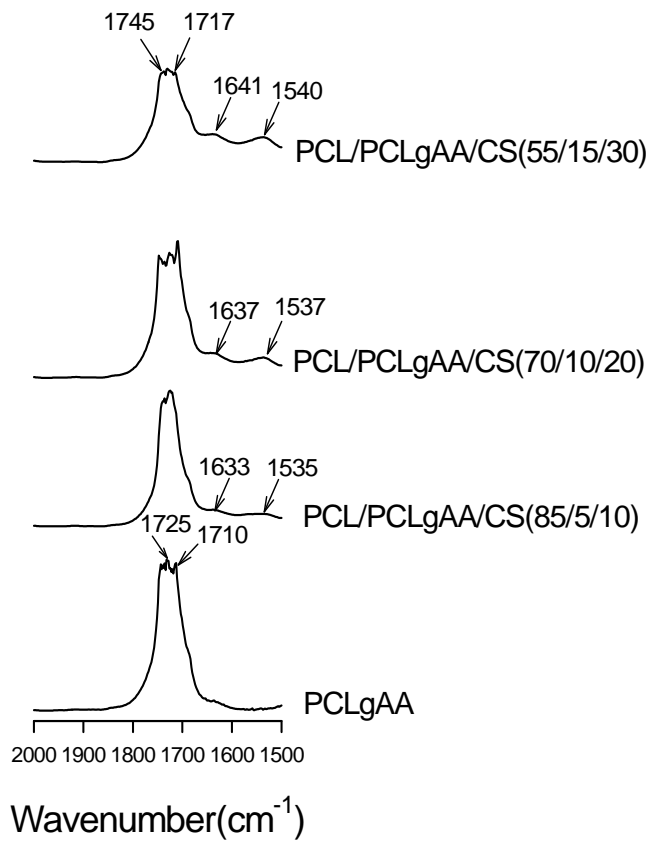
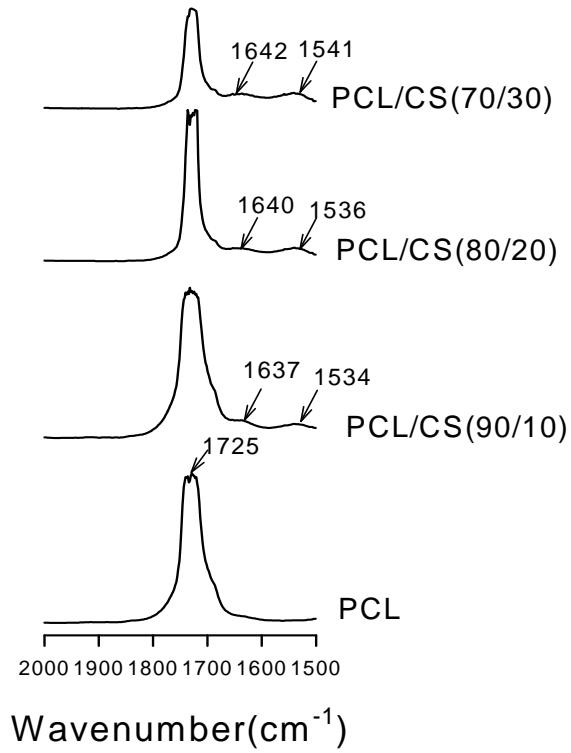


圖 4-2 複材區域放大之 FT-IR 分析光譜圖



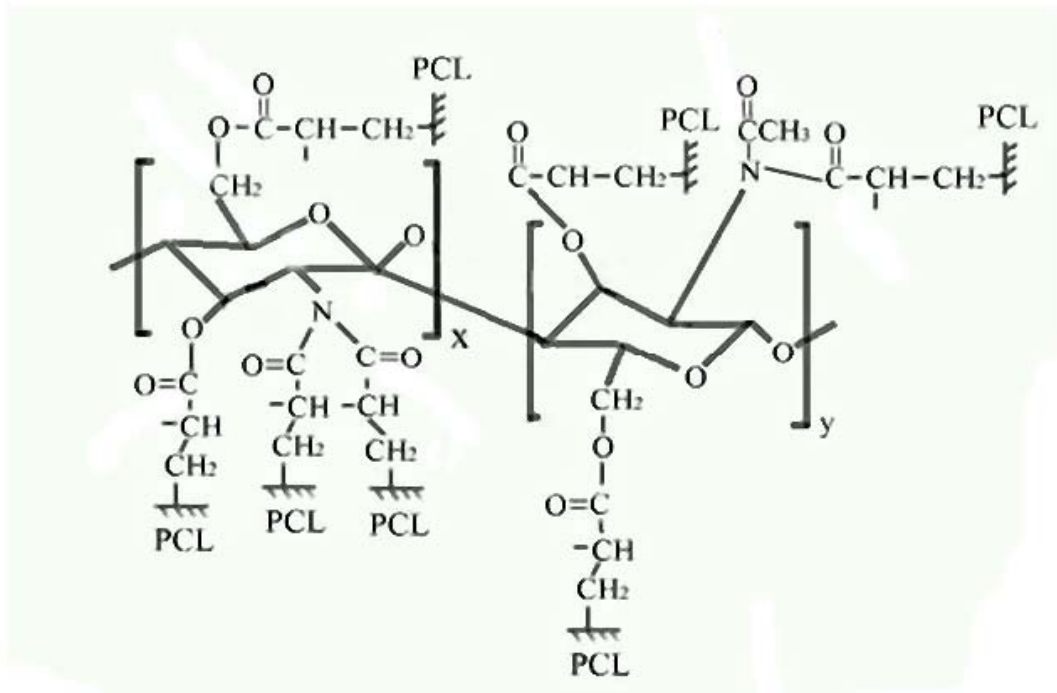


圖 4-3 PCL-g-AA 與 CS 間的化學鍵結<sup>[38]</sup>

## 4-2 幾丁聚醣微粒

由文獻上的回顧可了解到<sup>[26,27]</sup>，影響幾丁聚醣微粒粒徑的控制變因主要有幾丁聚醣的去乙醯度、幾丁聚醣分子量、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉的濃度、PH 值；本研究所使用的幾丁聚醣，藉由滴定法<sup>[1]</sup>測定其去乙醯度為 83.1%、利用凝膠滲透層析分析儀(GPC)測得其重量平均分子量約為 42.1 kDa、控制轉速 800rpm、溫度 25°C，以上為固定影響因子；本研究主要是控制幾丁聚醣濃度與 CS/TPP 的比值來獲得不同粒徑的幾丁聚醣微粒。

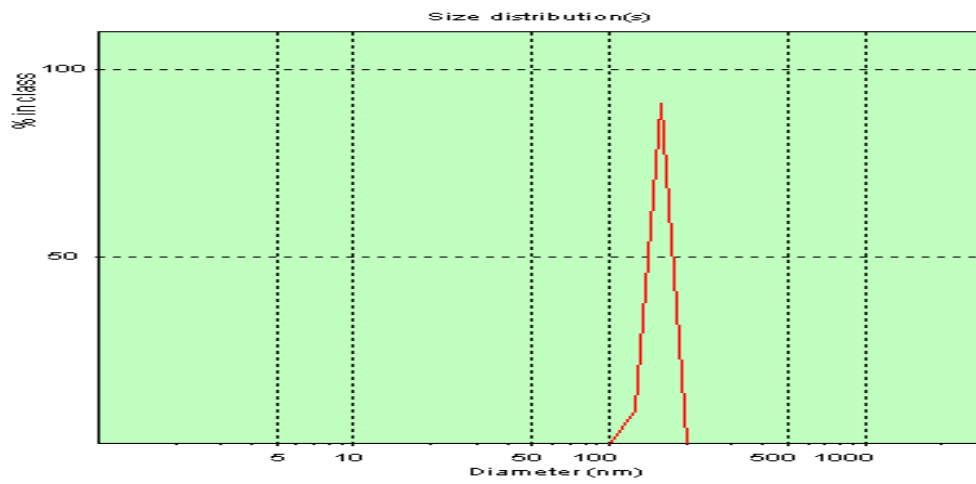
### 4-2-1 幾丁聚醣微粒粒徑

表 4-3 為不同條件下以粒徑分析儀所測得的幾丁聚醣微粒粒徑，

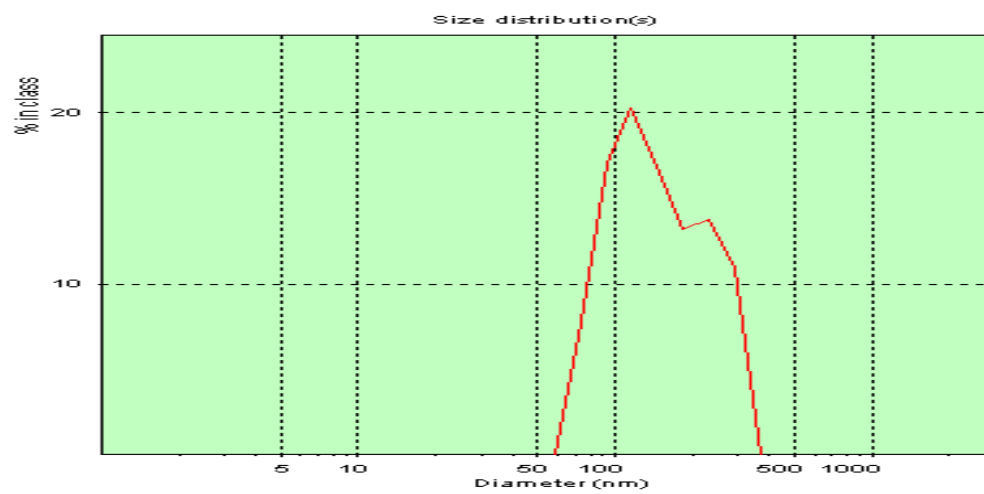
由不同的實驗方法可知，幾丁聚醣微粒會隨著幾丁聚醣濃度的減少而降低，而在 CS/TPP=4 時會有一最小的粒徑，當比值大於或小於 4 時其粒徑都會隨之增加；圖 4-4 為在 CS 0.1 wt% 時不同 CS/TPP 比值下的粒徑分佈圖，由圖上可看出在 CS/TPP=5.3 時會有粒徑分佈的單一峰，而隨著比值的降低使得分佈圖上出現第兩個粒徑峰，此趨勢說明了三聚磷酸鈉濃度的提高會產生微粒間的聚集；造成以上結果是由於當 CS/TPP 比值小於 4 時，三聚磷酸鈉濃度較低，每單位三聚磷酸鈉可與較多的幾丁聚醣分子鏈產生交聯，因此在此情況下粒徑會隨之下降。而比值若小於 5，三聚磷酸鈉濃度較高，會產生較多的幾丁聚醣微粒，微粒間因此也越容易產生離子性聚集。由不同實驗方法可看出在 CS/TPP=4 時會有一極限的最小粒徑。由 FESEM 的掃描圖可看出在 CS/TPP=4 時幾丁聚醣微粒會有較少的聚集，因此本研究選擇當幾丁聚醣濃度為 0.1wt%，CS/TPP=4 時的幾丁聚醣微粒來進行混摻，其粒徑為 133.8nm。

表 4-3 幾丁聚醣微粒粒徑分析

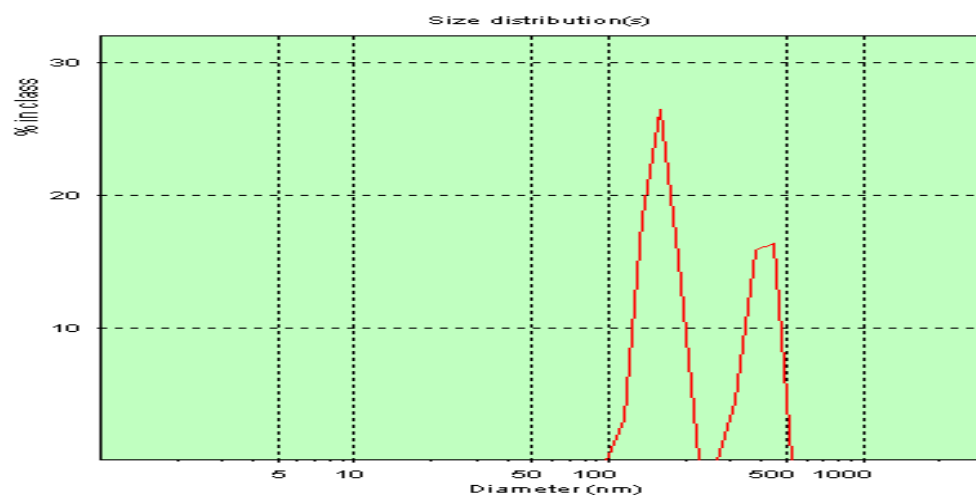
CS wt% \ CS/TPP	5.3	4	3.2	2.7
0.05	171.2±5.3nm	255.1±8.8nm	329.4±10.2nm	463.3±12.2nm
0.1	144.7±5.0nm	133.8±4.2nm	175.4±7.1nm	261.2±9.8nm
0.15	250.2±7.4nm	188.5±6.1nm	255.4±6.6nm	280.2±7.4nm



(a)



(b)



(c)

圖 4-4 CS=0.1 wt%下 CS 微粒粒徑分佈  
 (a)CS/TPP=5.3 (b)CS/TPP=4 (c)CS/TPP=3.2

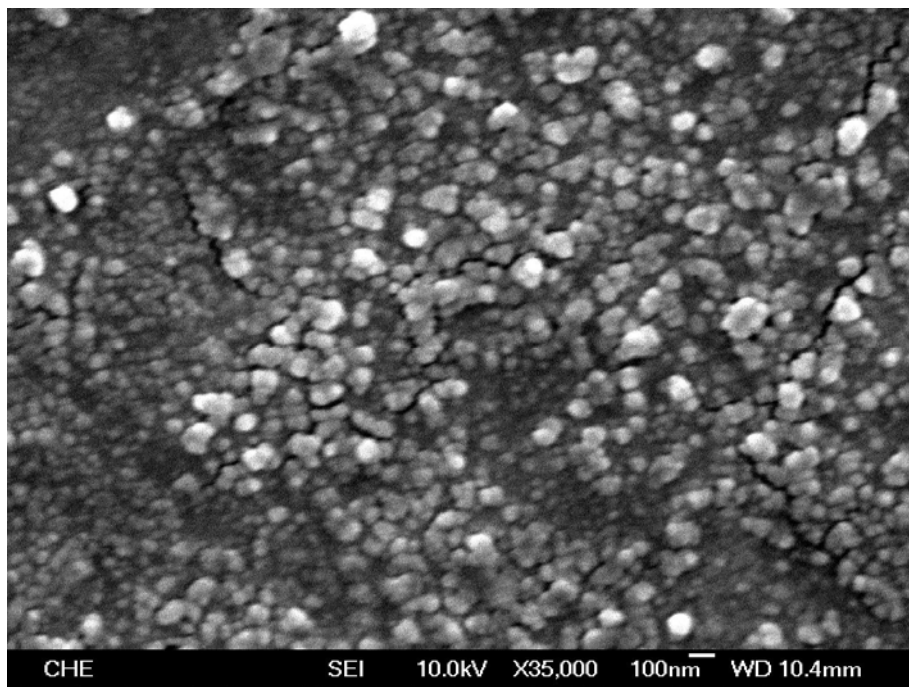


圖 4-5 CS/TPP=5.3 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 FESEM 圖。  
(magnification=35000X)

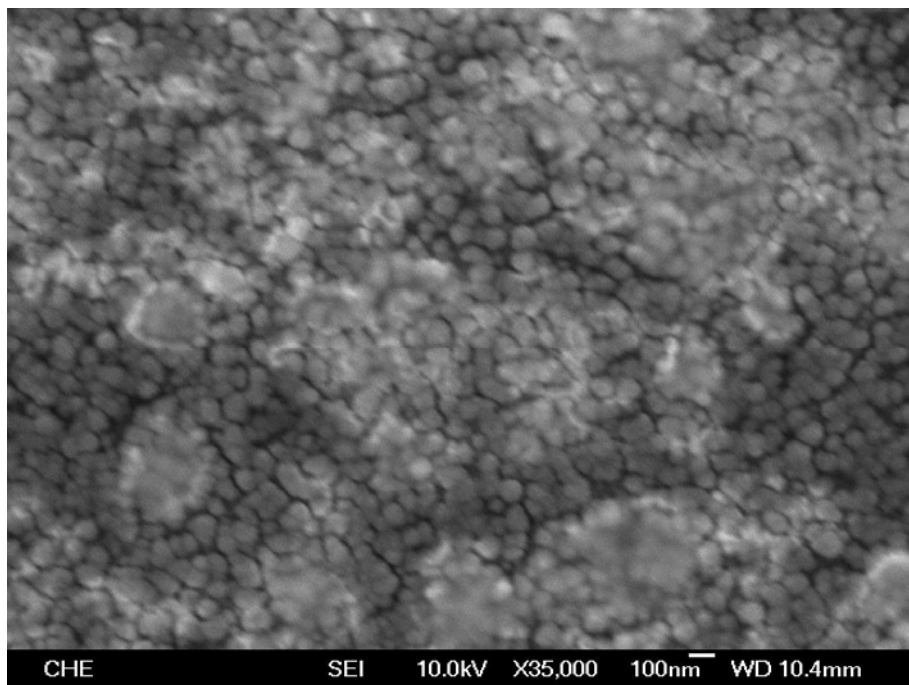


圖 4-6 CS/TPP=4 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 FESEM 圖。  
(magnification=35000X)

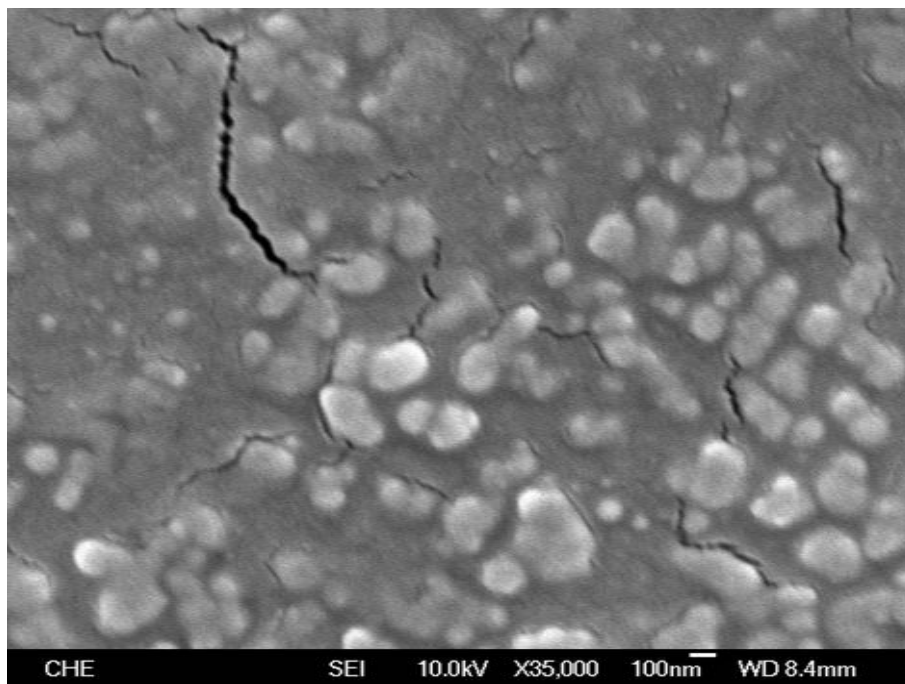


圖 4-7 CS/TPP=2.7 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 FESEM 圖。  
(magnification=20000X)

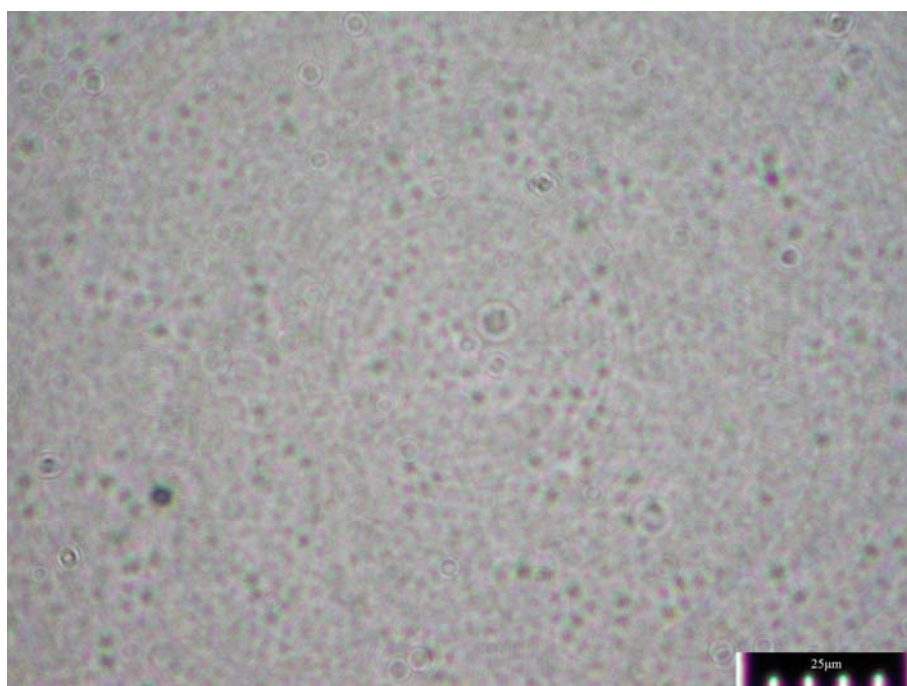


圖 4-8 CS/TPP=5.3 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 OM 圖。  
(magnification=1600X)

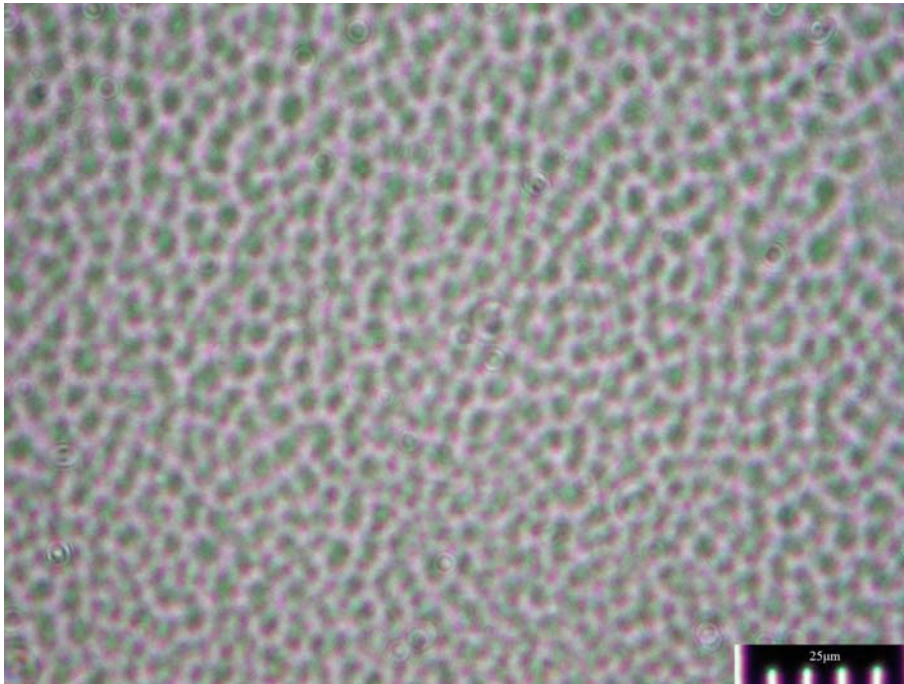


圖 4-9 CS/TPP=4 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 OM 圖。  
(magnification=1600X)

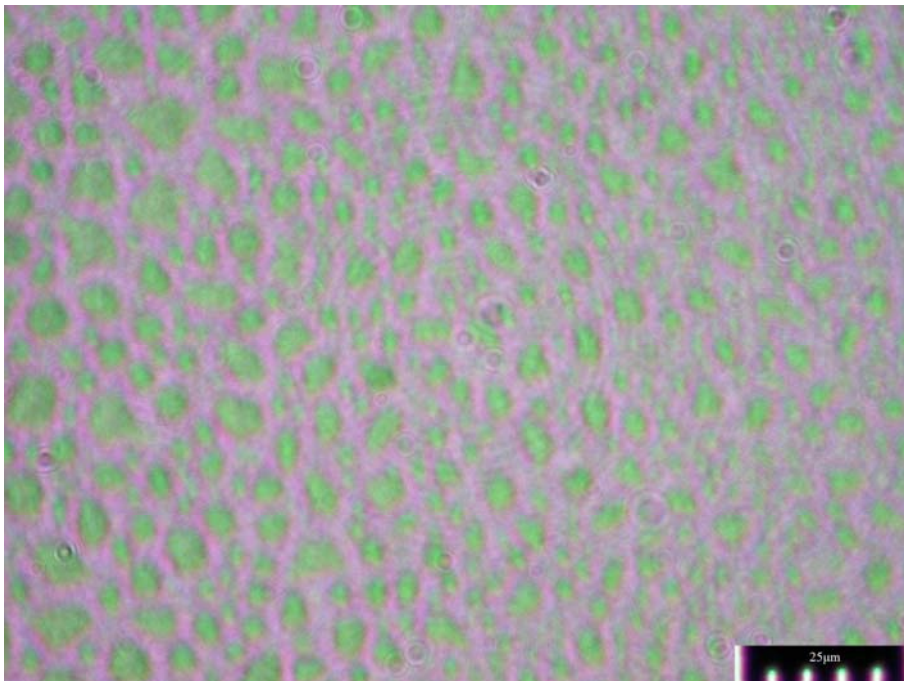


圖 4-10 CS/TPP=2.7 濃度下所交聯的幾丁聚醣微粒 OM 圖。  
(magnification=1600X)

## 4-2-2 幾丁聚醣界面電位

表 4-4 為幾丁聚醣奈米微粒的界面電位( $\zeta$  potential)結果，界面電位是顆粒分散狀態之重要指標，可很好的指示顆粒間作用強度從而它的測量可用來預測膠體系統的穩定性，界面電位絕對值越大越不易發生凝聚的現象。

當幾丁聚醣溶於醋酸溶液時，官能基上的 $\text{NH}_2$ 被質子化形成帶正電荷的 $\text{NH}_3^+$ 離子，此時加入三聚磷酸鈉會於溶液中解離成帶負電荷的三聚磷酸根離子，兩種離子形成中和反應產生幾丁聚醣微粒，而在微粒表面上所存在的正電荷，即為未與三聚磷酸根離子形成交互作用的 $\text{NH}_3^+$ 離子；由數據結果可觀察出，隨著CS/TPP比值的下降，界面電位值也會因此而降低，造成此結果是由於TPP濃度的增加讓幾丁聚醣微粒表面上更多的 $\text{NH}_3^+$ 離子與三聚磷酸根離子反應中和，因此而降低了界面電位值，由圖4-7~4-9中的OM圖也可觀察出CS/TPP比值的下降微粒間也越容易產生聚集。

表 4-4 幾丁聚醣微粒界面電位分析(0.1 wt% CS)

CS/TPP	2.7	3.2	4	5.3
Zeta 電位(mV)	38.7±3.1	42.3±2.8	47.2±3.3	51.3±4.1

### 4-3 PCL/CS 與 PCL/PCL-g-AA/CS 複合膜微結構分析

本實驗使用溶液法來混攪製備 PCL/CS 與 PCL/PCL-g-AA/CS 複材，以冰醋酸作為共溶劑，分別製得幾丁聚醣濃度為 10%、20%、30% 的 PCL/CS 與 PCL/PCL-g-AA/CS 摻合薄膜，藉由 OM 與 SEM 來觀察幾丁聚醣微粒與複材的分散情況。

#### 4-3-1 複合膜中幾丁聚醣微粒的分散狀況

圖 4-11、4-12、4-13 為 PCL/CS 不同濃度複材在融熔狀態下，以光學顯微鏡(OM)在 800 倍的放大倍率，於加熱平台上(100°C)觀察幾丁聚醣在複材中所呈的分散狀態。由於聚己內酯的結晶溫度在 55°C 左右，此時聚己內酯的狀態為透明的融熔態，所以由圖上所能觀察到的僅是幾丁聚醣微粒於複材中的分散情況。圖上可看出幾丁聚醣微粒以分散相的狀態分散於聚己內酯當中，混攪過後幾丁聚醣的粒徑大約介於 3~5 $\mu\text{m}$  之間，比起未混攪時有較大的粒徑，研判為在過濾時幾丁聚醣微粒之間產生了團聚的現象。

圖 4-14、4-15、4-16 為 PCL/PCL-g-AA/CS 不同濃度複材的光學顯微鏡圖；有添加 PCL-g-AA 過後的薄膜複材，相同的幾丁聚醣微粒也呈分散相狀態，除此之外，與 PCL/CS 薄膜複材的幾丁聚醣微粒比較起來，會有更小的粒徑分散，其粒徑大約介於 1~2 $\mu\text{m}$  之間。研判由於 PCL-g-AA 與幾丁聚醣比起未接枝的聚己內酯有最佳的親和性與相容性，故添加 PCL-g-AA 後可作為 PCL 與 CS 之間的相容劑，使得有添加 PCL-g-AA 過後的薄膜能讓幾丁聚醣微粒以更小的粒徑、更均勻的分散在聚己內酯當中。



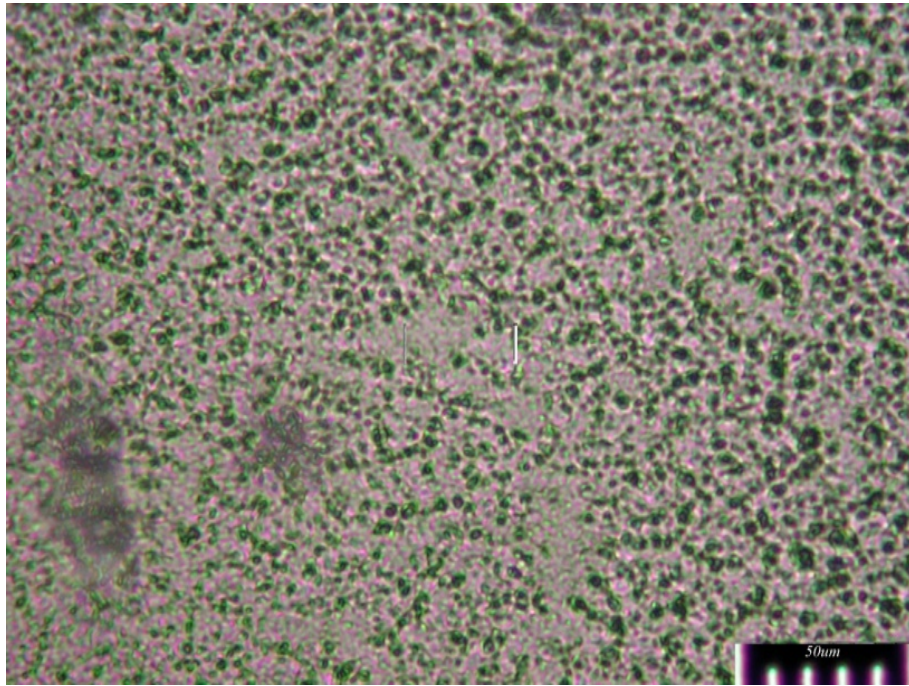


圖 4-11 PCL/CS(90/10)複材 OM 圖 (magnification=800X)

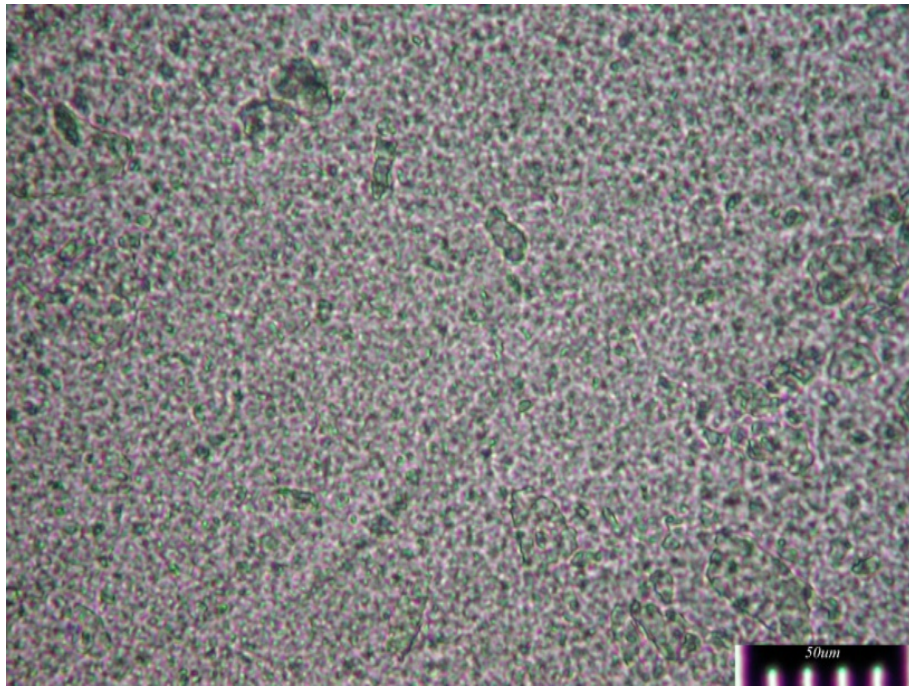


圖 4-12 PCL/CS(90/20)複材 OM 圖 (magnification=800X)

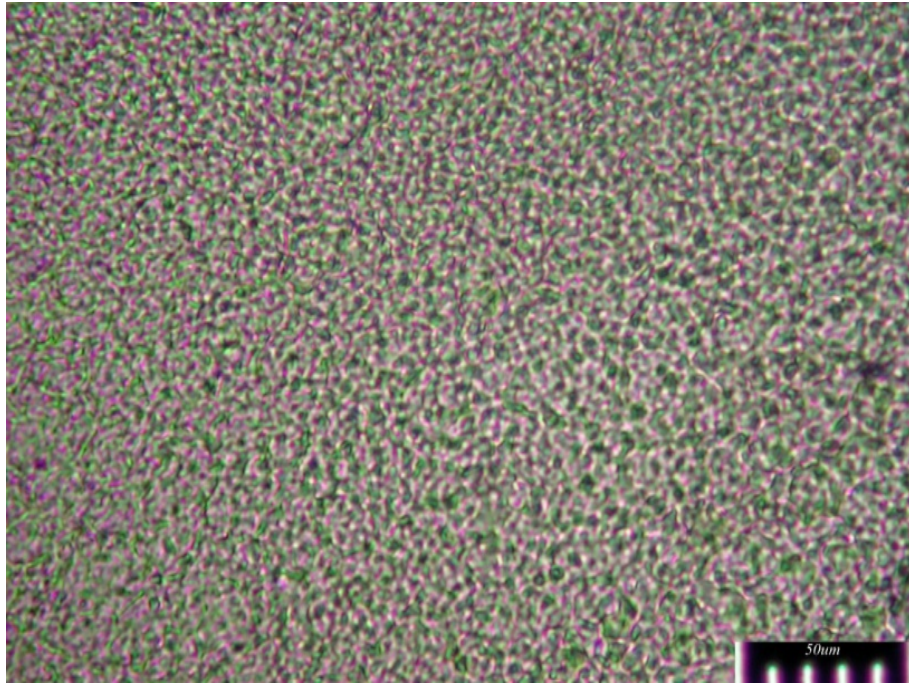


圖 4-13 PCL/CS(70/30)複材 OM 圖(magnification=800X)

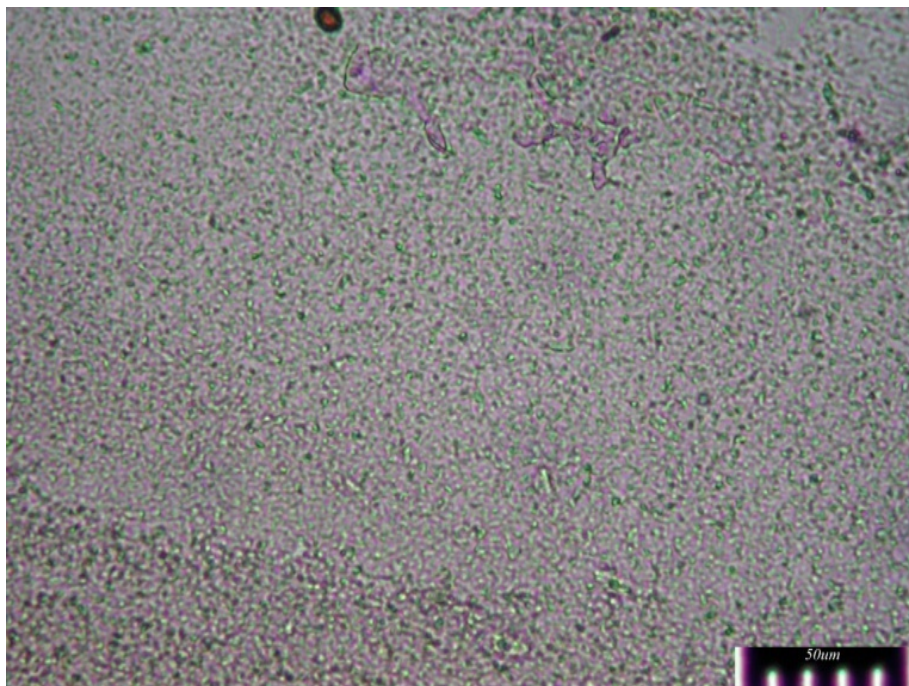


圖 4-14 PCL/PCL-g-AA/CS(85/5/10)複材 OM 圖(magnification=800X)

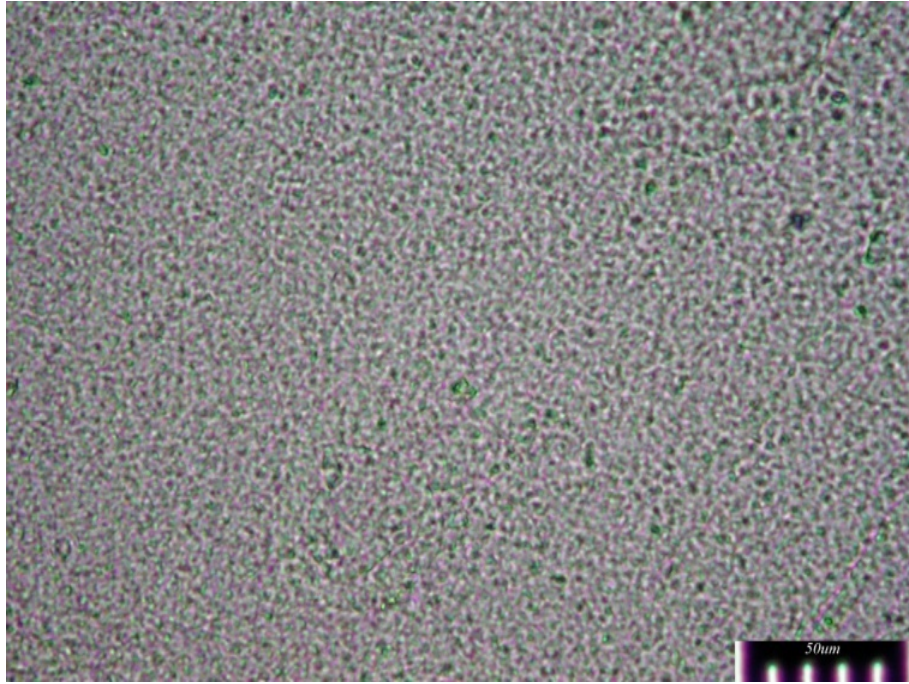


圖 4-15 PCL/PCL-g-AA/CS(70/10/20)複材 OM(magnification=800X)

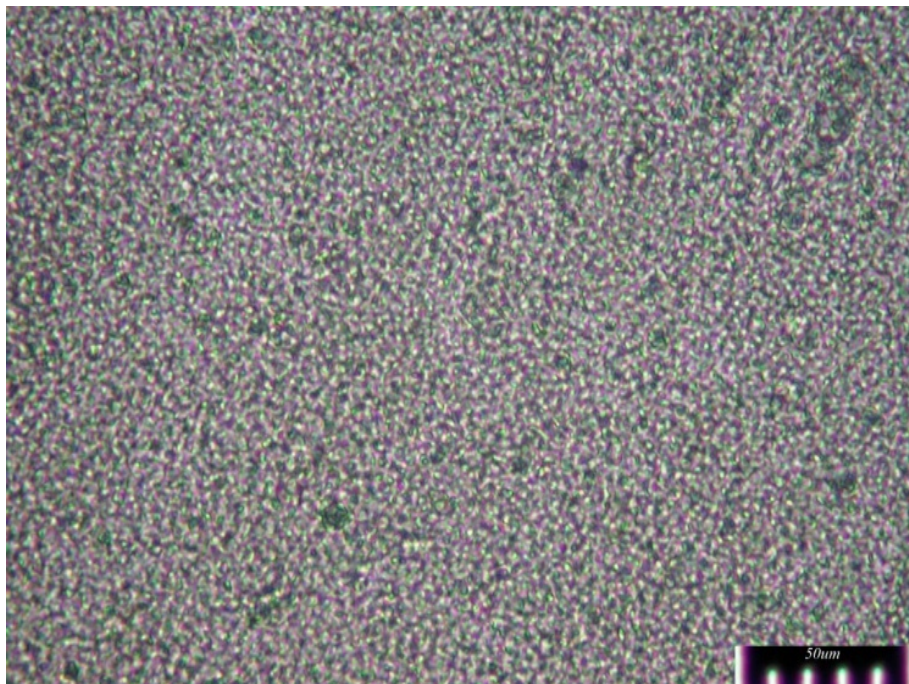


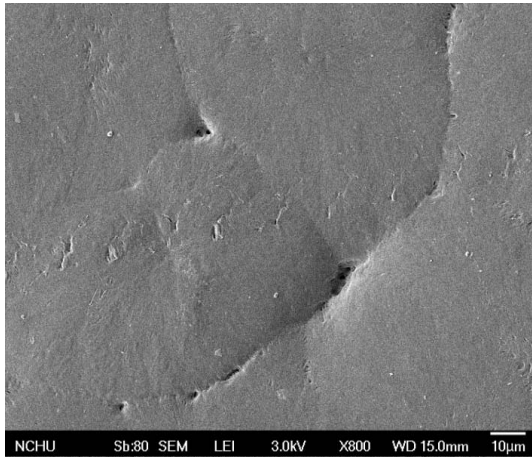
圖 4-16 PCL/PCL-g-AA/CS(55/15/30)複材 OM(magnification=800X)

### 4-3-2 複合膜表面微結構

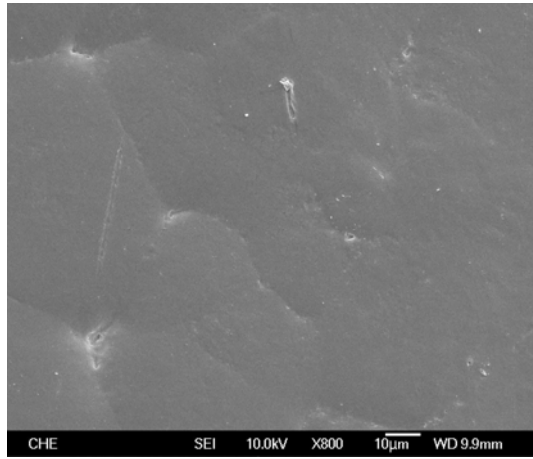
圖4-17(a)、(c)、(e)為以醋酸為溶劑製備出不同濃度PCL/CS複合膜於800倍率下的FESEM圖，聚己內酯(polycaprolactone)是一種結晶相當明顯且晶形為球晶(spherulite)結構的結晶性高分子，從圖可看出聚己內酯的晶體開始生長時類似中心輻射狀的晶體，然後逐漸地往軸向生長成球晶之完整結構。而隨著幾丁聚醣微粒的添加，聚己內酯的球晶面積將因此縮小，造成此結果是由於聚己內酯會以幾丁聚醣微粒為結晶核下產生異相結晶，使得球晶數量增加、面積縮小。圖4-16中的(b)、(d)、(f)為添加相容劑PCL-g-AA後的複材，由圖上可觀察出隨著PCL-g-AA的添加可讓複材表面較具均勻性，造成此效應是由於隨著相容劑PCL-g-AA的添加改善了聚己內酯與幾丁聚醣微粒間的相容性，讓幾丁聚醣微粒能以更小粒徑的狀態下分散於複材當中，可於複材單位面積下有較小較多的結晶，以致表面較為均勻；此外，PCL/PCL-g-AA/CS複材也會隨著幾丁聚醣微粒濃度的提高，使的聚己內酯以幾丁聚醣微粒為結晶核產生異相結晶。因此幾丁聚醣濃度越高，球晶的數量也越多，面積也越小。

圖4-18為以THF為溶劑製備出不同濃度PCL/CS與

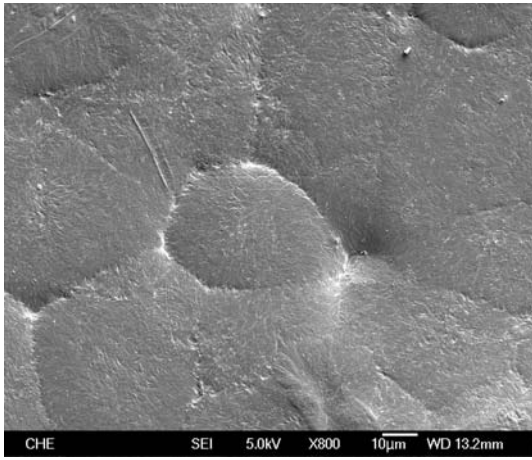
PCL/PCL-g-AA/CS複合膜於800倍率下的FESEM圖，由圖可觀察出，相較於以醋酸所製備的複合膜，表面有更明顯的球晶型態，造成此結果是由於THF比起醋酸與聚己內酯有更佳的可溶性，可讓聚己內酯高分子鏈段充分延伸，具有較高的結構規則性，讓複材的結晶行為更為明顯。而添加幾丁聚醣微粒與相容劑PCL-g-AA的效應皆與以醋酸為溶劑所製備出的複材具有相類似的結果；幾丁聚醣微粒的添加會促使聚己內酯以幾丁聚醣微粒為晶核產生異相結晶，造成結晶數量增加面積縮小；添加PCL-g-AA則可改善聚己內酯與幾丁聚醣的可溶性，使得複材表面均勻性較佳。



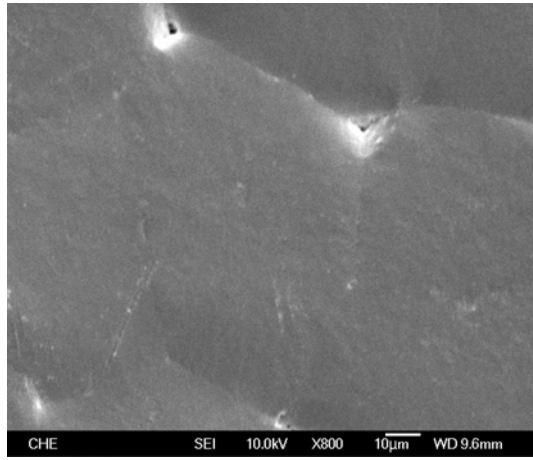
(a)



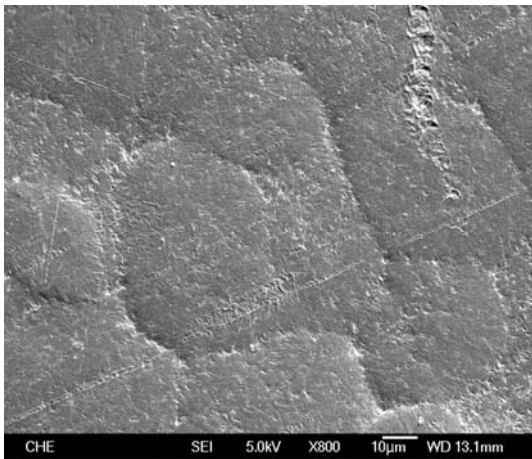
(b)



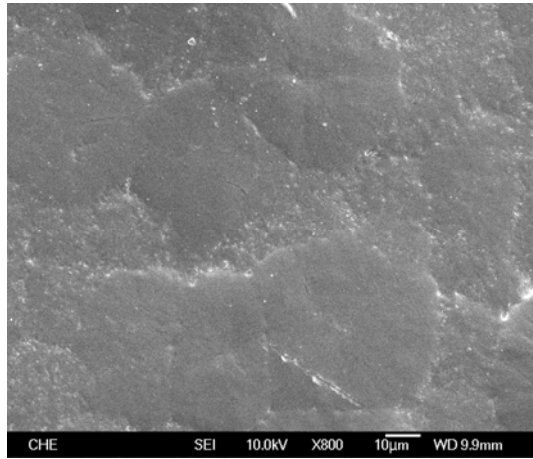
(c)



(d)



(e)

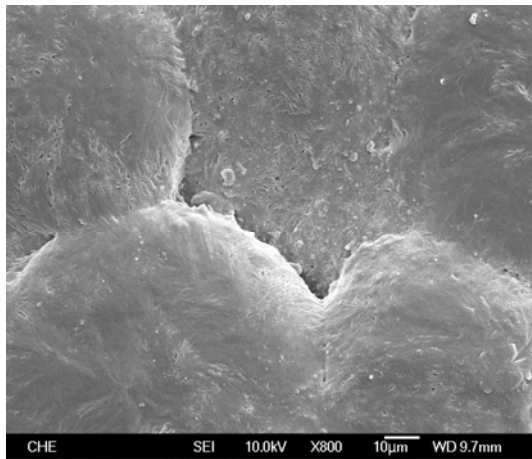


(f)

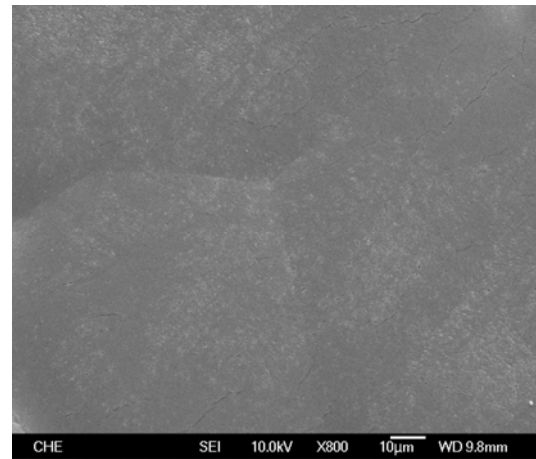
圖 4-17 以醋酸為溶劑製備複材之 FESEM 圖(magnification=800X)

(a)PCL/CS(90/10) (b)PCL/PCL-g-AA/CS(85/5/10) (c)PCL/CS(80/20)

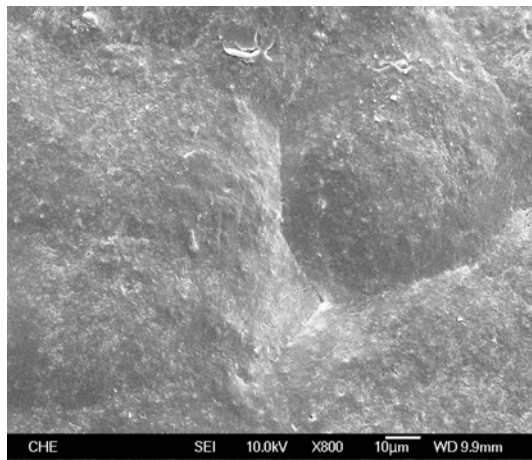
(d)PCL/PCL-g-AA/CS(70/10/20) (e)PCL/CS(70/30) (f)PCL/PCL-g-AA/CS(55/15/30)



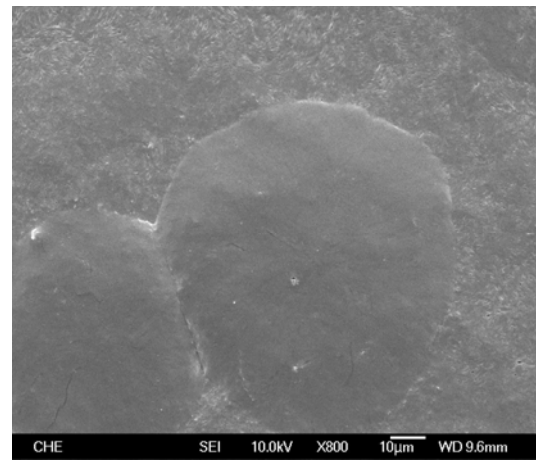
(a)



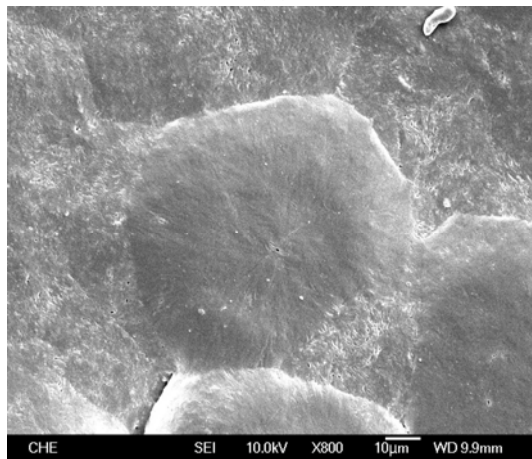
(b)



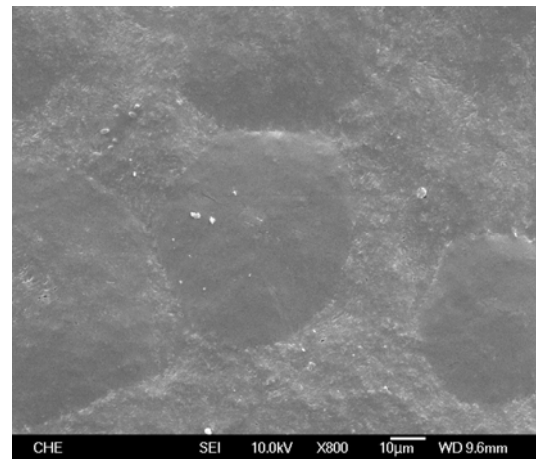
(c)



(d)



(e)



(f)

圖 4-18 以 THF 為溶劑製備複材之 FESEM 圖(magnification=800X)

(a)PCL/CS(90/10) (b)PCL/PCL-g-AA/CS(85/5/10) (c)PCL/CS(80/20)

(d)PCL/PCL-g-AA/CS(70/10/20) (e)PCL/CS(70/30) (f)PCL/PCL-g-AA/CS(55/15/30)

## 4-4 拉伸測試

本研究藉由拉伸測試來探討不同溶劑的選擇、添加幾丁聚醣、添加 PCL-g-AA 相容劑後對於複材機械性質的影響。圖 是 PCL、PCL/CS、PCL/PCL-g-AA/CS 混摻物經拉伸試驗所測得的應力-應變曲線圖，表 是拉伸測試所得的數據結果，每組不同濃度樣品均測 5 次以上，再取 3 組有效斷裂試樣的測試進行算術平均作為最後結果，圖中的拉伸模數(楊氏模數)是在應變為 0.3%時所得之數據。

### 4-4-1 不同溶劑對聚己內酯拉伸性質之影響

圖表 4-5、4-6 為聚己內酯分別以冰醋酸與 THF 為溶劑，由拉伸試驗所測得的應力-應變結果；由數據可看出，聚己內酯以冰醋酸為溶劑所製備出的薄膜延伸率為 286.7%，若改以 THF 溶劑其延伸率可提高至 639.6%，由此可看出以 THF 製備出的薄膜，會有較佳的柔韌性；造成此結果是由於聚己內酯與 THF 溶劑間有較佳的相容性與親合性，可使聚己內酯高分子鏈段充分延伸，延展性能因此而提升。

### 4-4-2 以醋酸為溶劑製備複材之拉伸性質

聚己內酯本身具柔韌性，而幾丁聚醣則具剛硬性，因此將幾丁聚醣混摻入聚己內酯時會使得複合膜剛性性質增加變的具易脆性。圖 4-19 與表 4-5 為 PCL/CS 複材以醋酸為溶劑所測得的拉伸測試結果，由結果可發現，拉伸模數與拉伸強度皆隨著幾丁聚醣濃度的增加而提



升，而延伸率則會隨著複材剛性提升而有降低之趨勢；其原因推測為幾丁聚醣中大分子鏈段中含有大量的環狀結構，且環上的-OH 及-NH<sub>2</sub>可形成分子間的氫鍵，阻礙了高分子鏈段的旋轉與運動，且幾丁聚醣官能基與聚己內酯之間由 FTIR 結果分析所示，彼此分子間存在著相互作用力，因此隨著幾丁聚醣添加複合膜的韌性會降低、力學強度增加。由以上結果所示，於幾丁聚醣濃度 10%時相較於其他濃度有較好的延展性，可改善幾丁聚醣易脆之缺點，而將幾丁聚醣濃度提升至 20%以上時則可提昇聚己內酯的拉伸強度，故將兩種材料材料摻合可改善單一分子所不足的性質。

由圖 4-20 與表 4-5 為以醋酸水溶液製備 PCL/PCL-g-AA/CS 複材之拉伸測試，其結果可觀察出，隨著幾丁聚醣添加拉伸模數與與拉伸強度皆會因此而增加，而剛性性質的提升也伴隨著斷裂伸長量的降低，與 PCL/CS 複材具有相同之效應；除此之外，添加 PCL-g-AA 相容劑過後的複材，其拉伸強度與延展率相較於 PCL/CS 複材皆有提升的趨勢；造成此結果是由於在進行拉伸測試時，其斷裂區域會在 PCL 與 CS 之間的介面產生，而添加 PCL-g-AA 過後的複材，可讓 CS 較均勻的分散於複合膜中，因此可讓複材有效的分散吸收外在施力，進而提升拉伸強度與延伸率。

#### 4-4-3 以 THF 為溶劑製備複材之拉伸性質

圖 4-21、4-22 表 4-6 為以 THF 為溶劑製備 PCL/CS、PCL/PCL-g-AA/CS 複材之拉伸測試；結果可觀察出以 THF 為溶劑所製備出的複材，其延伸率比較起以醋酸水溶液為溶劑會有較佳的拉伸

性能，造成如此效應類似於 章節所提及，是由於聚己內酯與 THF 溶劑間有較佳的相容性與親合性，可使聚己內酯高分子鏈段充分延伸，分子間的作用力較強。而若以醋酸為溶劑製備，由於聚己內酯與醋酸的親合性不佳，過程中必須於溫度 55°C 下來做混摻，結構上會有微相分離產生。因此以 THF 為溶劑來製備複材能夠增加複材之延展性，進而有效的提升複材的機械性質；而隨著幾丁聚醣的添加相同的複材之剛性性質也會因此而提升，造成延伸率下降，模數提升。添加 PCL-g-AA 後的複材可增加聚己內酯與幾丁聚醣間的相容性，能有效的提升複材的延伸率與拉伸強度，且相對於以醋酸溶液製備複材有更佳的提升效果。

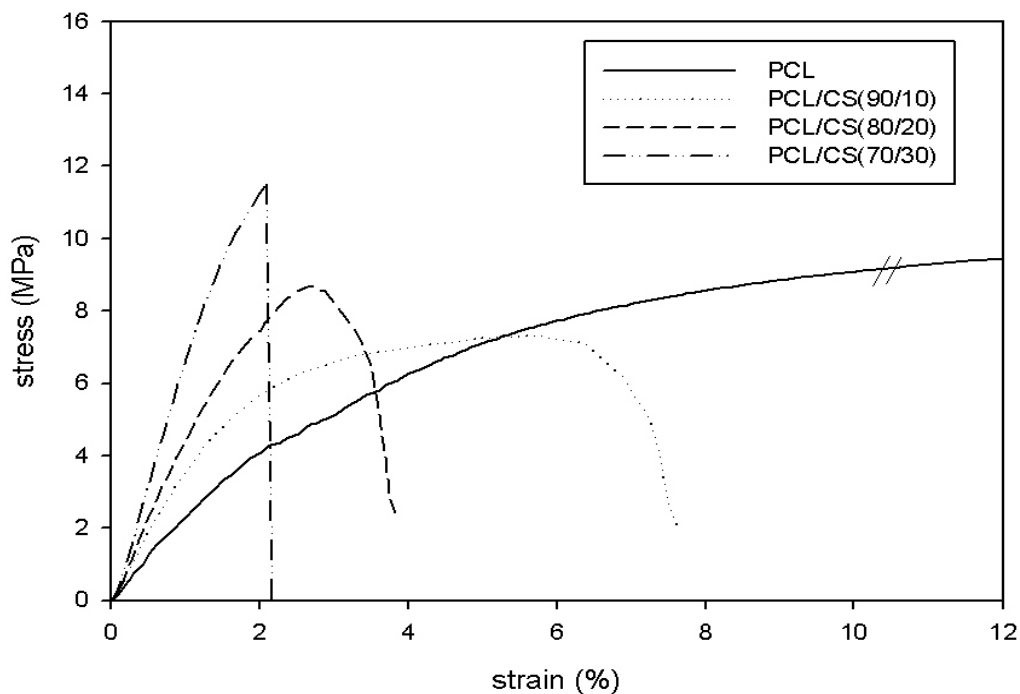


圖 4-19 PCL 與 PCL/CS 摻合物拉伸試驗之應力-應變圖  
(溶劑：醋酸)

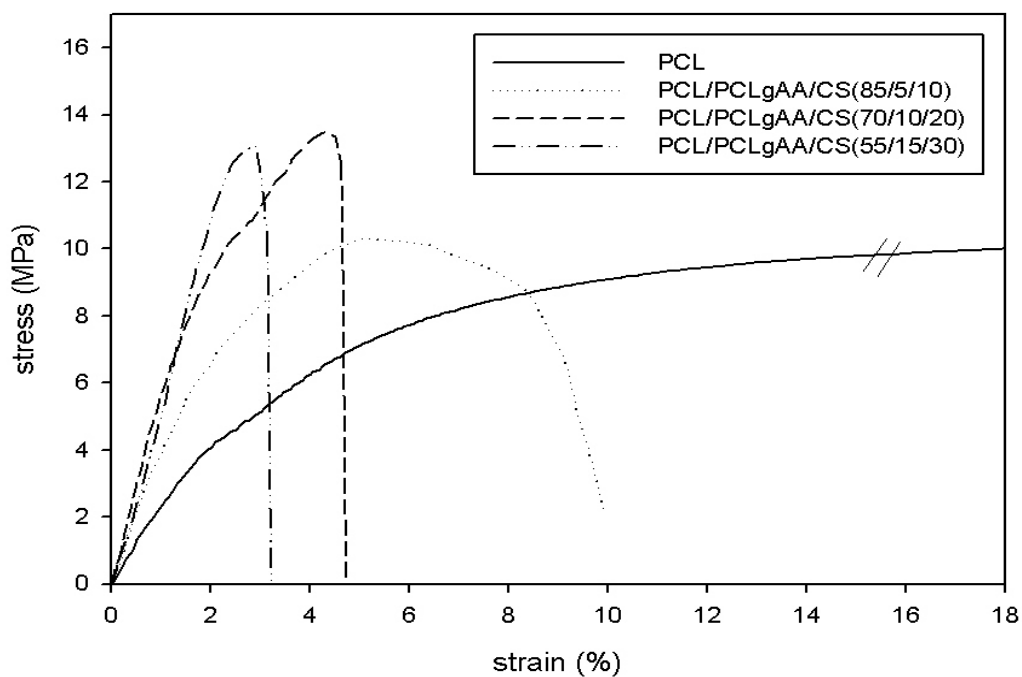


圖 4-20 PCL 與 PCL/PCL-g-AA/CS 摻合物拉伸試驗之應力-應變圖  
(溶劑：醋酸)

表 4-5 摻合物拉伸試驗之各項數據(溶劑：醋酸)

PCL/PCLgAA/CS	Tensile Modulus(MPa)	Tensile Strength(MPa)	Strain at break(%)
(100/0/0)	279.7±56	9.2±0.7	286.7±23
(90/0/10)	344.4±89	7.9±1.1	7.8±1.2
(85/5/10)	359.0±92	11.3±1.3	9.7±2.4
(80/0/20)	569.8±67	9.8±2.2	3.7±0.8
(70/10/20)	492.4±75	12.4±1.2	4.3±0.7
(70/0/30)	787.3±86	11.4±1.3	2.2±0.6
(55/15/30)	506.1±76	13.0±1.6	3.1±0.5

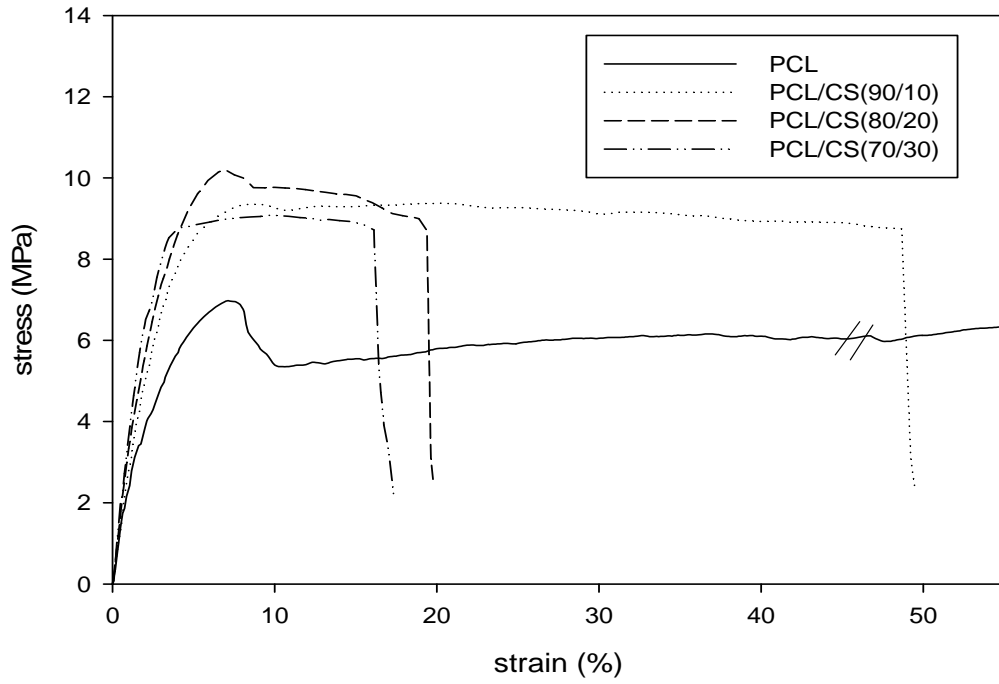


圖 4-21 PCL 與 PCL/CS 摻合物拉伸試驗之應力-應變圖  
(溶劑：THF)

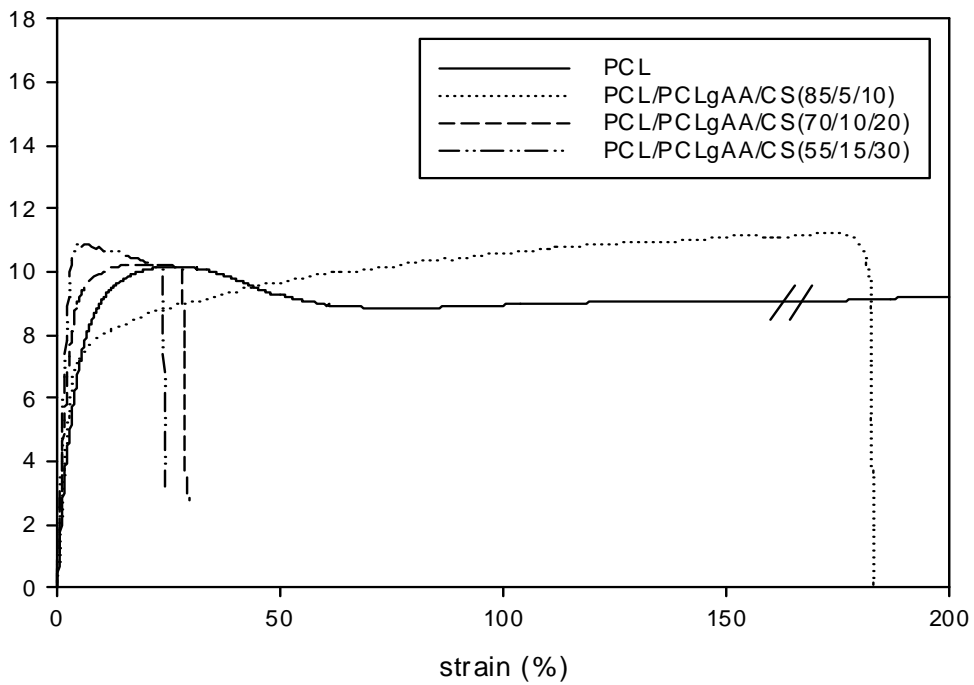


圖 4-22 PCL 與 PCL/PCL-g-AA/CS 摻合物拉伸試驗之應力-應變圖  
(溶劑：THF)

表 4-6 摻合物拉伸試驗之各項數據(溶劑：THF)

PCL/PCLgAA/CS	Tensile Modulus(MPa)	Tensile Strength(MPa)	Strain at break(%)
(100/0/0)	226.2±55	12.4±2.8	639.6±151
(90/0/10)	327.1±77	8.0±1.7	46.2±13
(85/5/10)	290.0±65	10.2±2	190.8±38
(80/0/20)	452.1±68	10.8±1.3	20.2±8
(70/10/20)	390.1±57	10.4±2.3	30.1±13
(70/0/30)	392.4±78	8.8±1.1	16.4±4.3
(55/15/30)	427.7±56	10.5±0.9	26.11±6.7

#### 4-5 熱差掃描式分析(DSC)

本實驗 DSC 操作溫度範圍為-60~150°C，因低於幾丁聚醣的玻璃轉移溫度( $T_g$ )203°C，所以在 DSC 升溫曲線上不會出現幾丁聚醣的熔融溫度，只能得知 PCL 的熱分析數據。圖 4-22 與表 4-7 分別為 PCL/CS 與 PCL/PCL-g-AA/CS 混摻物於第一次升溫過程之 DSC 分析曲線與熱性質分析數據。由文獻上可知<sup>[13]</sup>聚己內酯完全結晶時之  $\Delta H_f^* \doteq 142\text{J/g}$ ，因此可藉由結晶度的定義來計算出複材的結晶度與聚己內酯的結晶度。

$$X_{c,PCL} (\%) = \frac{\Delta H_f}{wt\% \times \Delta H_f^*} \times 100\%.$$

聚己內酯為一結晶性高分子，所以由圖上與表上的數據可看出聚己內酯具有單一融熔峰，其融點約為 57°C，結晶度為 33.3%；而隨著幾丁聚醣微粒的添加，可發覺融熔峰的強度逐漸減弱，複材的總結晶度因此而降低，但聚己內酯於複材中的結晶度則會略為提升，造成此效應研判是由於聚己內酯在幾丁聚醣微粒作為結晶核下，形成異相結晶的效應，促使聚己內酯本身結晶度因此提升，而伴隨著結晶度的上升，複材的熔點溫度也會略為提高。而添加 PCL-g-AA 相容劑過後的複材則可明顯的觀察出其結晶度較 PCL/CS 複材來的高 2~5%，造成此結果是由於幾丁聚醣微粒因添加相容劑 PCL-g-AA 後而有較好的分散，使得聚己內酯的異相結晶效應更為顯著，相同的 PCL/PCL-gAA/CS 複材的融熔溫度也會隨著聚己內酯結晶度的提高而上升。

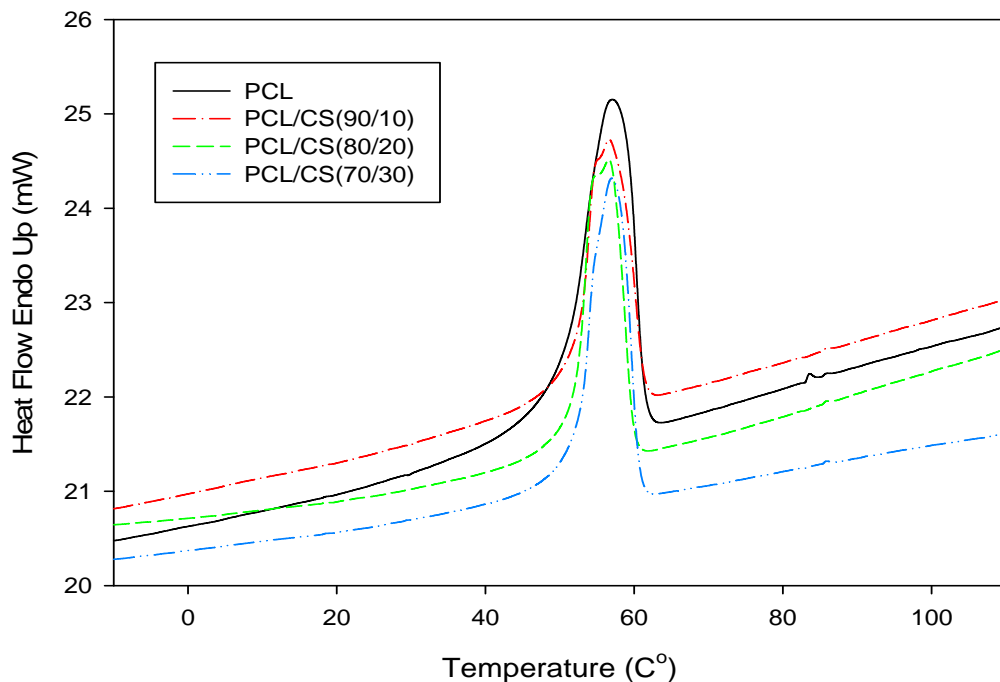


圖 4-23 PCL 與 PCL/CS 摻合物於升溫過程之 DSC 分析圖

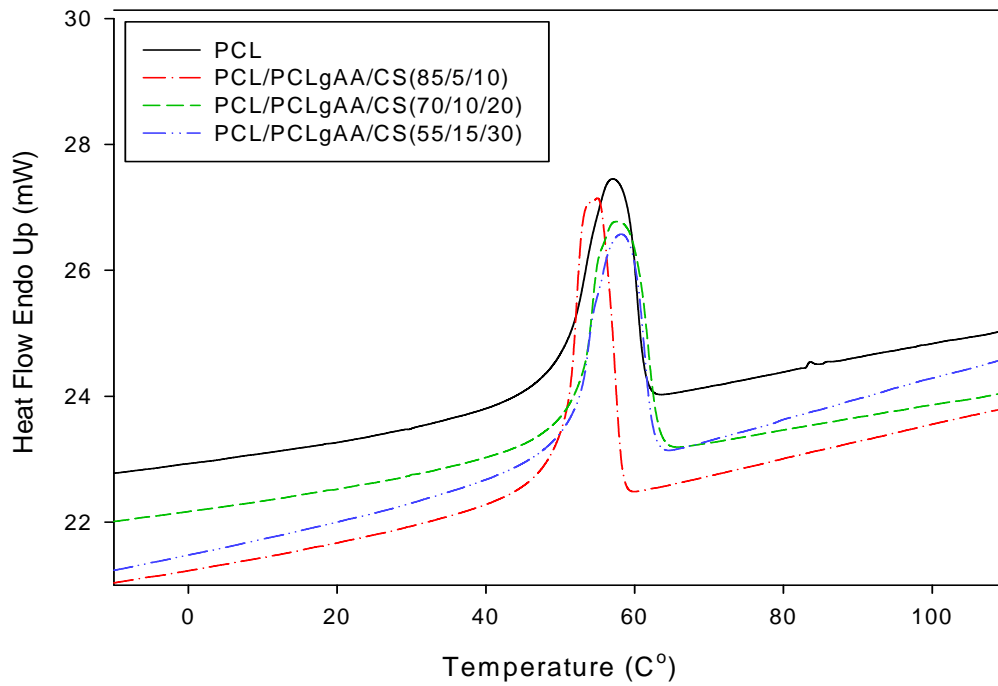


圖 4-24 PCL 與 PCL/PCL-g-AA/CS 摻合物於升溫過程之 DSC 分析圖

表 4-7 複合膜之 DSC 分析結果數據

PCL/PCLgAA/CS	T <sub>m</sub> (°C) 熔融溫度	ΔH <sub>m</sub> (J/g) 熔融熱	X <sub>c,comp</sub> (%)	X <sub>c,PCL</sub> (%)
(100/0/0)	56.95	49.46	35.10	33.34
(90/0/10)	56.98	46.25	32.57	36.19
(85/5/10)	54.99	49.33	34.74	38.60
(80/0/20)	57.06	43.24	30.45	38.07
(70/10/20)	57.53	46.85	33.01	41.26
(70/0/30)	57.26	39.59	27.88	39.83
(55/15/30)	58.19	43.80	30.85	44.07

## 4-6 複材於酵素分解液中之生物降解性

生物可分解性高分子即是指高分子材料的化學結構，可經由某些機制在合適的自然環境中分解之高分子，對高分子材料生物降解性能檢測主要有四種：(1) 土壤試驗 (2) 環境微生物試驗 (3) 培養特定的微生物試驗 (4) 酶解試驗。本實驗是將摻合物薄膜置入溶菌酶 (Lysozyme) 酵素分解液中，進行高分子材料的分解實驗程序，藉此來觀察高分子材料的分解情形，並探討添加天然的生物可分解幾丁聚醣 (chitosan) 與相容劑 PCL-g-AA 對於複材分解速率之影響。

高分子材料於分解過程中，其理化機械性質會逐漸轉弱而變脆，並崩解成碎片，再經由水解、溶解或微生物分解成簡單分子而消失，並得到最終產物生質、水與二氧化碳。實驗中以兩天為間隔來觀察重量變化的情形，圖 4-28 為 PCL 與幾丁聚醣其摻合物在酵素環境中分解後之重量分率分析結果，由結果可觀察出，幾丁聚醣會有較快的分解速率，在四天後分解速率即趨為平緩，可能為於長時間下酵素活性減弱所致，有待做進一步的確認。聚己內酯材料於酵素環境中分解速率較緩慢，即使經過 15 天的分解，其重量分率仍然趨近於 1.0；而添加幾丁聚醣過後的複材於分解初期(2 天)有最快的分解速率，四天後分解速率開始趨緩；此外複材的降解速率會因幾丁聚醣濃度之提高而有上升之趨勢，造成此效應是由於聚己內酯本身的疏水性質使的聚己內酯本身不易被分解，而添加幾丁聚醣過後的複材，可增加複材之吸濕性，且幾丁聚醣為天然可分解性高分子，相較於聚己內酯有更快的分解速率，因此添加幾丁聚醣能夠促進複材之分解。

圖 4-29 是代表以兩天為間隔所量測 PCL-g-AA 與複合膜在酵素



分解後的重量分解變化率結果，由結果可觀察出，幾丁聚醣具有最快的降解速率，因此 PCL/PCLgAA/CS 複材會隨著幾丁聚醣濃度的上升降解速率也隨之提升，與 PCL/CS 複材具有相同之效應；除此之外，PCL/PCLgAA/CS 複材與 PCL/CS 複材於相同幾丁聚醣濃度下相互比較可發現，PCL/PCLgAA/CS 的降解速率較慢，造成此結果是由於 PCLgAA 會與 CS 產生化學鏈結減緩了複材的降解速率且 PCL/CS 複材也有較高的吸濕性，因此 PCL/CS 相對於 PCL/PCLgAA/CS 複材會有更快的降解速率。

進一步觀察微結構影像分析，圖 4-25、4-26、4-27 為 PCL/CS 與 PCL/PCLgAA/CS 複材經過酵素分解後的微結構影像圖，由 800 倍率下的 FESEM 影像圖可觀察出，PCL/CS 與 PCL/PCLgAA/CS 複合膜經酵素降解後，其材料表面結構會被破壞崩解而產生小碎片及顆粒，且隨著酵素降解時間的增長，材料表面被分解的小碎片與顆粒明顯增多，材料表面也更為粗糙。而幾丁聚醣濃度的添加會促進複材之降解，因此隨著幾丁聚醣濃度的增加其材料表面被分解的碎片會越多也越為粗糙。

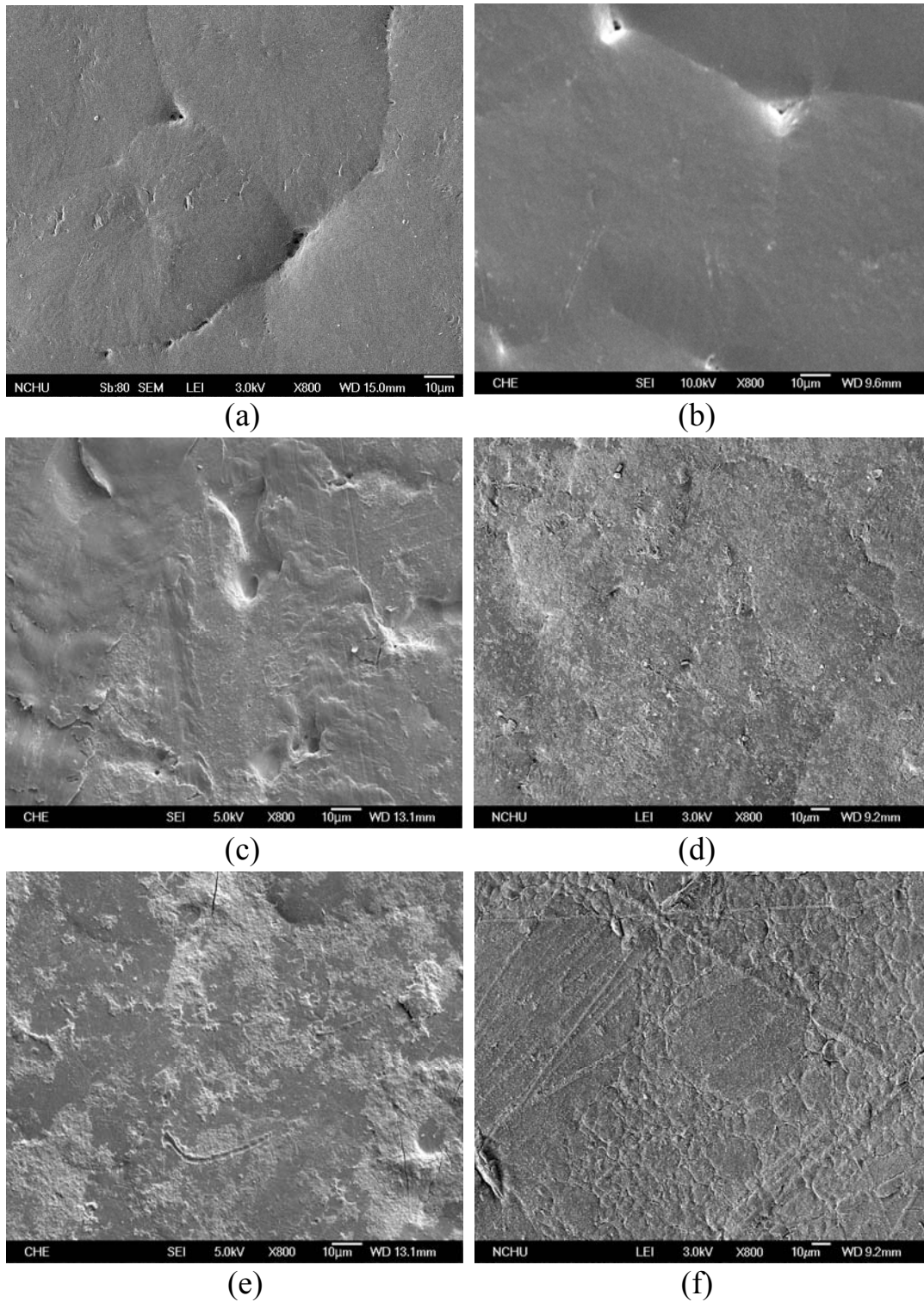


圖 4-25 PCL/CS(90/10)與 PCL/PCL-g-AA/CS(85/5/10)酵素降解

FESEM 圖

(a)、(c)、(e)為 PCL/CS(90/10)複材未降解、降解 6 天、降解 15 天

(b)、(d)、(f)為 PCL/PCL-g-AA/CS(85/10/5)複材未降解、降解 6 天、降解 15 天

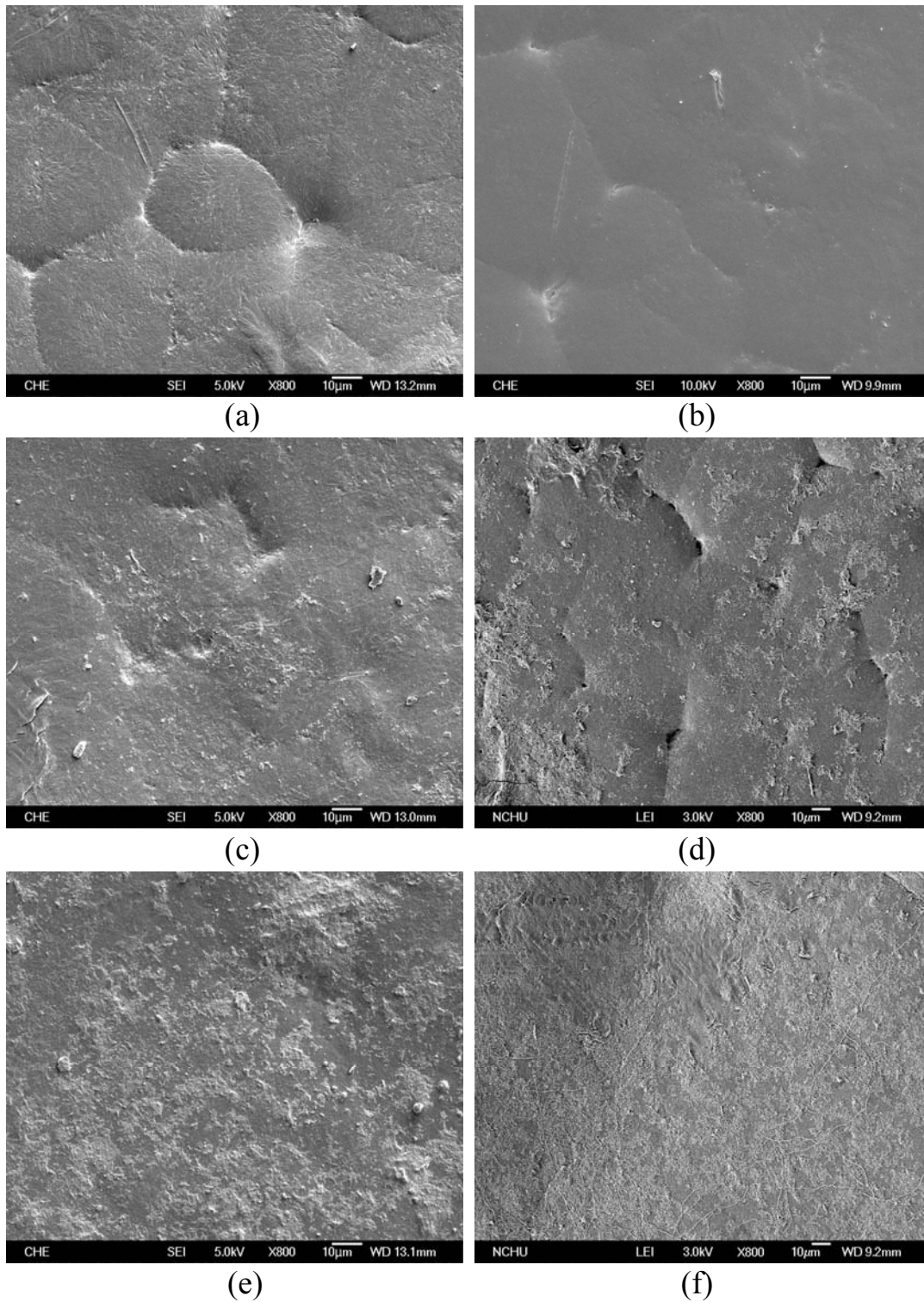


圖 4-26 PCL/CS(80/20)與 PCL/PCL-g-AA/CS(70/10/20)酵素降解  
FESEM 圖

(a)、(c)、(e)為 PCL/CS(80/20)複材未降解、降解 6 天、降解 15 天

(b)、(d)、(f)為 PCL/PCL-g-AA/CS(70/10/20)複材未降解、降解 6 天、降解 15 天

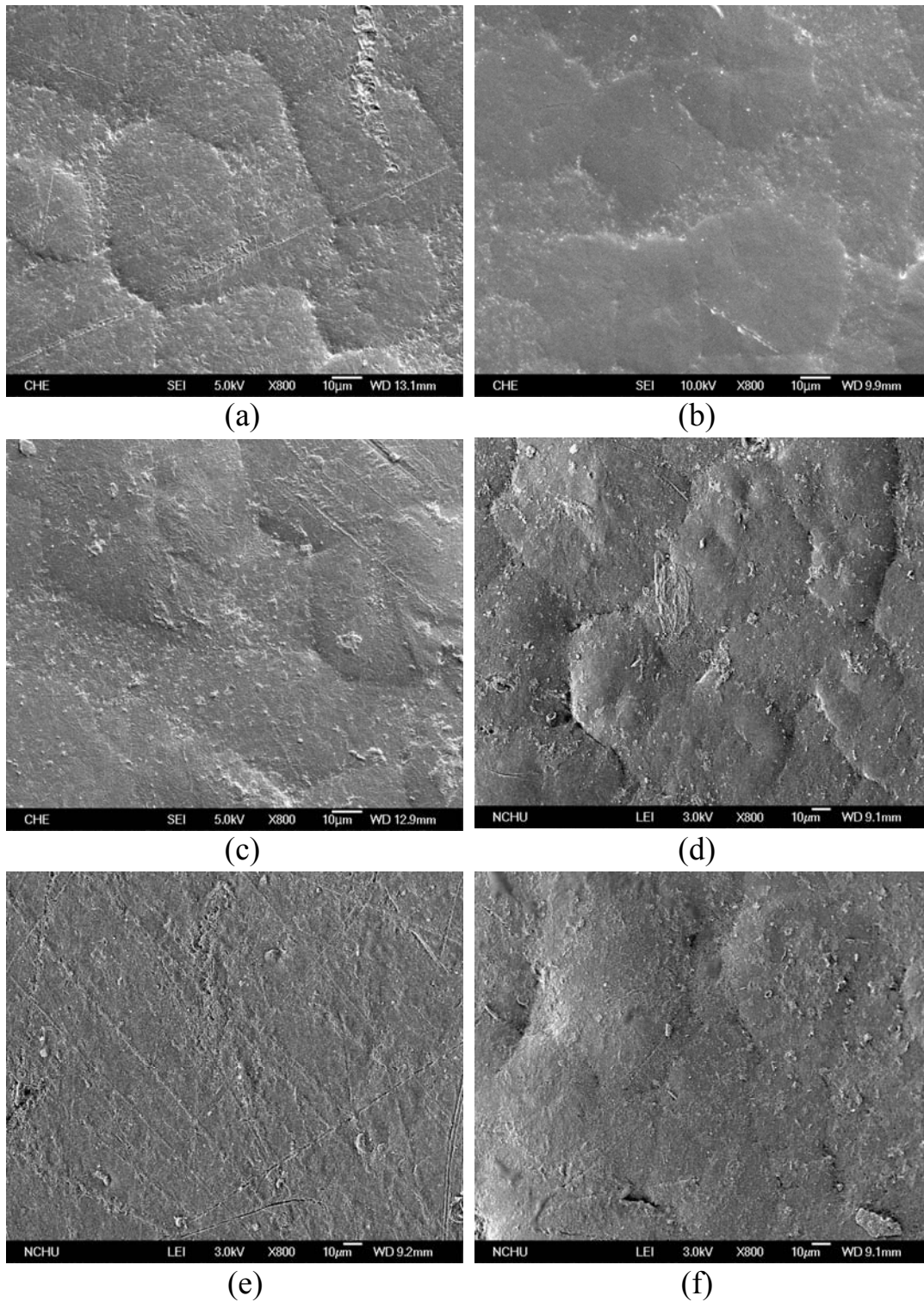


圖 4-27 PCL/CS(70/30)與 PCL/PCL-g-AA/CS(55/15/30)酵素降解  
FESEM 圖

(a)、(c)、(e)為 PCL/CS(70/30)複材未降解、降解 6 天、降解 15 天

(b)、(d)、(f)為 PCL/PCL-g-AA/CS(55/15/30)複材未降解、降解 6 天、降解 15 天

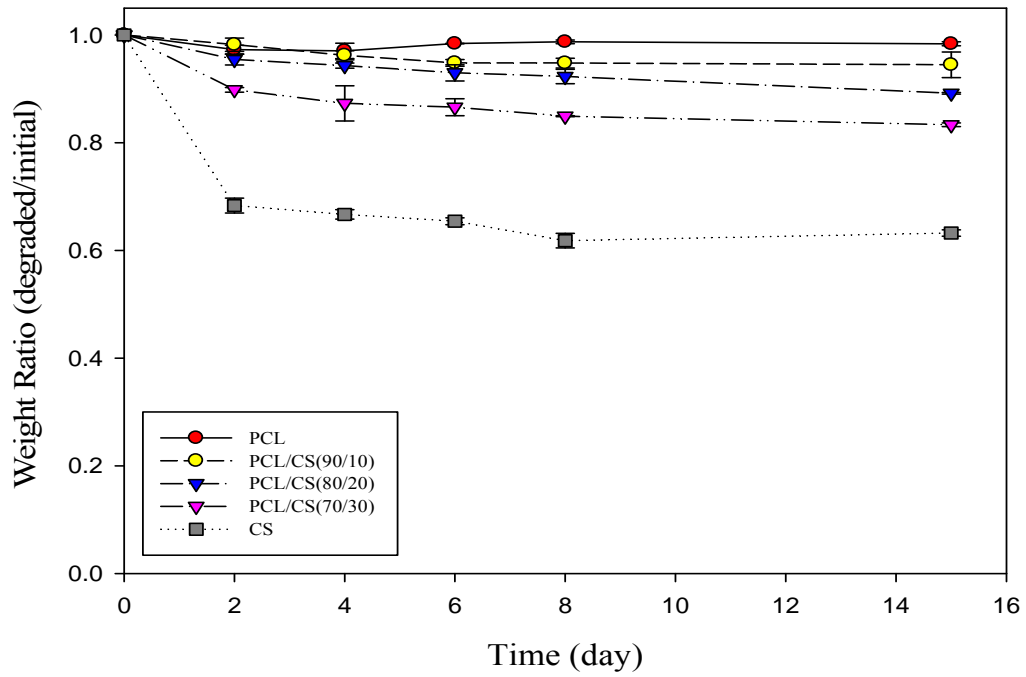


圖 4-28 PCL/CS 複材酵素降解重量損失曲線圖

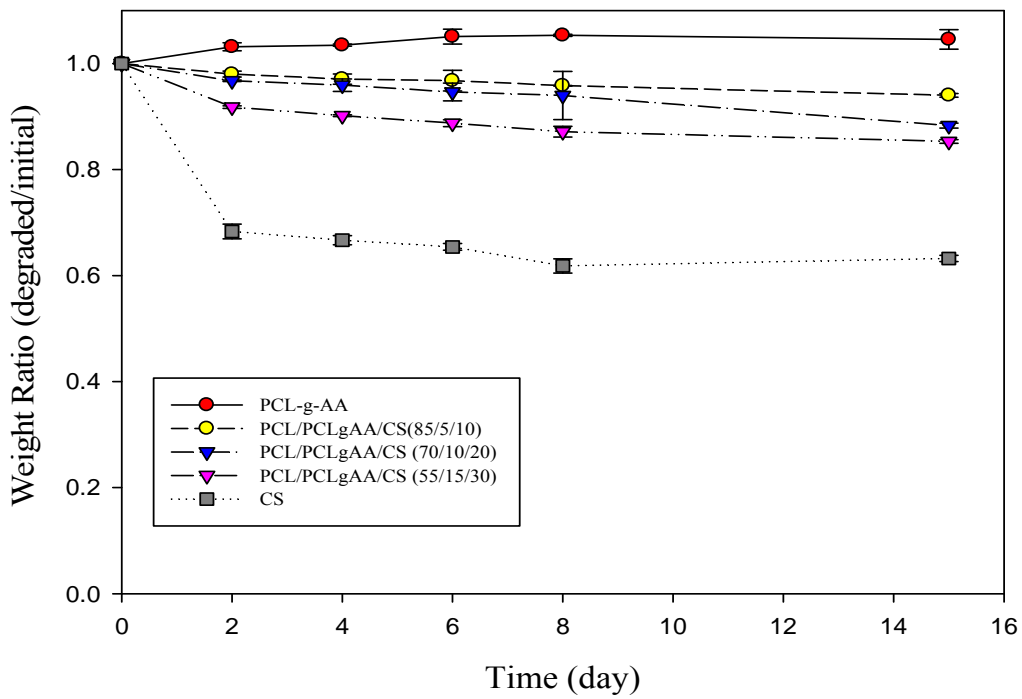


圖 4-29 PCL/PCL-g-AA/CS 複材酵素重量損失曲線圖

## 4-7 細胞對於表面微孔洞複材之生長情況

由相關文獻可知<sup>[3-5,8,19,34]</sup>，細胞的貼附成長與表面的孔洞、表面粗糙度有很大的關聯，但真正造成效應的原因，是化學的因素(局部化學結構差異)、表面的因素(表面能量)、機械的因素(應力)，或是純幾何的因素(表面凹孔或凸島等)所造成的，就有待更進一步的研究與探討。聚己內酯本身因其疏水性質，使得細胞不易於材料上產生附著；本研究將探討添加親水性幾丁聚醣微粒後，對於細胞貼附的影響；更藉由酸洗表面的幾丁聚醣微粒形成微孔洞，進一步的探討細胞對於表面微孔洞複材的貼附情況。

### 4-7-1 PCL/CS 與 PCL/PCL-g-AA/CS 微孔洞複材

本研究想藉由酸洗，將表面的幾丁聚醣微粒降解，以形成表面的微孔洞，其示意圖如圖 4-30。



圖 4-30 製備孔洞複材示意圖

圖 4-31、4-32 可觀察出，酸洗過後表面明顯的可看出微孔洞的

產生，且隨著幾丁聚醣濃度的提高孔洞數量也隨之增加。且由圖上可發現，PCL/CS 薄膜複材酸洗後的孔洞形態為圓弧形。表 4-8 為不同濃度複材酸洗後的表面孔洞孔徑，表上可知 PCL/CS(90/10)濃度下孔徑大小約為 250nm，當幾丁聚醣濃度提升至 30%時孔徑會變大至約 650nm，造成此結果是由於較高的幾丁聚醣濃度下，幾丁聚醣間越容易產生聚集以致於酸洗後孔徑變大，且孔洞的數量也會伴隨著濃度提升而增加。

PCL/PCL-g-AA/CS 的薄膜複材則為類似長條弧狀的孔洞，研判為在製備 PCL/PCL-g-AA/CS 過程中，因 PCL-g-AA 與 CS 之間有親合作用力存在，所以在將 PCL-g-AA 添加入 CS-TPP 水溶液時，伴隨著機械剪切力 PCL-g-AA 分子鏈與 CS 微粒會產生呈長條弧狀的凝聚，因此將 PCL/PCL-g-AA/CS 複材酸洗過後便會造成長條弧狀的孔洞。當幾丁聚醣濃度 10%下孔洞大小約為 530nm，幾丁聚醣濃度提升至 30%時孔徑會變大至約 820nm，與 PCL/CS 複材具有相同的效應。

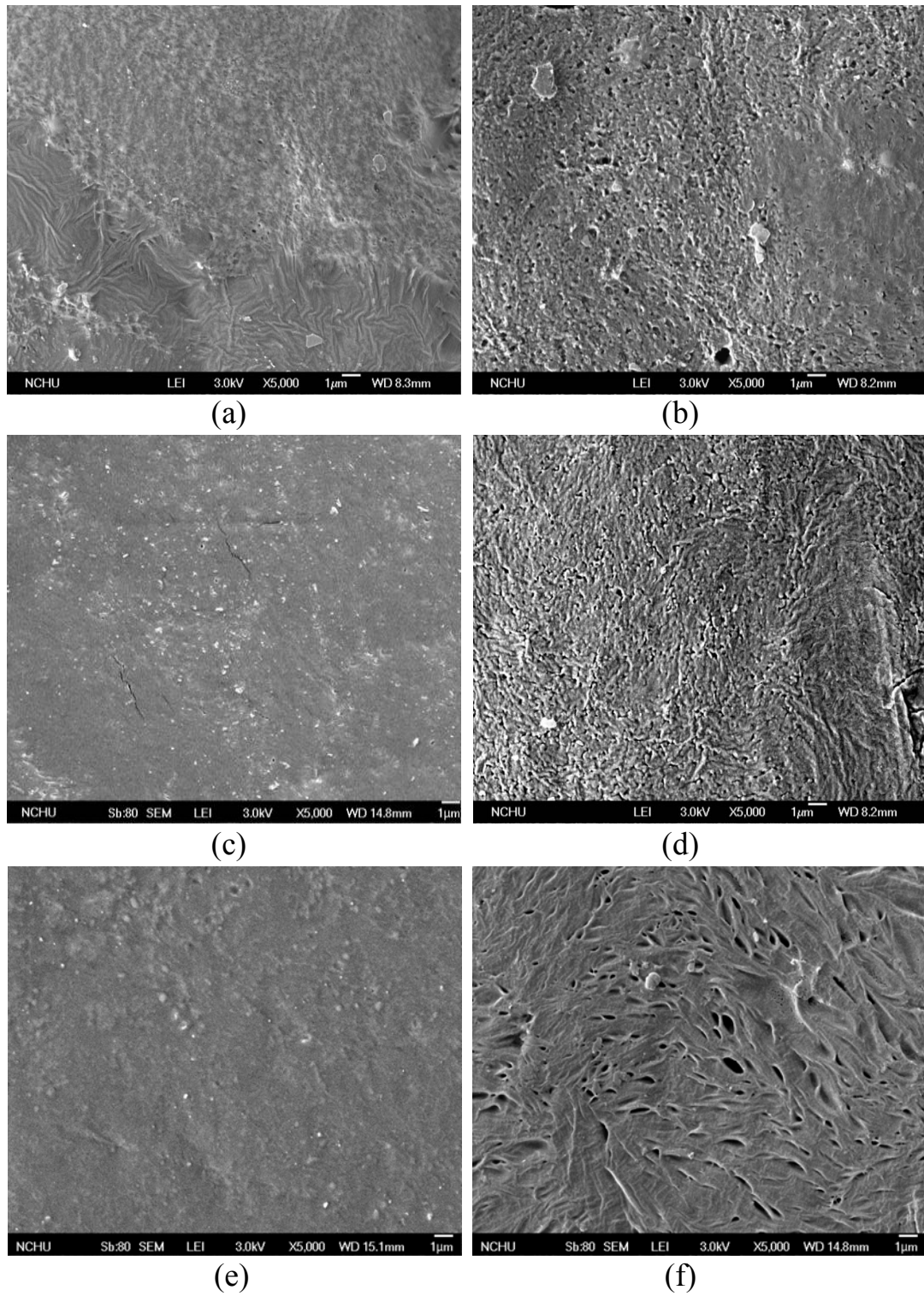


圖 4-31 PCL/CS 微孔洞複材 FESEM 圖

(a)、(c)、(e)為未經表面處理的 PCL/CS(90/10)、PCL/CS(80/20)、PCL/CS(70/30) 複材，(b)、(d)、(f)則為酸洗後複材的表面微結構。



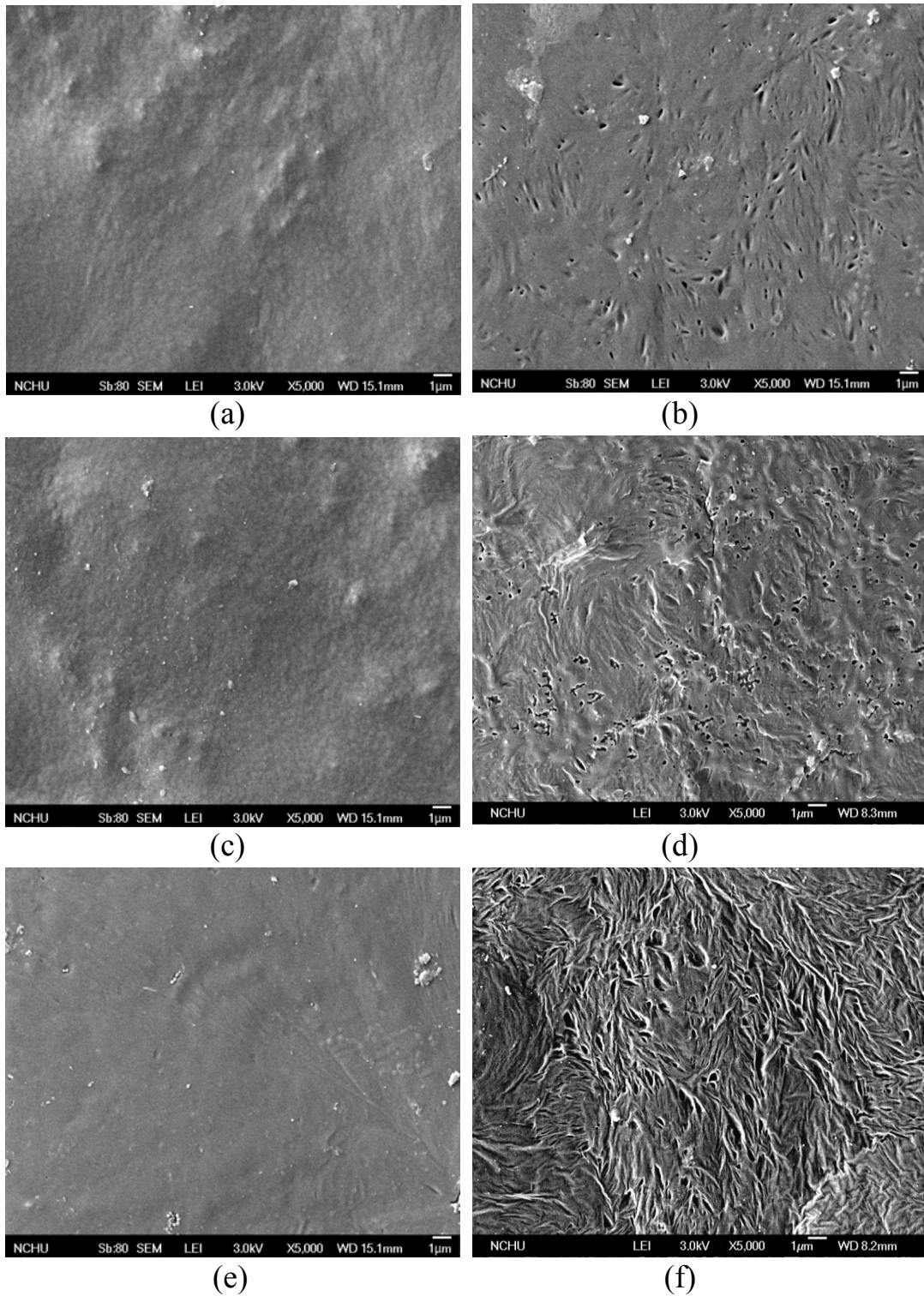


圖 4-32 PCL/PCL-g-AA/CS 微孔洞複材 FESEM 圖

(a)、(c)、(e)為未經表面處理的 PCL/PCL-g-AA/CS(85/5/10)、  
PCL/PCL-g-AA/CS(70/10/20)、PCL/PCL-g-AA/CS(55/15/30)複材，(b)、(d)、(f)  
則為酸洗後複材的表面微結構。

表 4-8 不同濃度複材酸洗後的表面孔洞孔徑

PCL/PCL-g-AA/CS	90/0/10	80/0/20	70/0/30	85/5/15	70/10/20	55/15/30
Pore size(nm)	260	240	650	530	420	820

#### 4-7-2 細胞培養

相關學者提出，為了增加於 PCL 材料上的生物活性，製備具孔洞的 PCL 基材，並混合氫氧化磷灰石(hydroxyapatite)顆粒，促進造骨細胞的生長；2004 年，Dai et al.以膠原蛋白製備具孔洞的支架，並於表面披覆 PCL 以減緩膠原蛋白的崩解，並增加材料的機械性質，以促進纖維母細胞的成長；2003 年 Chung et al.，將不同分子量的 PEG 混合接枝於 PU 材料表面，形成奈米表面後，光照接枝 RGD 於材料表面，藉此促進內皮細胞生長；2003 年 Thapa et al.研究，利用 NaOH 及 HNO<sub>3</sub> 對 PU 與 PLGA 材料表面進行化學處理，在利用矽膠為模具，拓印製備 PU(206.14nm)與 PLGA (368.82nm)奈米表面，可促進血管平滑肌細胞生長；由以上相關文獻可知，複材表面的孔洞、表面粗糙度能夠幫助細胞的貼附生長。

圖4-33、表4-9為PCL/CS複材於細胞密度 $10^5$ cells/well下之內皮細胞培養情況，放大倍率為100倍。由圖上可明顯的觀察出未經表面處理的複材，伴隨著幾丁聚醣微粒的添加，對於細胞密度會有降低的趨勢，研判為複材中三聚磷酸鈉造成細胞毒性或高濃度幾丁聚醣複材表面較不均勻所致，以上的原因將來有待進一步的探討。而酸洗過後的複材可明顯的觀察出，具有表面微孔洞的複材可幫助細胞的貼附生長，且伴隨著幾丁聚醣微粒濃度的提高，複材表面孔洞增多，細胞的

貼附情況也愈佳，改善了聚己內酯本身不易讓細胞貼附的性質。

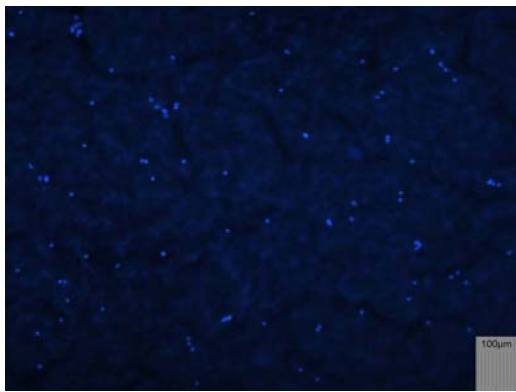
圖4-34、表4-9為PCL/CS複材於細胞密度 $1.5 \times 10^5$  cells/well下之內皮細胞培養情況，放大倍率為200倍。由圖上可觀察出未經表面處理的複材，細胞貼附的密度不大，且細胞間還會產生聚集的情況，此結果代表未經表面處理的複材不易讓細胞產生附著。而經過表面微孔洞處理後的薄膜複材則可有效的幫助細胞的貼附，讓細胞的貼附密度提高，也不會讓細胞間產生聚集，與細胞密度 $10^5$  cells/well下之內皮細胞培養情況有相同之結果。

表 4-9 複材酸洗前後之細胞生長密度

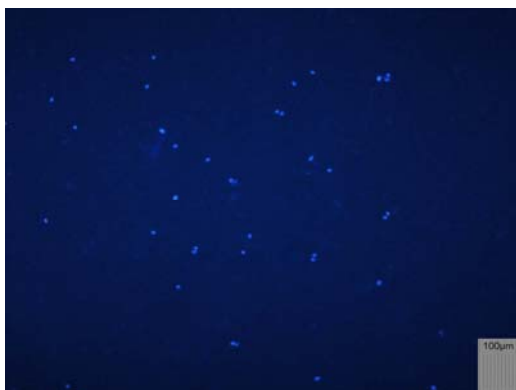
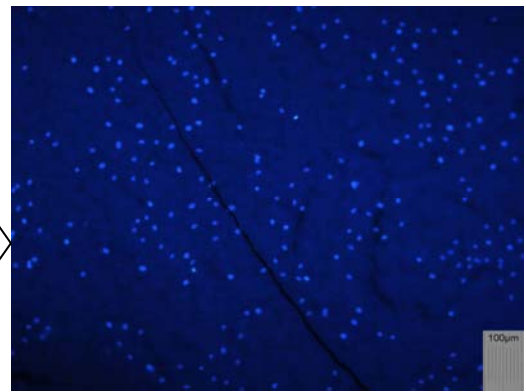
PCL/CS 細胞培養 密度	PCL	(90/10)		(80/20)		(70/30)	
		未酸洗	酸洗後	未酸洗	酸洗後	未酸洗	酸洗後
$10^5$ cells/well 培養 下細胞生長密度 (cells/mm <sup>2</sup> )	50±8	51±11	172±33	27±5	194±25	6±2	199±23
$1.5 \times 10^5$ cells/wel 培養下細胞生長 密度(cells/mm <sup>2</sup> )	203±47	83±21	363±66	76±23	402±78	73±11	169±39



PCL



酸洗後  
PCL/CS  
(90/10)



酸洗後  
PCL/CS  
(80/20)



酸洗後  
PCL/CS  
(70/30)

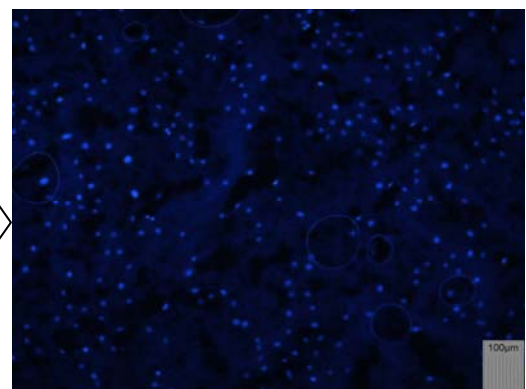


圖 4-33 PCL/CS 複材細胞培養後以螢光複式顯微鏡觀察  
(細胞密度： $10^5$  cells/well magnification：100X)

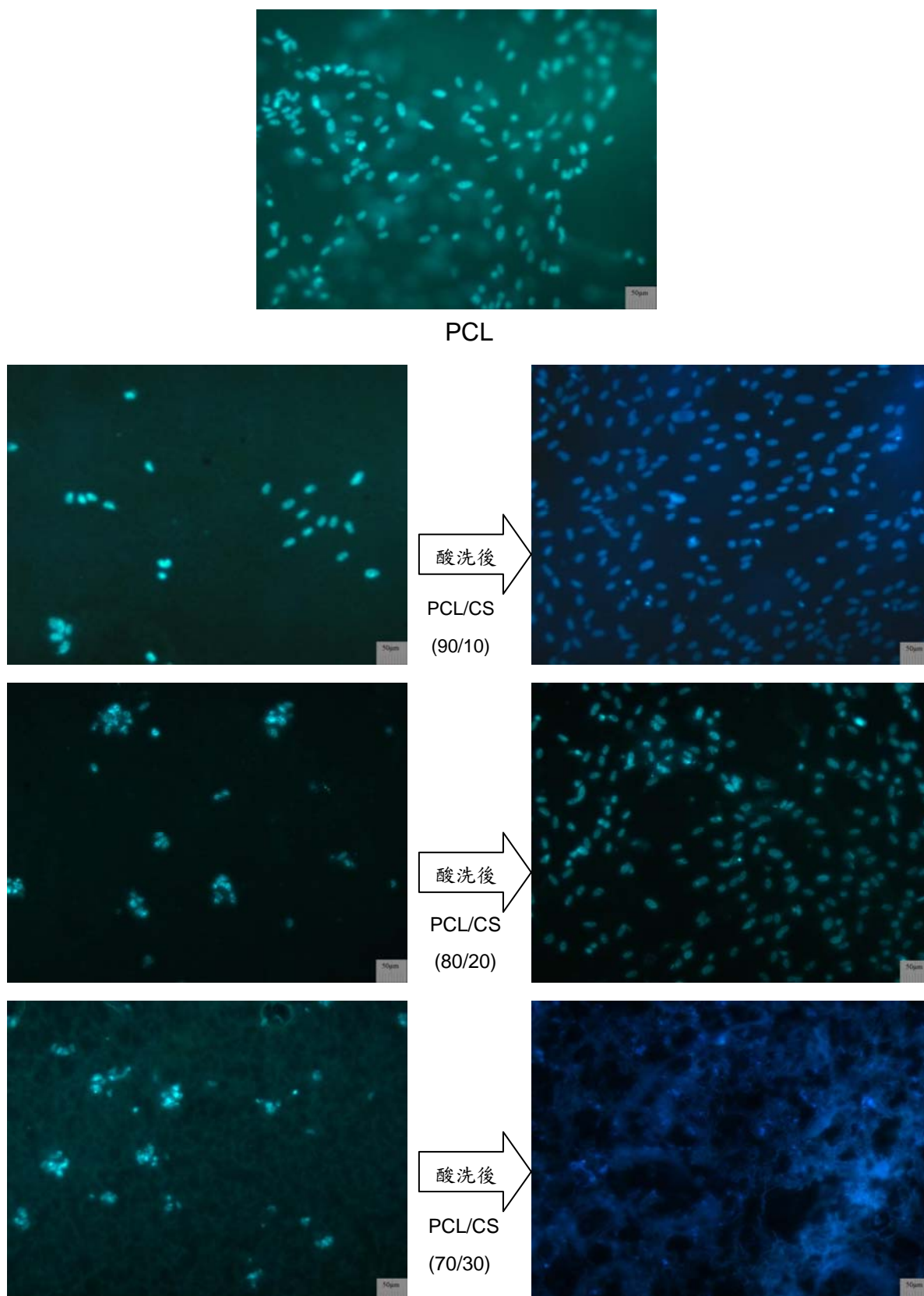
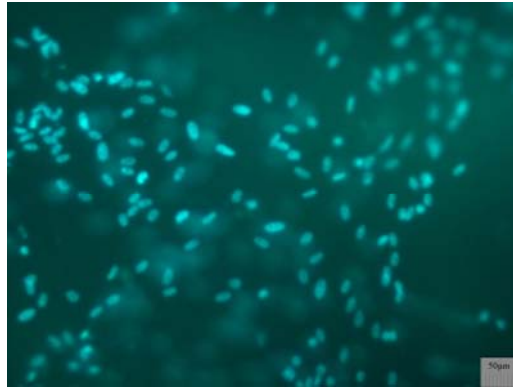
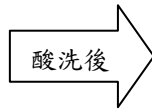
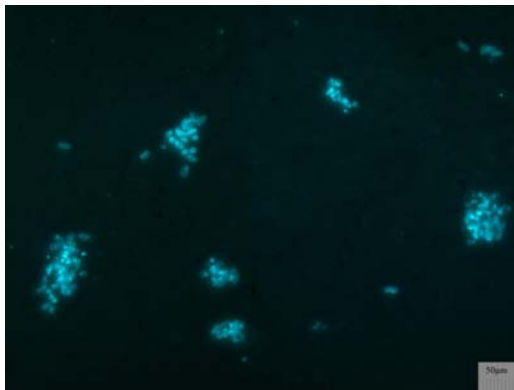


圖 4-34 PCL/CS 複材細胞培養後以螢光複式顯微鏡觀察  
 (細胞密度： $1.5 \times 10^5$  cells/well magnification：200X)

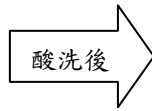
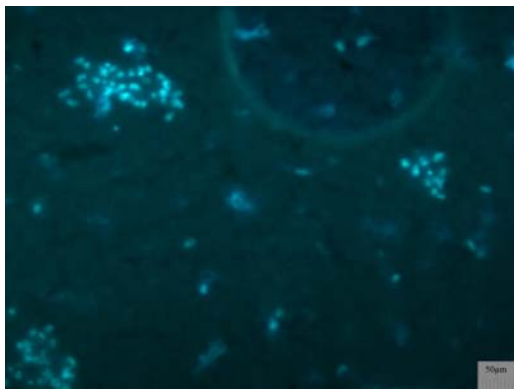
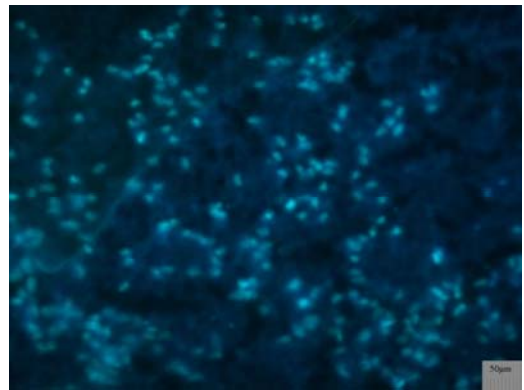
圖 4-35 為 PCL/PCLgAA/CS 複材於細胞密度  $1.5 \times 10^5$  cells/well 下之內皮細胞培養情況，放大倍率為 200 倍。由圖上同樣的可觀察出未經表面處理的複材，細胞貼附的密度不大，且細胞間還會產生聚集的情況，此結果代表未經表面處理的複材不易讓細胞產生附著。而經過表面微孔洞處理後的薄膜複材則可有效的幫助細胞的貼附，讓細胞的貼附密度提高，也不會讓細胞間產生聚集。但於 PCL/PCL-g-AA/CS (70/10/20)、PCL/PCL-g-AA/CS(55/15/30)的薄膜複材經表面處理後幫助細胞貼附的效果並不高，與圖 4-36 SEM 圖結果相互對照可看出，於這些濃度下酸洗過後會產生大於  $2\mu\text{m}$  的孔洞，研判由於細胞培養下的薄膜複材較薄，機械強度也較差，因此在製備孔洞薄膜複材的實驗過程中(於超音波洗淨器下中和表面酸性溶液)產生破裂而形成這些較大的孔洞。由文獻上提及<sup>[51]</sup>，細胞較不易於表面平坦的材料上生長，但當孔徑過大也會影響到細胞之貼附，由此研判，內皮細胞較不適於在  $2\mu\text{m}$  以上的表面孔洞產生附著。



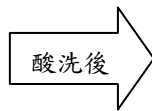
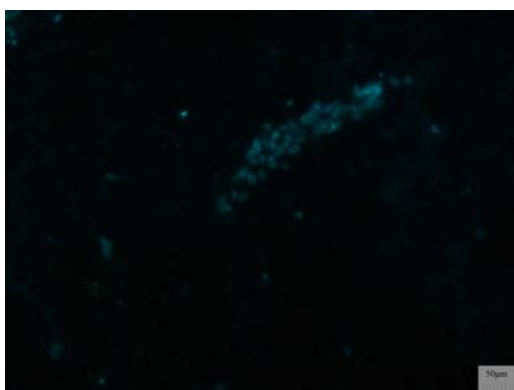
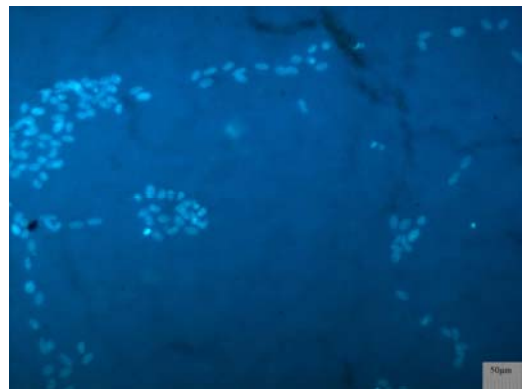
PCL



PCL/PCLgAA/CS  
(85/5/10)



PCL/PCLgAA/CS  
(70/10/20)



PCL/PCLgAA/CS  
(55/15/30)

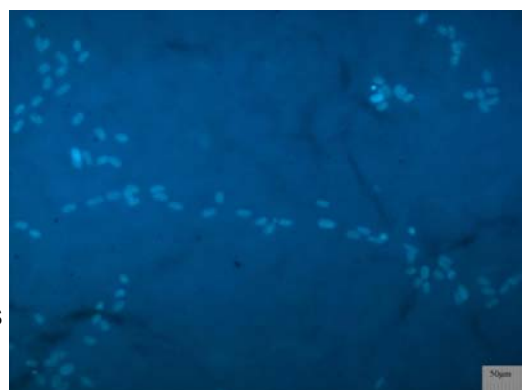
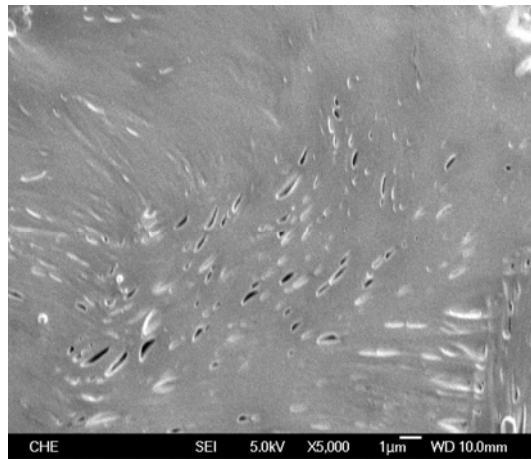
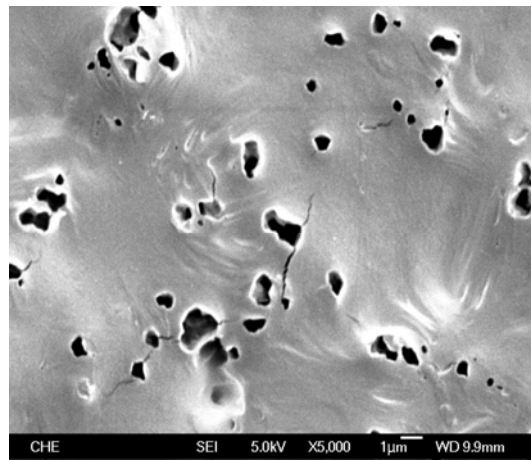


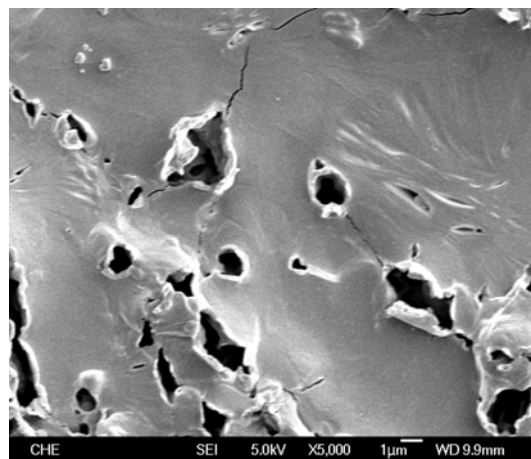
圖 4-35 PCL/PCL-g-AA/CS 複材細胞培養後以螢光複式顯微鏡觀察  
(細胞密度： $1.5 \times 10^5$  cells/well magnification：200X)



PCL/PCLgAA/CS (85/5/10)



PCL/PCLgAA/CS(70/10/20)



PCL/PCLgAA/CS (55/15/30)

圖 4-36 於細胞培養盤上酸洗後複材 SEM (magnification : 5000X)



## 伍、結論

本研究先利用離子凝膠法來製備幾丁聚醣奈米微粒，再利用溶劑法，分別以冰醋酸、THF 為溶劑將幾丁聚醣微粒與聚己內酯均勻混摻。此外，為了改進聚己內酯與幾丁聚醣間的相容性，本研究藉由添加 PCL-g-AA 改善複材間的相容性。將上述製程所製得的複材經由各種實驗分析檢測，來探討溶劑的選擇與 PCL、PCL-g-AA、CS 不同濃度下混摻後其物性、相容性、機械性質、分解速率、細胞貼附的情形。以下為本研究之實驗分析結果作一綜合性之整理。

### 微結構、物性分析：

1. DSC 數據觀察出複材總結晶度隨會 PCL 濃度減少降低，而 CS 的的添加則會促進 PCL 本身產生異相結晶，使得 PCL 結晶度的提升；添加 PCL-g-AA 的複材對其結晶度的影響更為顯著。
2. 從 FTIR 觀察得知 CS 與 PCL-g-AA 會產生分子間氫鍵及共價鍵結的作用，由此結果可知添加 PCL-g-AA 後的複材可增加 PCL 與 CS 間的相容性；而結晶特徵鋒則會隨著 PCL 濃度減少而減弱。
3. 由微結構的影像圖可觀察出 PCL 於複材中呈連續相，CS 則為非連續的微粒狀態；添加 PCL-g-AA 後的可讓複材間相容性較佳，讓 CS 以更均勻更小粒徑的狀態分散在 PCL 當中。
4. 由拉伸數據觀察，CS 的添加可使得拉伸模數上升，而添加

PCL-g-AA 的複材其延伸率與拉伸強度都會有所提升。比較以 THF 與醋酸為溶劑所製備出的複材，以 THF 為溶劑製備複材會有較佳的延展性質，其 PCL-g-AA 對於複材的改善效應也較為顯著。

#### 生物可分解性、細胞培養：

1. 添加 CS 可促進混摻薄膜在溶菌酶酵素中的分解，CS 濃度愈高，分解速率愈快。有添加 PCL-g-AA 的複材由於會與幾丁聚糖產生化學鏈結，使得複材的分解速率較慢。
2. 酸洗過後的複材會使複材表面造成孔洞，隨著 CS 濃度的提高複材表面的孔洞數越多也越大。
3. 具有微孔洞的複材能幫助內皮細胞之附著，且隨著孔洞數量增加其效應會有所提升；但內皮細胞不易於表面  $2\mu\text{m}$  以上的孔洞複材生長。

## 陸、未來研究方向

1. 本研究是以離子凝膠法來製備幾丁聚醣微粒，將幾丁聚醣以微粒的分散相狀態與聚己內酯來做混摻。之後的研究可探討將不同粒徑的幾丁聚醣與聚己內酯混摻，對於複材的微結構、物性、生物分解性、細胞貼附之影響。
2. 研究中選擇了 THF 與醋酸來作為聚己內酯與幾丁聚醣之混摻溶劑，未來可選擇不同溶劑來製備摻合薄膜，進而探討薄膜整體性能之影響。
3. 本研究只探討了內皮細胞對於複材表面的生長情況，之後可藉由不同時間培養下的細胞貼附情況、培養不同細胞和細胞活性測試來獲得更進一步的探討。
4. 未來可再研究聚己內酯與幾丁聚醣間的相容劑、改質聚己內酯或修飾幾丁聚醣，設法找到一最佳的加工方式讓混摻後複材的物性能更有所提升與改善。

## 柒、參考文獻

1. D.K. Han, K.D. Park, S.Y. Jeong, Y.H. Kim, U.Y. Kim, and B.G. Min, *In vivo* biostability and calcification-resistance of surface-modified PU-PEO-SO<sub>3</sub>., *J. Biomed. Mater. Res.*, 27, 1063-1073, 1993.
2. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003;24:2339-49.
3. 日本生物分解性塑膠實際應用研究委員會，新塑膠時代的來臨  
1995年10月
4. 化學工業日報，2001年2月19日。
5. Perrin D A. *Handbook of biodegradable plastic*. New York : Harwood Academic Publishers, 1997 : 326.
6. Ikada Y, Tsuji H. Biodegradable polyesters for medical and ecological application. *Macromolecular Rapid Communication*, 2000, 21(3) : 117-132.
7. Agrawal C M, Ray R B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001, 55(2) : 141-50.
8. Chin-San Wu. Performance of an Acrylic Acid Grafted Polycaprolactone/Starch Composite : Characterization and Mechanical Properties. *Journal of Applied Polymer Science* 2003 ; 89 : 2888-2895.
9. Yew GH, Mohd Yusof AM, Mohd Ishak ZA, Ishiaku US. Water absorption and enzymatic degradation of poly(lactic acid)/rice starch

- composites. *Polym. Degrad. Stab.* 2005 ; 90 : 488-500.
10. Rosa DS, Lopes DR, Calil MR. Thermal properties and enzymatic degradation of blends of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/with starches. *Polym. Testing* 2005 ; 24 : 756-761.
  11. Lanza RP, Langer R, Vancanti J, editors. Principles of tissue engineer-ing.2nd edition, Academic Press, 2000.
  12. Cai Q, Bei J, Wang S. Synthesis and degradation of a tri-component copolymer derived from glycolide, L-lactide and  $\epsilon$ -caprolactone. *J. Biomater. Sci. Polym Edn.* 2000 ; 11 : 273-288.
  13. Elzein T, Nasser-Eddine M, Delaite C, Bistac S, Dumas P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004 ; 273 : 381-387.
  14. Vink ETH, Rabago KR, Glassner DA, Gruber PR. Application of life cycle assessment to Nature Work<sup>TM</sup> polylactide (PLA) production. *Polymer Degradation and Stability* 2003 ; 80 : 403-419.
  15. Sarasam A, Madihally SV. Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2005 ; 26 : 5500-5508.
  16. F.H. Seyler. *Berichte der Deutschen Gesellschaft* 1984: 27 , 3329.
  17. P.Broussignac, *Chimie et Industrie-Genie Chimique* 1968 : 99,1241.
  18. Y. Araki , E. Ito, A pathway of chitosan formation in *Mucro rouxii*. Enzymatic deacetylation of chitin, *European Journal of Biochemistry* 1975 : 55,71.
  19. S.B. Rao and C. P. Sharma, Chitosan as a biomaterial. *Biomaterials Artificial Cells and Artificial Organs* 1990 : 18,1.

20. X. F. Liu, Y. L. Guan, D. Z. Yang, Z. Li, K.D.Yao, Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan, *Journal of applied polymer Science* 2001 : 79,1324.
21. Ander Begin, Marie-Rose Van Calsteren, Antimicrobial films produced from chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules* 1999 : 26 , 63.
22. Y. Shigemasa and S. Minami, Applications of chitin and chitosan for biomaterials, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1995 : 13,383.
23. T. Chandy and C. P. Sharma, Chitosan(as a biomaterial. *Biomaterials Artificial Cells and Artificial Organs* 1990 : 18, 1.
24. Bodmeier R., Chen H. G., Paeratakul O.. *Pham. Res. [J]* 1989,6(5) : 413-417.
25. Calvo, P., Remunan-Lopez, J. L., Vila-Jato, J. L. and Alonso, M. J. 1997.Novel hydrophilic chitosan and chitosan/polyethylene oxide nanoparticles as protein carrier. *J. Appl. Polym. Sci.* 63: 125-132.
26. K. A. Janes, M. J. Alonso, Depolymerized Chitosan Nanoparticles for Protein Delivery. *Journal of Applied polymer Science* 2003,Vol 88, 2769-2776.
27. Hong Zhang, Megan Oh, Christin Allen, and Eugenia Kumacheva, Monodisperse Chitosan Nanoparticle for Mucosal Drug Delivery. *Biomacromolecules* 2004, 5 : 2461-2468.
28. D.K. Han, K.D. Park, K.D. Ahn, S.Y. Jeong, and Y.H. Kim,Preparation and surface characterization of PEO-grafted andheparin-immobilized polyurethane., *Biomed. Mater. Res. :*

- Applied Biomedicals 1989 : 23(A1), 87-104.
29. A.M.A. Coombes , E. Verderio, B. Shaw, X. Li, M. Griffin, S. Downes. Biocomposites of non-crosslinked natural and synthetic polymer. *Biomaterials* 2002 : 23 , 2113-2118.
  30. E. Ural, K. Kesenci, L. Fambri, C. Migliaresi, E. Piskin, poly (D,Llactide/ $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatitecomposites. *Biomaterials*.2000;21:2147-2154.
  31. J. Hao, Y. Liu, S. Zhou, Z. Li, X. Deng. Investigation of nanocomposites basedon semi-interpenetrating network of [L-poly ( $\epsilon$ -caprolactone)] / [netpoly( $\epsilon$ -caprolactone)] and hydroxyapatite nanocrystals. *Biomaterials*,2003;24:1531-1539.
  32. C. Gao, Y. Zhu, J. Shen. Surface modification of polycaprolactone withpoly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility. *Biomaterials*.2002;23:4889-4895.
  33. S.H. Teoh, Z. Cheng. Surface modification of ultra thin poly ( $\epsilon$ -caprolactone)films using acrylic acid and collagen. *Biomaterials* 2004 ;25:1991-2001.
  34. N.T. Dai, M.R. Williamson, N. Khammo, E.F. Adams, A.G.A. Coombes. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprlactone for tissue engineering of skin. *Biomaterials* 2004:25:4263-4271.
  35. Mi F. L., S. S. Shyu, 1999, "Chitosan –polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. I. Effect of phosphorous polyelectrolyte complex and enzymatic hydrolysis of polymer.",*J. of Applied Polymer Sci.*, vol.

36. Unger, R.E., K. Peters, M. Wolf, A. Motta, C. Migliaresi and C.J. Kirkpatrick, Endothelialization of a non-woven silk fibroin net for use in tissue engineering: growth and gene regulation of human endothelial cells, *Biomaterials* 2004: 25, 5137-5146 ◦
37. Chung, T.W., D.Z. Liu, S.Y. Wang and S.S. Wang Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale, *Biomaterials* 2003, 24, 4655-4661 ◦
38. Chin-San Wu. A comparison of the structure, thermal properties, and biodegradability of polycaprolactone/chitosan and acrylic acid grafted polycaprolactone/chitosan. *Polymer* 2005 ; 46 : 147-155.
39. Chin-San Wu. Performance of an Acrylic Acid Grafted Polycaprolact-one/Starch Composite : Characterization and Mechanical Properties. *Journal of Applied Polymer Science* 2003 ; 89 : 2888-2895.
40. Sarasam A, Madihally SV. Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2005 ; 26 : 5500-5508.
41. Chen C, Dong L, Cheung MK. Preparation and characterization of biodegradable poly(L-lactide)/chitosan blends. *European Polymer Journal* 2005 ; 41 : 958-966.
42. Sarasam AR, Krishnaswamy RK, Madihally SV. Blending Chitosan with Polycaprolactone : Effects on Physicochemical and Antibacterial Properties. *Biomacromolecules* 2006 ; 7 : 1131-1138.
43. Senda T, He Y, Inoue Y. Biodegradable blends of poly( $\epsilon$ -caprolactone)



- with  $\alpha$ -chitin and chitosan : specific interactions, thermal properties and crystallization behavior. *Polym Int* 2001 ; 51 : 33-39.
44. M. Lampin, R. Warocquier-Clerout, C. Legris, M. Degrange, and M.F.Sigot-Luizard, Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration., *J. Biomed. Mater. Res.*, 36, 99-108, 1997.
  45. K. Kieswetter, Z. Schwartz, T.W. Hummert, D.L. Conchran, J.Simpson, D.D. Dean, and B.D. Boyan, Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast- like MG-63 cells., *J. Biomed. Mater. Res.*, 32, 55-63, 1996.
  46. M.D. Pierschbacher and E. Ruoslahti, Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule., *Nature*, 309, 30-33, 1984.
  47. K. Anselme, Osteoblast adhesion on biomaterials., *Biomaterials*, 21, 667-681, 2000.
  48. Y.S. Lin, S.S. Wang, T.W. Chung, Y.H. Wang, S.H. Chiou, J.J. Hsu, N.K. Chou, K.H. Hsieh, and S.H. Chu, Growth of endothelial cells on different concentrations of Gly-Arg-Gly-Asp photochemically grafted in polyethylene glycol modified polyurethane., *Artificial Organs*, 25(8) , 617-621, 2001.
  49. B.K. Mann, A.T. Tsai, T. Scott-Burden, and J.L. West, Modification of surfaces with cell adhesion peptides alters extracellular matrix deposition., *Biomaterials*, 20, 2281-2286, 1999.
  50. Chandra R, Rustgi R. Biodegradation of maleated linear low-density

polyethylene and starch blends. *Polymer Degradation and Stability*  
1997 ; 56 : 185-202.