

壹、緒論

1-1 研究背景與動機

近年來，生醫材料的發展，如：骨釘、可降解性手術縫線、人工皮等，對現今醫療有著相當的助益。當生醫材料直接植入體內或作為患部之敷料時，直接與細胞及組織接觸，必須考慮材料的生物相容性亦須具有生物可降解性。而以高分子材料為主之生醫材料，可以簡單分為(1)天然性高分子與(2)合成性高分子，其中天然性高分子，如：幾丁聚醣(Chitosan,CS)、明膠(Gelatin)等最常被應用於生醫材料；合成高分子因具有高強度及高韌性的特性，如：聚乳酸(PLA)、聚己內酯(PCL)，也常被使用作骨科及整形醫療上之支撐材。

幾丁質廣泛存在於昆蟲、蝦、蟹殼中，於自然界中含量僅次於纖維素，而幾丁聚醣為幾丁質去乙酰化後之產物。因為幾丁聚醣具有良好之生物相容性、生物可降解性、低細胞毒性且容易取得，為主要應用於生醫材料之天然高分子。現今有許多學者將幾丁聚醣奈米微粒作為一種藥物載體，並研究其包覆藥物之效率及在體內釋放速率，但微粒大小對藥物包覆與釋放效率有一定的影響。而目前包覆藥物之幾丁聚醣微粒研究可分成(1)皮下注射(2)口服，進行口服試驗時，因藥物被包覆於幾丁聚醣微粒中，進入胃部可避免被破壞，使得藥物可順利被運輸至腸胃道。而皮下注射必須控制微粒大小，因為微粒大小對藥物釋放速率的控制有著很大的影響。本研究利用不同分子量之幾丁聚醣所形成的微粒，先對其物性進行研究。進一步研究包覆效率及釋放速率。

1-2 研究方法與目的

本研究使用離子交聯法製備幾丁聚醣微粒。為了找出最小之幾丁聚醣交聯微粒，利用不同分子量之幾丁聚醣(CS)與三聚磷酸鈉(TPP)進行交聯反應，先改變實驗操作變因，如：溶液 pH 值、幾丁聚醣與三聚磷酸鈉比值，並找出最小交聯微粒之操作條件。為了得到更小分子量之幾丁聚醣，接著利用分餾方法，隨著分餾 pH 值區段的不同，不同分子量之幾丁聚醣因此析出。先對不同區段之幾丁聚醣物性作研究，進一步利用上述最小交聯微粒之條件，觀察各分餾 pH 值區段之幾丁聚醣所形成交聯微粒的變化。接著包覆牛血清蛋白後，改變實驗操作變因，如：幾丁聚醣溶液 pH 值、包覆蛋白濃度、幾丁聚醣分子量，研究各項變因與包覆效率的關係和釋放速率。

因為幾丁聚醣為一種生物相容性良好的材料且為長鏈狀高分子，被廣泛地應用在生醫材料中。當幾丁聚醣微粒被作為一種載體時，分子量大小會影響微粒大小，進一步進行藥物包覆時，如：胰島素(Insulin)、蛋白質(Protein)，亦會有影響。而目前幾丁聚醣微粒之研究指出，腸細胞 Caco-2 通道大小約為 200 nm，當微粒太大時，不利於細胞的吸收。在進行口服試驗時，微粒必須先通過胃部強酸的環境再進入腸道被吸收，且在通過的過程中，微粒會被破壞，而皮下注射可避免此問題，但微粒應用於皮下注射時，必須將微粒控制在小粒徑，而小粒徑微粒表面積比較大，不僅有利於血液運輸並可有效地控制藥物釋放速率。然而分子量會影響微粒大小，本研究利用不同分子量幾丁聚醣形成之交聯微粒來包覆牛血清蛋白，並研究微粒大小對包覆率及釋放速率之關係。

貳、文獻回顧

2-1 生物可降解性高分子簡介

生物可降解性高分子為在合適的自然環境中可被分解之高分子材料，而在分解過程中材料之物性逐漸變脆弱，使製品分成小碎片。而生物可降解性高分子通常具有下列特點：1.含有可水解之鍵結，如酯基、醯胺基等且不具苯環；2.親水性；3.低結晶性。而生物可降解性分子主要分為天然及化學合成兩大類高分子，天然之生物可降解性高分子如：膠原蛋白(collagen)、褐藻酸鈉(Alginate)、明膠 (gelatin)、幾丁質(chitin)、幾丁聚醣(chitosan)。天然性材料生物相容性佳且具有細胞識別訊號，有利於細胞吸附、增殖及分化，但缺點是材料機械強度較差且分解速率不易控制，通常作為添加劑來增加聚合物之可降解性及生物相容性。

2-1-1 生物可降解性高分子分類

生物可降解性高分子依不同取得來源可分為 1.天然高分子；2.化學合成高分子。因為天然高分子生物相容性佳、毒性低，有利於應用在生醫領域。而化學合成高分子其合成方式有縮合聚合及開環聚合，縮合聚合係指將不同官能基團的單體透過脫水酯化得到聚酯的過程，反應條件控制容易且生產成本較低；開環聚合主要用於交酯類與內酯類，產物之分子質量較高，如聚己內酯(PCL)、聚乳酸(PLA)。而化學合成高分子通常具有良好之機械強度及耐氣候條件，但缺點是生物適應性低且降解速率慢。

2-1-2 生物可降解性高分子之應用

傳統塑膠產品，因分解性低且對環境造成嚴重汙染，而近年來石油危機，使人們開始重視環保。生物可降解性高分子因其本身之可降解性，因此具有高附加價值且用途廣泛，其用途如下表

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、漁網、釣魚線
	土木建築用資材	隔熱材料、護土網、水土保持用布材
	野外休閒用品	高爾夫球用品、登山用品
使用後難以回收或再利用(堆肥處理最有效)	食品包裝用薄膜、容器	便當盒、速食店用容器
	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、農業等批覆材料
	保水性、吸水性	沙漠或荒地的育林用素材

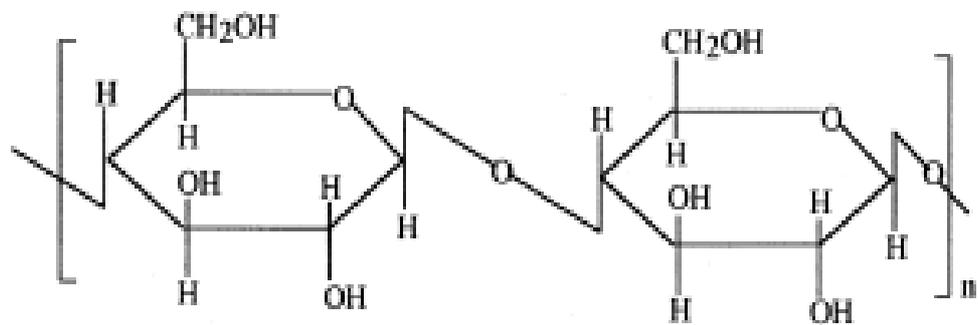
表 2-1 可降解性高分子應用範圍^[1]

2-2 幾丁質與幾丁聚醣

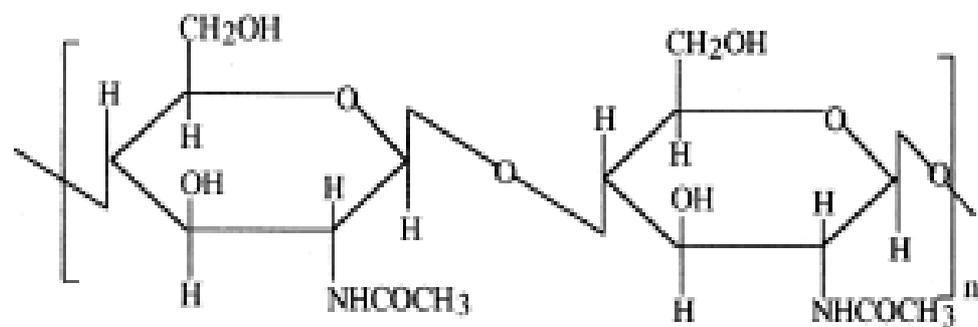
2-2-1 幾丁質與幾丁聚醣之簡介

幾丁聚醣為幾丁質部分去乙醯基後之產物，且幾丁質廣泛存在於自然界且含量僅次於纖維素。幾丁質 chitin 起源為希臘文的 chiton，原意為「外殼、信封」。1799 年英國人 Hachett 利用酸處理蝦、蟹外骨骼時，發現幾丁質，但當時並不知道此物質為何^[2]；1821 年 Odiler 利用氫氧化鈉處理昆蟲表面硬殼後亦發現類似物質，並將其物質命名「chitin」^[3]；1881 年法國植物學家 Braconnot 使用氫氧化鈉加熱處理洋菇時，發現一種不溶於水之物質，且將其命名 fungine；1859 年 Rouget 發現經過氫氧化鈉加熱處理後之幾丁質可溶於有機酸，而幾丁聚醣(chitosan)此名詞的出現則為 Hoppe-Seyler 於 1894 年命名。

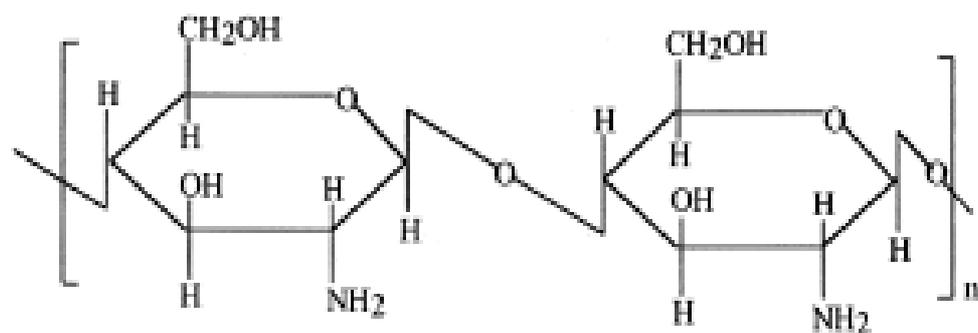
幾丁質為 2000~3000 個之 N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl glucosamine)及葡萄糖胺(glucosamine)經 β -1,4 糖苷鍵鍵結所形成之直鏈狀多醣類高分子聚合物 (biopolymer)，分子架構「(1,4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucose」，而幾丁質與纖維素兩者分子架構類似，但不同的地方為 C2 位置上之官能基。纖維素 C2 上所接為氫氧基(-OH, hydroxyl group)，幾丁質 C2 上所接為乙醯胺基(-NHCOCH₃, acetylamino group)，因為幾丁聚醣為幾丁質部分去乙醯基後之產物，幾丁質 C2 上之乙醯胺基被胺基(-NH₂, amino group)所取代，三者架構如圖 2-1 所示。



Cellulose



Chitin



Chitosan

圖 2-1 纖維素、幾丁質及幾丁聚醣之結構^[4]

2-2-2 幾丁質與幾丁聚醣之晶型種類與特性

晶型種類

幾丁質依照不同晶型可分為 α 、 β 、 γ 三種^[5]。 α 晶型為斜方晶型，兩股雙螺旋以反向平行的方式排列，因此結構緊密且質地堅硬，而自然界所存在之幾丁質大多為此晶型； β 晶型為單斜晶型，兩股雙螺旋以平行方式排列，結構鬆散且容易被分解； γ 晶型則為 α 與 β 兩晶型之混合體。幾丁聚醣之晶型則類似於 α 晶型。

特性

1. 無毒性：且有良好之生物相容性，進入人體後幾乎不會有排斥作用發生。
2. 性質穩定：由於幾丁質晶型多數為 α 晶型，而 α 晶型可在高溫的鹼性環境中維持穩定的晶型結構。
3. 抗菌性^[6,7]：幾丁聚醣之胺基溶於弱酸環境中會形成 $(-\text{NH}_3^+)$ ，而細菌及病毒細胞膜表面帶有 (COOH) ，因為正負電荷之螯合作用可干擾細胞膜的功能，增加細胞膜之通透性使得細胞質流出，因此干擾細菌的生長。
4. 生醫性質：因為幾丁聚醣擁有良好的生物相容性，而幾丁聚醣更為自然界中少數帶正電可溶性高分子，因此幾丁聚醣不僅擁有抗菌性，且於凝血機制中不會影響內在凝血途徑，進一步更能促使血小板之聚集來加速傷口的癒合。
5. 溶劑性質：同時具有疏水基 $(-\text{COCH}_3 \text{ group})$ 及親水基 $(-\text{NH}_3^+$ 、 $-\text{OH})$ ，可作為乳化劑使用，幾丁質通常溶於強酸且溶解度隨著去乙酰基的程度增加，而幾丁聚醣使用弱酸即可溶解。

2-2-3 幾丁質與幾丁聚醣之製備

2-2-3.1 幾丁質之製備

幾丁質為一種生物可分解性高分子，廣泛存在於蝦、蟹、甲殼類動物身上，且含量僅次於纖維素。而蝦、蟹外殼組成為幾丁質、蛋白質、碳酸鈣，如圖 2-2 所示，但幾丁質取得必須去除甲殼內蛋白質與碳酸鈣。蛋白質的去除最常使用方法是利用氫氧化鈉溶液處理，但蛋白質去除效果受到溶液濃度、處理時間及處理溫度的影響；碳酸鈣的去除通常使用鹽酸，因強酸與碳酸根的反應產生二氧化碳藉此去除，而用強酸會導致幾丁聚醣分子間鍵的斷裂及去乙酰作用，但強酸濃度太高或處理時間過長甚至會導致幾丁聚醣降解，強酸濃度太低則又不易去除礦物質。近年來有學者改用醋酸、亞硫酸來去除蛋白質。

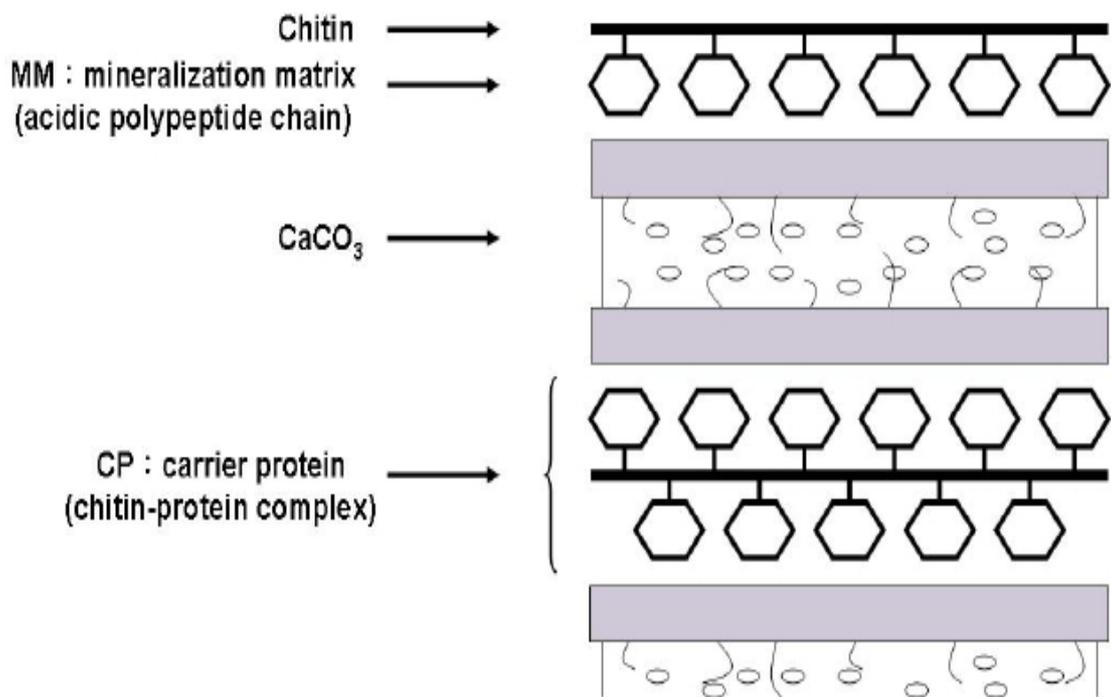


圖 2-2 動物外殼結構模型^[8,9]

2-2-3.2 幾丁聚醣之製備

幾丁聚醣為幾丁質部分去乙醯基之產物，而去乙醯基的方法分為下列二種：

1. 化學法：

通常利用氫氧化鈉溶液於高溫環境下進行幾丁質之去乙醯反應，而幾丁質之去乙醯程度主要與氫氧化鈉濃度，反應時間長短，反應溫度有關，而下表為去乙醯程度與濃度及反應時間關係。

Degree of deacetylation (DD)(%)	Treatment conditions needed
30-40	30%NaOH, 6-8hr
	40%NaOH, 0.5hr
40-50	40%NaOH, 1.0hr
60-70	50%NaOH, 0.5hr
70-75	40%NaOH, 2.5hr
	50%NaOH, 1.0hr
	60%NaOH, 0.5hr
75-80	40%NaOH, 4.0hr
	60%NaOH, 1.0hr
80-85	40%NaOH, 6.0hr
	50%NaOH, 4.0hr
	60%NaOH, 2.5hr
85-90	50%NaOH, 8.0hr
	60%NaOH, 4.0hr

表 2-2 不同去乙醯程度幾丁聚醣之製備條件^[10]

2. 生化法：

利用化學法可控制去乙醯程度，但缺點就是會有許多廢液產生且分子間鍵結容易斷裂，而使用生化法則利用能對幾丁質具有反應之酵素來達到去乙醯的目的，但此方法之去乙醯程度約為 50%且作用時間較長。

2-2-4 幾丁聚醣之降解

因為幾丁聚醣為一種天然性高分子，生物相容性又高，因此應用範圍相當廣泛，但高分子量之幾丁聚醣溶解度低，僅能溶於有機酸中；另一方面高分子量幾丁聚醣完全溶解後，黏度很高，於食品應用方面因此受到限制。目前重要目標是製備低分子量且溶解度佳之幾丁聚醣，而製備低分子量幾丁聚醣有下列幾種方法

1. 酵素法：

利用酵素對幾丁質或幾丁聚醣的專一性來降解幾丁聚醣，而酵素法具有反應條件溫和、專一性高與過程簡單等優點，但酵素昂貴，並不經濟。

2. 酸水解法：

利用鹽酸、硝酸、磷酸等無機酸或甲酸、乙酸及乳酸等有機酸來打斷幾丁聚醣間之糖苷鍵使得分子量變小，而水解時間則取決酸的濃度高低。高濃度酸水解作用佳因此水解時間短且水解後之幾丁質與幾丁聚醣為單醣，但弱酸水解所需時間拉長，所得之產物多為多醣聚合物^[11]。因為酸水解成本較低，因此工業上生產以此方法為主，但酸性廢液具有腐蝕性並對環境造成污染，且原料前處理、酸液濃度及種類、反應時間、反應溫度皆會影響產率。

3. 氧化還原法：

通常利用過氧化氫^[12]及次氯酸鈉，然而過氧化氫反應作用快且操作成本低因此常被利用，但是所得之幾丁聚醣分子量分佈較寬。

4. 超音波降解法^[13]：

利用超音波破壞幾丁聚醣之結晶結構，產生不同分子量之幾丁聚醣，而降解程度隨著超音波處理時間變長而增加。

2-3 奈米藥物載體及釋放

2-3-1 奈米藥物載體及釋放

近年來藥物載體的發展可分為藥物投遞目標與傳送途徑，表二為藥物傳輸技術之主要用途。因為奈米藥物投遞系統可改變人體中藥物的分佈且達到高度靶向、可控制釋放、提高難溶藥物之溶解與吸收率。而藥物經由不同載體攜帶後，於體內的吸收、分佈、吸收與藥物本身性質有關之外，同時也受到藥物載體的影響。當奈米大小的藥物載體進行靜脈注射時，進入具有網狀內皮系統的器官，如：肝臟、脾臟、骨髓，當粒徑大小為 100~200 nm 時，載體不易被網狀內皮系統吸收，也不易穿過內皮細胞擴散至周圍組織，可延長藥物載體在循環系統中的循環時間，使藥物有足夠的時間延長釋放作用且可以維持有效之藥物濃度^[14]。

2-3-1.1 奈米藥物載體之材料

使用於藥物輸遞系統中之奈米級藥物載體需要考慮其生物相容性及生物可降解性，目前材料以 poly(D, L-lactide)、poly(lactic acid)、poly(glycolide)、poly(lactide-co-glycolide)、與 poly(cyanoacrylate) 為主，另外像明膠(gelation)、幾丁聚醣(chitosan)、褐藻酸鈉(sodium alginate)其他擁有親水性之聚合物也常用作為奈米級藥物載體之材料。

藥物傳遞系統	主要用途
微脂粒	<ul style="list-style-type: none"> ◎被動性腫瘤標的投藥 ◎疫苗佐藥 ◎基因治療時被動性標的肺部內皮 ◎標的局部淋巴結 ◎標的不同器官/病變部分之細胞表面的抗原 ◎注射部位儲藥系統
奈米級顆粒	<ul style="list-style-type: none"> ◎被動性腫瘤標的投藥 ◎藥物持續釋放系統 ◎疫苗佐藥
微米級顆粒	<ul style="list-style-type: none"> ◎注射部位儲藥系統 ◎藥物持續釋放系統 ◎疫苗佐藥
環糊精	<ul style="list-style-type: none"> ◎脂溶性藥物的注射溶解劑
乳劑	<ul style="list-style-type: none"> ◎脂溶性藥物的給藥載體 ◎以細胞表面抗原為標的
聚合物-藥物結合	<ul style="list-style-type: none"> ◎被動性腫瘤標的投藥
植入系統	<ul style="list-style-type: none"> ◎治療感染症及癌症的局部儲藥系統 ◎全身性治療用藥物持續釋放系統
無針式注射	<ul style="list-style-type: none"> ◎減低注射時疼痛 ◎增加皮膚間疫苗的生體可用率

表 2-3 現代藥物輸遞技術之主要用途^[15]

2-3-1.2 奈米藥物載體之製備

藥物載體之製備主要可分成功能性聚合與單體聚合，有許多方法使用 PLA、PGA、PLGA、PCL 功能性聚合物來製備奈米藥物載體，而常用製備方法有下列幾種：

1. 聚合法

聚氰基丙烯酸酯(PACA, poly(alkylcyanoacrylate))為生物可降解性材料，於生醫工程可作為手術黏膠，而製藥工業中也廣泛應用於奈米級聚合物基材。

2. 自發性乳化/溶劑擴散法

由溶劑揮發法所修改之製造方法，將丙酮及甲醇等水溶性溶劑與氯仿或二氯甲烷非水溶性溶劑混合後，此時非水溶性溶劑為油相，而水溶性溶劑會自發性地擴散製水中，此時在兩相之間形成紊流導致小顆粒的產生，當水溶性溶劑濃度增加時，顆粒尺寸有降低的作用^[16]。

3. 鹽析/乳化擴散法

因自發性乳化/溶劑擴散法須使用有機溶劑，對環境造成危害，所以有使用上的限制^[17]。為了避免有機溶劑的殘留，因此研發出鹽析技術及乳化溶劑擴散技術兩種製備奈米級顆粒的技術。

4. 溶劑揮發法

先將聚合物溶於二氯甲烷或乙酸乙酯等有機溶劑，再將藥物溶解分散於此溶液中，接著利用介面活性劑將油相混合物乳化形成水中油滴(O/W)型乳劑。乳劑穩定後，利用加溫及連續攪拌使溶劑揮發後即

得負載藥物之奈米級顆粒。O/W 型乳劑可製備裝載脂溶性藥物之奈米級顆粒；W/O/W 型乳劑可製備裝載水溶性藥物之奈米級顆粒。

5. 親水性高分子製備奈米級顆粒

利用聚乙烯醇(PVA, poly(vinyl alcohol))等多元醇聚合物作為核心，接枝上寡聚生物可降解性酯製備出水溶性聚酯。因為這類聚合物擁有自發性自行組裝能力，所以可輕易製備出奈米級顆粒，而這類聚合物的優點是不需使用溶劑及介面活性劑。

2-3-2 藥物釋放

藥物釋放技術約在 1960 年開始被重視，而多年的研究重點是將常用之藥物於適當的時間以適當的量有效地作用在目標上，不會在輸送的過程中，造成不必要之支外效應^[18]。然而大多數藥劑常因人體代謝速度快，作用僅侷限於很短之時間內，但過多之藥劑量對人體又會造成損害，而藥物釋放的控制可解決此一問題^[19]。

目前載體藥物之釋放受到重視，而藥物釋放模式大致可分成持續釋放、持續性作用、延長作用、長時間作用及延遲釋放，而改良劑型分為下列 3 種：

1. 延長釋放劑型

為一種當與藥物存在於立即釋放性比較，可減少給藥次數 2 倍之劑型，包括控釋型及持續性藥物產品。

2. 延遲釋放劑型

為一種給藥後部分可能迅速釋放，但部分則是多次不連續地釋放藥物，腸溶衣劑型為最常見延遲釋放劑型

3. 靶向型劑型

為一種恰在接近相作用的生理部位釋放藥物劑型，此劑型可兼具立即釋放或延長釋放之特性。

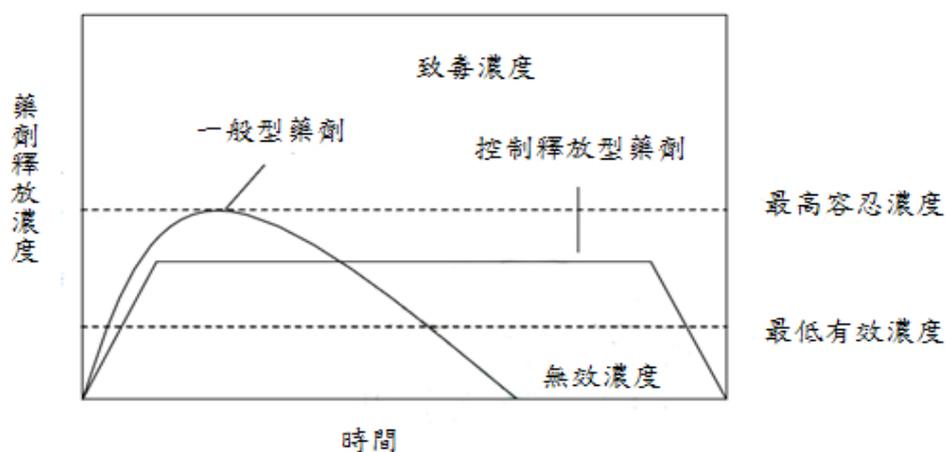
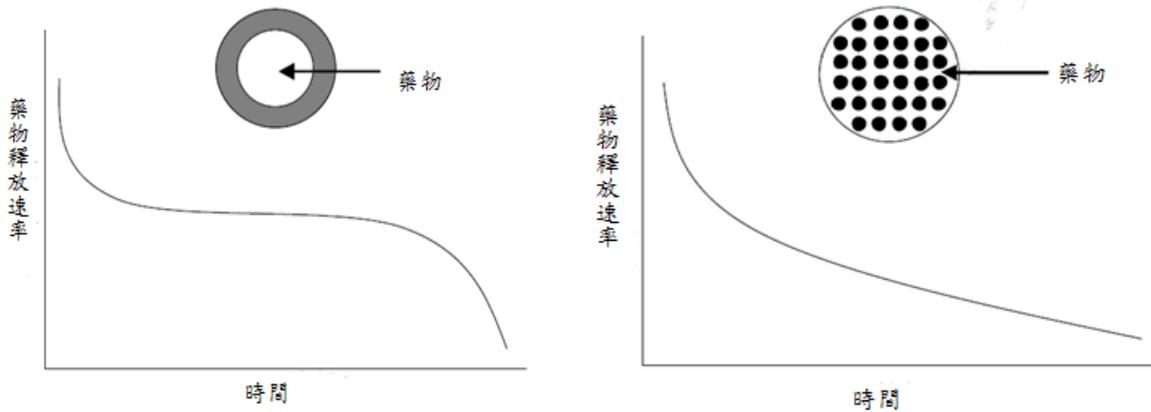


圖 2-3 藥物釋放濃度與時間關係^[20,21]

2-3-2.1 藥物釋放模式

一般藥物釋放模式如圖 2-3 所示，若藥劑釋放模式不同一般可分為溶蝕式及擴散式，兩者釋放模式也不同，而大致上可分為以高分子材料將藥物包覆於核或殼之結構中稱為核殼式；藥物均勻分散於高分子材料中稱為均勻分散，下列圖 2-4 為核殼式及均勻分散藥物包覆示意圖。因為核殼式通常將藥物包覆於高分子材料中，此藥物釋放速率為一常數且可靠改變實驗操作變因控制藥物釋放速率；均勻分散式則直接與高分子材料接觸，釋藥速率及濃度並不好控制。

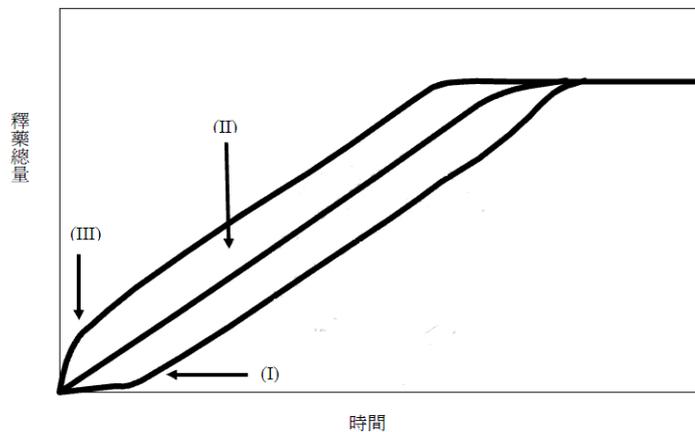


(a)核殼式

(b)均勻分散式

圖 2-4 藥物包覆模式

微膠囊釋放模式通常為零階釋放動力模式，通常有三個階段如圖 2-5 所示。I 階段稱為時間延遲^[22]，此階段因溶液仍未進到微膠囊中，釋藥速率隨時間變快，但達到平衡後，釋藥速率會達到平衡，如 II 階段所示。因藥物釋放速率已穩定，此時藥物穩定地釋放並直至微膠囊內外濃度平衡，如 III 階段。此三階段中只有 II 階段為零階釋放模式，也被廣為研究，因 II 階段藥物釋放速率與時間成正比，當此直線涵蓋的時間越長，表示藥物釋放可穩定且持久地釋放，藥效也越好。



(I) 時間延遲效應(II)標準零階釋放(III)突釋效應

圖 2-5 藥物釋放模式

2-3-2.2 藥物釋放動力學

以球型微囊為例，主要釋放動力學可分為(1)一階溶出模式(2)零階溶出模式(3)Higuchi 間質化溶出，下列則為三種釋放動力學介紹：

1. 一階藥物釋放模式^[23]

當微膠囊與溶解介質之接觸面積不變，下式可成立

$$\frac{dC}{dt} = K_1(C_s - C) \quad (1)$$

C 為溶解介質之藥物濃度，C_s 為藥物在溶解介質中之平衡濃度，

K₁ 為一階速率常數，根據 Fick's law

$$K_1 = \frac{DA}{Vl} \quad (2)$$

D 為擴散係數，A 為藥物與溶解介質接觸之表面積，V 為溶解介質之體積，l 為微膠囊之膜厚，由(1)式乘 V 可得

$$\frac{dW}{dt} = K_1(VC_s - W) \quad (3)$$

W 為時間 t 時，溶解介質中之藥物總量(即藥物溶出量)

$$\log(VC_s - W) = \log VC_s - \frac{K_1}{2.303} t \quad (4)$$

因 VC_s 為達到飽和時溶解介質中藥物之總量(亦即原來微膠囊內之藥物含量 Q₀)，而 VC_s-W 則為經過時間 t 仍殘留於微膠囊內之藥量 Q_t，故式中可寫成

$$\log \frac{Q_0}{Q_t} = -\frac{K_1}{2.303} t \quad (5)$$

由藥物殘留量百分率之對數圖與時間作圖，可得 K₁ 速率常數

2. 零階藥物釋放模式^[24]

因微膠囊為圓球形，其擴散方式主要依據 Fick's law，而微膠囊內藥物之滲透速率為

$$\frac{dQ}{dT} = DA \frac{\Delta C}{l} \quad (6)$$

其中， Q 為藥物溶出量， ΔC 為微膠囊內部(C_2)與外部(C_1)之藥物濃度差， l 為微膠囊之壁膜厚度， A 為微膠囊之表面積， D 為視擴散係數。若 $C_2 \gg C_1$ ，則 ΔC 可視為常數，則可寫成

$$Q = K_o t \quad (7)$$

其中， $K_o = DaA\Delta C/l$ 稱為零階速率常數。亦即微膠囊內藥物之溶出量為定值，不因時間而改變。

3. Higuchi 間質化溶出模式^[25]

Higuchi 於 1963 年提出了平面間質化粒子模式及圓球間質化粒子模式，此模式中模物質是從均態且非水溶性的母質中經擴散方式而溶出，由擴散的快慢來決定其釋放速率：

$$Q = [\epsilon \tau D_s (2C_o - \epsilon C_s) C_s t]^{1/2} \quad (8)$$

Q ：在時間 t 時，單位表面積所釋出之藥物總量

D_s ：藥物在溶解介質中的擴散係數

ϵ ：母質粒子的孔隙度 (porosity)

τ ：母質粒子的扭曲度 (tortuosity)

C_o ：在時間 $t=0$ 時，未釋出之藥物初始濃度

C_s ：藥物在溶解介質中的平衡濃度 (溶解度)

由方程式 (8) 可簡化成：

$$R = K_h t^{1/2} \quad (9)$$

K_h ：Higuchi 速率常數

所以若藥物釋出百分比對時間之平方根作圖成一直線，則等合 Higuchi 母質動力學模式。

2-4 幾丁聚醣奈米微粒之製備

因為幾丁聚醣為可帶正電之天然性高分子，具有低細胞毒性、生物可降解性、良好的生物相容性，且幾丁聚醣所具有之胺基有助於化學修飾反應，所以常作為藥物傳遞、人工皮膚、骨骼修護等生醫材料。

當幾丁聚醣微粒包覆藥物後進行口服試驗時，在小腸會被吸收。小腸黏膜具有絨毛，而絨毛表面具有上皮細胞。而分子被吸收的途徑分成：1.擴散並穿過細胞膜；2.擴散並通過細胞間隙；3.透過載體傳遞^[26]。因為幾丁聚醣為親水性高分子，細胞膜通常都由雙層磷脂質所組成，親水性分子無法直接穿過細胞膜須藉由 paracellular pathway，而 paracellular pathway 由細胞間隙之緊密接合(tight junction)來限制並選擇通過的物質。

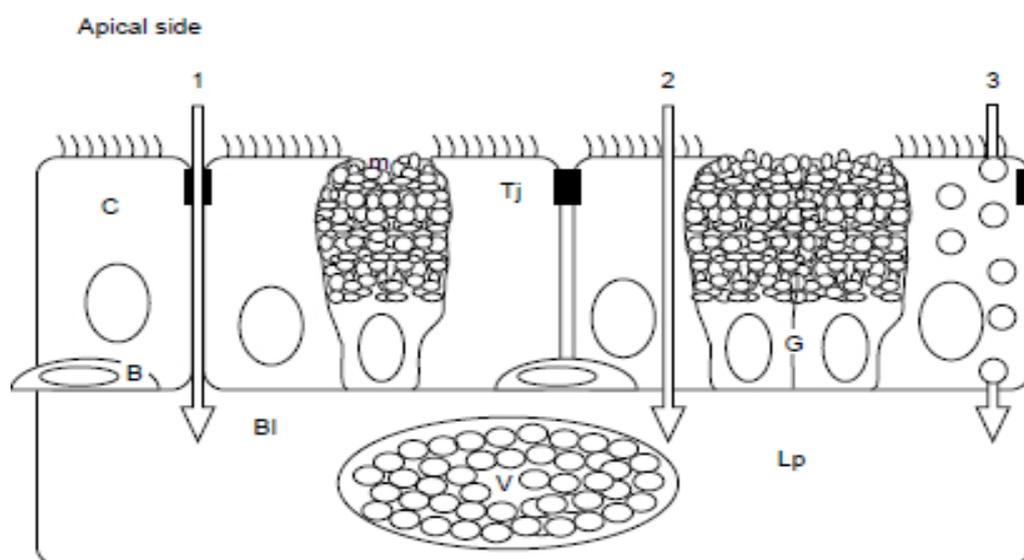


圖 2-6 鼻黏膜傳送示意圖^[27]

(1)穿透細胞間隙；(2)進入細胞；(3)細胞滲透作用；(G)杯狀細胞
(C)纖毛柱狀細胞；(Tj)細胞間隙；(B)基底細胞；(B1)基底層；(Lp)固有層

當微粒從微米級變成奈米級後，表面積不但增大，更有不同的材料性質出現，奈米級幾丁聚醣微粒明顯提升生物吸收性。製備幾丁聚醣微粒可分為物理法及化學法，物理方法為研磨粉碎與噴霧乾燥，但物理方法製備出的幾丁聚醣微粒粒徑分佈範圍大且微粒不易達到奈米級，製備出的微粒單純只靠吸附作用來攜帶藥物。化學法為溶膠凝膠與微乳化，化學法製備出的微粒可將藥物包覆或吸附於微粒中。下列幾種為常用製備幾丁聚醣微粒的方法：

1. 沉澱法

因幾丁聚醣之 pKa 為 6.5，當溶液 pH 值大於 6.5 時幾丁聚醣隨即析出。而沉澱法則利用幾丁聚醣此特性，透過壓縮空氣將幾丁聚醣溶液噴出針頭並滴入氫氧化鈉溶液中。在鹼液中形成之顆粒則利用離心或過濾收集，再經由去離子水清洗即為幾丁聚醣微粒，但此法微粒大小則由空氣壓力及針頭大小所控制。為了將幾丁聚醣微粒大小控制至均一，可在攪拌條件下逐漸加入硫酸鈉溶液於含表面活性劑之幾丁聚醣溶液中，利用硫酸鈉的去溶劑化作用使微粒析出，再經過超音波處理可得到較均一的粒徑。沉澱法製備出之幾丁聚醣微粒粒徑、表面狀態是可掌握的，但該法製備條件嚴苛，必須存在乳化劑、有機溶劑、和超音波震盪條件下才可進行，另外此法製備出幾丁聚醣微粒交聯度不大。

2. 噴霧乾燥法^[28]

利用高溫的氣流，將藥液霧化成微細的液滴進行瞬間乾燥，此法自 19 世紀發明以來，已廣泛使用於食品、藥品、化工原料等粉末的生產。利用此方法製備幾丁聚醣奈米微粒則將藥物溶入加有交聯劑之

幾丁聚醣溶液，接著通過噴霧乾燥機，再經過有機溶劑的清洗、離心純化即得微粒。噴霧乾燥法為目前最常見之製藥方法，但其方法對設備要求高，且微粒交聯度也不大。

3. 乳化交聯法

利用幾丁聚醣分子鏈上之胺基或羥基能與某些化學交聯劑反應的特性來製備包覆藥物之幾丁聚醣顆粒。此法先製備出穩定 W/O 型幾丁聚醣微乳液，於高速攪拌條件下加入交聯劑，經過清洗與分離步驟後即可得幾丁聚醣顆粒。此製備方法粒徑大小受幾丁聚醣去乙醯程度影響，去乙醯程度越高形成之顆粒越小。

4. 離子交聯法

此法利用幾丁聚醣之胺基於酸性環境下帶正電，易與帶負電之物質進行離子交聯反應而產生奈米顆粒，目前最常使用為三聚磷酸鈉 (TPP, tripolyphosphate)。圖 2-6 為幾丁聚醣與三聚磷酸鈉反應機制圖。此法優點有下列幾項：

1. 反應所需之條件溫和、簡單且不會使用到具有毒性之化學交聯劑
2. 藉由改變操作變因，可製備所需之粒徑大小。製備出之微粒大小範圍 100~1000 nm 與表面電位帶正電之微粒。
3. 對蛋白質、疫苗、質體、DNA 等物質包覆率極佳。
4. 製備出微粒經冷凍乾燥後，仍可維持包覆藥物之活性與顆粒的完整性。

因為此法係利用離子間作用形成微粒，受到(1)幾丁聚醣與三聚磷酸鈉之正負電荷比例、(2)溶液 pH 值、(3)幾丁聚醣分子量、(4)去乙醯度等條件影響，圖 2-8 為幾丁聚醣與三聚磷酸鈉在不同 pH 值下鍵

結情形。目前許多幾丁聚醣微粒的研究都是利用離子交聯法並研究實驗操作變因對幾丁聚醣微粒關係。

1997 年 Calvo^[29]等學者對離子交聯法進行改進，研究中利用三聚磷酸鈉之陰電荷與聚氧乙烯-聚氧丙烯的嵌段共聚物交聯製備出幾丁聚醣微粒，而該微粒可藉由改變成分比例使微粒尺寸達 200~1000 nm 之間，及 Zeta 電位介於 20 mV~60 mV。而該學者亦有研究，增加三聚磷酸鈉之含量會使微粒粒徑變大且 DNA 包覆率有上升之趨勢，但 Zeta 電位變小。

1999 年 Fernandez-Urrusuno^[30]等學者將幾丁聚醣與三聚磷酸鈉比值固定為 6:1 製備幾丁聚醣微粒，所得粒徑介於 300~400nm，而 Zeta 電位介於+25~45mV。

2001 年 Janes^[31]等學者指出幾丁聚醣微粒粒徑會隨著幾丁聚醣分子量增加而變大，而分子量大於 20KDa 時，分子量的影響較不顯著。

2003 年 Xu 和 Du^[32]以穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察幾丁聚醣與三聚磷酸鈉之交聯微粒，微粒粒徑為 20~200nm，另外以傅立葉轉換紅外光譜(FTIR)分析交聯微粒，證實幾丁聚醣之胺基與三聚磷酸鈉確實有反應。

2004 年 Zhang^[33]等學者提出去乙醯程度越高之幾丁聚醣可製備較小的幾丁聚醣微粒，且微粒大小分佈較均一，另外本篇研究亦指出幾丁聚醣微粒粒徑會受 pH 值影響，該研究結果在 pH=3 有最小粒徑，

當 pH 小於或大於此 pH 值，微粒粒徑皆會增加。

本研究以三聚磷酸鈉作為幾丁聚醣之交聯劑，而作用機制如圖 2-6 所示，三聚磷酸鈉溶於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鍵結而形成幾丁聚醣微粒，圖 2-7 為交聯微粒示意圖。

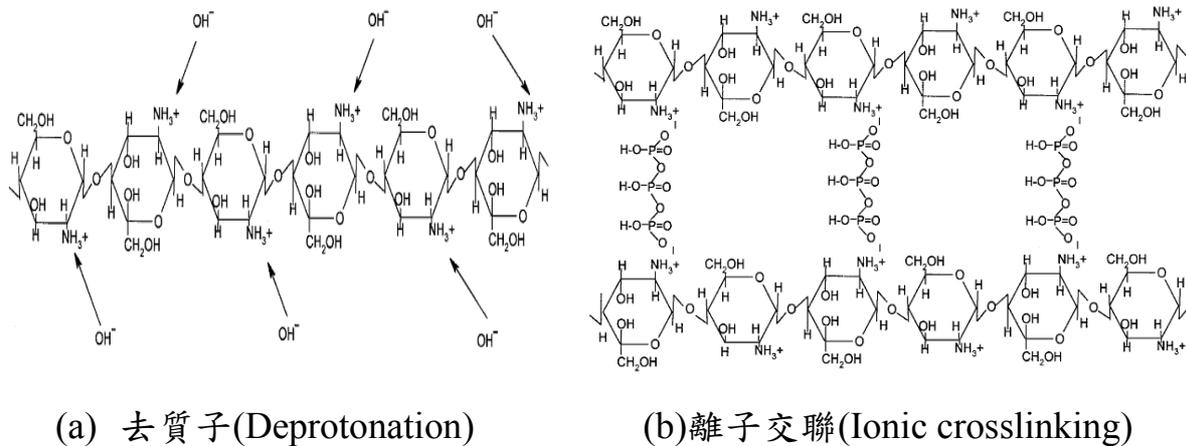


圖 2-7 幾丁聚醣與三聚磷酸鈉反應機制^[34]

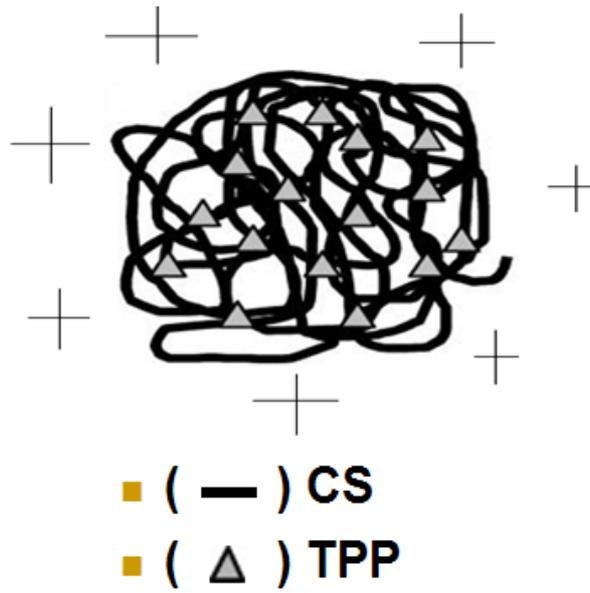


圖 2-8 幾丁聚醣與三聚磷酸鈉交聯微粒示意圖

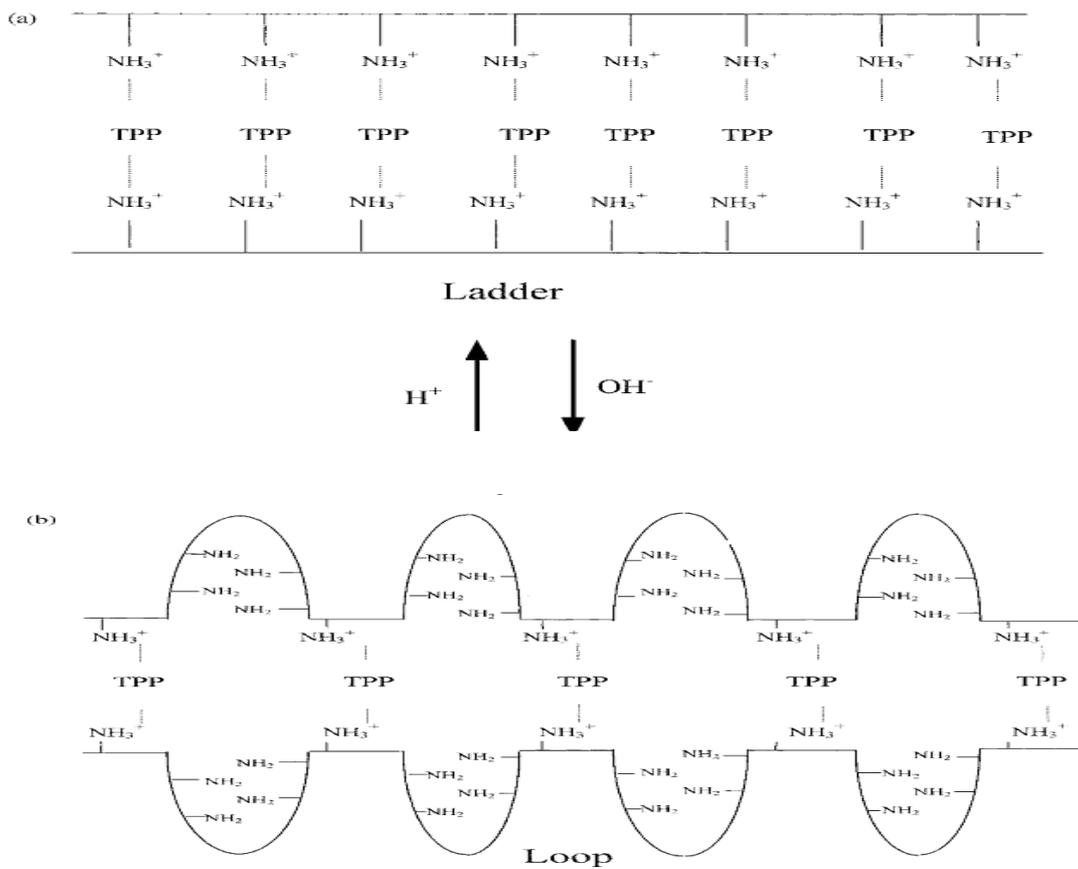


圖 2-9 幾丁聚醣與三聚磷酸鈉在不同 pH 值下之鍵結情形^[34]

2-5 包覆牛血清蛋白微粒之製備

2-5-1 牛血清蛋白簡介^[35]

牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin)為牛血液主要組成成分，包含 583 個胺基酸，分子量 68KDa 而等電位為 4.8。含氮量 16%、含糖量 0.08%，僅含己糖與己糖胺且含脂量為 0.2%。一般使用之牛血清蛋白經過乾燥後呈現透明片狀或粉末狀，因為牛血清蛋白主要從牛血清中萃取，且容易取得，又其本身性質易溶於水且安定，於酸性環境中，分子會延展和伸長且會可逆地回到原狀；於鹼性環境中，會發生去醯胺作用或雙硫鍵交換作用，但鹼性環境中 BSA 之穩定性比酸性環境中較好，因此常被作用蛋白質研究之模型。

近年來藥物釋放實驗利用許多生物相容性佳及生物可降解性之材料對藥物進行包覆，如：胰島素(insulin)^[37,38]、牛血清蛋白(bovine serum albumin)^[39]、DNA^[40,41]等。因為蛋白質可被人體迅速代謝並排除，進一步利用生物相容性佳及可降解性之載體對蛋白質進行包覆後，進入人體後可達到緩釋作用且延長藥物作用時間，以達到減少注射次數並維持體內藥物濃度。

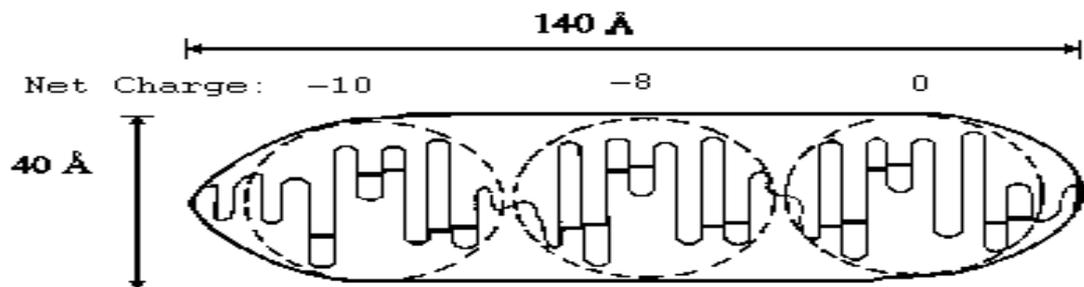


圖 2-10 牛血清蛋白之結構^[35]

2-5-2 包覆牛血清蛋白微粒之製備

因牛血清蛋白之等電位為 4.8，當溶液 pH 值大於 4.8 時會帶負電。幾丁聚醣包覆牛血清蛋白係利用幾丁聚醣溶於弱酸溶液後，表面胺基質子化後產生之正電與三聚磷酸鈉之交聯，透過物理性包覆將牛血清蛋白包覆，但溶液 pH 值大於 4.8 後牛血清則帶負電。於此條件下進行包覆牛血清之實驗必須考慮牛血清之物理性包覆，另一方面則要考慮幾丁聚醣同時與三聚磷酸鈉和牛血清蛋白反應。然而交聯微粒表面未反應之胺基正電與牛血清蛋白仍會有反應，因此必須考慮吸附效應，下圖為幾丁聚醣包覆牛血清蛋白之圖：

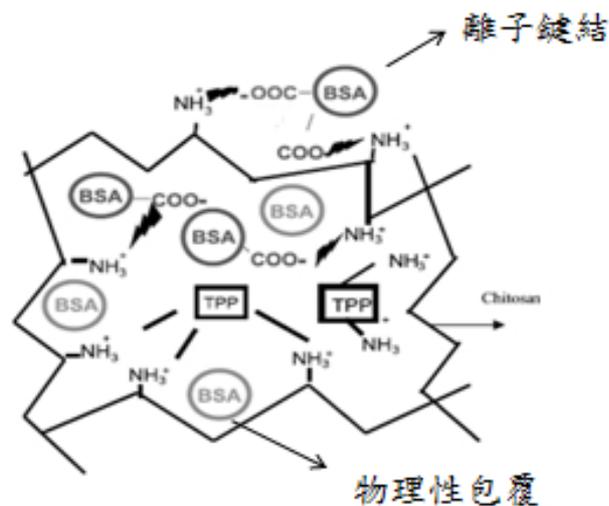


圖 2-11 幾丁聚醣微粒包覆及吸附牛血清蛋白圖^[36]

當幾丁聚醣微粒包覆牛血清蛋白後，必須考慮包覆率。當改變實驗操作變因，如下：(1)幾丁聚醣溶液 pH 值、(2)牛血清蛋白濃度、(3)幾丁聚醣分子量、(4)幾丁聚醣與三聚磷酸鈉比值、(5)幾丁聚醣溶液濃度、(6)幾丁聚醣去乙酰基程度、(7)添加順序，包覆率都有所不同且對釋放速率都有影響。現今有許多研究改變實驗操作變因來研究包

覆率及釋放速率。

1997 年 Calvo^[29]等學者研究幾丁聚醣溶液 pH 值、牛血清蛋白濃度及添加順序對包覆率之影響，實驗結果顯示隨著幾丁聚醣溶液 pH 值上升包覆率也變大，但當牛血清蛋白濃度變大時包覆率則隨之變小，另外不同的添加順序對包覆率則為先將牛血清蛋白添加進三聚磷酸鈉為最大。

2003 年 Xu^[32]等學者對牛血清蛋白包覆及釋放有更完整之研究，而研究中提及幾丁聚醣分子量、牛血清蛋白濃度、幾丁聚醣溶液濃度與去乙酰程度等操作變因對包覆率的影響。包覆率隨著分子量增加而變大，因為分子量大之幾丁聚醣擁有較長之長鏈可包覆牛血清蛋白；牛血清濃度變大，包覆率變小但負載率卻變大；幾丁聚醣溶液濃度變大黏度也隨之增加，阻礙了交聯作用，因此包覆率隨著溶液黏度增加而變小；去乙酰程度增加包覆率也隨之變大，因為胺基增加擁有更多正電可以反應。而釋放速率研究結果顯示，分子量小、去乙酰程度大、幾丁聚醣溶液濃度大較佳之釋放效果。

2004 年 Zhang^[33]等學者研究牛血清蛋白濃度對包覆率及附載率之影響有著相同趨勢，當牛血清濃度增加，包覆率及負載率也隨之變大。而釋放速率實驗，當微粒在 pH 1.2 環境下之釋放效率優於 pH 7.4，但釋放平衡後並無任何差別。

2007 年 Gan^[42]等學者研究幾丁聚醣與三聚磷酸鈉之比值、牛血清蛋白濃度及幾丁聚醣濃度與包覆率及釋放速率關係。隨著幾丁聚醣

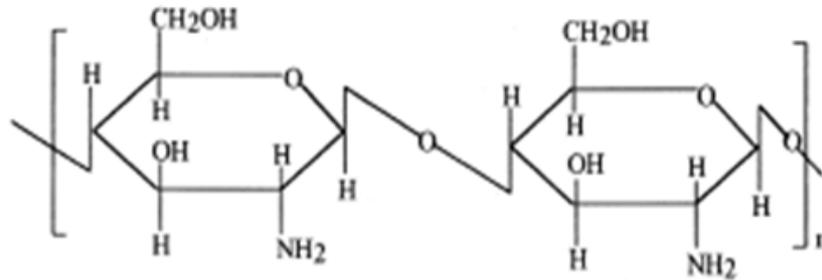
與三聚磷酸鈉比值之上升包覆率隨之下降。而牛血清蛋白濃度增加包覆率也隨之變大且文中提及牛血清蛋白添加與包覆率關係仍未有定論，而幾丁聚醣濃度變大則使得包覆率下降。釋放速率實驗中低分子量幾丁聚醣、低濃度幾丁聚醣溶液、高幾丁聚醣與三聚磷酸鈉比值、低牛血清蛋白濃度都有較好之釋放效果。

本研究為了探討不同粒徑大小之幾丁聚醣微粒對包覆率及藥物釋放速率的影響，先改變包覆之實驗操作變因，如：幾丁聚醣溶液之 pH 值、牛血清蛋白之濃度並研究上述兩變因對包覆率與負載率之關係，再利用不同分子量之幾丁聚醣包覆牛血清蛋白後，研究不同分子量對包覆率與負載率之關係並研究釋放速率。

參、實驗方法與原理

3-1 實驗材料

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，去乙酰度為 86.20%，含水率 7.8%，不溶物小於 0.2%，粒徑為 80mesh。



牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin, Fraction V)：製造商為德國 MP Biomedicals 公司，Mw=66338。

交聯劑：

三聚磷酸鈉(Sodium tripolyphosphate,TPP)：由昭和化學株式會社(Showa chemical Ind. Co., Ltd.)提供，分子量為 367.86，熔點 622°C，含水率<1wt%。

溶劑：

冰醋酸(Acetic acid)，ACS 級，由聯工化學股份有限公司(Union Chemical Works Ltd.) 提供，純度 99.7%，沸點為 118°C，密度為 1.05 g/ml。

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%

其他藥品：

1. 氫氧化鈉(Sodium Hydroxide)，ACS 級，由聯工化學股份有限公司(Union Chemical Works Ltd.)提供，純度 97.0%，密度為 2.13g/ml。
2. 鹽酸(Hydrochloric Acid)，ACS 級，由景明化工提供，純度 37.0%，密度 1.15g/ml

3-2 幾丁聚醣與微粒製備

3-2-1 幾丁聚醣純化、降解

取 4g 幾丁聚醣溶於體積 500ml、醋酸濃度為 1wt%之溶液中並攪拌均勻，接著加入 4g 氫氧化鈉於體積 50ml 之水中形成 2M 氫氧化鈉水溶液，產生沉澱後利用濾紙過濾，濾得之上層物再透過反覆的水洗並烘乾即得純化之幾丁聚醣。

取純化後 1.5g 之幾丁聚醣溶於體積 50ml、醋酸濃度為 2wt%之水溶液中並攪拌均勻，而後加入鹽酸並形成幾丁聚醣溶液體積與鹽酸體

積比值為 3，攪拌 2 小時後加入 8wt%之氫氧化鈉溶液中中止反應，所得之沉澱物以去離子水反覆清洗直至中性後，使用抽氣過濾得到沉澱物，烘乾後即為降解之幾丁聚醣。

3-2-2 幾丁聚醣之分餾

將幾丁聚醣溶於 2wt%之醋酸水溶液形成濃度 1.75wt%之幾丁聚醣溶液，接著逐滴加入 10wt%氫氧化鈉溶液並慢慢調整溶液之 pH 值至 5.8，此時有白色懸浮物析出並沉澱，而後用離心機，將轉速設定 7000rpm、時間 10 分鐘分離沉澱物，烘乾後之沉澱物為分餾後之幾丁聚醣。

3-2-3 離子凝膠法製備幾丁聚醣微粒

將幾丁聚醣溶於 0.175wt%醋酸水溶液中並形成濃度 1.0wt%之幾丁聚醣溶液，接著配製濃度 1.25mg/ml 的三聚磷酸鈉水溶液；將上述溶液以適當體積比例攪拌 10 分鐘，並以超音波震盪後即得幾丁聚醣微粒。

3-3 分子量測量

3-3-1 黏度分子量測試

取 0.2 克幾丁聚醣溶入體積 100ml、醋酸濃度 0.5%之水溶液並攪拌均勻，接著用 0.45 μ m 濾紙過濾溶液，即得 0.2g/dl 溶液，接著將溶液分別稀釋成 0.15、0.10、0.05g/dl 之溶液，實驗作法取過濾後之濾液放入黏度計中並恆溫於 30°C 之水槽，每個濃度測試三次，每次測試誤差不得大於 1 秒。

3-3-2 凝膠滲透層析儀(Gel Permeation Chromatography, GPC)

GPC 是利用高分子流經管柱時，留滯於管中時間來判斷分子量大小，大分子量之高分子滯留時間短，小分子量滯留時間長，另外 GPC 也可知分子量分布情形。本研究檢量線利用 Shodex 公司以分子量 P-5($M_w=6000$)、P-10($M_w=10000$)、P-20($M_w=21700$)、P-50($M_w=48800$)、P-100($M_w=113000$)、P-200($M_w=210000$)、P-400($M_w=366000$)、P-800($M_w=805000$)標準品建立，分析軟體為訊華 SISC2.0。

分子量測試所使用之 GPC(製造廠商；SHIMADZU)操作條件為：(1)管柱：G5000PWxl；(2)移動相：醋酸濃度 0.3M、醋酸鈉 0.1M；(3)流速：0.6ml/min；(4)注射量：20 μ l；(5)樣品濃度：2mg/ml；(5)偵測器：RI detector

3-4 去乙醯度測量^[85,86]

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。

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 4000~400 cm^{-1} ，掃描次數為 16 次，解析度為 4 cm^{-1} 。樣品分析前先以溴化鉀做背景掃瞄後，接著放上壓錠後之圓片，幾丁聚醣與溴化鉀比值為 1:100，並以紅外線光譜測其在

1655 cm^{-1} 及 3450 cm^{-1} 之吸收值，而 A1655 為 Amide I band 於 1655 cm^{-1} 之吸收強度，A3450 為 O-H band 於 3450 cm^{-1} 之吸收強度，接著算出吸收度比值後並帶入去乙醯度標準曲線後可得，而本研究使用之幾丁聚醣去乙醯度為 83.8%。

$$\log_{10}(DF/DE)=(A)_{\text{amide}} \quad (1)$$

$$\log_{10}(AC/AB)=(A)_{\text{hydroxyl}} \quad (2)$$

$$\text{Absorbance ratio} = (A)_{\text{amide}} / (A)_{\text{hydroxyl}} \quad (3)$$

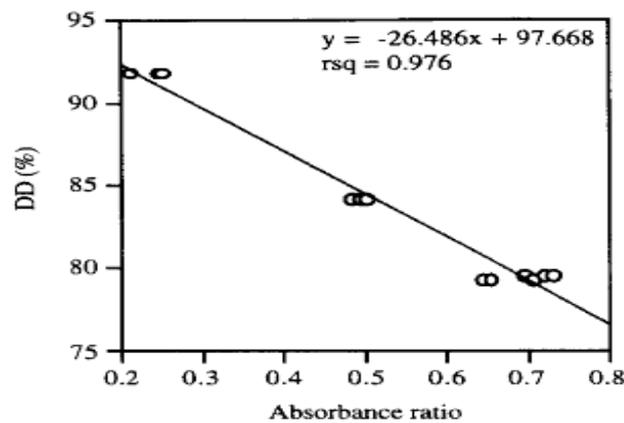


圖 3-1 去乙醯度標準曲線

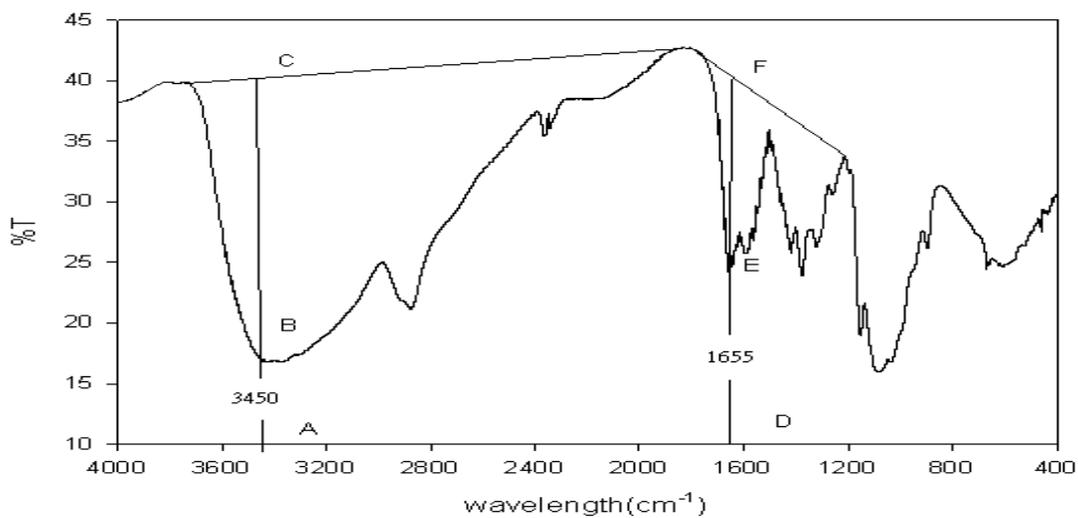


圖 3-2 幾丁聚醣 FT-IR 圖

Wavenumber, $\nu(\text{cm}^{-1})$	Assignments
3450	-OH hydroxyl group
3360	-NH group-stretching vibration
2925, 2880	asymmetric or symmetric CH_2 stretching vibration
1644	Symmetric stretch of $\text{C}=\text{O}$ in the amide group
1560	Stretch of $\text{C}-\text{N}$ and bend of $\text{N}-\text{H}$ in the amide group
1380	CH_3 in amide group
1165	$\text{C}-\text{O}$ group
1064	- $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ - group

表 3-1 幾丁聚醣於 FT-IR 中之特徵吸收峰

3-5 微結構分析

3-5-1 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。

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：20mA，80 秒 (2)加速電壓：2~15kV (3)放大倍率：400~2000 倍。

3-5-2 原子力顯微鏡(AFM)

1985 年 Binnig、Quate 和 Gerber 發明原子力顯微鏡(atomic force microscope,AFM)，其原理是利用極柔軟懸臂上之探針與試片之間微小的原子力—凡得瓦力(約為數個 nN 左右)做呈像訊號，如此不僅能對非導體做觀測，而且具有可在液相、氣相中操作與樣品不需複雜前處理的特性，目前也被廣泛的應用在生物樣本型態學的研究，其力學量測的功能更被視為量測軟組織或分子間力學特性的利器。

主要測試模式分為三種

(1) 接觸式(contact mode)

利用原子間排斥力變化而產生表面輪廓的方式稱為接觸式，期互斥能的大小與原子間距倒數的十二次方成正比，當探針與試片的距離約為數個埃時，兩原子的電子雲會有互斥現象。由於凡得瓦力乃屬短距力，因此微小的距離變化量，就會造成互斥力明顯的變化，因此隨著樣品表面形貌的高低起伏，探針和樣品間的間距不同，其交互作用力也不同，使得懸臂的變形量不同，利用含四象限的光學感測器偵測懸臂偏移量，即可得樣品的表面形貌。

(2) 非接觸式(non-contact mode)

利用原子吸引力的變化而產生表面輪廓的成像方法稱為非接觸式。探針與試片的距離約為數十個到數百個埃，其吸引力的大小主要

與原子間距倒數的六次方成正比。此操作模式是在黏附於懸臂上的壓電晶體施予一交變電壓，使懸臂受一力作用產生一微小振幅擺動，此懸臂的振幅與頻率會隨探針與樣本間的作用力不同而改變，可透過監測振幅的變化量來得知樣本的表面輪廓。

(3) 半接觸式模式(tapping mode)

使懸臂上下擺動輕拍於樣本表面，並藉振幅的改變而呈像，由於受到吸力與斥力的交互作用，也稱為間歇式的接觸式模式或半接觸模式。敲擊模式與非接觸模式的操作方式類似，但探針懸臂振動的振幅較大，而探針和樣品間的距離也比非接觸模式來得大，在掃描過程中，探針會接觸到樣品表面，其解析度也較非接觸模式的解析度來得高。但此種探針和樣品的接觸只是輕敲樣品表面，故對樣品表面的刮傷可減到最低，對於柔軟性較好的試片，如生物樣本，使用敲擊模式觀察表面輪廓時，在不損傷試片下，可得到極佳的呈像效果，特別在空氣中敲擊式的顯微術可避免樣本上自然水層的干擾。

本研究將含有幾丁聚醣微粒之溶液滴至載玻片上，於常溫下直接乾燥後，使用原子力顯微鏡(MT-MDT 公司製造，型號為 SolverP47)之探針(型號為 NSG01-DLC，彈性係數 5.5N/m，共振頻率 165kHz)觀察幾丁聚醣微粒表面之狀態與分散情形。

	接觸式	非接觸式	敲擊式
影像解析度	高	低	中
破壞樣品程度	高	中	低
軟性材料測試	差	正常	正常

表 3-2 AFM 操作模式優缺點比較

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(m²/sec)

k = 波茲曼常數(J/K) T = 絕對溫度(K)

η = 溶液黏度(cp)

Zeta電位是與一個顆粒在某一特定介質中所帶的總電荷有關，確切來說是顆粒在剪切面處的電位，可用作來為膠體體系穩定性的指標。介面電位測量的基本原理是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，並經軟體直接精算出其介面電位值，測定中須確定石英槽內無氣泡存在，避免干擾。

粒徑及介面電位測量使用儀器為Zetasizer3000 HS_A (製造廠商：Malvern)，實驗前熱機30分鐘，而交聯微粒進行粒徑及介面電位測試前必須經過超音波震盪15分鐘方可進行測試。

3-7 包覆率及負載率

蛋白質為許多胺基酸所組成且結構複雜並還有許多官能基，利用芳香族官能基在 UV 的測量下，於波長 280nm 會有吸收峰，接著利用蛋白質此特性對包覆後奈米幾丁聚醣微粒進行包覆率及負載率的測試。實驗步驟先配製幾丁聚醣溶液並攪拌均勻後加入牛血清蛋白，持續攪拌至完全溶解後，加入三聚磷酸鈉溶液進行離子交聯反應並攪拌 30 分鐘。為了分離包覆牛血清蛋白後之幾丁聚醣微粒，利用超高速離心機，轉速設定 20000rpm、時間 30 分鐘、溫度 4°C 之條件進行離心，而離心後上層澄清液進行包覆率測試。而包覆率與負載率都必須先利用未包覆牛血清蛋白微粒離心後上層澄清液製作出一條標準檢量線後，檢量線濃度分別為 0、10、20、30、40、50 $\mu\text{g/ml}$ 。下列為標準檢量線圖：

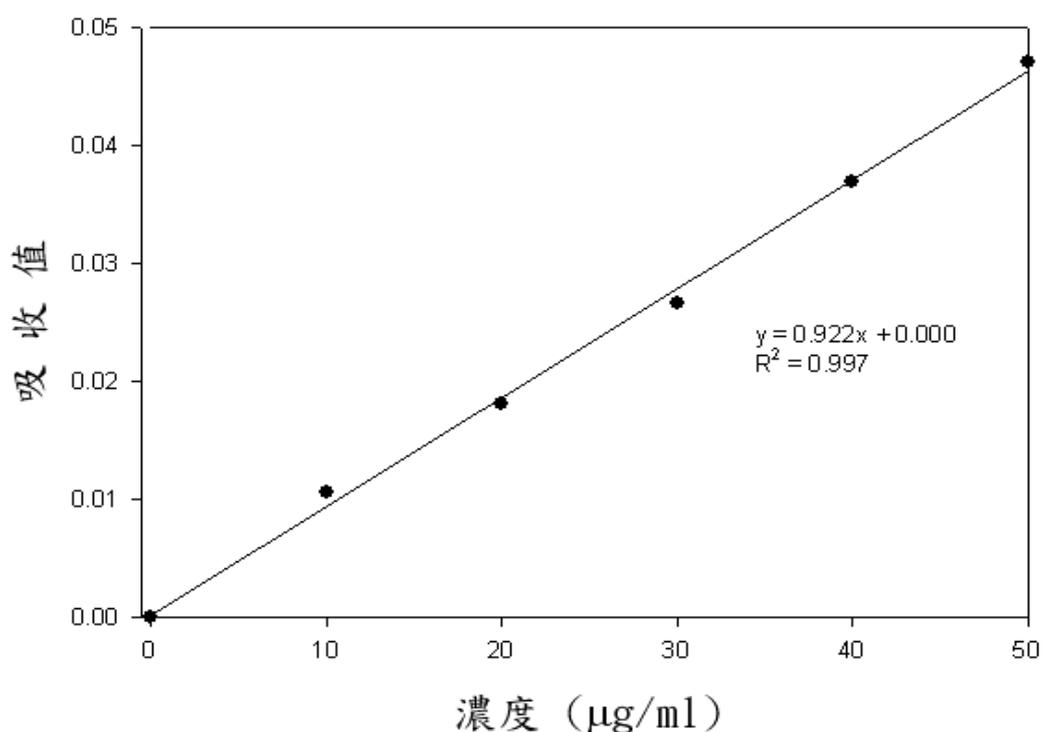


圖 3-3 牛血清蛋白標準檢量線

包覆率實驗步驟：

取 5mg 之牛血清蛋白加入 5ml、pH6 之幾丁聚醣溶液形成牛血清濃度 1.0mg/ml 之幾丁聚醣溶液並攪拌 15 分鐘確認牛血清蛋白完全溶解，接著加入 2ml 之三聚磷酸鈉溶液形成幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比值為 4 之溶液並攪拌 30 分鐘。利用離心分離包覆牛血清蛋白之微粒，離心條件如下：轉速 20000rpm、溫度 4°C、時間 30 分鐘，取出 1ml 離心後上層澄清液並稀釋 10 倍，微粒則保留用於藥物釋放速率實驗，而每次進行包覆率實驗前先用未包覆牛血清蛋白奈米微粒離心後之上層澄清液較正後並作標準檢量線。接著將稀釋後之上層澄清液置入 UV 中，測量出於 280nm 下之吸收值為 0.037，內插於標準檢量線中並求出該吸收值下之牛血清蛋白濃度 0.04028mg/ml，再乘上稀釋倍率即為 1ml 中牛血清蛋白濃度 0.4028mg/ml。因為溶液總體積為 7ml，接著乘上總體積則為離心後上層澄清液中所含牛血清蛋白之重量 2.82mg，實驗加入之牛血清蛋白總量為 5mg，而包覆率計算方法如下：

$$\% \text{ 包覆率} = \frac{\text{添加的 BSA 總量} - \text{上清液中的 BSA 含量}}{\text{添加的 BSA 總量}} \times 100$$

負載率實驗步驟：

離心後上層澄清液所含牛血清蛋白量計算方法同包覆率，然而負載率必須計算乾燥後微粒總重，以 pH6、1.0mg/ml 為例，離心後上層澄清液中所含牛血清蛋白之重量為 2.82mg，實驗加入之牛血清蛋白總量為 5mg，而乾燥後微粒總重為 8.01mg，而負載率計算方法如下：

$$\% \text{ 負載率} = \frac{\text{添加的 BSA 總量} - \text{上清液中的 BSA 含量}}{\text{乾燥微粒重量}} \times 100$$

3-8 釋放速率

藥物釋放速率實驗步驟將包覆牛血清蛋白之幾丁聚醣微粒離心後，將微粒取出並分別加入 pH1.2 與 pH7.4 之 PBS 中，接著將已加入微粒之 PBS 置入溫度 37°C 之恆溫水槽中而轉速設為 100rpm，接著於反應時間 1.5、3、6、12、24、48 小時離心並取出 3ml 之上層澄清液進行藥物釋放實驗，而取出之 3ml 之溶液則用同體積之 PBS 補充。取出之上層液利用蛋白質在 UV 波長 280nm 之吸收峰，來測定藥物釋放量。

藥物釋放步驟：

以 pH6、1.0mg/ml 於 pH1.2 之 PBS 中為例，先取 5mg 之牛血清蛋白加入 5ml、pH6 之幾丁聚醣溶液中並攪拌 15 分鐘確認牛血清蛋白完全溶解，接著 2ml 之三聚磷酸鈉溶液形成幾丁聚醣與三聚磷酸鈉重量比值為 4 之溶液並攪拌 30 分鐘。利用離心分離包覆牛血清蛋白之微粒，離心條件如下：轉速 20000rpm、溫度 4°C、時間 30 分鐘，離心後微粒取出後加入 6ml、pH1.2 之 PBS 中，並置入轉速 100rpm 之 37°C 恆溫水槽中，於設定時間間隔離心後取出 3ml 之上層離心液進行 UV 測試，而取出之 3ml 再以同體積 PBS 填回。以釋放 1.5 小時為例，離心後取出 1ml 上清液並稀釋 10 倍，於 UV 下測試所得之吸收值為 0.00763，此吸收值所求得之濃度為 0.008098mg/ml，所以 3ml 上清液含牛血清蛋白總量為 0.24295mg，而包覆進微粒中之牛血清蛋白量 2.15mg，由下列藥物釋放速率的計算方法可知 1.5 小時藥物釋放速率為 11.3%。

$$\% \text{藥物釋放速率} = \frac{\text{上清液中 BSA 總量}}{\text{微粒中 BSA 總量}} \times 100$$

肆、結果與討論

4-1 幾丁聚醣物性分析

4-1-1 幾丁聚醣分子量與分子量分佈

幾丁聚醣為天然性高分子且分子量大，而高分子量之幾丁聚醣當溶解後因為黏度會很大不利於應用，然而有多種降解方式都能使分子量變小，如：酵素法、酸水解法及臭氧法，但每種方法都有其優缺點。酵素法專一性強但反應時間長；酸水解法必須考慮酸之濃度且反應時間不能太長；臭氧法降解效果最好但幾丁聚醣結構容易被破壞，而酵素法及酸水解法主要打斷幾丁聚醣之醣苷鍵，本研究使用酸水解法來對幾丁聚醣進行降解反應。

黏度計測試最常用於幾丁聚醣黏度平均分子量之測量，通常使用奧士瓦黏度計，先測出幾丁聚醣溶液通過之時間後，可求得本體黏度，再利用 Mark-Houwink 公式： $[\eta]=KM^a$ 理論求得黏度平均分子量。而公式中常數求法則利用醋酸為可解離弱酸之特性，計算該濃度下之醋酸解離強度即可得，而本研究降解前幾丁聚醣黏度平均分子量為 530KDa，而降解後幾丁聚醣黏度平均分子量為 123KDa，可知鹽酸確實將幾丁聚醣之醣苷鍵打斷並使分子量變小。

CS	未降解	降解
M _v (KDa)	530.00±27.47	123.33±3.42

表 4-1 降解對幾丁聚醣黏度平均分子量影響

本研究為了得到更小之分子量，參考 Zhang^[33] 等學者，利用分餾法使幾丁聚醣分子量更小，先研究分餾區段大小與分子量分佈的關係。從表 4-2 中可知分餾區段大小對分子量之影響，當分餾範圍為 pH5.8-7.0 大分子量幾丁聚醣被析出，而當分餾區段縮小，分子量亦隨之變小。為了研究各分餾區段分子量對幾丁聚醣微粒粒徑大小之影響，本研究以小分餾區段來進行幾丁聚醣分餾反應，分餾區段分別為 pH5.8-6.2、pH6.2-6.6、pH6.6-7.0、pH7.0 以上及未分餾。

表 4-4 及 4-5 分別為未降解及降解幾丁聚醣分餾後之分子量及 PDI 變化，分子量與 PDI 皆隨分餾區段接近中性而變大，另外由 GPC 疊圖中可看出為未分餾幾丁聚醣峰之分佈範圍為最寬，然而峰的分佈範圍可表示分子量分佈情形，峰越窄代表分子量分佈越一致。而峰出現的時間代表分子量大小，因大分子量之高分子於管柱中滯留時間較短，所以大分子量之高分子出現時間會較早。另外 PDI 代表著分子量分佈情形，而 $PDI = M_w/M_n$ 。從圖 4-1 中可知未分餾幾丁聚醣峰出現的時間為 9 分鐘開始而結束時間為 17.7 分鐘，在此時間範圍中分成 10 個區段並計算各區段莫耳分率，接著利用二次迴歸方程式計算各區段之分子量，即為 M_i ，而 M_w 算法為 $\sum n_i M_i^2 / \sum n_i M_i$ ； M_n 算法為 $\sum n_i M_i$ ，從表 4-1 計算出 M_w 為 624KDa， M_n 為 207KDa，PDI 為 3.01。而理論上分子量大小變化為 $M_w > M_v > M_n$ ，而表 4-4 符合此變化，接著進一步作 mole ratio V.S log M_w ，理論上 M_w 落點在圖之後段，而本研究之 log M_w 值為 5.79，落點在圖形後段也符合理論。

分餾範圍	pH5.8-6.2	pH5.8-6.5	pH5.8-6.8	pH5.8-7.0
Mv(KDa)	105	175	192	216

表 4-2 分餾區段大小與分子量關係

T	ni	Mi	niMi ²	niMi
9-9.87	0.0165	1777662	3.160E+12	29331
9.87-10.74	0.0727	812225	6.597E+11	59048
10.74-11.61	0.1415	383569	1.471E+11	54275
11.61-12.48	0.1784	187219	3.505E+10	33400
12.48-13.35	0.1899	94449	8.921E+9	17935
13.35-14.22	0.1722	49248	2.425E+9	8480
14.22-15.09	0.1259	26541	7.044E+8	3341
15.09-15.96	0.0711	14784	2.186E+8	1051
15.96-16.83	0.0497	8511	7.244E+7	423
16.83-17.7	0.00482	5065	2.565E+7	24

二次回歸方程式： $\text{Log Mw} = 1.086 \times 10^1 - (5.78 \times 10^{-1})^T + (9.473 \times 10^{-3})^T^2$

表 4-3 GPC 計算數值

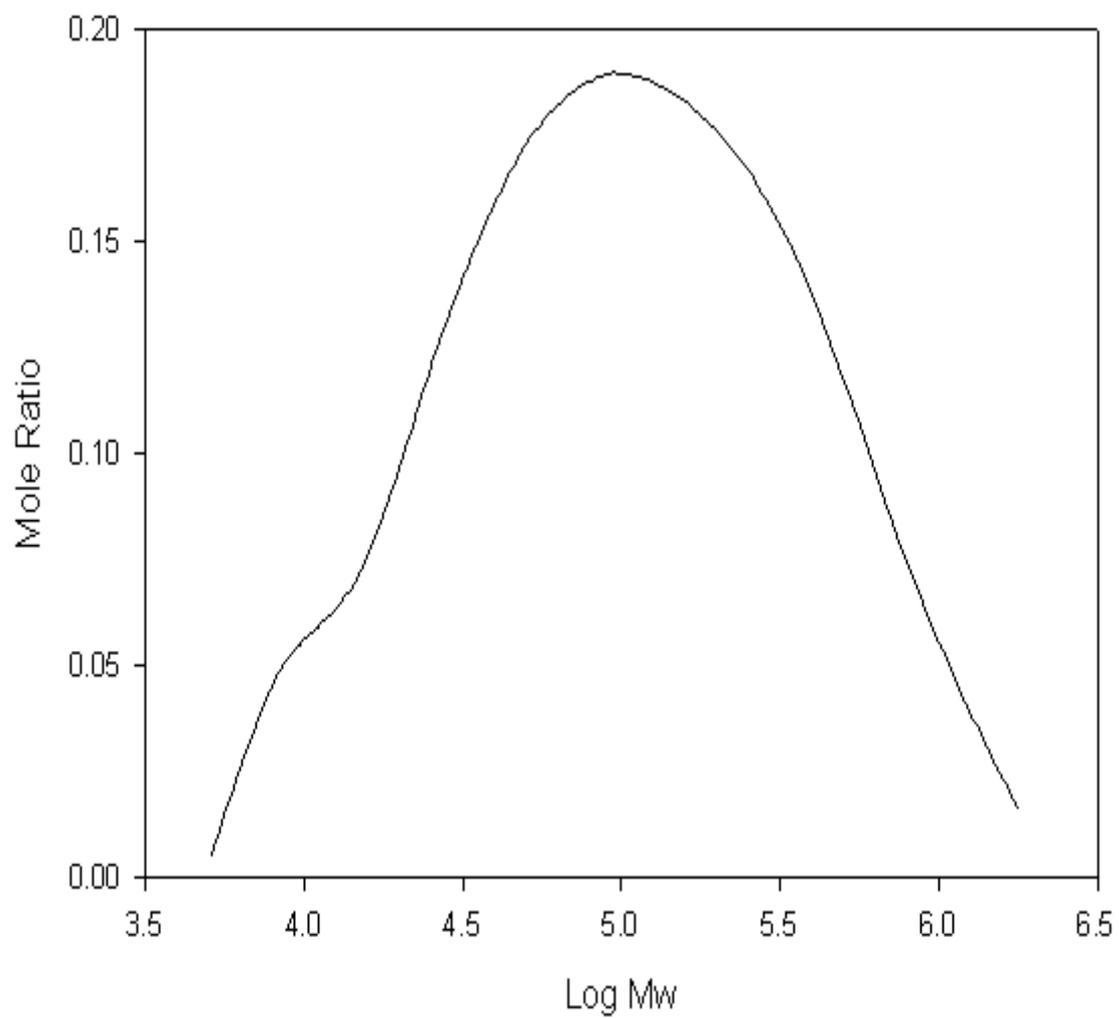


圖 4-1 莫耳分率對分子量對數圖

	Mv(KDa)	Mw(KDa)	Mn(KDa)	PDI
未分餾	530.33	624.15	207.31	3.01
pH5.8-6.2	112.00	125.63	84.89	1.48
pH6.2-6.6	192.67	216.06	114.93	1.88
pH6.6-7.0	240.67	271.01	141.15	1.92
pH7.0 以上	307.00	434.46	163.95	2.65

表 4-4 未降解幾丁聚糖分餾區段與分子量關係

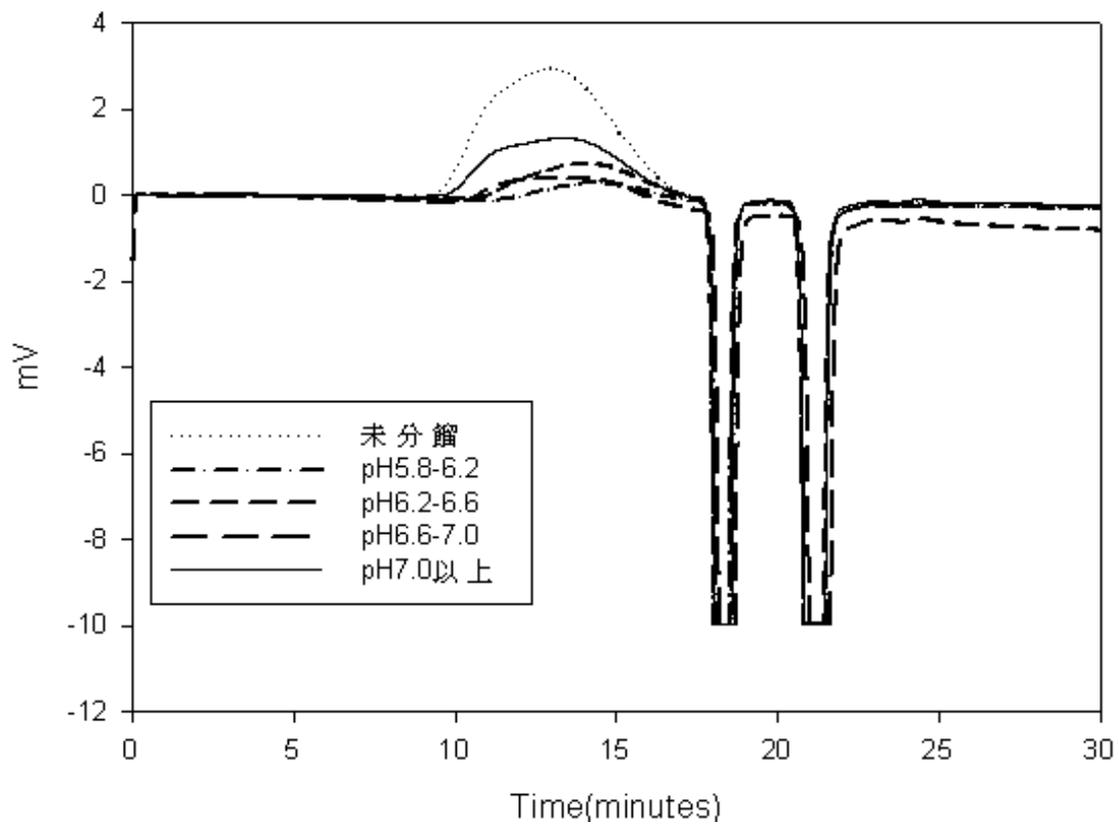


圖 4-2 未降解各分餾區段 GPC 疊圖

	Mv(KDa)	Mw(KDa)	Mn(KDa)	PDI
未分餾	123.33	297.06	123.87	2.40
pH5.8-6.2	61.67	65.11	38.92	1.67
pH6.2-6.6	89.00	134.11	69.85	1.92
pH6.6-7.0	108.00	237.92	112.68	2.11
pH7.0 以上	117.00	283.08	120.46	2.35

表 4-5 降解幾丁聚醣分餾區段與分子量關係

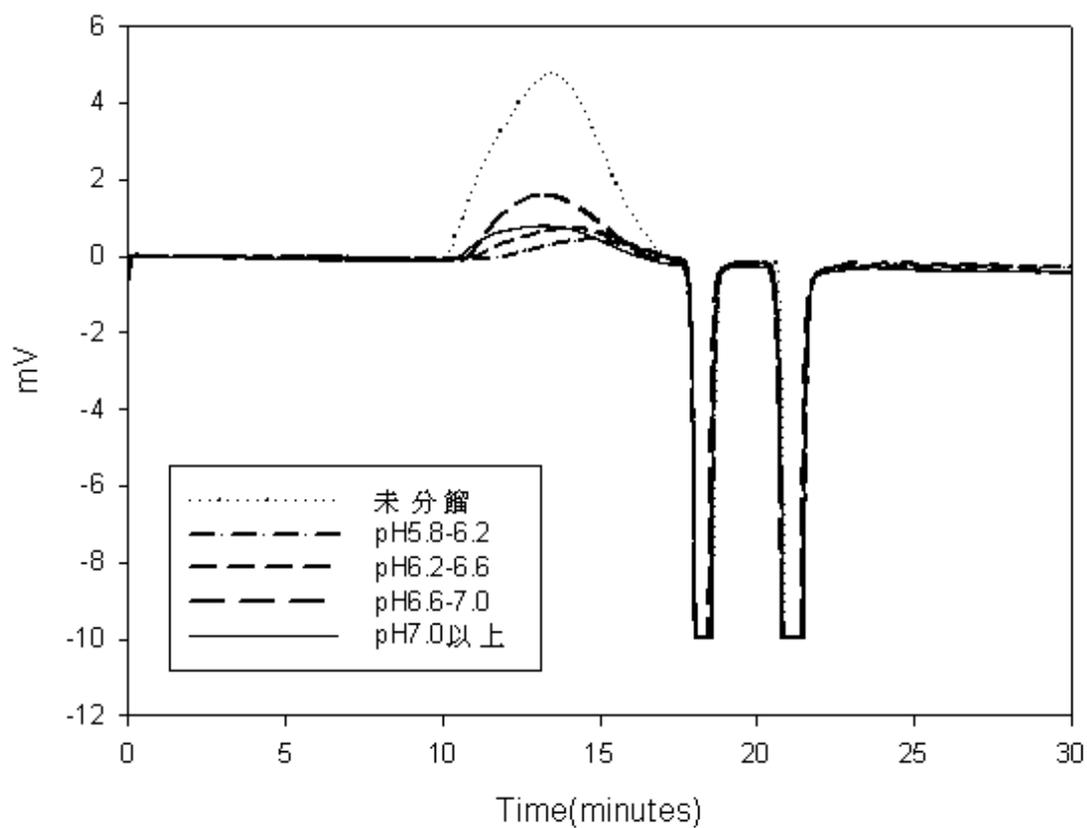


圖 4-3 降解各分餾區段 GPC 疊圖

4-2 幾丁聚醣交聯微粒結構分析

從文獻回顧^[28-32]中可知影響幾丁聚醣交聯微粒粒徑之變因主要有：1.幾丁聚醣分子量；2.幾丁聚醣溶液 pH 值；3.幾丁聚醣去乙醯度；4.幾丁聚醣與三聚磷酸鈉比值，而本研究使用之幾丁聚醣，由紅外線光譜法測出其去乙醯度為 83.8%，轉速控制 600rpm、溫度 25°C 以上為固定變因，接著改變 pH 值及 CS/TPP 比值找出最小交聯粒徑之條件。

4-2-1 幾丁聚醣溶液 pH 值對交聯微粒粒徑影響

因為小粒徑微粒表面積較大且容易均勻分散在溶液中，進一步應用於藥物釋放實驗也有較佳之釋放速率，為了找出適合交聯出最小微粒之交聯條件，本研究先固定轉速、溫度及幾丁聚醣與三聚磷酸鈉比值，接著於不同 pH 值下研究最小粒徑分佈。圖 4-4 為不同 pH 值下幾丁聚醣微粒粒徑變化，分子量 530KDa，在 pH4 時有最小粒徑 $230.3 \pm 2.3\text{nm}$ ，而分子量 123KDa 則為 $206.8 \pm 2.9\text{nm}$ ，因為隨著 pH 值變大幾丁聚醣質子化程度逐漸降低，此時交聯微粒彼此間之靜電排斥力變小，因此微粒發生聚集現象，而從介面電位圖中可知 pH 值 6 時之介面電位最小。而 pH 值 3 有較大之粒徑是因為三聚磷酸鈉於此環境下產生了還原反應，使得 CS 與 TPP 間離子強度變小，因此微粒結構鬆散，所以有較大之粒徑。圖 4-6 不同 pH 值幾丁聚醣微粒粒徑圖可知隨著 pH 值的上升，粒徑皆為雙峰分佈，然而隨著 pH 值上升粒徑分佈範圍不但變寬，且 pH 值 6 時大粒徑分佈甚至大於 $1\mu\text{m}$ ，表示微粒粒徑有變大且有聚集情形發生。

介面電位可代表微粒於溶液中之穩定性及分散性，而一般穩定分散系統之介面電位分界為 $\pm 30\text{mV}$ ，然而介面電位容易受到 pH 值之影響，圖 4-5 為不同 pH 值對介面電位的影響，從圖 4-5 可知介面電位隨著 pH 值上升從 $+42\text{mV}$ 變小至 $+23\text{mV}$ ，且分子量大小之介面電位變化皆有著相同趨勢。因幾丁聚醣利用質子化後胺基所帶之正電與三聚磷酸鈉上磷酸根負電進行離子交聯反應，當溶液接近中性時，不利於幾丁聚醣質子化，而形成之幾丁聚醣交聯微粒因靜電排斥力的降低，使微粒有聚集情形產生。

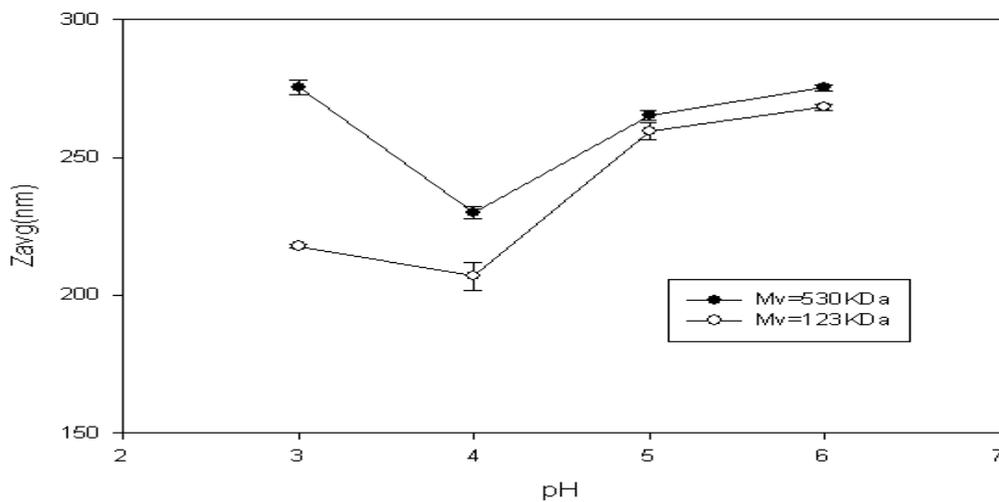


圖 4-4 不同 pH 值幾丁聚醣微粒粒徑分析

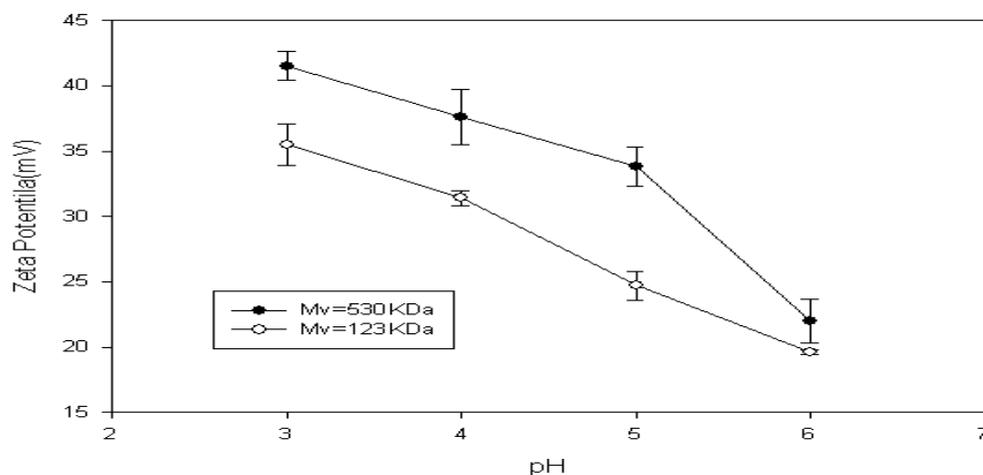
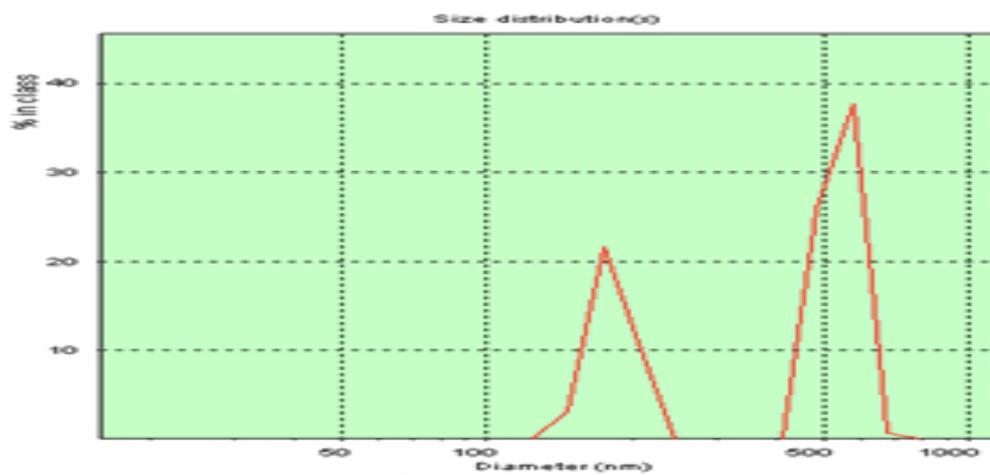
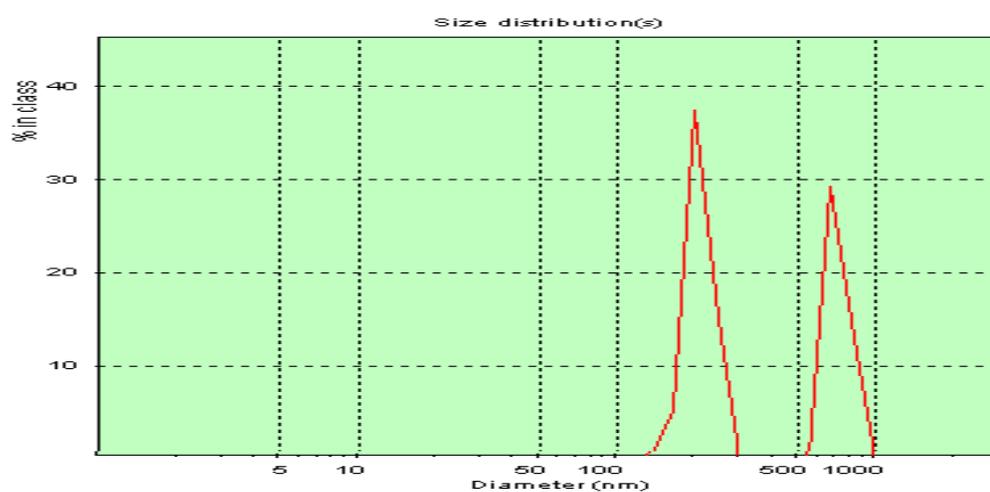


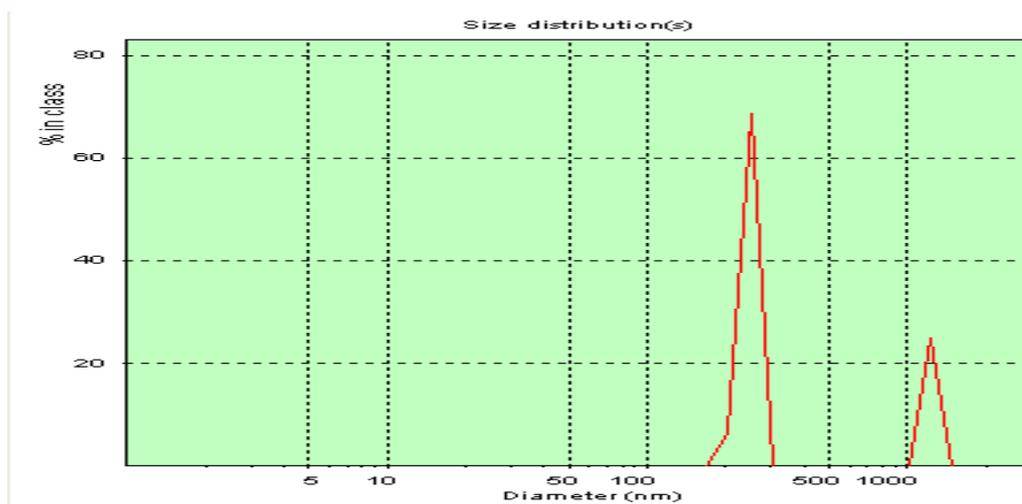
圖 4-5 不同 pH 值幾丁聚醣微粒介面電位分析



(a)



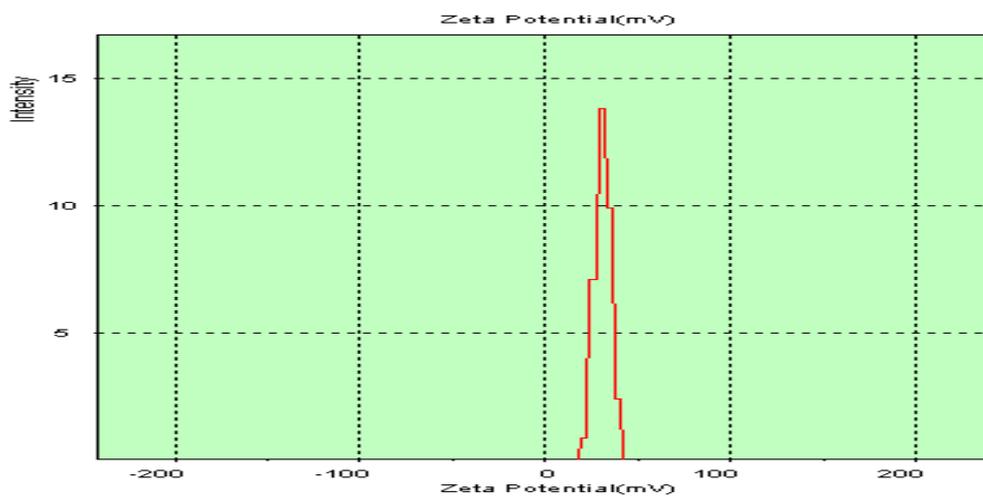
(b)



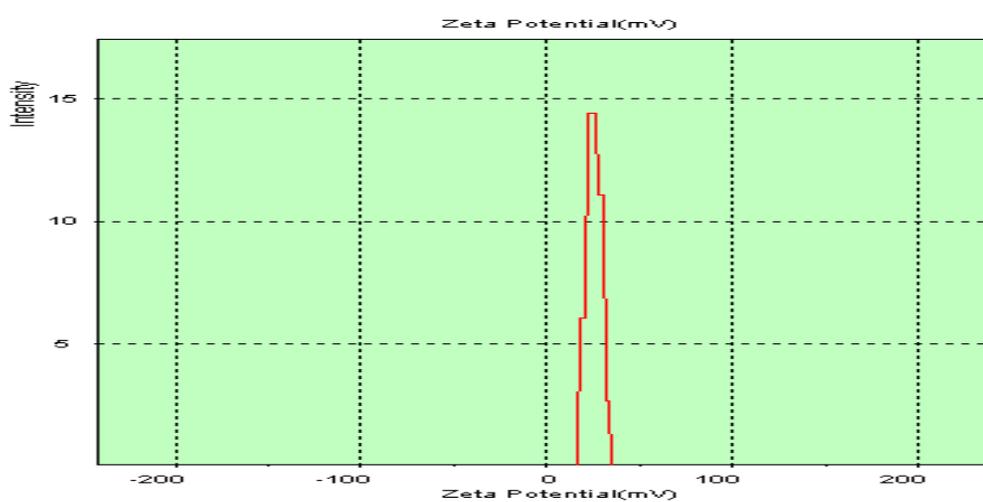
(c)

圖 4-6 不同 pH 值幾丁聚糖微粒粒徑圖

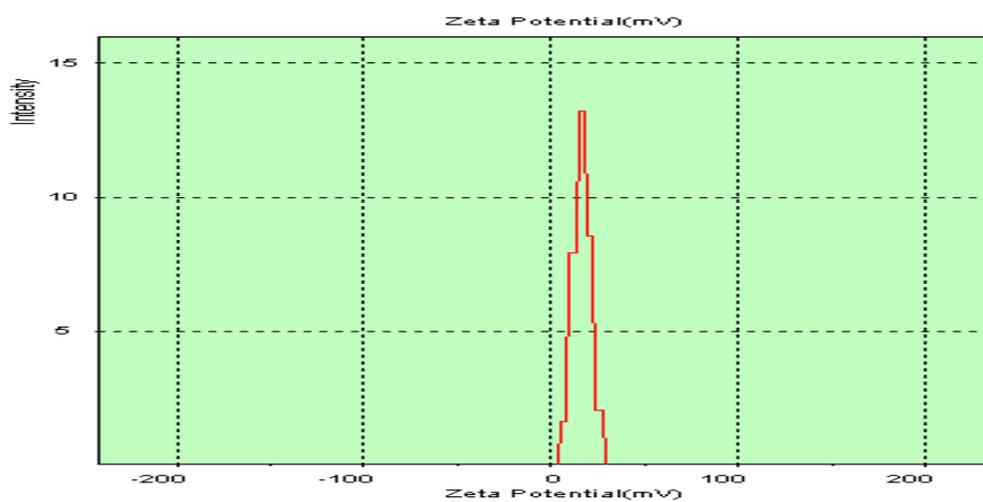
(a)pH=4 (b)pH=5(c)pH=6



(a)



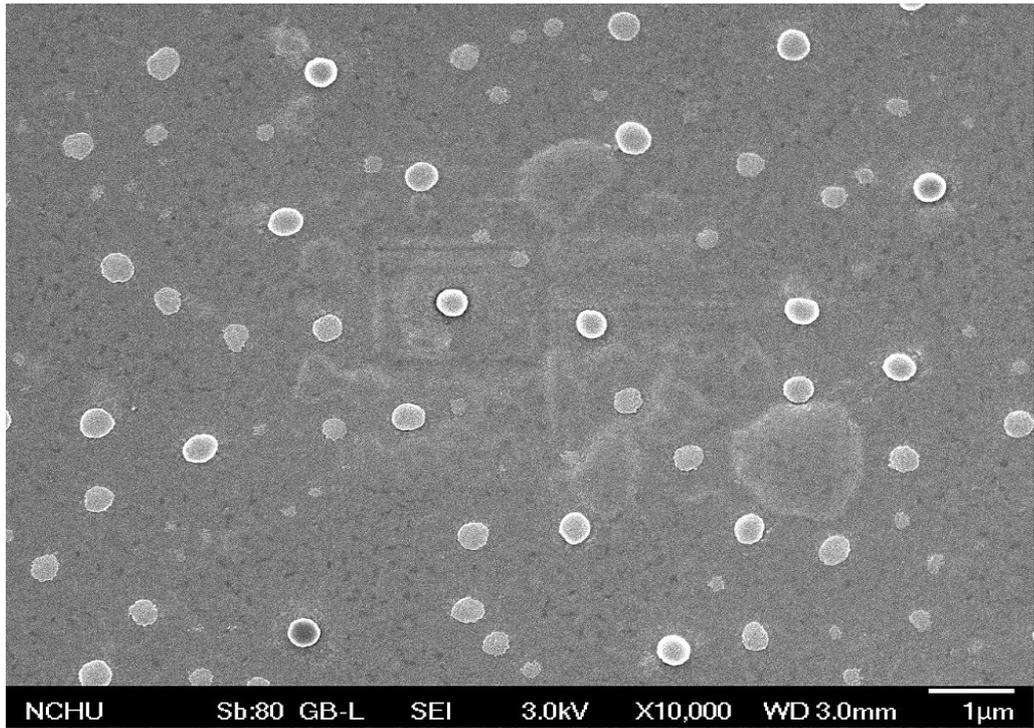
(b)



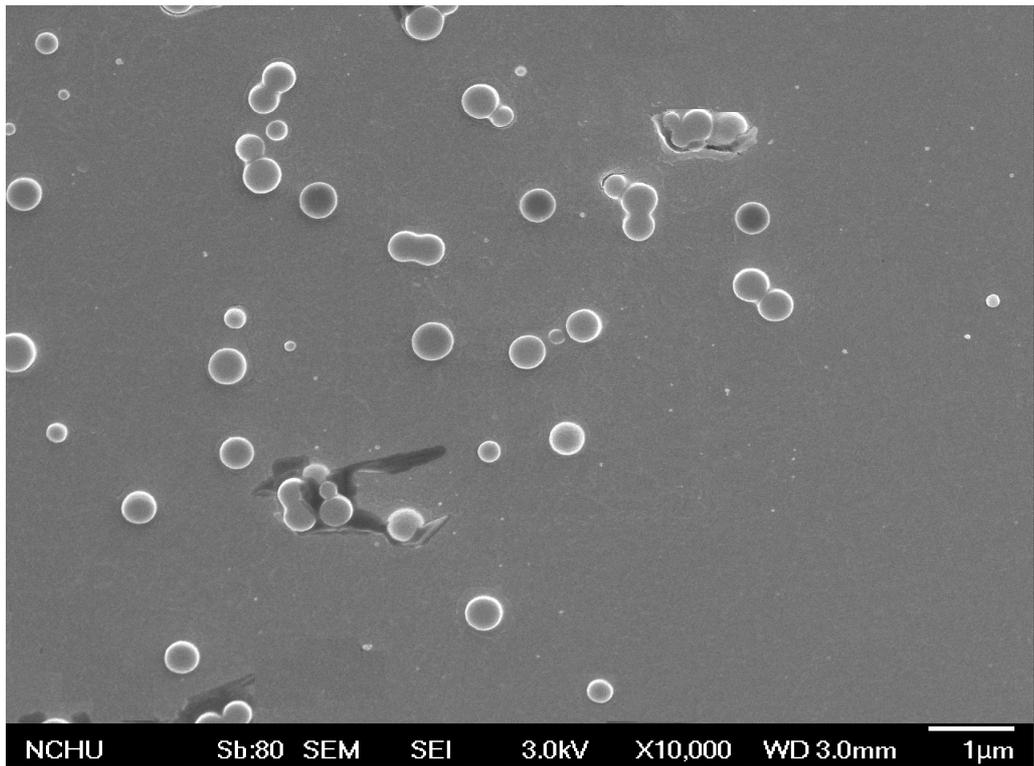
(c)

圖 4-7 不同 pH 值幾丁聚醣微粒介面電位圖

(a)pH=4 (b)pH=5(c)pH=6



(a)



(b)

圖 4-8 不同 pH 值幾丁聚醣微粒 SEM 圖

(a)pH=4(b)pH=6

4-2-2 幾丁聚醣與三聚磷酸鈉比值對交聯微粒粒徑影響

有許多變因會影響幾丁聚醣交聯，本研究先找出可交聯出最小微粒粒徑之 pH 值，再找出幾丁聚醣與三聚磷酸鈉比值對粒徑大小的影響。圖 4-9 不同 CS/TPP 比值幾丁聚醣微粒粒徑分析，當 CS/TPP 比值 4 時有最小微粒粒徑 $230.3 \pm 2.3 \text{ nm}$ ，大小分子量皆有相同實驗結果。因為幾丁聚醣為長鏈狀高分子，當比值變大時幾丁聚醣量也增加，此時有較多質子化後之胺基可與三聚磷酸鈉進行交聯反應，而 CS/TPP 比值 4 有最小微粒粒徑必須考慮各種變因會互相影響，如：幾丁聚醣溶液 pH 值、材料本身性質、濃度等，因為本研究於 pH 值 4 時有最小微粒粒徑，當進行 CS/TPP 比值對微粒粒徑之影響亦將 pH 值固定在 4。當 pH 值 4 且 CS/TPP 比值也在 4 時，此時進行交聯反應是最有效率。而 CS/TPP=3 有較大的粒徑是因為於此比值狀態，因幾丁聚醣可進行交聯反應之質子化胺基較少，CS 與 TPP 彼此間作用為部分架橋，使得交聯微粒結構鬆散，因此有大之粒徑。然而隨著 CS/TPP 比值上升，可與 TPP 進行反應之胺基增加，使得微粒變大。而圖 4-11 粒徑分佈圖可看出不同比值之粒徑分佈皆為雙峰分佈且大粒徑分佈訊號較強，而隨著比值變大，大粒徑分佈範圍變得較大。

不同 CS/TPP 比值形成之幾丁聚醣微粒介面電位，隨著比值增加介面電位也變大，因為比值變大時幾丁聚醣質子化胺基數目增多，當與三聚磷酸鈉進行交聯反應後，微粒表面所帶之正電荷亦增加，因此介面電位隨著 CS/TPP 增加而變大。

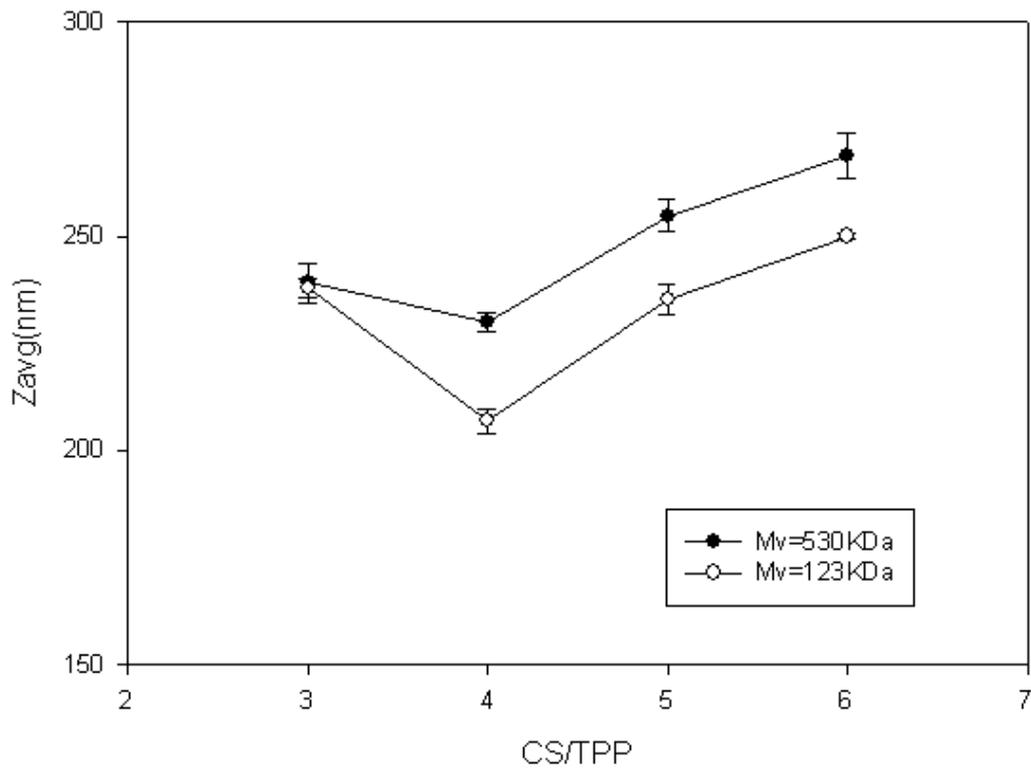


圖 4-9 不同 CS/TPP 比值幾丁聚醣微粒粒徑分析

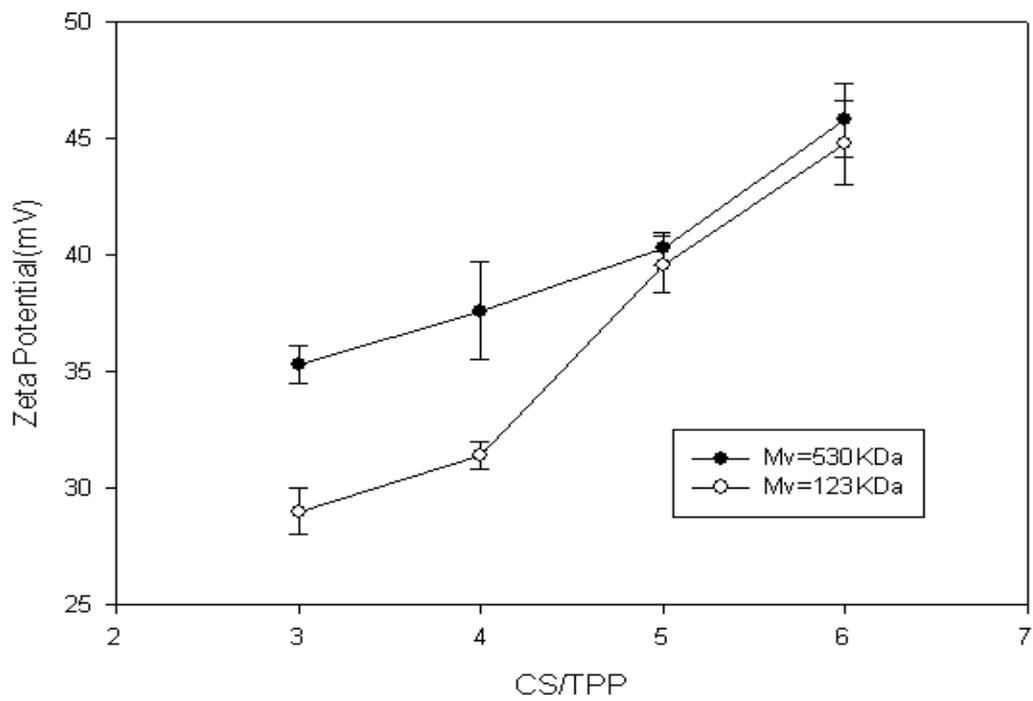
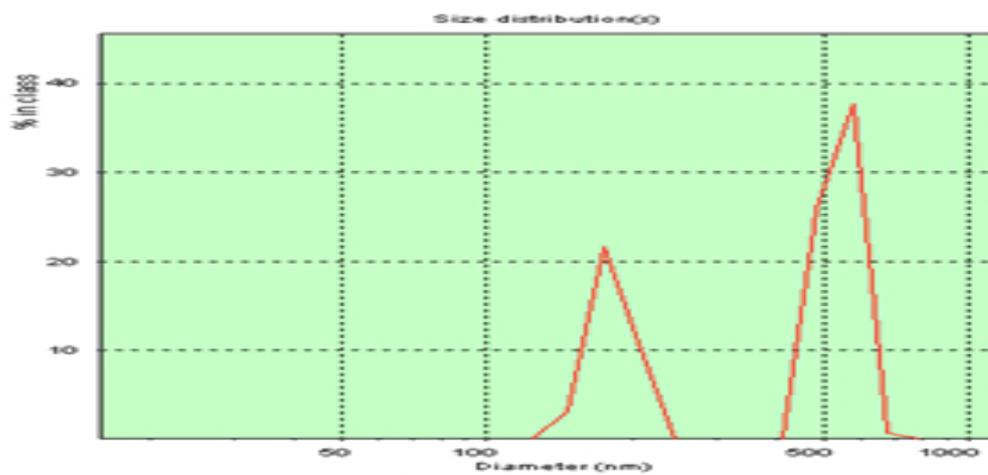
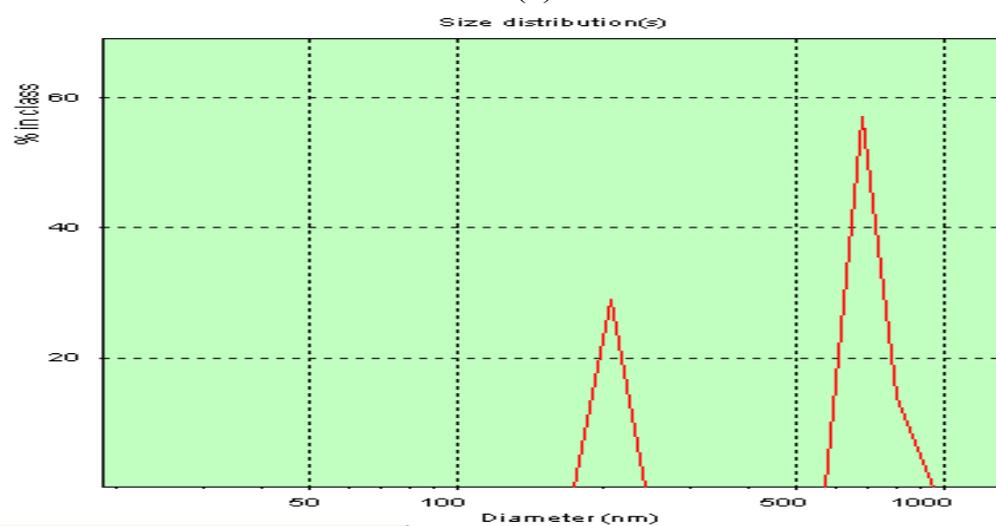


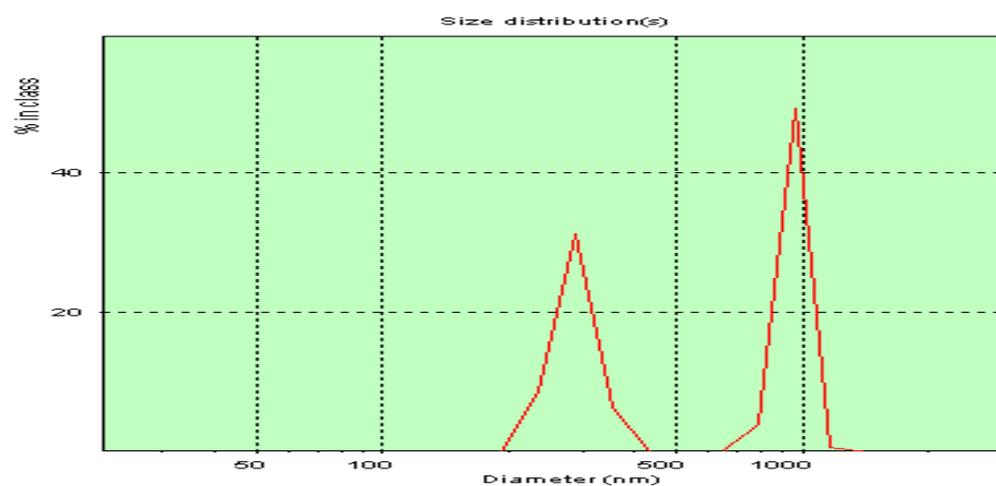
圖 4-10 不同 CS/TPP 比值幾丁聚醣微粒介面電位分析



(a)



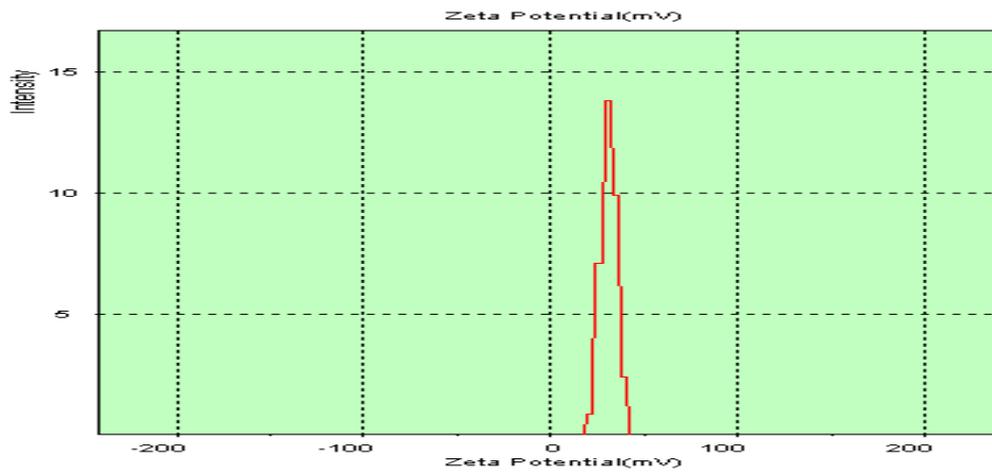
(b)



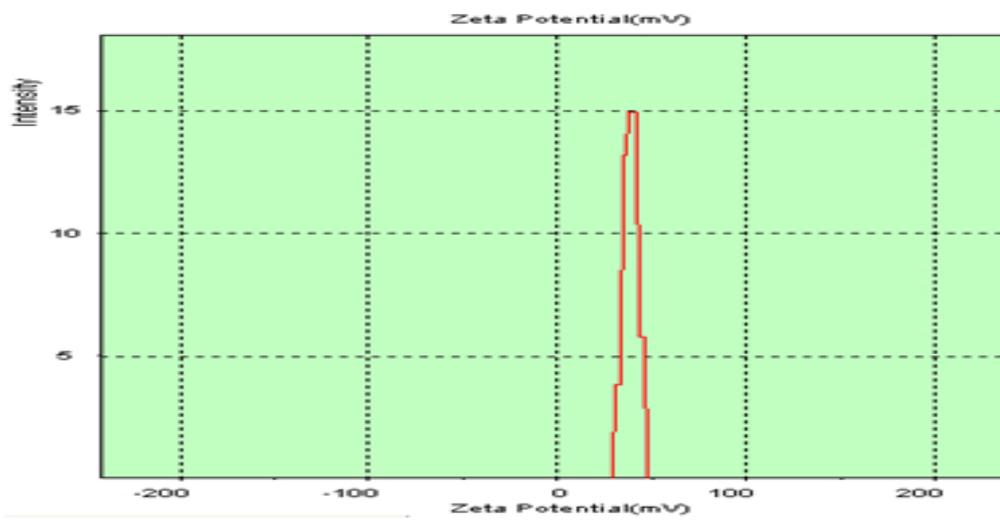
(c)

圖 4-11 不同 CS/TPP 比值幾丁聚糖微粒粒徑圖

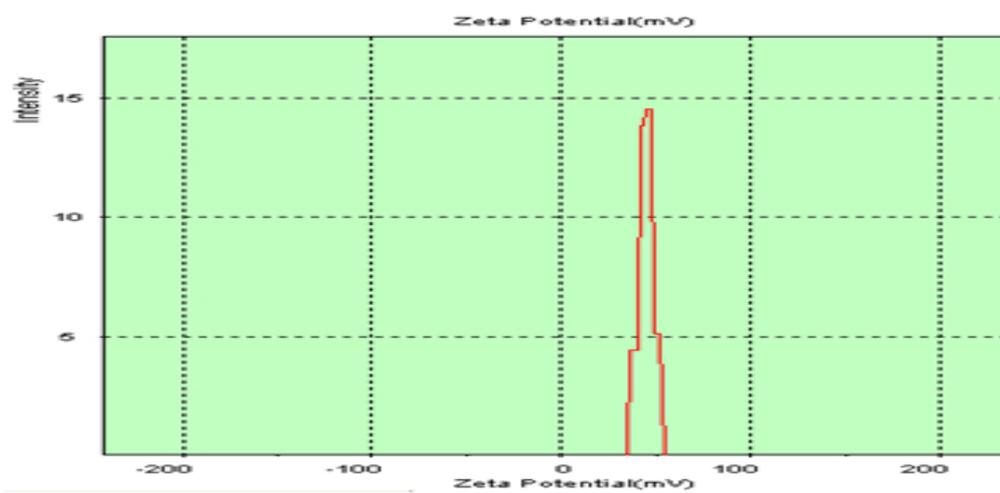
(a)CS/TPP=4 (b)CS/TPP=5(c)CS/TPP=6



(a)



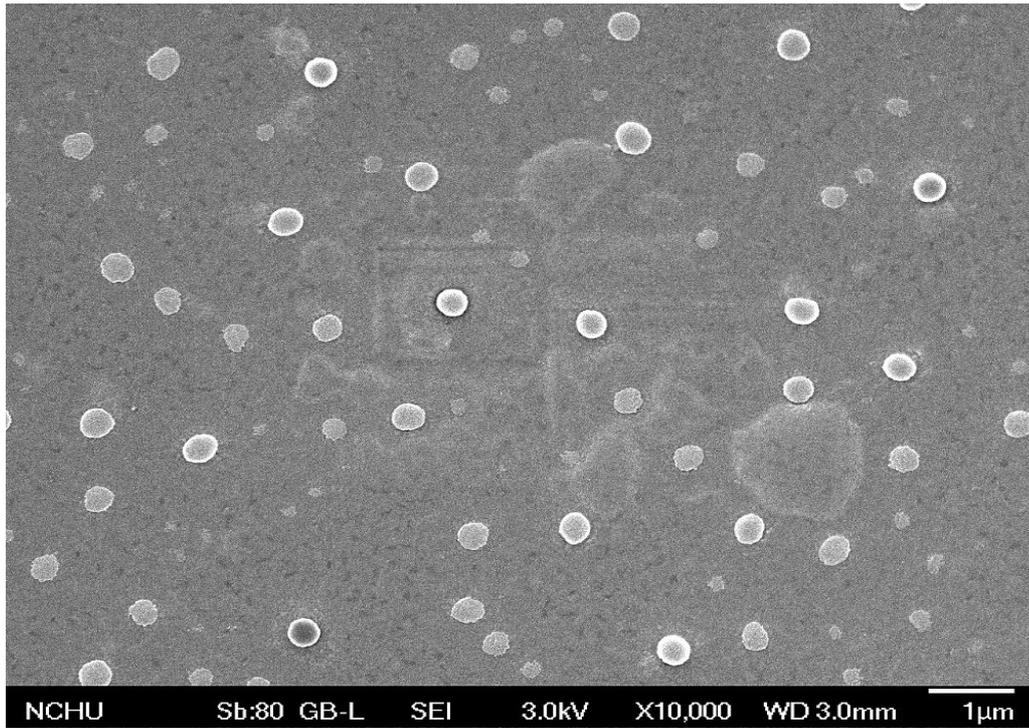
(b)



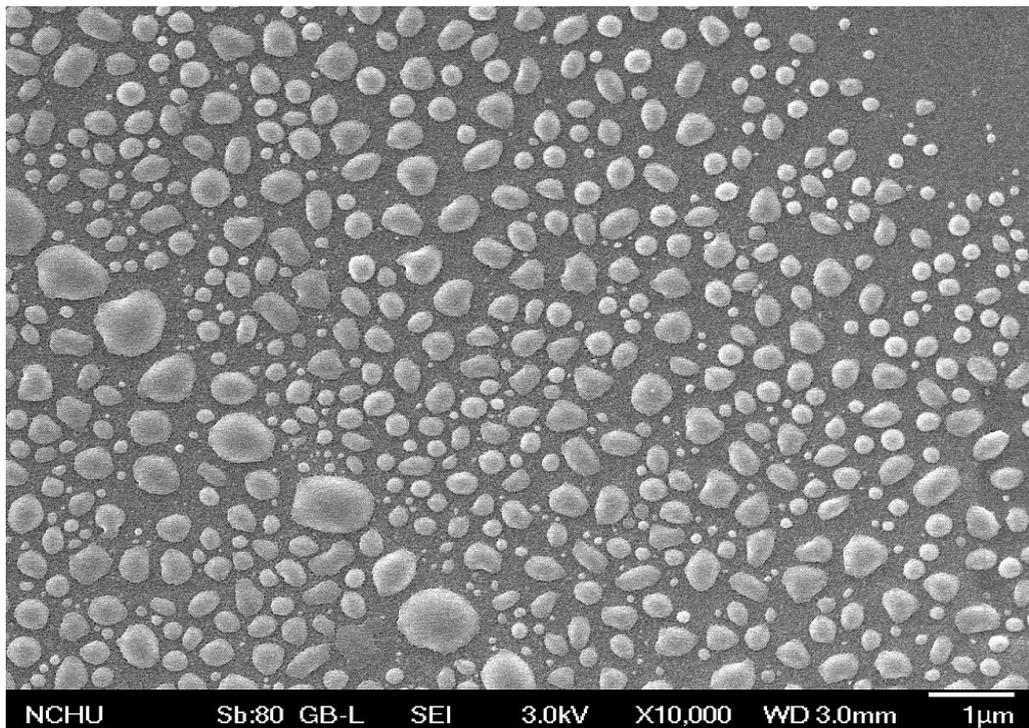
(c)

圖 4-12 不同 CS/TPP 比值幾丁聚糖微粒介面電位圖

(a)CS/TPP=4 (b)CS/TPP=5(c)CS/TPP=6



(a)



(b)

圖 4-13 不同 CS/TPP 比值幾丁聚醣微粒 SEM 圖

(a)CS/TPP=4(b)CS/TPP=6

4-2-3 幾丁聚醣分子量對交聯微粒粒徑影響

天然性幾丁聚醣通常擁有高分子量，但因為溶解性質不佳且溶解後黏度大，不適合作應用，為了得到小分子量之幾丁聚醣，先利用鹽酸使幾丁聚醣降解，接著研究降解作用對幾丁聚醣微粒的影響。而後為了得到更小分子量之幾丁聚醣，再透過分餾作用使更小分子量析出並觀察分餾作用對幾丁聚醣微粒粒徑之影響。

圖 4-14 未降解幾丁聚醣各分餾區段交聯微粒分析中可知大分子量幾丁聚醣有較大之微粒粒徑，另外圖 4-15 降解幾丁聚醣也有相同趨勢。比較分餾前未降解幾丁聚醣與降解幾丁聚醣微粒粒徑，未降解幾丁聚醣微粒粒徑 230 nm 大於降解幾丁聚醣微粒 206 nm，因為幾丁聚醣為長鏈狀高分子，而大分子量幾丁聚醣有較長之鏈長，溶於弱酸溶液後有較多之胺基可質子化，能與三聚磷酸鈉上磷酸根進行交聯反應，所以形成之交聯微粒粒徑較大。接著比較未降解及降解幾丁聚醣分餾前後交聯微粒粒徑之變化，分餾前粒徑為 233 nm，而分餾後粒徑為 170 nm，兩者分餾後幾丁聚醣交聯微粒都比分餾前小，因為分餾作用可使小分子量幾丁聚醣析出，接著研究各分餾區段幾丁聚醣交聯微粒粒徑變化可知，隨著分餾區段接近中性環境時微粒粒徑也隨之變大。另外從粒徑圖 4-16 中可看出微粒分布情形，未分餾幾丁聚醣微粒為雙峰分佈且大粒徑峰的強度大於小粒徑峰的強度，而分餾後未降解及降解幾丁聚醣微粒仍為雙峰分佈，但小粒徑峰的強度皆有變大的趨勢。分餾前交聯微粒介面電位為+42mV，而分餾後交聯微粒為+19mV，因為隨著分餾區段接近中性時，所交聯出之微粒粒徑變大，因此微粒表面有較多胺基正電荷，所以介面電位隨之變大。

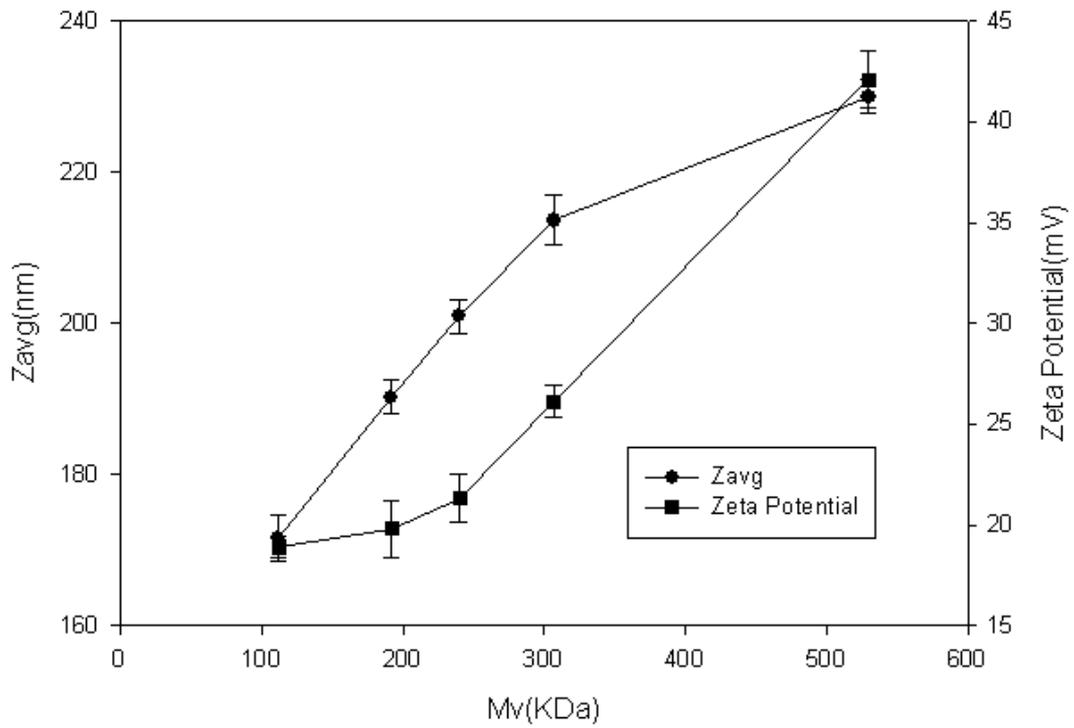


圖 4-14 未降解幾丁聚醣各分餾區段交聯微粒之分析

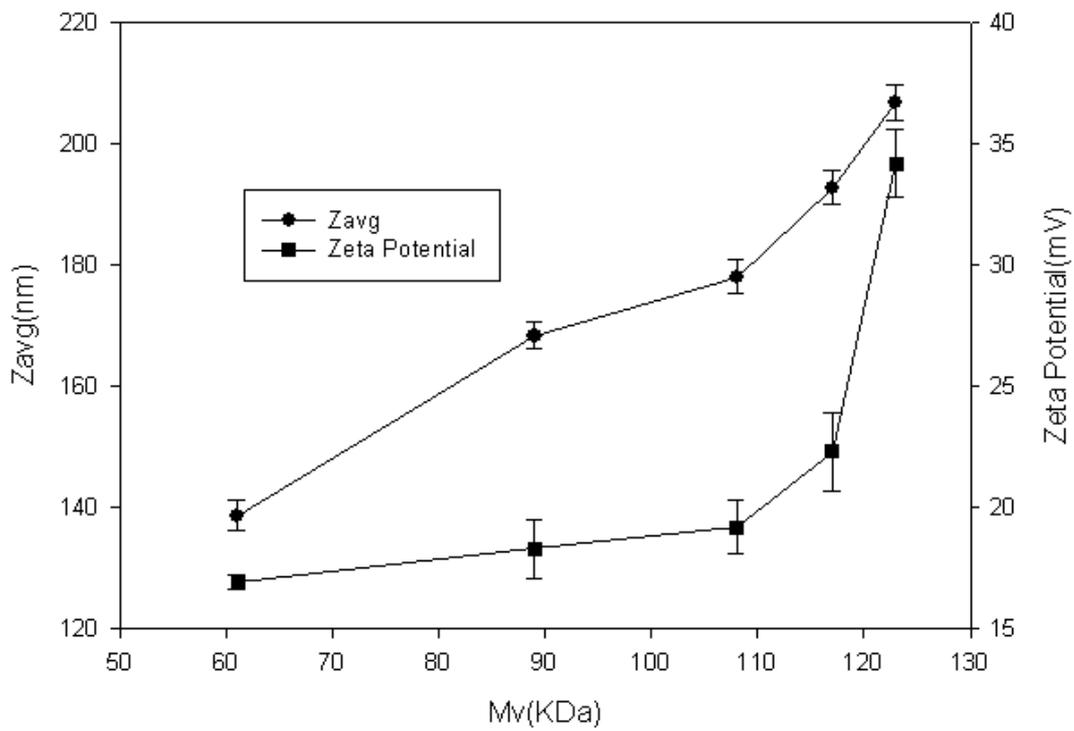
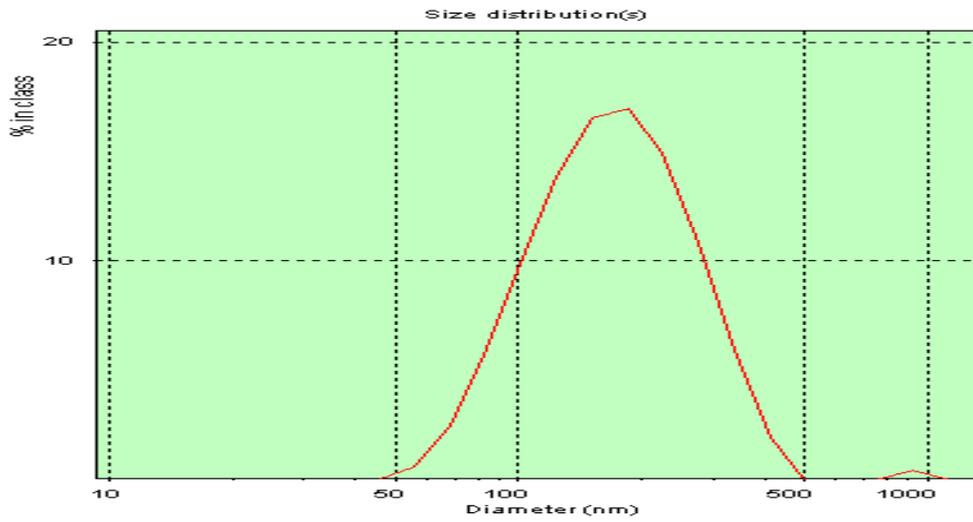
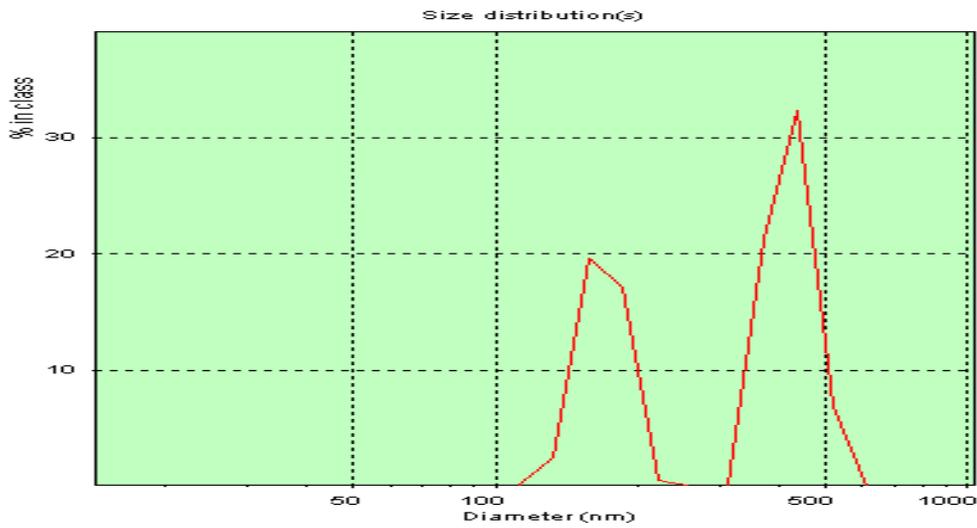


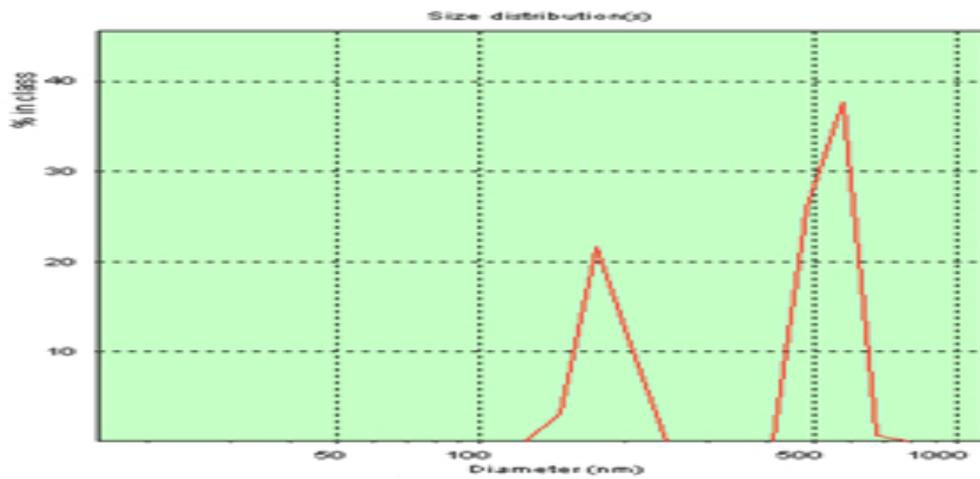
圖 4-15 降解幾丁聚醣各分餾區段交聯微粒之分析



(a)



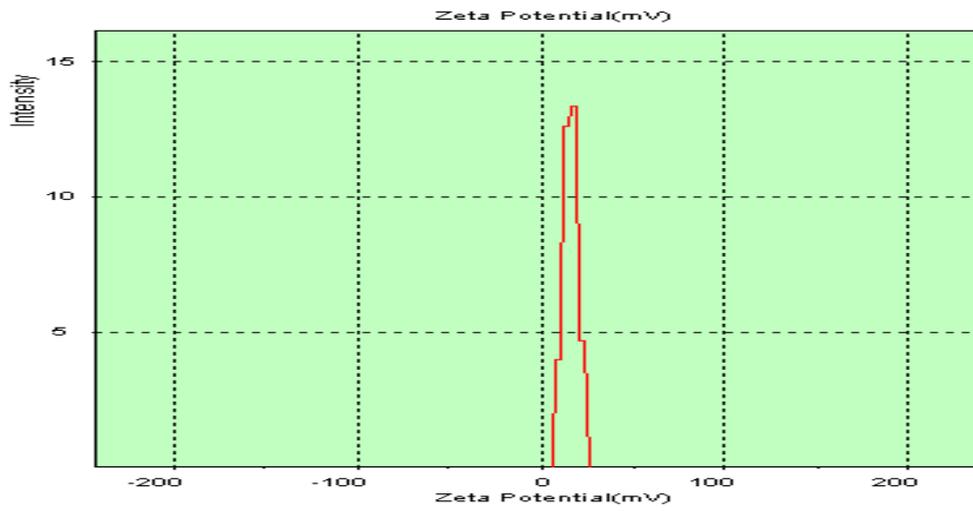
(b)



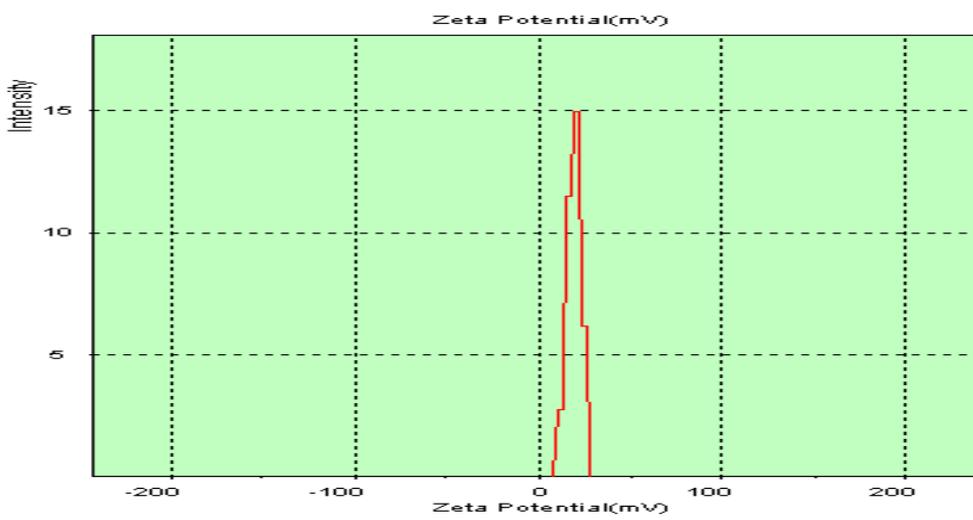
(c)

圖 4-16 不同分子量幾丁聚醣微粒粒徑圖

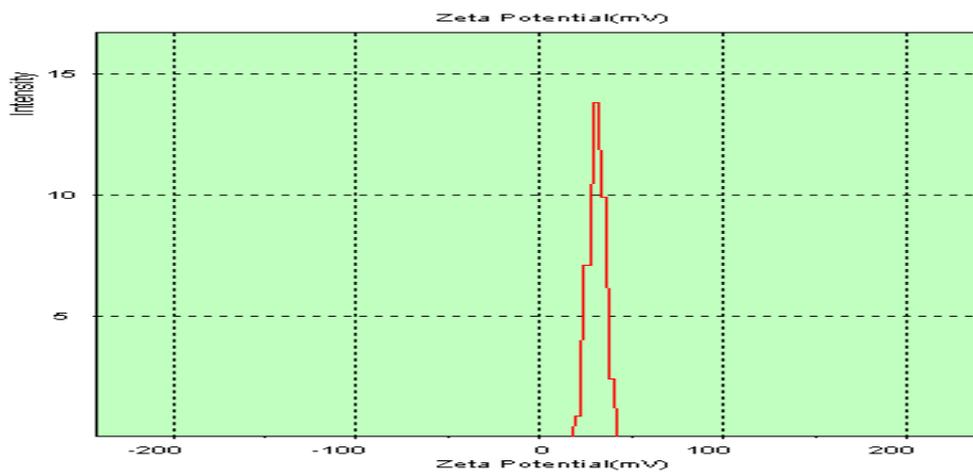
(a)Mv=61KDa (b)Mv=123KDa(c)Mv=530KDa



(a)



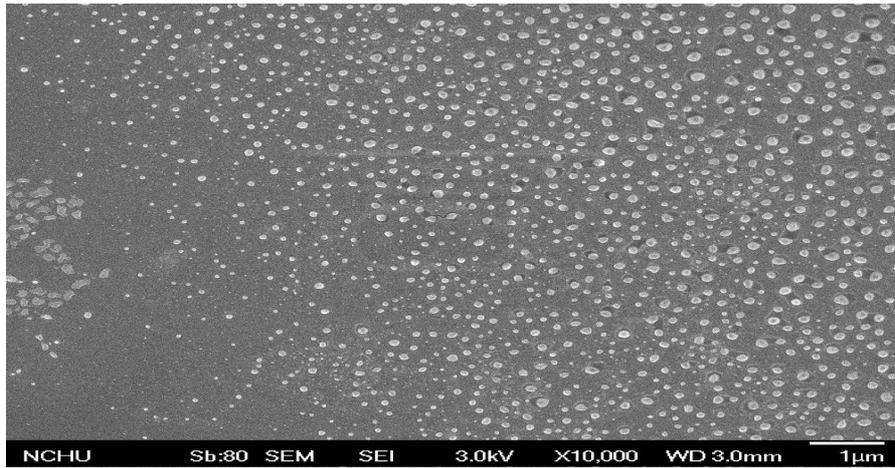
(b)



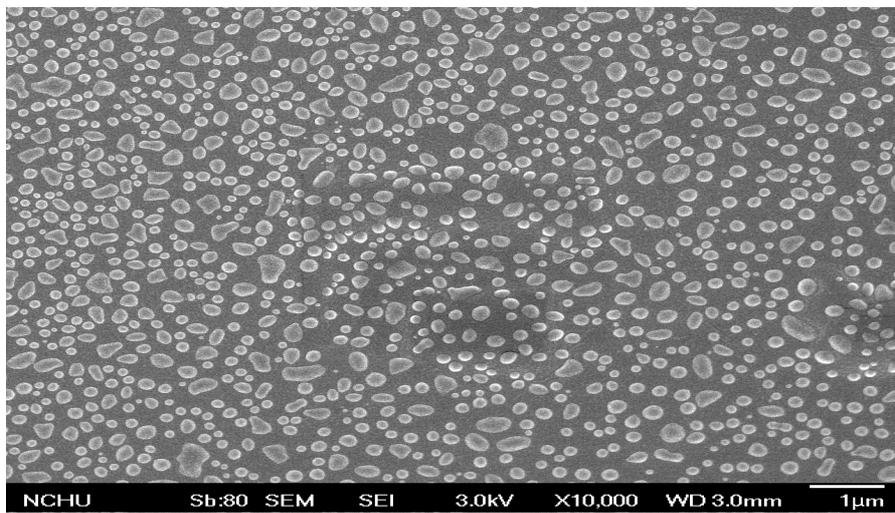
(c)

圖 4-17 不同分子量幾丁聚醣微粒介面電位圖

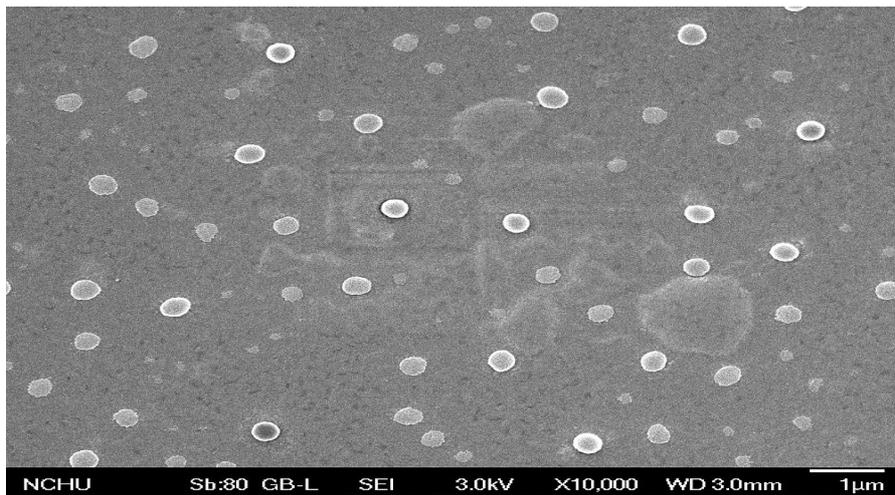
(a)Mv=61KDa (b)Mv=123KDa(c)Mv=530KDa



(a)



(b)

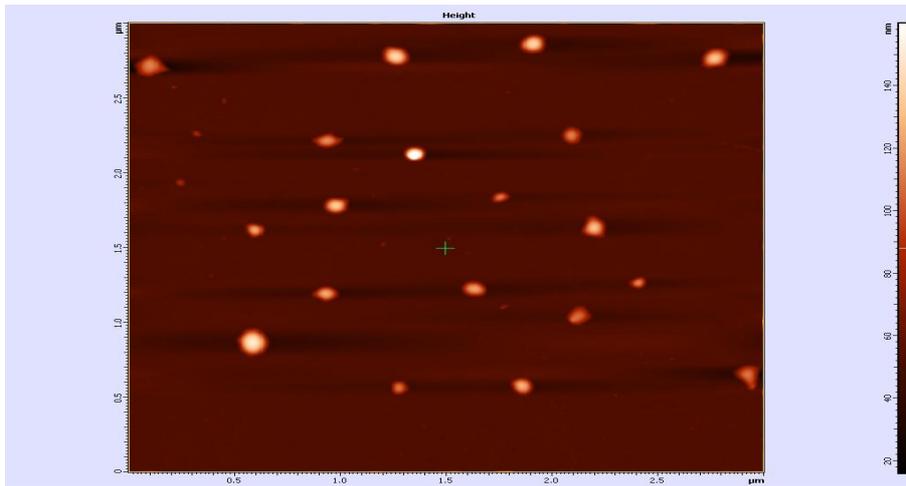


(c)

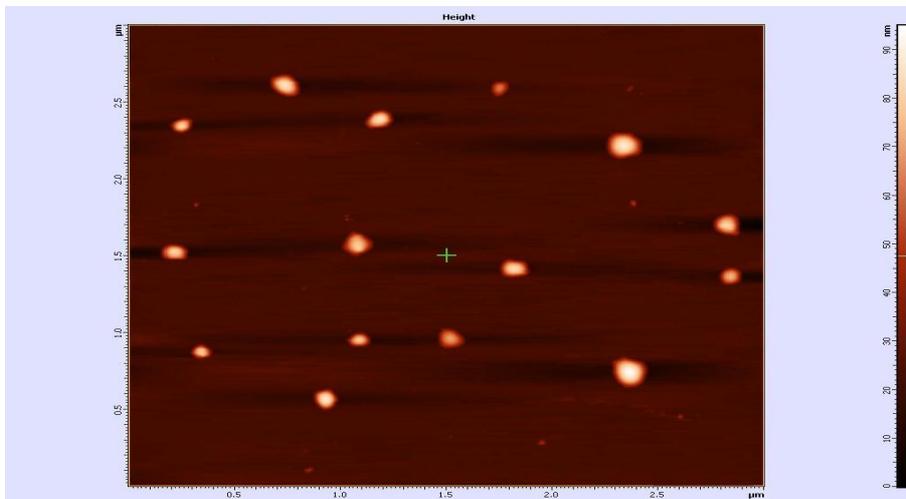
圖 4-18 不同分子量幾丁聚醣微粒 SEM 圖
(a)Mv=61KDa (b)Mv=123KDa(c)Mv=530KDa

4-2-4 原子力顯微鏡微結構觀測

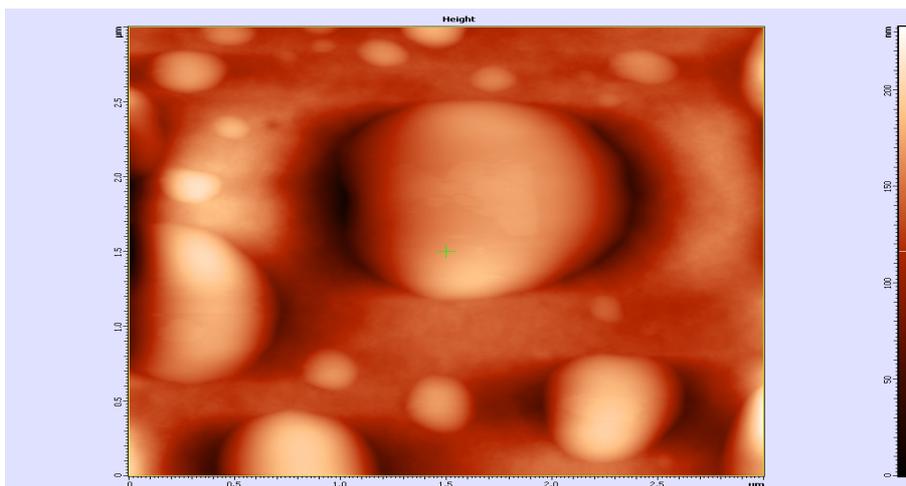
原子力顯微鏡可觀察微粒大小、分散狀態及微粒表面狀態，圖 4-19 為不同分子量幾丁聚醣微粒，分子量 530KDa 微粒分佈範圍為 200nm~800nm；分子量 123KDa 微粒分佈範圍為 100~200nm；分子量 61KDa 微粒分佈範圍為 80nm~150nm，由此可知隨著分子量變小，微粒大小分佈變得較均勻且微粒皆有變小的變化，另外 AFM 圖可判斷交聯微粒表面狀態，從圖中可知無論的分子量大小，微粒皆為光滑狀態。



(a)



(b)



(c)

圖 4-19 不同分子量幾丁聚醣微粒 AFM 圖
 (a)Mv=61KDa (b)Mv=123KDa(c)Mv=530KDa

4-3 包覆微粒性質探討

文獻回顧^[29,32,33,42]有提及 BSA 包覆受到許多變因的影響，如：溶液 pH 值、幾丁聚醣分子量、BSA 濃度、幾丁聚醣濃度等，而本研究先找出擁有較好包覆率之 pH 值，再進一步研究 BSA 濃度及分子量對包覆率之影響。

4-3-1 pH 值對包覆微粒測試

因 BSA 等電位為 4.8，當溶液 pH 值大於 4.8 時，進行包覆時必須考慮物理性包覆及吸附作用，從圖 4-20 可知包覆微粒粒徑隨著 pH 增加而變大，而 pH5 及 pH6 進行包覆時，必須考慮 BSA 的吸附效應，而介面電位變化則為包覆後微粒較小，是因為交聯微粒未反應之胺基正電與 BSA 之負電透過離子鍵結作用，使得微粒表面正變荷數目減少，因此介面電位變小。

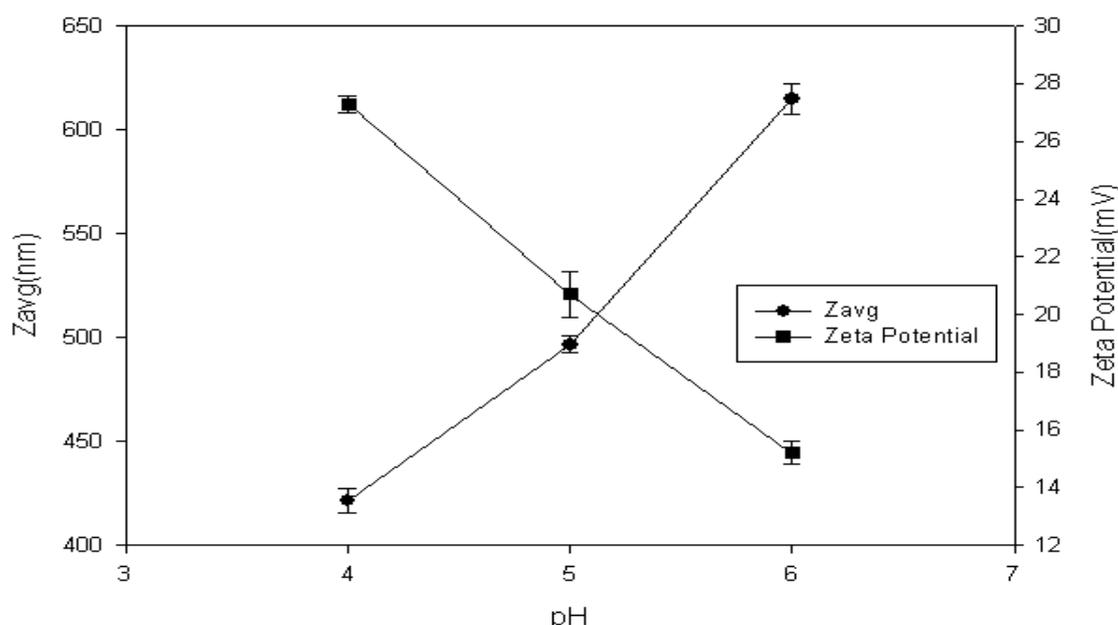
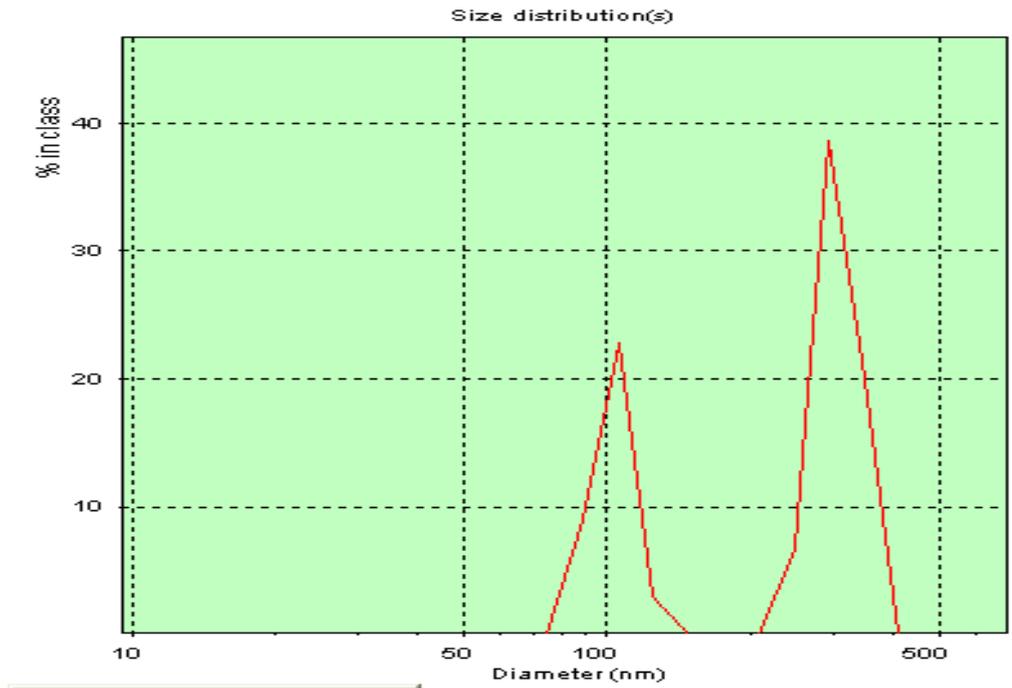
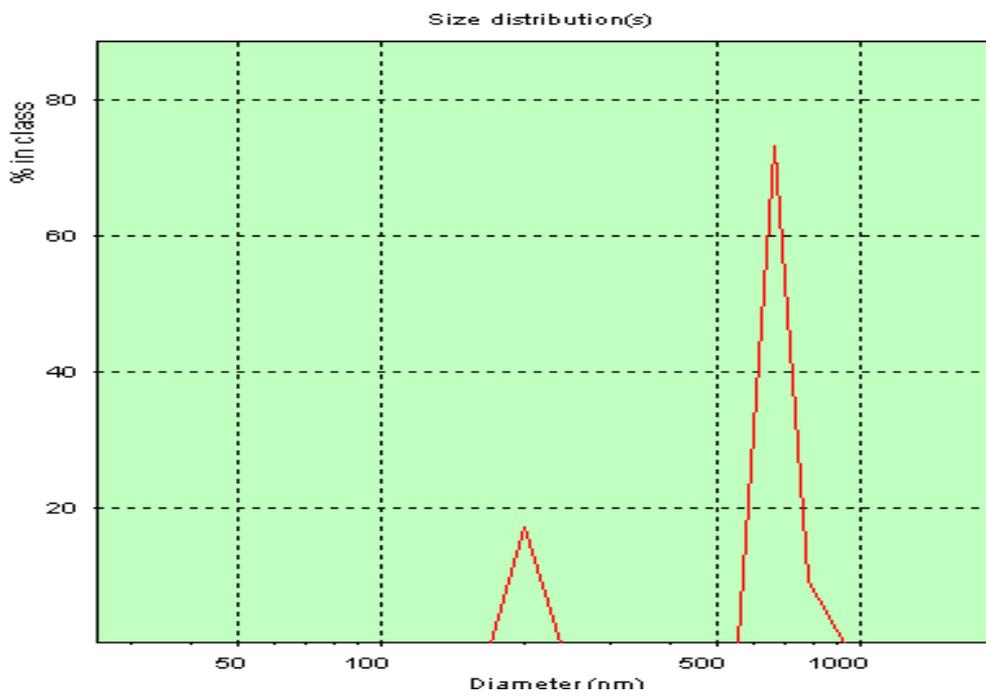


圖 4-20 pH 值對包覆微粒及介面電位影響



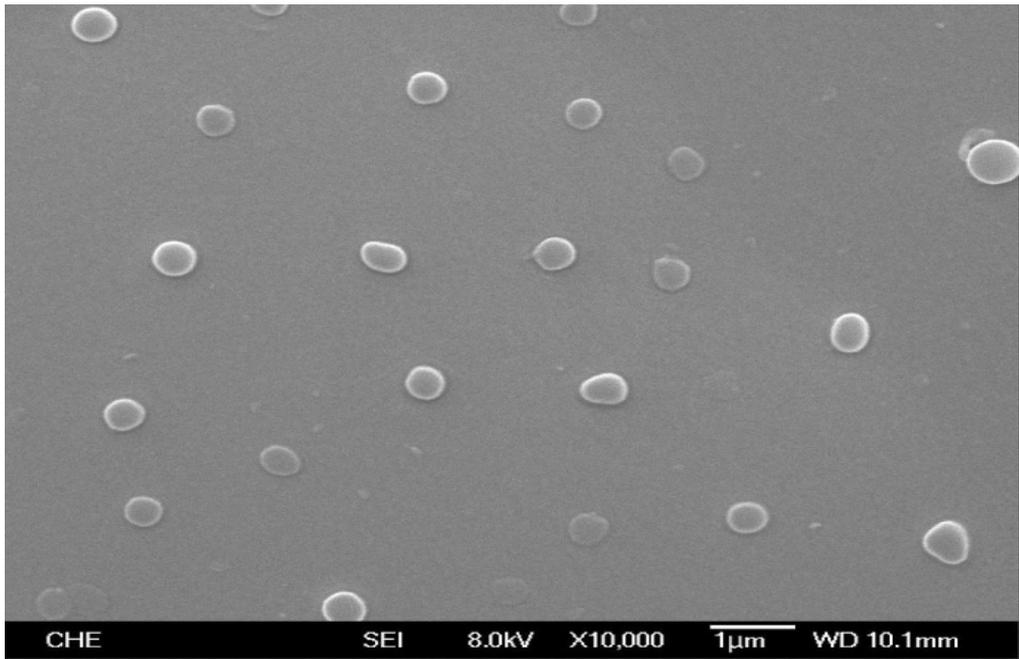
(a)



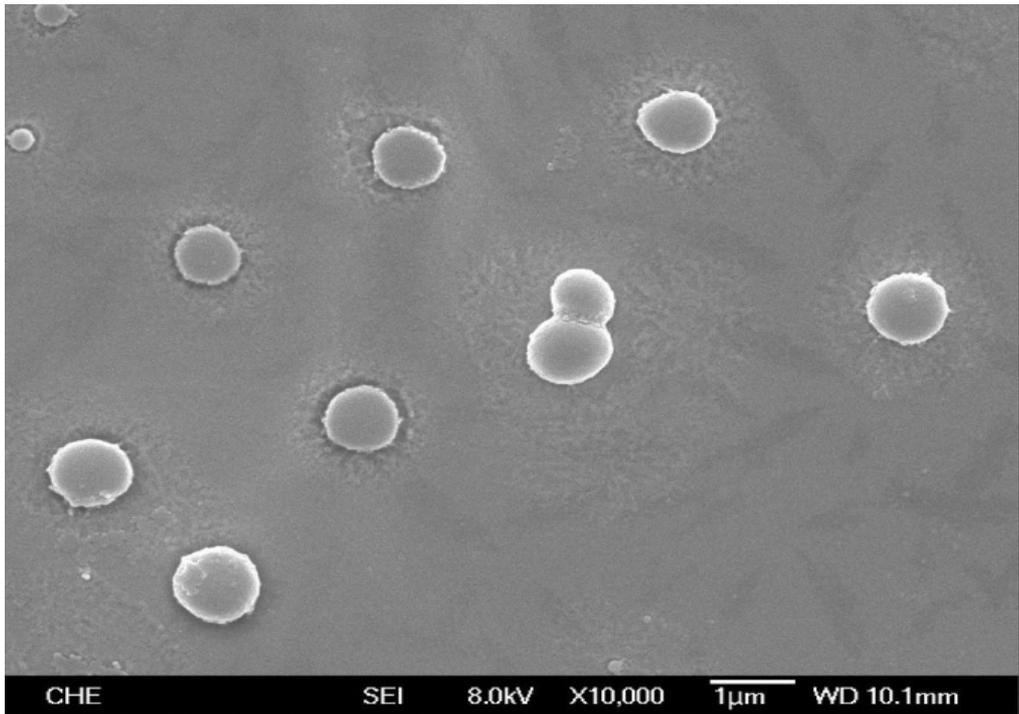
(b)

圖 4-21 不同 pH 值包覆微粒徑分佈圖

(a)pH4(b)pH6



(a)



(b)

圖 4-22 不同 pH 值包覆微粒 SEM 圖

(a)pH=4(b)pH=6

4-3-2 pH 值對包覆率及負載率影響

本研究利用牛血清蛋白來進行包覆實驗，實驗中 BSA 總量 5mg，由圖 4-23 可知包覆率隨著 pH 值增加而變大，因為牛血清蛋白等電位為 4.8，當溶液 pH 值大於 4.8 時即帶負電，所以進行包覆時除了物理性包覆仍需考慮吸附效應。吸附效應是因為幾丁聚醣微粒表面仍有未反應之正電荷，此時 BSA 藉由離子鍵結與微粒上正電荷反應，進一步研究吸附量與 pH 值關係，由表 4-8 中可知 BSA 的確有吸附至微粒上且吸附量 pH 值 4 為 0.02mg，然而 pH 值 6 為 0.29mg，吸附量的確隨著 pH 值增加吸附量也變多。

負載率則隨著 pH 值增加而變小，然而負載率必須考慮微粒之產率，由表 4-7 可知微粒產率 pH 值 4 為 18.56%，然而 pH 值 6 時產率為 64.24%有明顯增加，而表 4-6 BSA 包覆量與 pH 值關係，與產率有相同變化，然而負載率算法為 BSA 包覆量除上微粒重，各 pH 值 BSA 包覆量分別為 1.06、1.20、1.94、2.15mg，而微粒重分別為 2.32、3.30、6.11、8.03mg，兩者相除後結果，負載率隨 pH 值增加而變小。

因 pH6 有最佳之包覆率及產率，本研究選定 pH 6 進行包覆實驗，並研究不同 BSA 濃度、不同分子量幾丁聚醣與包覆率及負載率之關係。

pH 值	pH4	pH5	pH5.5	pH6
重量(mg)	1.06±0.07	1.20±0.07	1.94±0.01	2.15±0.10

表 4-6 BSA 包覆量與 pH 值關係

pH 值	pH4	pH5	pH5.5	pH6
產率(%)	18.56±2.00	26.40±3.00	48.89±1.92	64.24±1.44

表 4-7 微粒產率與 pH 值關係

pH 值	pH4	pH5	pH5.5	pH6
重量(mg)	0.02±0.003	0.11±0.01	0.18±0.02	0.29±0.04

表 4-8 BSA 吸附量與 pH 值關係

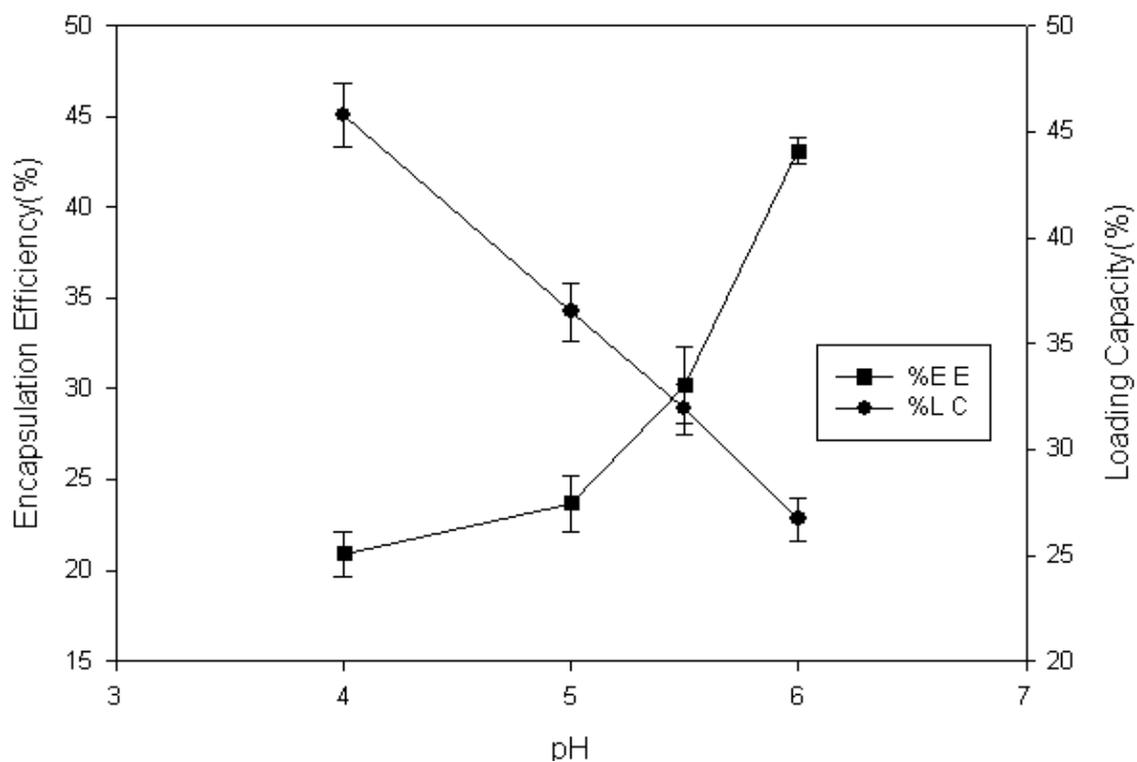


圖 4-23 pH 值對包覆率及負載率分析

4-3-3 BSA 濃度對包覆微粒測試

圖 4-24 不同濃度與微粒粒徑變化可知，微粒粒徑隨著濃度增加而變大，且濃度 2.0mg/ml 微粒粒徑為 1147nm，而微米級顆粒不但難以被吸收且藥物釋放速率不佳。介面電位變化則隨著濃度增加而變小，代表 BSA 濃度變大時，有較多之 BSA 吸附至微粒表面上，微粒表面正電荷數目隨著濃度增加而減少。

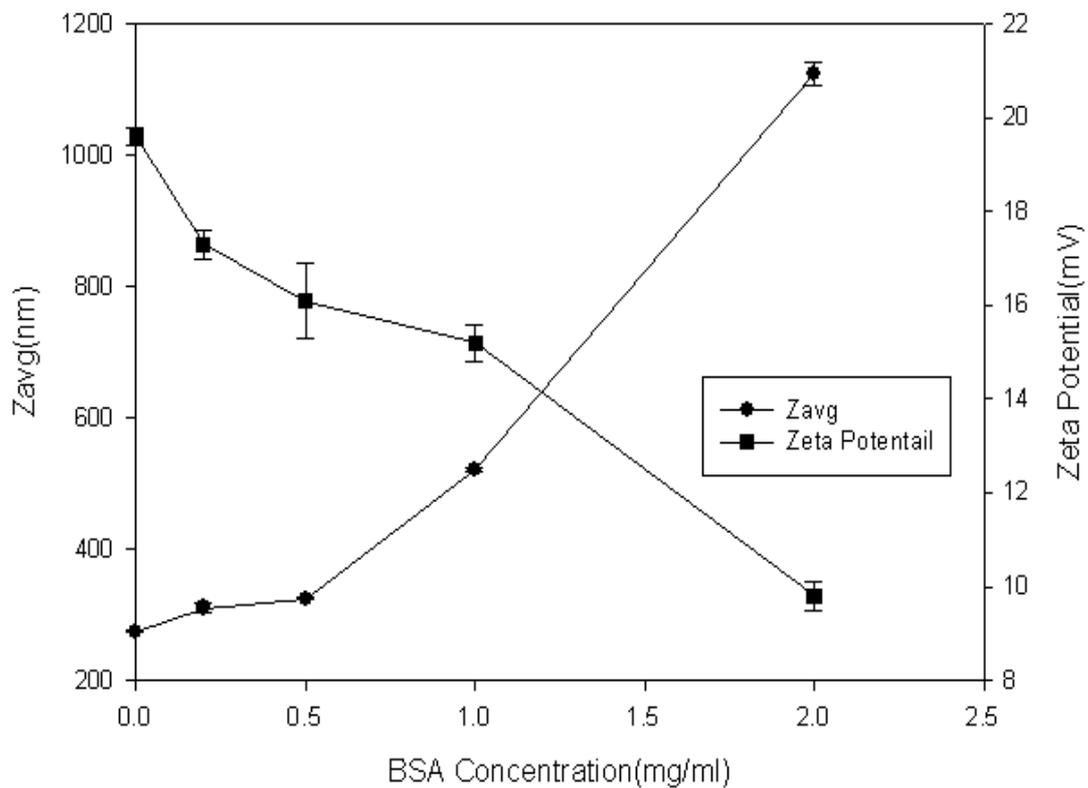
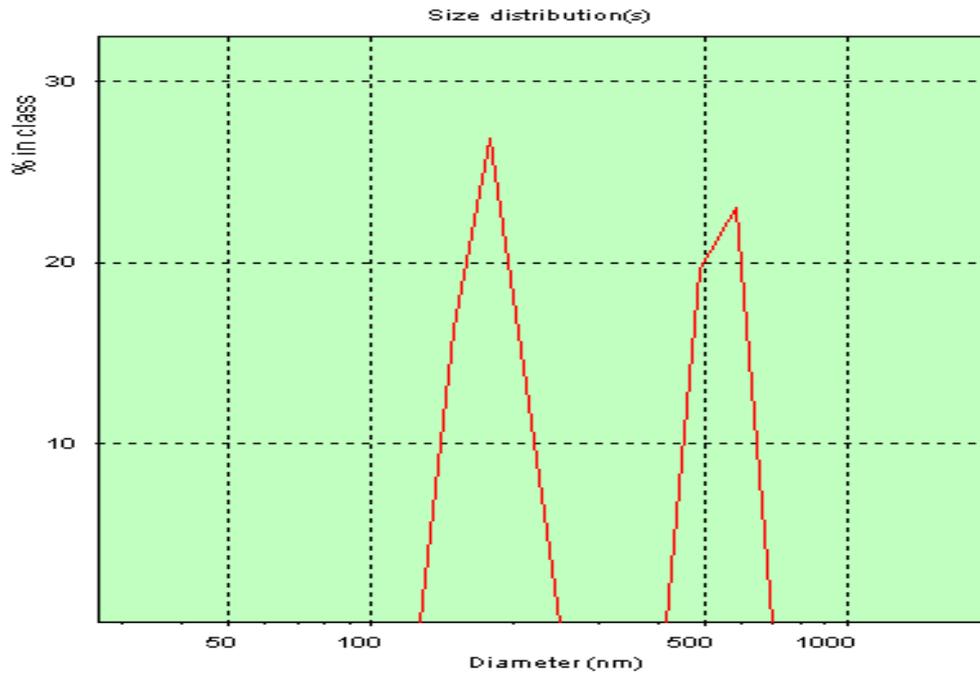
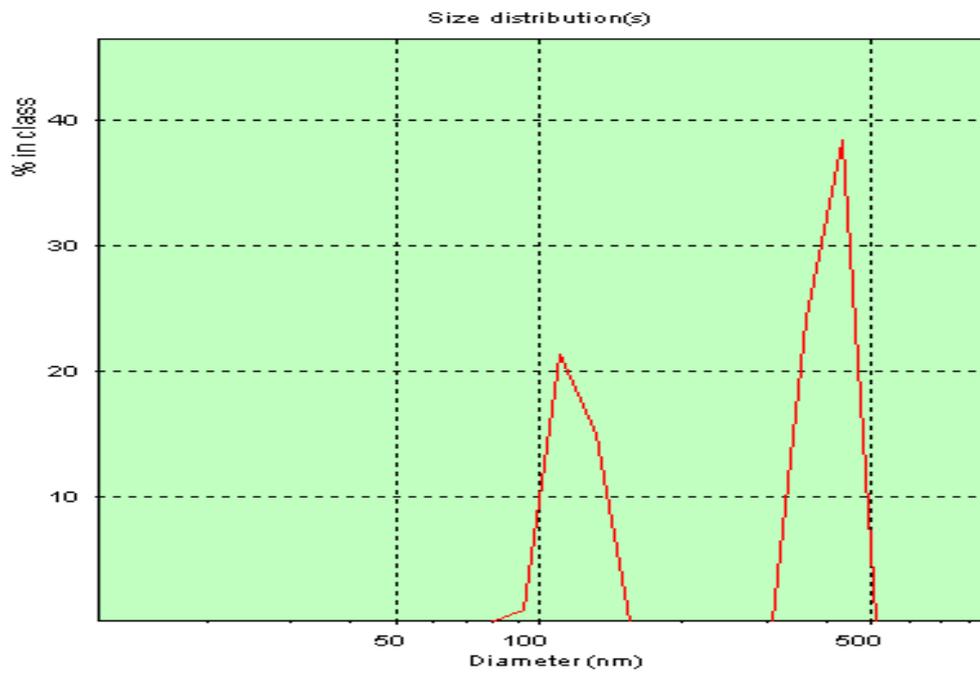


圖 4-24 BSA 濃度對包覆微粒及介面電位影響



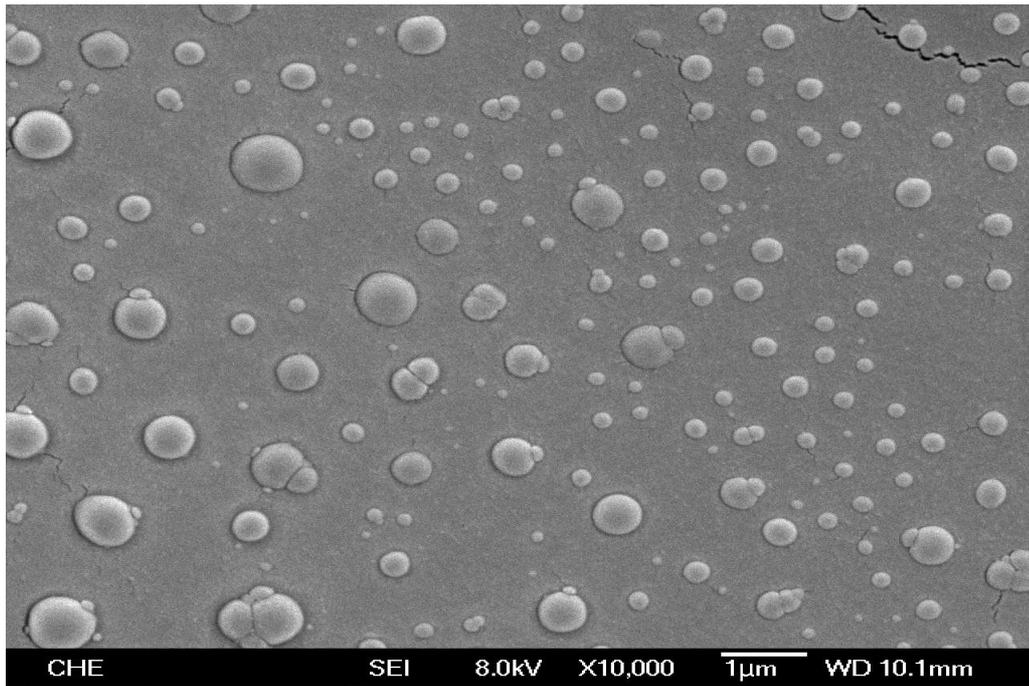
(a)



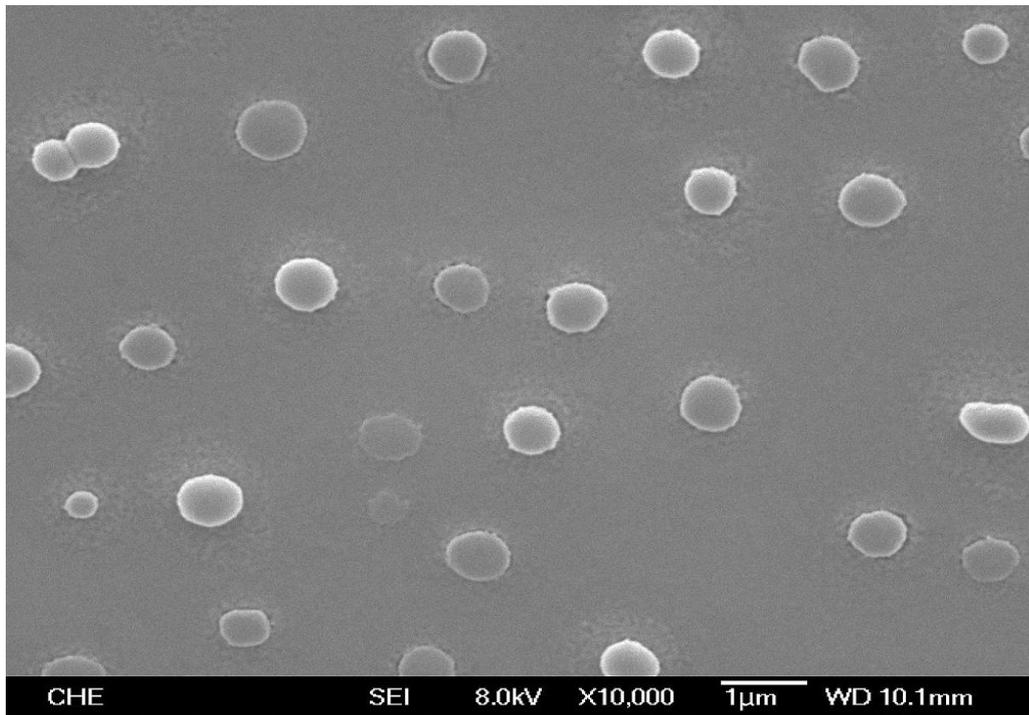
(b)

圖 4-25 不同 BSA 濃度包覆微粒徑分佈圖

(a)0.2mg/ml(b)1.0mg/ml



(a)



(b)

圖 4-26 不同 BSA 濃度包覆微粒 SEM 圖

(a)0.2mg/ml(b)1.0mg/ml

4-3-4 BSA 濃度對包覆率及負載率影響

目前相關文獻^[32,33,42] 研究 BSA 濃度與包覆率關係有不同結果。Xu^[32] 等學者研究隨著 BSA 濃度變大包覆率變小，然而 Quan^[42] 等學者結果為包覆率隨著 BSA 濃度增加而變大，並解釋隨著濃度的增加，包覆後微粒為多層結構，有較多之 BSA 吸附之微粒表面，使得包覆率上升。

由圖 4-27 看出包覆率隨著 BSA 濃度增加從 91%減小至 28%，而負載率則隨著 BSA 濃度上升從 14%增加至 34%，接著進一步作重量分析由表 4-9 與表 4-10 可知包覆量及微粒產率皆隨著濃度增加而變大，然而本研究將幾丁聚醣溶液體積固定 5ml，此時各濃度為相對值，隨著濃度增加溶液中 BSA 總量也相對增加，包覆率因此下降。微粒產率的變化隨著 BSA 濃度增加而變大，因為有較多之 BSA 可與微粒作用因此產率增加。然而隨著濃度上升，微粒產量分別為 6.6、6.9、7.7、8.1mg，而負載率算法為包覆量除微粒產量，各濃度計算出之負載率分別為 13.7、22.8、28.3、34.4%，所以負載率隨著 BSA 濃度增加而變大。

微粒進行包覆實驗時，濃度 2.0mg/ml 包覆後微粒粒徑大於 1 μ m，且將近 70%之 BSA 無法包覆於微粒內，而濃度 0.2mg/ml 有最大之包覆率但因負載率太小，無法維持有效濃度。本研究於濃度 1.0mg/ml 發現包覆微粒為奈米級且有合適之包覆率及負載率，故選擇此濃度。

濃度(mg/ml)	0.2	0.5	1.0	2.0
重量(mg)	0.91±0.11	1.58±0.11	2.18±0.08	2.79±0.20

表 4-9 BSA 包覆量與濃度關係

濃度(mg/ml)	0.2	0.5	1.0	2.0
產率(%)	52.80±5.04	55.28±4.16	62.16±2.48	65.12±2.32

表 4-10 微粒產率與濃度關係

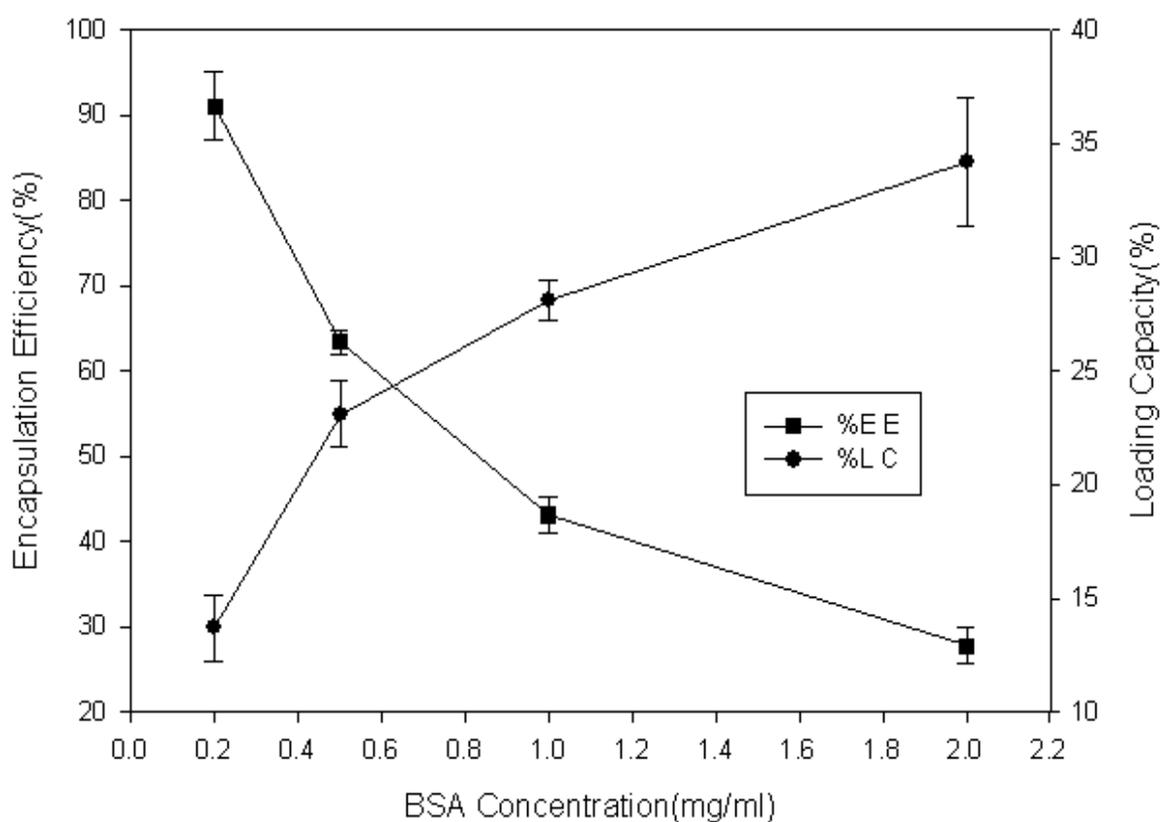


圖 4-27 BSA 濃度對包覆率與負載率分析

4-3-5 分子量對包覆微粒測試

幾丁聚醣為直鏈天然性高分子，分子量之幾丁聚醣擁有較長之鏈長，而本研究先使用鹽酸降解高分子量幾丁聚醣，再透過分餾作用使小分子幾丁聚醣析出，而不同分子量包覆微粒測試，由圖 4-28 可知包覆微粒隨分子量增加從 340 nm 變大至 610 nm，因大分子量幾丁聚醣有較長之長鏈，當進行包覆反應時可包覆較多 BSA，而介面電位亦從 10.8 mV 變大至 15.2 mV。因為本研究將幾丁聚醣溶液 pH 值設為 6，此時進行包覆必須考慮吸附作用，另外文獻^[36]有提及物理性包覆與離子鍵結兩種機制。

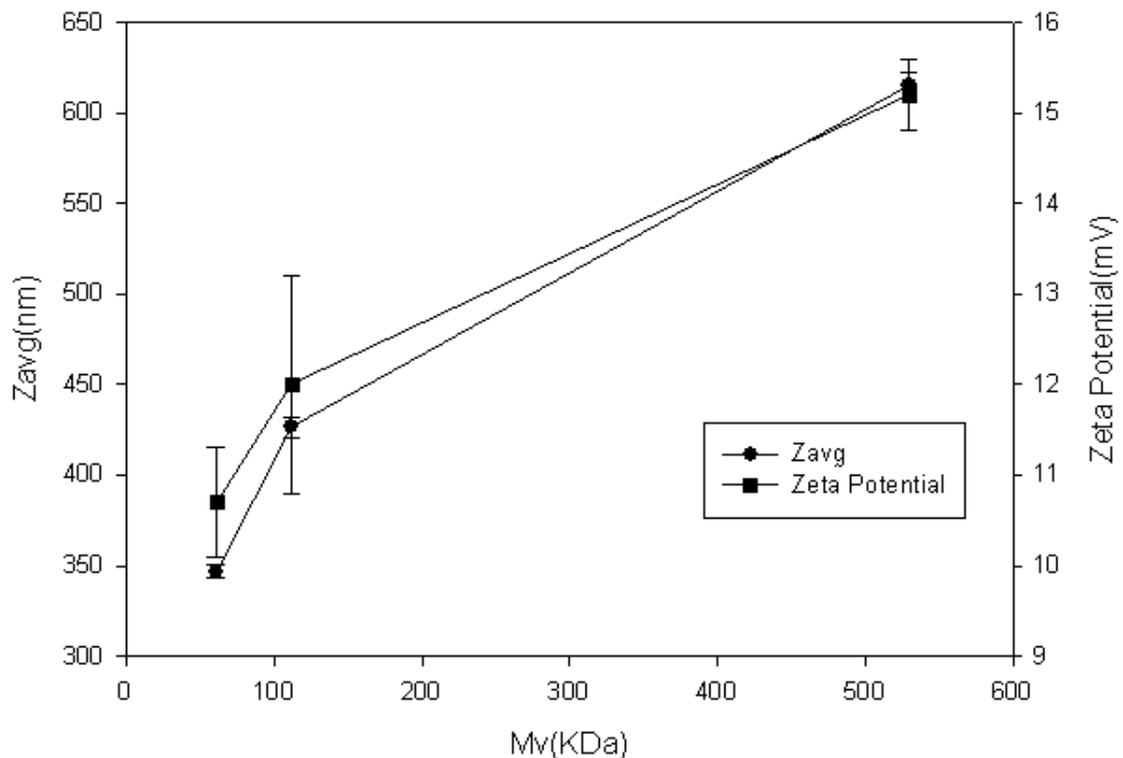
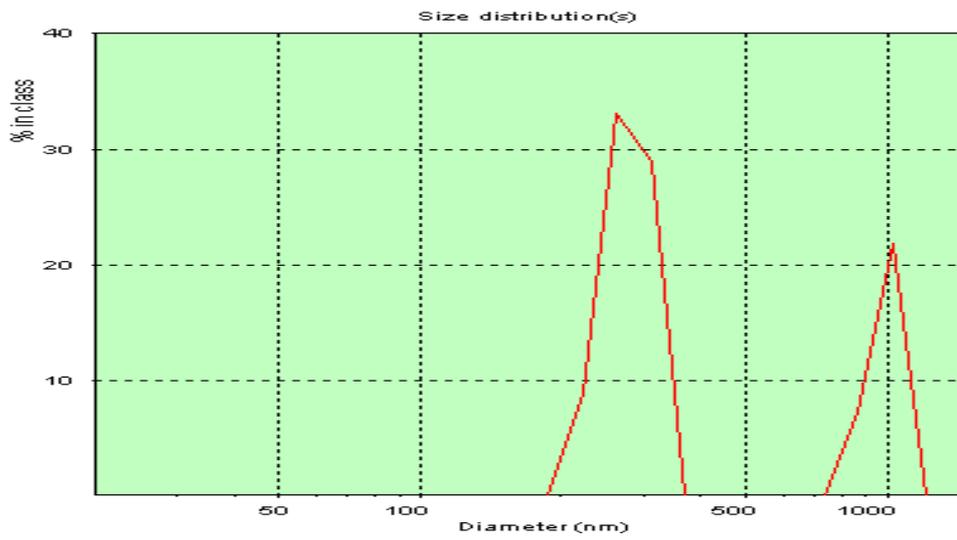
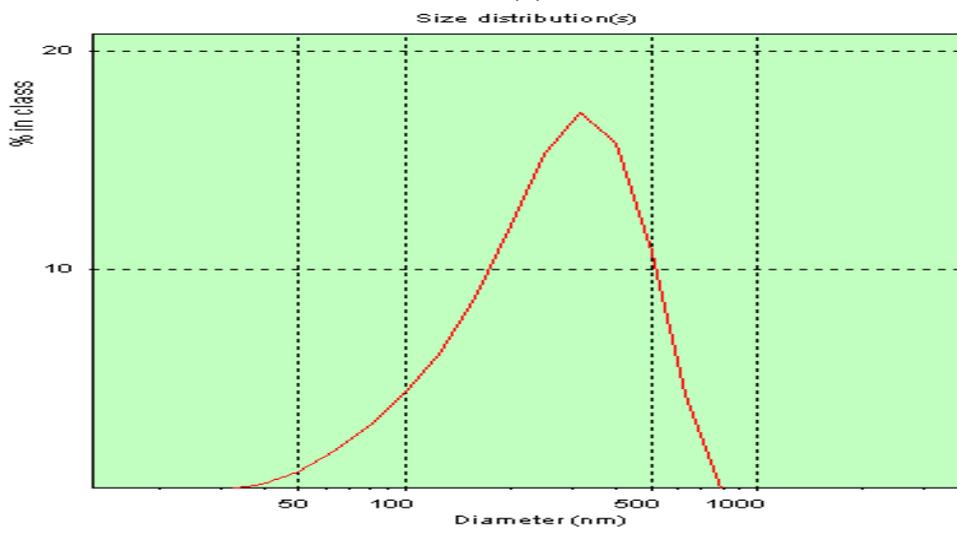


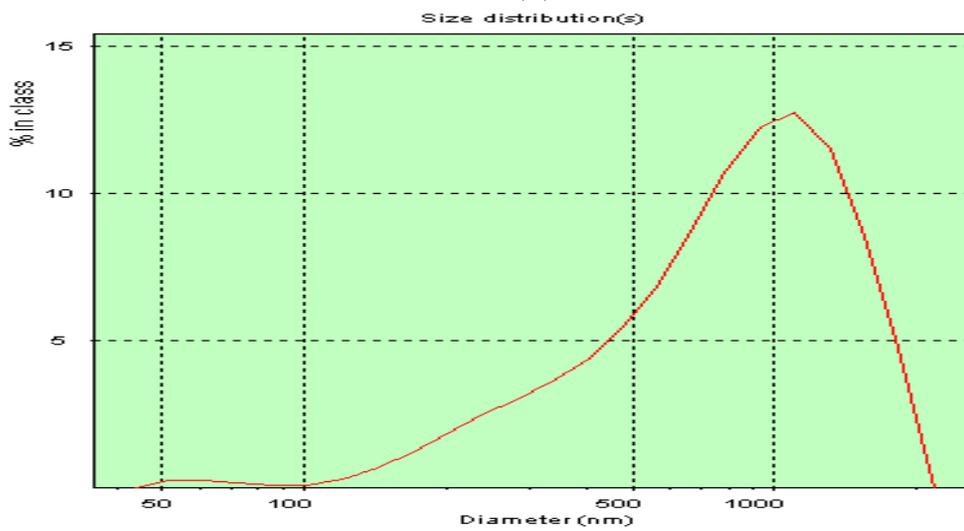
圖 4-28 分餾作用對未降解幾丁聚醣微粒影響



(a)



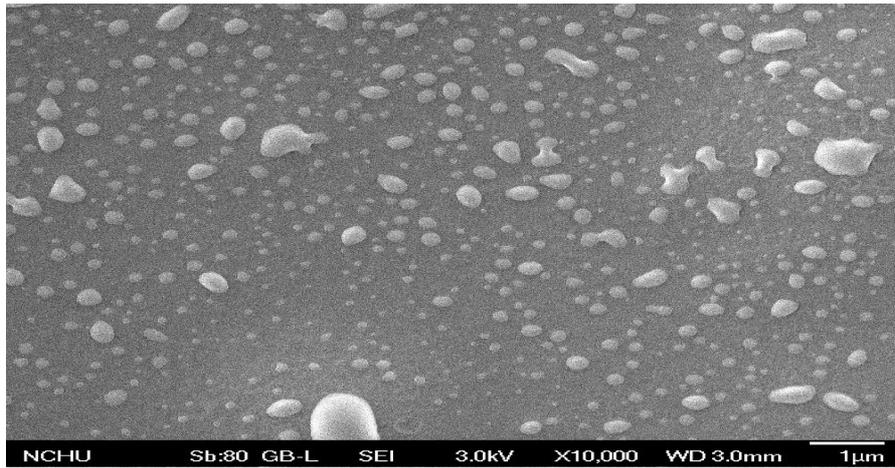
(b)



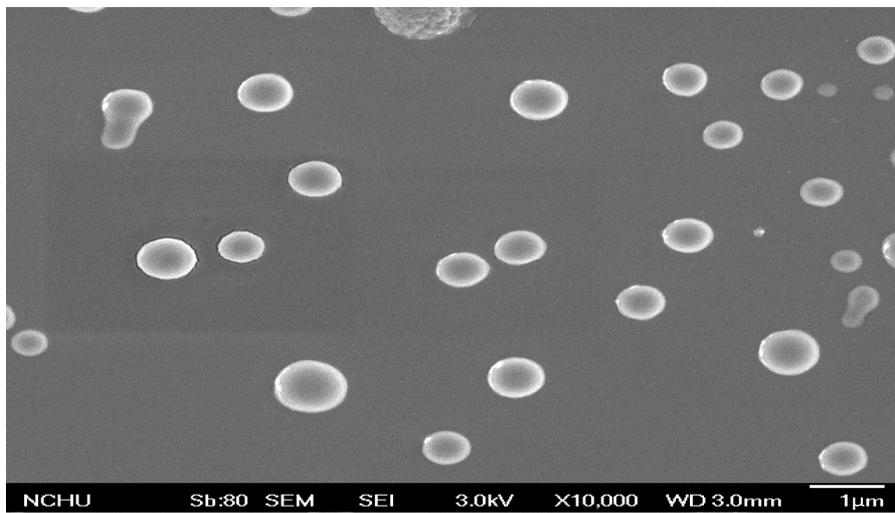
(c)

圖 4-29 不同分子量幾丁聚醣微粒粒徑圖

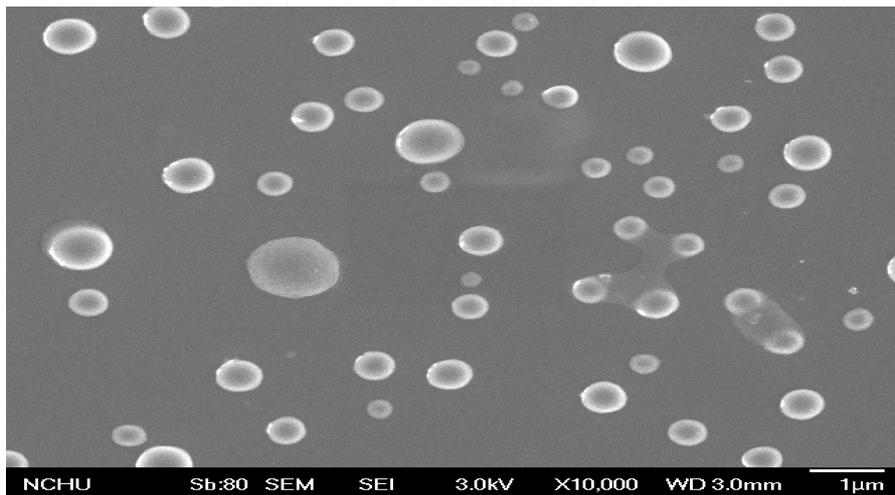
(a) $M_v=61\text{KDa}$ (b) $M_v=123\text{KDa}$ (c) $M_v=530\text{KDa}$



(a)



(b)



(c)

圖 4-30 不同分子量幾丁聚醣微粒 SEM 圖
(a)Mv=61KDa (b)Mv=123KDa(c)Mv=530KDa

4-3-6 分子量對包覆率與負載率影響

表 4-11 及表 4-12 可知包覆率隨著分子量增加，從 14% 變大至 42%，因為幾丁聚醣鏈長隨著分子量變大而變長，當包覆反應進行時，長鏈之幾丁聚醣有利於包覆所以有較好之包覆率。負載率變化則隨著分子量增加，從 17% 變大至 26%，而負載率與微粒重有關，進一步作包覆量及微粒產率分析，包覆量隨著分子量變大而增加，但分餾後微粒產量變小，然而負載率計算為包覆量除微粒重，而結果為負載率隨著分子量增加而變大。

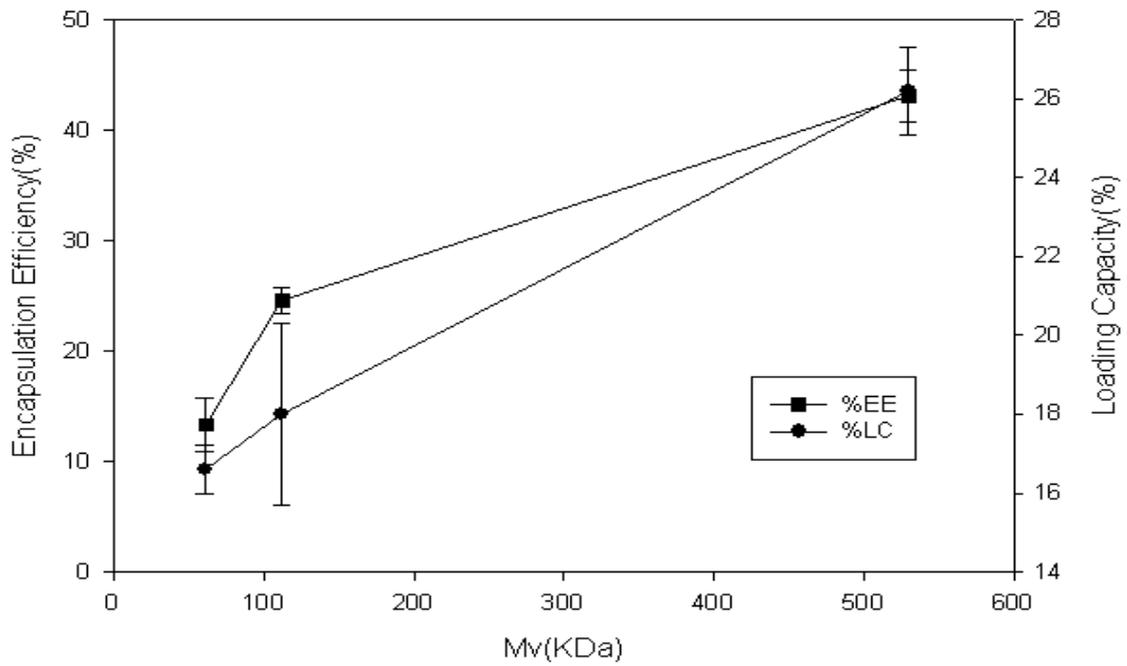


圖 4-31 分子量與包覆率及負載率關係

Mv(KDa)	530	123	61
重量(mg)	2.16±0.12	1.81±0.20	0.67±0.12

表 4-11 包覆量與分子量關係

Mv(KDa)	530	123	61
產率(%)	63.20±1.44	71.20±2.24	32.08±0.88

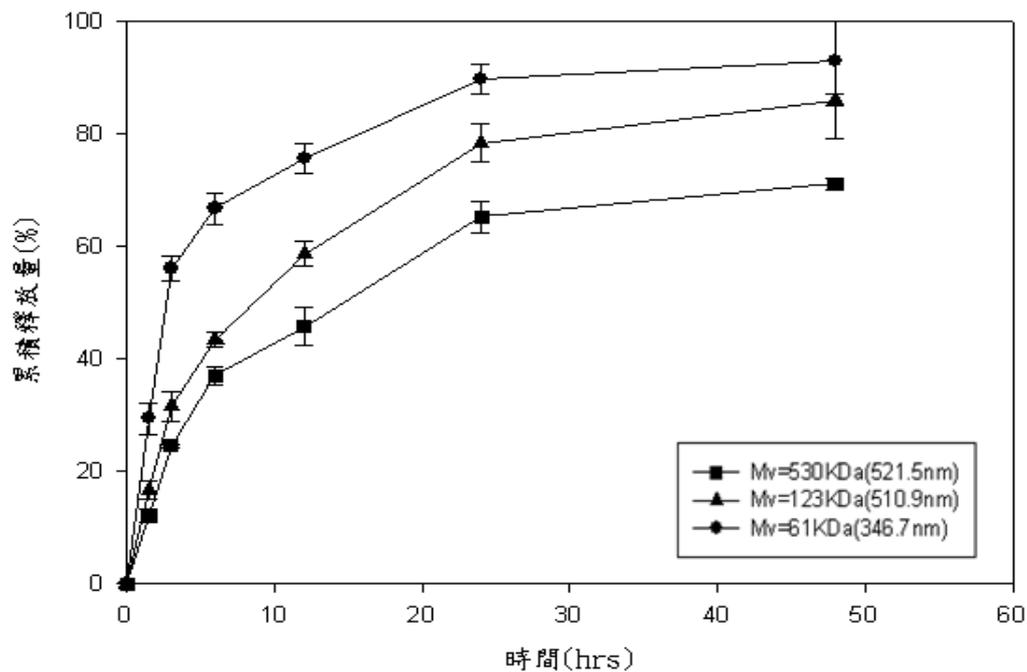
表 4-12 微粒產率與分子量關係

4-4 釋放速率

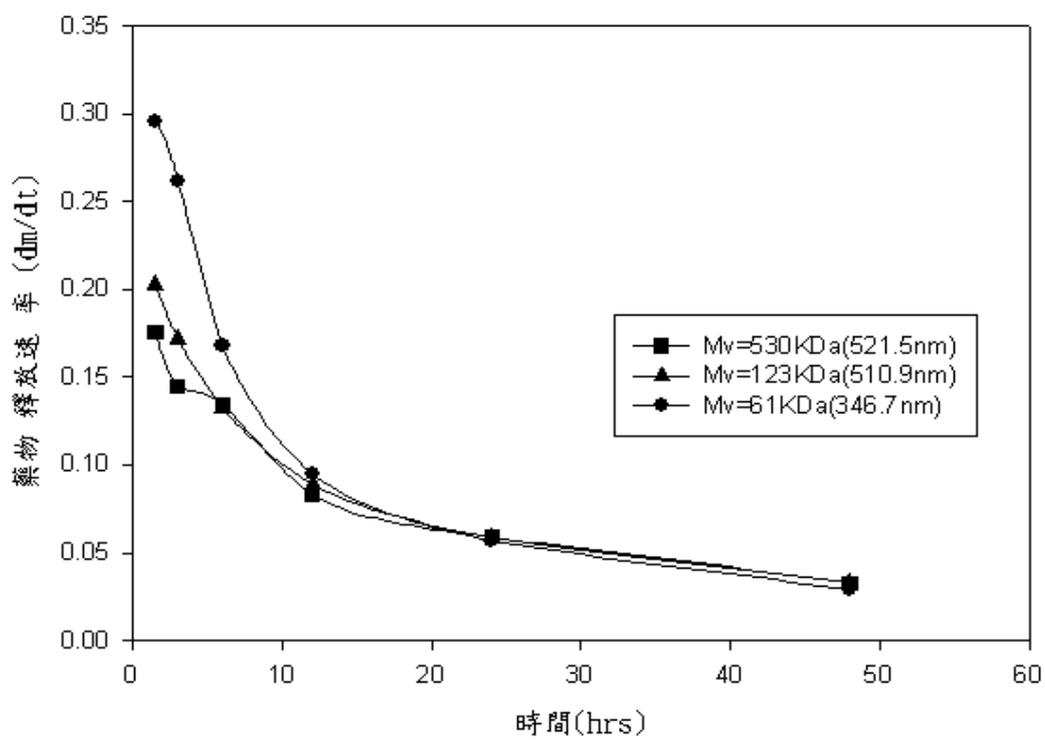
傳統藥物釋放速率難以控制，因此增加病患服藥次數，而控制型藥物釋放可延長藥物釋放且有較佳之釋放速率。目前許多生分性材料被作為藥物載體，當藥物被包覆後並受到保護，進入人體更能有效地被吸收。

4-4-1 酸性環境(pH1.2)釋放速率

由圖 4-32 中可知小粒徑微粒釋放速率較快，因酸性環境下，CS 與 TPP 之間作用力減弱，使得微粒結構鬆散，有較好之滲透性，所以小粒徑微粒釋放速率較快。文獻回顧中有提及微粒包覆主要分為核殼式及均勻分散式，為了研究包覆 BSA 模式，進一步作了溶離曲線，由曲線中可知微粒包覆模式為均勻式分散，而分子量大小皆有相同包覆模式。



(a)



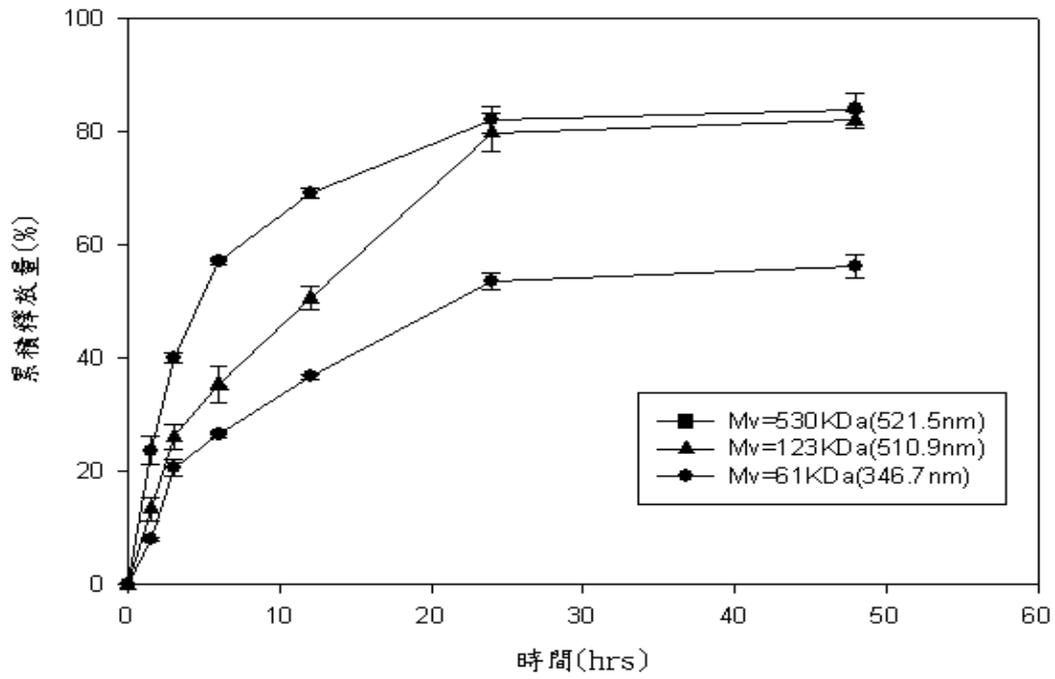
(b)

圖 4-32 酸性環境釋放及溶離曲線

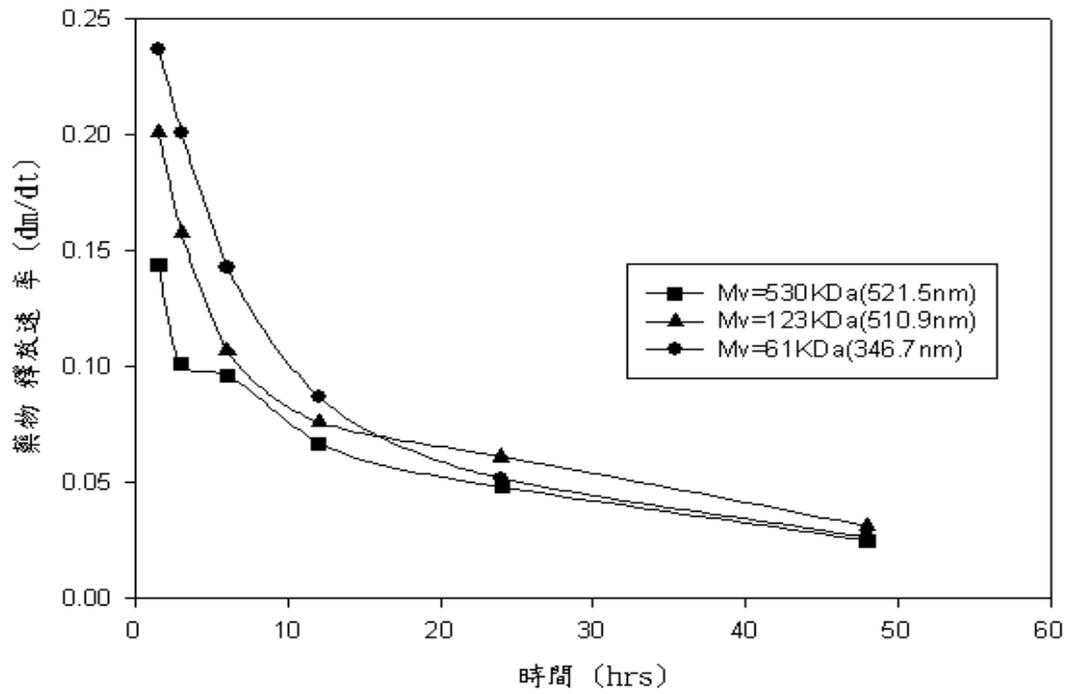
(a) 釋放曲線(b)溶離曲線

4-4-2 弱鹼性環境(pH7.4)釋放速率

弱鹼性釋放速率與酸性釋放速率有相同趨勢，小分子量幾丁聚糖微粒釋放速率較好。弱鹼性時 CS 與 TPP 作用必須考慮離子強度，因為此時 CS 與 TPP 靠氫鍵及離子作用力鍵結；酸性之環境使 TPP 有還原作用產生，使得 CS 與 TPP 之間作用力減弱，因此微粒結構鬆散，進一步作酸鹼環境釋放速率比較，酸性環境釋放速率比弱鹼性佳。酸性環境下，分子量 61KDa 之幾丁聚糖微粒於 3 小時釋放量已超過 50%，於弱鹼性環境中，分子量 61KDa 之幾丁聚糖微粒超過 6 小時釋放量才會超過 50%，然而隨著分子量變大，釋放速率變得不佳，因為大微粒包覆 BSA 量較多，微粒結構較緊實，滲透速率較慢。接著研究溶離曲線，曲線符合均勻分散式包覆，無論分子量大小皆為均勻分散式包覆。



(a)



(b)

圖 4-33 弱鹼性環境釋放及溶離曲線

(a) 釋放曲線 (b) 溶離曲線

伍、結論

微結構分析：

1. 黏度計測試可知降解及分餾作用都可使分子量變小且不同分餾區段有不同分子量分佈。而 GPC 中降解及分餾後幾丁聚醣分子量分佈也變得較均勻。
2. 從 SEM 圖中觀察降解及分餾作用對幾丁聚醣交聯微粒大小的變化，降解後幾丁聚醣微粒變小且微粒分佈範圍變小，而分餾作用也有相同作用。

包覆微粒分析：

1. 包覆率隨著 pH 值及分子量增加而變大，但隨著 BSA 濃度增加而變小；負載率隨著 BSA 濃度及分子量增加而變大，但隨著 pH 值增加而變小。
2. 微粒產率隨著 pH 值及 BSA 濃度增加而變大，但隨著分子量降低而變小。
3. 因為 BSA 等電位為 4.8，當 pH 值大於 4.8 時，進行包覆反應除了考慮物理性包覆仍需考慮吸附效應，而吸附量隨著 pH 增加而變

大，可知 pH 值越大吸附效應越明顯。

藥物釋放：

1. 藥物釋放速率測試中可知，61KDa 幾丁聚醣微粒在腸胃道環境中皆有較好之釋放速率。
2. 藥物包覆模式主要分為核殼式及均勻分散式，而本研究大小分子量幾丁聚醣交聯微粒皆為均勻分散式。

陸、參考文獻

1. 化學工業日報，2001年2月19日
2. 賴淑琪，水產廢棄物蝦、蟹物外殼之高度利用。食品工業，(1979)
， 11：23-28
3. Ruiz-Herrera. The distribution and quantitative importance of chitin in fungi. Muzzarelli, R. A. A. and Pariser, E. R. Eds. MIT Sea Grant Program, Cambridge, (1978), Mass. P.11
4. Majeti, N.V., Kumar K. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*,(2000),46：1-27
5. Muzzarelli, R. A. A. In "chitin". Muzzarelli, R. A. A. Eds. Pergamon Press, Oxford. New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, (1977), p.5
6. 阮進惠、林翰良、羅淑珍，幾丁聚醣水解物之連續式生產及其抑菌作用。中農化誌，(1997)，35：596-611
7. Shigemasa Y., Minami S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*,(1995),13：383
8. 張耀中，葡萄糖胺衍生物萃取與生醫材料改質應用。私立大同大學生物工程研究所碩士論文，(2008)
9. Poulicek M., Voss-Foucart M. F., Jeuniaux C. Chitinoproteic complexes and mineralization in mollusk skeletal structures. In: "Chitin in Nature and Technology". Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux C., Gooday G. W. Eds. Plenum Press, New York and London. (1986), p.7-12
10. 李勳宜，草蝦幾丁聚醣之製備及其應用研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文，(1988)
11. 程志仁，戊二醛修飾幾丁聚醣在藥物包覆及釋放研究。國立高雄師範大學研究所論文，(2004)
12. Tian Feng, Liu Yu, Hu Keao, Zhao Binyuan. The depolymerization mechanism of chitosan by hydrogen peroxide. *Journal Of Materials Science*, (2003), 38：4709 – 4712
13. Lopatin S. A., Derbeneva M. S., Kulikov S. N., Varlamov V. P., and Shpigun O. A. Fractionation of Chitosan by Ultrafiltration. *Journal of Analytical Chemistry*, 2009, Vol. 64, No. 6, pp. 648–651

14. Gref R., Domb A., Quellec P., Blunk T., Muller R. H., Verbavatz J. M., Langer R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.*,(1995), 16 : 215-233
15. 李昂，奈米級顆粒在藥物輸遞的應用。化工資訊，(2001)，10：44-55
16. Niwa T., Takeuchi H., Hino T., Kunou N., Kawashima Y. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and nonsoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method and the drug release behavior. *J. Control. Rel.* (1993), 25 : 89-98
17. Birnbaum T. D., Kosmala J. D., Henthorn D. B., Peppas L. B. Controlled release of β -estradiol from PLAGA microparticles : The effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *J. Control. Rel.*,(2000), 65 : 375-387
18. Tanquary A. C., Lacey R. E. Controlled release of biologically active agent. Plenum Press, New York,(1974), vol.47,pp.15-71
19. 糜福龍，幾丁聚醣應用於藥物及疫苗傳輸系統之設計及研究。國立中央大學，化學工程所博士論文，(1997)
20. Hoffman A. Pharmacodynamic aspects of sustained release preparations. *J. Microencapsulation* ,(1998), Vol.33,pp.185-190
21. 張碧姿，奈米幾丁聚醣微粒對降血脂藥物包覆與釋放研究。國立雲林科技大學，化學工程所碩士論文，(2005)
22. Crank J. The mathematics of Diffusion. Oxford University Press. London,(1956)
23. Donbrow M., Samuelov Y. Zero order drug delivery from double-layer porous films release rate profile from ethylcellulose .ethylcellulose hydroxypropylcellulose and polyethylene glycol mixture. *J. Pharm. Pharmacol.*, (1979), vol.32.pp.463
24. Scott D. C.,Hollenbeck G. Design and manufacture of a zero-order sustained-release pellet dosage form through nonuniform drug distribution in a diffusion matrix. *Pharm. Res.*,(1991), vol.8.pp.156-161
25. Highchi T.Mechanism of sustained-action medication theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.*,(1991), vol.52.pp.1145-1149
26. 朱家瑜，人體組織學。藝軒出版公司，(2000)，台北

27. Junginger H. E., Verhoef J. C. Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs-a fiction. *PSTT.*, (1998), 9 : 370-376
28. He P., Davis S. S., Illum L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int. J. Harm.*,(1999), 187 : 53-65
29. Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J. L., Alonso M. J. Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines. *Pharmaceutical Research*,(1997),Vol.14, No.10
30. Fernandez-Urrusuno R., Calvo P., Remunan-Lopez C.,Vila-Jato J.L.,Alonso M. J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.*,(1999),16 : 1576-1581
31. Janes K. A., Alonso M. J. Depolymerized Chitosan Nanoparticles for Protein Delivery: Preparation and Characterization. *Inc. J Appl Polym. Sci.*,(2003),88: 2769–2776
32. Xu Yongmei, Du Yumin. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* , (2003),250 : 215-226
33. Zhang Hong, Oh Megan, Christine Allen, Eugenia Kumacheva. Monodisperse Chitosan Nanoparticles for Mucosal Drug Delivery. *Biomacromolecules* , (2004), 5 : 2461-2468
34. Mi F. L., Shyu S.S., Lee S.H., Wong T.B. Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *J. Polymer Sci.*, (1999), 37 : 1551-1564
35. Peters, T.,Jr. Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.*,(1985)37; 161-245
36. Luangtana-anan M., Opanasopit P.,Ngawhirunpat T., Nunthanid J., Sriamornsak P., Limmatvapirat S., Lim L. Y. Effect of chitosan salts and molecular weight on a nanoparticulate carrier for therapeutic protein. *Pham. Dev. Technol*,(2005),10 : 189-196
37. Yan Pan , Li Ying-jian, Zhao Hui-ying , Zheng Jun-min , Xu Hui, Gang Wei, Hao Jin-song, Cui Fu-de. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system:chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International Journal of Pharmaceutics* ,(2002), 249 : 139-147
38. Ma Zengshuan, Lim Tit Meng, Lim Lee-Yong. Pharmacological activity of peroral chitosan–insulin nanoparticles in diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutics* ,(2005) ,293 : 271–280
39. Wan A-jun, Sun Yan, Li Wen-tao, Li Hui-li. Transmission Electron Microscopy and Electron Diffraction Study of BSA-Loaded Quaternized Chitosan Nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials*

Research Part B : Applied Biomaterials.

40. Mao Hai-Quan, Roy Krishnendu, Troung-Le Vu L., Kevin A. Janes, Lin Kevin Y., Wang Yan, Thomas August J., Kam W. Leong. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers : synthesis characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, (2001),70 : 399-421
41. Moran M. C., Laranjeira T., Ribeiro A., Miguel M. G., Lindman B. Chitosan-DNA Particles for DNA Delivery: Effect of Chitosan Molecular Weight on Formation and Release Characteristics. *Journal of Dispersion Science and Technology*, (2009),30:1494–1499
42. Gan Quan, Wang Tao. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* ,(2007),59 : 24–34
43. Liu Zonghua, Jiao Yanpeng, Liu Fanna, Zhang Ziyong. Heparin/chitosan nanoparticles carriers prepared by polyelectrolyte complexation. *J. Biomed Mater Res* 83A,(2007),806-812
44. Angela M. De Campos, Alejandro Sanchez, Maria J. Alonso. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. : Application to cyclosporin A *International Journal of Pharmaceutics*, (2001),224 : 159–168
45. Ana Vila, Alejandro Sanchez, Kevin Janes, Isabel Behrens, Thomas Kissel,Jose Luis Vila Jato, Maria Jose Alonso. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2004), 57 : 123–131
46. Angela M. de Campos, Yolanda Diebold, Edison L. S. Carvalho, Alejandro Sánchez, Maria José Alonso. Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: in Vitro Stability, in Vivo Fate, and Cellular Toxicity *Pharmaceutical Research*, (2004),Vol. 21, No. 5
47. Wan A-jun, Sun Yan, Li Hui-li. Characterization of Novel Quaternary Chitosan Derivative Nanoparticles Loaded with Protein. *Journal of Applied Polymer Science*,(2009),Vol. 114 : 2639–2647
48. Elzatahry A.A., Mohy Eldin M.S. Preparation and characterization of metronidazole loaded chitosan nanoparticles for drug delivery application. *Polym. Adv. Technol.* (2008), 19: 1787–1791
49. Anitha R. Dudhani, Shantha L. Kosaraju. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers* ,(2010) ,81 : 243–251
50. Ashish Dev, Binulal N.S., Anitha A., Nair S.V., Furuike T., Tamura

- H., Jayakumar R. Preparation of poly(lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications. *Carbohydrate Polymers*, (2010), 80 : 833–838
51. Hu Bing, Pan Chenliang, Sun Yi, Hou Zhiyun, Ye Hong, Hu Bing, Zeng Xiaoxiong. Optimization of Fabrication Parameters To Produce Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles for Delivery of Tea Catechins. *J. Agric. Food Chem.* (2008), 56 : 7451–7458
 52. Remunan-Lopez C., Lorenzo-Lamosa M.L., Vila-Jato J.L., Alonso M.J. Development of new chitosan–cellulose multicore microparticles for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (1998), 45 : 49–56
 53. Devika R. Bhumkar¹, Varsha B. Pokharkar. Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*, (2006), 7 (2) : Article 50
 54. Ieva E., Trapani A., Cioffi N., Ditaranto N., Monopoli A., Sabbatini L. Analytical characterization of chitosan nanoparticles for peptide drug delivery applications. *Anal Bioanal Chem*, (2009), 393:207–215
 55. Mi Fwu-Long, Shyu Shin-Shing, Wong Tsung-Bi, Jang Shiang-Fang, Lee Sung-Tao, Kai-Tailu. Chitosan–Polyelectrolyte Complexation for the Preparation of Gel Beads and Controlled Release of Anticancer Drug. II. Effect of pH-Dependent Ionic Crosslinking or Interpolymer Complex Using Tripolyphosphate or Polyphosphate as Reagent. *Journal of Applied Polymer Science*, (1999), Vol. 74 : 1093–1107
 56. Mi Fwu-Long, Sung Hsing-Wen, Shyu Shin-Shing, Su Chia-Ching, Peng Chih-Kang. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin cocrosslinked chitosan gel beads. *Polymer*, (2003), 44 : 6251–6530
 57. Yang Hui-Chia, Honn Min-Hsiung. The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery. *Microchemical Journal*, (2009), 92 : 87–91
 58. Du Jian, Zhang Sheng, Sun Rui, Zhang Li-Fang, Xiong Cheng-Dong, Peng Yu-Xing. Novel Polyelectrolyte Carboxymethyl Konjac Glucomannan–Chitosan Nanoparticles for Drug Delivery. II. Release of Albumin In Vitro. *Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, (2005), 72B: 299–304
 59. Xu J. H., Li S. W., Tostado C., Lan W. J., Luo G. S. Preparation of monodispersed chitosan microspheres and in situ encapsulation of BSA in a co-axial microfluidic device. *Biomed Microdevices*, (2009), 11:243–249
 60. Jae Hyung Park, Gurusamy Saravanakumar, Kwangmeyung Kim, Ick Chan Kwon. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, (2010), 62 :

61. Gupta K.C., Fawzi Habeeb Jabrail. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, (2006), 66 : 43–54
62. Chang Ke Liang B., Tai Ming-Chih, and Cheng Fu-Hsiang. Kinetics and Products of the Degradation of Chitosan by Hydrogen Peroxide. *J. Agric. Food Chem.* (2001), 49 : 4845-4851
63. Park Kyung Min, Choi Jong Hoon, Bae Jin Woo, Joung Yoon Ki, Park Ki Dong. Nano-aggregates using thermosensitive chitosan copolymers as a nanocarrier for protein delivery. *Journal of Experimental Nanoscience*, (2009), Vol. 4, No. 3, 269–275
64. Kalpana Nagpal, Shailendra Kumar Singh, Dina Nath Mishra. Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. *Chem. Pharm. Bull*, (2010), 58(11) : 1423—1430
65. Zhang Lina, Guo Ji, Peng Xianghong, Jin Yong. Preparation and Release Behavior of Carboxymethylated Chitosan/Alginate Microspheres Encapsulating Bovine Serum Albumin. *Inc. J Appl Polym Sci*, (2004), 92: 878–882
66. Qi Lifeng, Xu Zirong, Jiang Xia, Hu Caihong, Zou Xiangfei. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, (2004), 339 : 2693–2700
67. Qia Lifeng, Xu Zirong. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2006), 16 : 4243–4245
68. Chen Li-Chen, Kung Shao-Kai, Chen Hui-Huang, Lin Shih-Bin. Evaluation of zeta potential difference as an indicator for antibacterial strength of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers*, (2010), 82 : 913–919
69. Cascone M. G., Maltinti S. Hydrogels based on chitosan and dextran as potential drug delivery systems. *Journal Of Materials Science: Materials In Medicine*, (1999), 10 : 301-307
70. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, and Janos Borbely. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules*, (2005), 6 : 2521-2527
71. Maryam Amidi, Stefan G. Romeijn, Gerrit Borchard, Hans E. Junginger, Wim E. Hennink, Wim Jiskoot. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release*, (2006), 111 : 107 – 116

72. Magdolna Bodnar, John F. Hartmann, Janos Borbely. Synthesis and Study of Cross-Linked Chitosan-N-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles. *Biomacromolecules*, (2006), 7, : 3030-3036
73. Lee Min , Li Weiming, Siu Ronald K. , Whang Julie , Zhang Xinli , Soo Chia , Ting Kang , Wu Benjamin M. Biomimetic apatite-coated alginate/chitosan microparticles as osteogenic protein carriers. *Biomaterials*, (2009) ,30 : 6094–6101
74. Noemi Csaba, Magnus Koping-Hoggard, Maria Jose Alonso. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics* ,(2009),382 : 205–214
75. Naser Mohammadpourdownighi, PhD, Azam Behfar, MSc, Ali Ezabadi, PhD, Hosein Zolfagharian, PhD, Maryam Heydari, MSc 59. Preparation of chitosan nanoparticles containing Naja naja oxiana snake venom. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* ,(2010),6 : 137–143
76. Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J. L., Alonso M. J. Novel Hydrophilic Chitosan–Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, (1997), Vol. 63, 125–132
77. Ping He , Stanley S. Davis, Lisbeth Illum. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* ,(1998),166 : 75–68
78. Gan Quan, Wang Tao, Colette Cochrane, Paul McCarron. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* ,(2005),44 : 65–73
79. Yuan Q. , Shah J. , Hein S. , Misra R.D.K. Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier. *Acta Biomaterialia*, (2010),6 : 1140–1148
80. Shobhan Sabnis , Lawrence H. Block Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems.I. Molecular modifications. *International Journal of Biological Macromolecules*, (2000),27 : 181–186
81. Sunil A. Agnihotri, Nadagouda N. Mallikarjuna, Tejraj M. Aminabhavi. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, (2004),100 : 5–28
82. Sofia Papadimitriou , Dimitrios Bikiaris , Konstantinos Avgoustakis , Evangelos Karavas , Manolis Georgarakis. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. *Carbohydrate Polymers* ,(2008) ,73 : 44–54

83. López-León T. , Carvalho E.L.S. , Seijo B., Ortega-Vinuesa J.L. , Bastos-González D. , Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles:electrokinetic and stability behavior. *Journal of Colloid and Interface Science* ,(2005),283 : 344–351
84. Wang Chun, Fu Xiong , Yang LianSheng. Water-soluble chitosan nanoparticles as a novel carrier system for protein delivery. *Chinese Science Bulletin* ,(2007), vol. 52 ,no. 7 : 883-889
85. Sun Yan, Wan A-jun. Preparation of Nanoparticles Composed of Chitosan and Its Derivatives as Delivery Systems for Macromolecules. *Inc. J Appl Polym Sci* ,(2007),105: 552–561
86. Baxter A., Dillon M., Taylor K. D., Roberts G. A. Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol*,(1992),14(6) : 166-169
87. Shobhan Sabnis, Lawrence H. Block. Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-acetylation of chitosan. *Polymer Bulletin*,(1997),39 : 67-71