

東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授:顧野松 博士

探討球形 SBA-15 的製備及修飾對蛋白質或辣椒素固定化之
影響

**Synthesis and Modification of Spherical SBA-15 for the
Effective Immobilization of Protein or Capsaicin**

研究生:郭柏廷 撰

中華民國 一百零三年一月

中文摘要

在藥物控制釋放系統的研究之中，載體的生物相容性是重要的一環，而載體適合的形貌及良好的分散性對確保其生物相容性非常重要。本研究除了探討中孔 SBA-15 球形粒子之製備條件外，對其包覆與釋放蛋白質的效果進行了深入的探討。此外，通過對 SBA-15 進行官能基團的修飾，可達到對蛋白質包覆與釋放的優化效果。

綜合研究結果，在合成 SBA-15 方面，若在加入 Tetraethoxysilicate (TEOS) 進行縮合聚合反應時持續攪拌，會造成微胞之間相互作用而有聚集的現象產生，導致 SBA-15 粒子發生嚴重的團聚現象，因此在合成 SBA-15 的過程中選擇靜置來降低其團聚現象的發生，使 SBA-15 能夠有良好的分散性。鹽酸濃度也是影響 SBA-15 形貌的關鍵，研究中發現當鹽酸濃度不足，P123 (poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)) 無法完整的形成微胞，進而使 SBA-15 之形貌較不規則；而過高的鹽酸濃度則會使 SBA-15 縮合聚合的反應速度過快，造成粒子容易因為碰撞而產生聚集；研究中發現當鹽酸濃度為 2 M 時能合成出分散性良好的球形 SBA-15。當加入 TMB 濃度為 3 mmol 時 SBA-15 的孔徑分布不均一，而 6、9 及 12 mmol 分別對應之孔徑為 18、20 及 22 nm，針對大分子的蛋白質可以利用 1,3,5-Trimethylbenzene (TMB) 來調整 SBA-15 的

孔徑大小以利其包覆效果。

在包覆與釋放方面發現，蛋白質與載體之間的帶電性有很大的影響，與 SBA-15 帶同性電荷的 Bovine serum albumin(BSA)其包覆量只有 57.2 mg/g，而帶有異性電的 Lysozyme 則有 225.5 mg/g 的包覆量，同時因為帶電性的關係，BSA 在 pH 低的環境中與 SBA-15 的排斥力較小而有高的包覆量，Lysozyme 則是在 pH 高的環境中與 SBA-15 的作用力較強而包覆量較高。另外在釋放時，Lysozyme 也因為與 SBA-15 之間的靜電作用力較強而觀察到有緩釋作用，而 BSA 則是因為與 SBA-15 之間存在著排斥力導致釋放速度過快。

為了改善其中包覆與釋放效果不佳的情況，因此將 SBA-15 進行官能基團的修飾，經由研究結果發現，經過官能基修飾之 SBA-15 的蛋白質包覆量明顯提高，尤其是 BSA 的包覆量提高了將近 1 倍之多，這是因為修飾後的 SBA-15 與蛋白質之間產生了比靜電作用力更強的作用力，這不只讓原本與 SBA-15 排斥的 BSA 提高了包覆量，也讓 BSA 在釋放效果上也觀察到了明顯的緩釋作用。因此，證明利用 SBA-15 做為大分子蛋白質藥物的載體，並且將其進行修飾來優化其應用於藥物控制是放系統當中是可行的。

關鍵字:藥物釋放、SBA-15、BSA、Lysozyme、表面修飾

Abstract

In drug delivery system, the biocompatibility of a carrier is really important, and the morphology and dispersion of the carrier particles are considered as the major influence to the biocompatibility. Therefore, we will establish an optimum the condition to synthesize well-dispersed spherical SBA-15 in this study and investigate. The protein adsorption and release as well. Meanwhile, we will improve the protein immobilization by tailoring the surface chemistry of SBA-15.

Based on the results from the synthesized SBA-15, stirring while adding TEOS could cause the interactions between micelles, in which promote the severe aggregation of SBA-15, therefore a settling process was recommended. The concentration of hydrochloric acid could dramatically influence the ionic strength of the reaction solution, and both the hydrophobic and hydrophilic chain of triblock copolymer P123. We found an appropriate concentration (2 M HCl) could increase zeta-potential of SBA-15 and well-dispersed spherical SBA-15 was obtained. However the higher hydrogen concentration (3 M HCl) caused the fast condensation polymerization, and resulted in a serious aggergation. Besides adding swelling-agent TMB can change the micelle size, then to control the morphology and pore size distribution of SBA-15, which dependent on the concentrations of hydrochloric acid and salts used.

This study has also shown that the charges between the carrier and protein would have a great influence on protein adsorption by carrier. For example, when the carrier and lysozyme displaced opposite charge on

their surface, the amount of protein adsorbed will be 3 times higher than that for those for same type of charges. Because of the significant electrostatic force between carrier and protein, we can clearly observe the slow drug release phenomenon based on the lysozyme releasing test.

Adsorptions of Bovine serum albumin (BSA) at pH 5 and lysozyme at pH 8 on SBA-15 functionalized with chloromethyl (CM), octyl (Oc) or aminopropyl (AP) groups were investigated and were compared with those without modification. The results have shown that the adsorption performance, including adsorption capacity and adsorption rates can be tailored by incorporating a specific functional group and its modification efficiency. Therefore, we have confirmed the feasibility for our synthesized spherical SBA-15 (or functionalized one) as a carrier for macromolecular drugs delivery system.

Key word : drug delivery system, SBA-15, BSA, Lysozyme, modification, functionalized.

致謝

兩年多的研究所生活，讓我有全新的求學體驗，感謝在研究所求學的期間，各老師在專業知識領域上的授課以及學弟妹的幫忙，讓我能夠順利的完成論文，感謝這段日子以來所有幫助我的人。

首先要感謝我的父母，一直以來對我的鼓勵與期盼，並且給予我強力的支持與援助，讓我能夠毫無後顧之憂的完成研究所學業，謝謝你們。

這篇論文能夠完成，要感謝指導教授顧野松博士在研究過程中給予寶貴的建議，讓我學習到相關知識及研究方法，更重要的是學會以客觀角度及反覆縝密邏輯推演的研究精神，這不但對我在研究上有所幫助，在處事的態度上也應如此。同時也要感謝論文口試委員，杜景順教授、吳靖宙副教授、楊怡寬教授以及林其昌助理教授在繁忙之餘撥空前來給予的批評與建議，讓論文更加完整。

另外也要感謝在求學階段陪伴我的朋友，西瓜、彥哲、小光、王靜、清新以及各位學弟妹大牛、江門、飄飄、世偉等人，因為有你們讓研究生涯中多了很多趣味。最後，感謝我身邊的每個人，在需要時給予我幫助的人，謝謝。

郭柏廷 2014.1

目錄

中文摘要	I
Abstract	III
致謝	V
目錄	VI
圖目錄	IX
表目錄	XI
第一章 緒論	1
1-1 前言	1
1-2 藥物傳輸系統之概述	5
1-3 奈米藥物技術的介紹	7
1-4 蛋白質藥物的介紹	9
1-4.1 牛血清蛋白(BSA)的介紹	9
1-4.2 溶菌酶(Lysozyme)的介紹	10
1-4.3 辣椒素(Capsaicin)的介紹	12
1-5 中孔洞矽材 SBA-15 的介紹	14
1-5.1 嵌段共聚物溶液的自組裝	14
1-5.2 SBA-15 的介紹	16
1-6 蛋白質與載體的結合	22
1-7 SBA-15 表面修飾法的簡介	24
第二章 文獻回顧與研究動機	26
2-1 文獻回顧	26
2-2 研究動機	33
第三章 實驗材料與儀器原理	35
3-1 實驗藥品	35
3-2 實驗儀器	37
3-3 儀器原理	39
3-3.1 場發射掃描式電子顯微鏡(FFSEM)	39
3-3.2 氮氣吸附	42
3-3.3 Bio-Rad 蛋白質定量分析	49
3-3.4 熱重分析法	50
3-3.5 Zeta-potential	51
3-3.6 紫外光/可見光分光光度計	53
第四章 實驗方法	54
4-1 分散性良好之球形 SBA-15 的製備	54
4-1.1 SBA-15 的製備過程中攪拌與否	54
4-1.2 改變鹽酸濃度之 SBA-15 製備步驟	56

4-1.3	改變 TMB 濃度探討 SBA-15 孔徑的影響	57
4-2	蛋白質的包覆	58
4-2.1	蛋白質溶液的製備	58
4-2.2	不同 pH 環境 SBA-15 對蛋白質的包覆步驟	59
4-2.3	不同孔徑之 SBA-15 對 BSA 的包覆步驟	59
4-2.4	不同包覆時間之 SBA-15 對蛋白質的包覆步驟	60
4-3	包覆蛋白質之 SBA-15 釋放速率步驟	61
4-4	SBA-15 的表面修飾	62
4-4.1	修飾之 SBA-15 與蛋白質的包覆步驟	63
4-4.2	修飾之 SBA-15 包覆蛋白質後之釋放步驟	64
4-5	辣椒素的包覆與釋放步驟	65
4-5.1	辣椒素的包覆步驟	65
4-5.2	辣椒素的釋放之實驗步驟	65
4-6	分析儀器操作實驗步驟	66
4-6.1	BET 操作步驟	66
4-6.2	SEM 樣品前處理	66
4-6.3	Zeta potential	67
4-6.4	HPLC 樣品前處理	67
4-6.5	熱重分析(TGA)測量包覆量之操作步驟	68
4-6.6	UV/Vis 分光光度儀	70
第五章	結果與討論	71
5-1	製備球形 SBA-15 之條件與探討	71
5-1.1	探討合成過程中攪拌之影響	71
5-1.2	鹽酸濃度對合成 SBA-15 的影響	73
5-1.3	擴孔劑(TMB)濃度對合成 SBA-15 的影響	77
5-2	球形 SBA-15 對蛋白質的包覆效果	81
5-2.1	不同 pH 環境下進行蛋白質的包覆	81
5-2.2	不同孔徑的 SBA-15 對 BSA 的包覆效果	90
5-2.3	不同包覆時間對蛋白質包覆效果的影響	94
5-3	包覆蛋白質後的 SBA-15 之釋放測試	98
5-4	球形 SBA-15 的修飾與其對蛋白質包覆、釋放之情形	103
5-4.1	對 SBA-15 進行修飾之結果	104
5-4.2	修飾之 SBA-15 在不同 pH 環境下對蛋白質的包覆效果	109
5-4.3	修飾之 SBA-15 包覆蛋白質後之釋放效果	116
5-5	辣椒素(Capsaicin)的包覆與其白老鼠動物試驗	120
第六章	結論與建議	124
6-1	分散性良好之球形 SBA-15 的製備條件結論	124
6-2	SBA-15 對蛋白質的包覆與釋放之結論	126

6-3	SBA-15 的修飾以及其包覆與釋放之結果	127
6-4	SBA-15 包覆辣椒素進行動物試驗之結論	129
6-5	未來建議	130
參考文獻		131



圖目錄

Fig. 1-1 傳統藥物與藥物控制釋放系統在血液中的濃度隨時間變化圖.....	3
Fig. 1-2 奈米藥物傳輸載體技術關聯圖.....	8
Fig. 1-3 溶劑、模版與無機源在合成介孔氧化物之主要關係圖.....	18
Fig. 1-4 不同 pH 環境下，表面活性劑與矽源在介面處的作用關係.....	18
Fig. 1-5 中孔材料的合成流程.....	20
Fig. 1-6 矽氧烷在酸性環境下進行縮合聚合的反應機制圖.....	20
Fig. 1-7 水熱反應對 SBA-15 孔壁結構的影響.....	21
Fig. 1-8 材料表面與蛋白質的相互作用示意圖.....	23
Fig. 2-1 合成溫度與攪拌速率影響 SBA-15 形狀之 SEM 圖.....	29
Fig. 2-2 TMB 含量影響 SBA-15 粒子分散性之 SEM 圖.....	29
Fig. 2-3 兩性嵌段高分子親疏水鏈段比例之差異，對微胞堆積的影響示意圖.....	30
Fig. 2-4 P123 受到溶液影響而改變堆積參數所形成微胞的形貌.....	32
Fig. 3-1 電子束與試片的作用原理.....	41
Fig. 3-2 掃描式電子顯微鏡之構造圖.....	41
Fig. 3-3 IUPAC 氣體吸附等溫線與吸附遲滯環類型.....	44
Fig. 3-4 Micromeritics ASAP2020 氮氣等溫吸脫附儀.....	48
Fig. 3-5 Coomassie Blue G-250 與蛋白質結合反應示意圖.....	49
Fig. 3-6 擴散電雙層的 Stern 模型示意圖.....	52
Fig. 5-1 合成過程中攪拌與否對 SBA-15 粒子之 SEM 圖.....	72
Fig. 5-2 不同鹽酸濃度合成的 SBA-15 之 SEM 圖.....	76
Fig. 5-3 不同 TMB 濃度在 2 M 鹽酸下合成 SBA-15 之 SEM 圖.....	79
Fig. 5-4 不同 TMB 濃度下合成 SBA-15 之氮氣等溫吸脫附曲線.....	80
Fig. 5-5 不同 TMB 濃度下合成 SBA-15 之孔徑分布圖.....	80
Fig. 5-6 不同 pH 下 SBA-15 包覆 BSA 之熱重分析圖.....	84
Fig. 5-7 不同 pH 下 SBA-15 包覆 Lysozyme 之熱重分析圖.....	85
Fig. 5-8 SBA-15 與蛋白質在不同 pH 環境下之 Zeta 電位測試.....	89
Fig. 5-9 不同 TMB 濃度下 SBA-15 包覆 BSA 之熱重分析圖.....	93
Fig. 5-10 不同包覆時間下 BSA 包覆之熱重分析圖.....	96
Fig. 5-11 不同包覆時間下 Lysozyme 包覆之熱重分析圖.....	97
Fig. 5-12 BSA 濃度 v. s. 吸收值之標準線.....	101
Fig. 5-13 Lysozyme 濃度 v. s. 吸收值之標準線.....	101
Fig. 5-14 BSA 釋放曲線圖.....	102
Fig. 5-15 Lysozyme 釋放曲線圖.....	102
Fig. 5-16 修飾之 SBA-15 的 SEM 圖.....	106
Fig. 5-17 修飾之 SBA-15 的 EDS 元素分析結果.....	107

Fig. 5-18 (a)X-ray diffraction pattern ; (b)氮氣等溫吸脫附曲線.....	108
Fig. 5-19 修飾之 SBA-15 的熱重分析圖(TGA).....	108
Fig. 5-20 修飾之 SBA-15 與蛋白質在不同 pH 環境下之 Zeta 電位測試.....	115
Fig. 5-21 修飾之 SBA-15 包覆 BSA 於 pH 8.0 中釋放情形.....	118
Fig. 5-22 修飾之 SBA-15 包覆 BSA 於 pH 7.4 中釋放情形.....	118
Fig. 5-23 修飾之 SBA-15 包覆 BSA 於 pH 6.4 中釋放情形.....	119
Fig. 5-24 SBA-CM 包覆 BSA 於各 pH 環境中的釋放情形.....	119
Fig. 5-25 辣椒素於乙醇中進行不同時間包覆之 TGA 圖.....	121
Fig. 5-26 辣椒素之釋放曲線圖.....	122



表目錄

Table. 1-1 創新藥、仿效藥和學名藥的定義.....	3
Table. 1-2 牛血清蛋白(BSA)與溶菌酶(Lysozyme)的物理性質.....	11
Table. 1-3 部分辣椒的史高維爾指數.....	13
Table. 1-4 多孔性材料之孔洞大小的分類.....	17
Table. 1-5 材料表面性質與蛋白質相互作用的關係.....	23
Table. 2-1 界面活性劑堆積參數(g)與微胞結構之關係.....	31
Table. 4-1 磷酸鉀緩衝溶液的製備(0.1 M).....	60
Table. 4-2 表面修飾所用的試劑與其比例(1g SBA-15:試劑).....	62
Table. 5-1 不同 TMB 濃度對應之容積與孔徑.....	78
Table. 5-2 不同 pH 下 SBA-15 包覆 BSA 之熱重損失與包覆率.....	84
Table. 5-3 不同 pH 下 SBA-15 包覆 Lys 之熱重損失與包覆率.....	85
Table. 5-4 SBA-15 與蛋白質在各 pH 環境下之 Zeta 電位測試.....	88
Table. 5-5 SBA-15 與蛋白質之間的電位差.....	88
Table. 5-6 不同 TMB 濃度下 BSA 之熱重損失與包覆率.....	93
Table. 5-7 不同包覆時間下 BSA 包覆之熱重損失與包覆率.....	96
Table. 5-8 不同包覆時間下 Lysozyme 包覆之熱重損失與包覆率.....	97
Table. 5-9 EDS 元素分析結果表.....	107
Table. 5-10 修飾之 SBA-15 對 BSA 包覆效果.....	111
Table. 5-11 修飾之 SBA-15 對 Lysozyme 包覆效果.....	111
Table. 5-12 蛋白質與修飾之 SBA-15 於各 pH 的帶電關係.....	114
Table. 5-13 蛋白質與修飾之 SBA-15 間的電位差.....	114
Table. 5-14 辣椒素於乙醇中之包覆結果.....	121

第一章 緒論

1-1 前言

近年來，由於奈米科技的技術急速成長，藥物釋放控制系統的領域迅速成長，當然藥物釋放的技術也為健康產品帶來了無限的商機和醫療上的價值。對全球的醫療企業與工業而言，新藥物的開發具有投資大、風險大、难度大、意義大、市場大和週期長等等的特點，相較於台灣的製藥廠商而言，整體的研究環境、人才缺乏以及資金的條件限制下，新藥開發是相當不易進行的。雖然學名藥(Generic Drugs)在技術上的發展比較容易，但也因為產業進入障礙低以及成本因素的影響程度普遍較高的情況下，使得學名藥在全球的藥物市場中競爭激烈；而仿效藥(Me-too Drugs, 舊藥新劑型)著重於現有藥物的改良上，不管是在提升藥物的安全性，或是提高藥效這兩方面都具有高度的發展潛力。因此，台灣的製藥廠商主要的重心都放在仿效藥的研發上。其中，劑型的改良即是調控藥物釋放系統(Drug-delivery system, DDS)的應用 (王, 2005)。(詳見 Table1-1)。

在傳統的藥物治療當中，因為口服藥物與針劑注射的藥物都會因為藥物半衰期過短的關係而需要多次的服藥；且也會因為人體中正常的代謝作用，使得藥物在人體當中的濃度低於有效濃度時並沒有適時

的服藥，而造成藥物濃度在人體血液當中呈現鋸齒狀(Fig.1-1)，進而導致了患者在用藥上的不便與危險性提高。為此，藥物釋放控制系統就是為了改善上述傳統藥物的缺點，提升用藥品質與藥物療效而進行研發 (Vallet-Regi, 2007)。

在藥物傳輸系統當中是將藥物以不同的給藥技術或是以其他形式注入人的體內，以達到治療疾病的目的，而藥物傳輸系統在整個製藥工業的技術發展當中佔有相當重要的地位。根據統計，藥物傳輸系統的市場價值在過去幾年期間平均每年都有 20% 甚至數倍的成長幅度，因此，藥物傳輸系統的未來發展是相當具有潛力的。

基於「舊藥新劑型」的開發成本較低、耗費時程較短，同時也可以提高舊藥的療效並且減少不良副作用的產生，還提供了更方便的給藥模式等的種種原因，使得藥物傳輸系統新劑型的開發逐漸受到重視。除此之外，藥物方面不只一般化學合成物(小分子藥物)，隨著生物醫學科技技術的快速進步，蛋白質等等的大分子藥物被開發，掀起了研究大分子藥物傳輸系統的風潮。因此，專門針對大分子藥物的新型控制藥物傳輸系統正積極的開發研究中，而其中最具有潛力的就是應用於大分子藥物控制傳輸系統的材料—中孔洞矽材 (Vallet-Regi, 2000)。

Table. 1-1 創新藥、仿效藥和學名藥的定義 (王, 2005)。

類別	FDA 審查藥物分類	研究定義
創新藥	新小分子藥物	藥物有效成分為市場上從未見過的，或是仍屬於未曾被核准過的成分。
	類新藥	
仿效藥	藥物新劑型	藥物有效成分為改變有效成分的劑型，劑量及用藥頻率、組合不同的有效成分。
	新組合藥物	
學名藥	製藥廠商專利過期藥	與專利藥具有相同的有效成分、劑型及劑量的藥物產品。

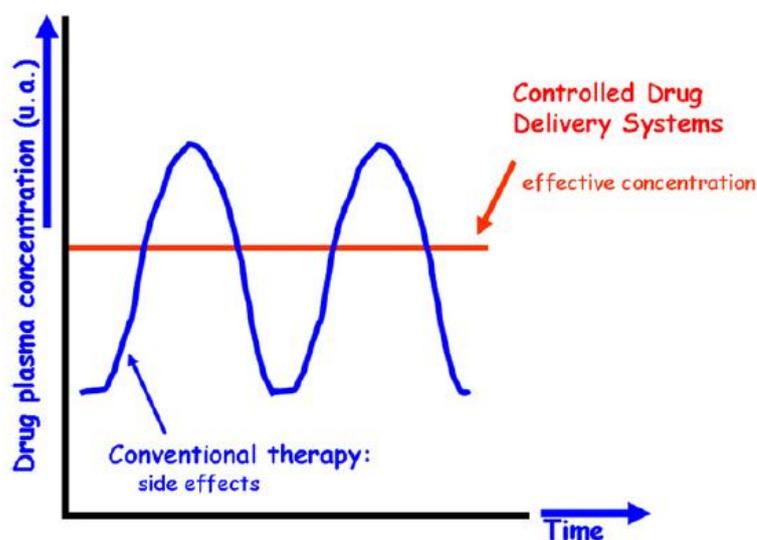


Fig. 1-1 傳統藥物與藥物控制釋放系統在血液中的濃度隨時間變化

圖 (Vallet-Regi, 2007)。

近年來，由於奈米科技的進步，已經有部分學者在研究如何將奈米級結構的材料運用於生物醫學領域之中。1990 年，中孔洞矽材 MCM-41 被合成出來，但主要作為分子篩的應用；到了 2001 年，MCM-41 首次被應用在生醫領域當中作為藥物釋放系統的材料，進而開啟了以中孔洞矽材運用在生醫方面的研究。目前主要研究的中孔洞矽材除了 MCM-41 外，還有 SBA-15 與 MCM-48...等，其中 SBA-15 是本研究所使用的中孔洞矽材，它是以三嵌段高分子 P123($\text{EO}_{20}\text{-PO}_{70}\text{-EO}_{20}$)形成的微胞作為模板，於酸性的環境下利用氫鍵的作用力與帶有正電荷的矽源作結合而合成出來的中孔洞矽材 (Arruebo, 2006), (Song, 2007)。

本文主要研究蛋白質的藥物釋放傳輸系統，因此會選擇 SBA-15 作為材料有以下幾點：

1. SBA-15 利用三嵌段高分子 P123 作為模板，形成的孔洞大小比 MCM 系列的大而且孔壁也較厚，水熱穩定性較佳。
2. 利用 TMB(三甲基苯)或其他疏水性擴孔劑可以調控孔徑大小，可依照大分子藥物的大小尺寸進行微調。
3. 除了孔徑可調控以外，還可以進行表面修飾，修飾與蛋白質接合之官能基團使其優化，在包覆與釋放都有不錯的表現。
4. 尚有比表面積大與生物相容性佳...等優點。

1-2 藥物傳輸系統之概述

藥物傳輸系統(Drug Delivery System, DDS)簡單來說就是指將患者在接受治療的過程中，所使用的各種藥物的不同給藥模式，在藥劑學上稱之為劑型，如膠囊、注射劑、錠劑、貼片、軟膏與氣霧劑等等。劑型的發展也隨著科技發展的進步而日新月異，從簡單的口服藥丸、外用藥膏等劑型，一直到改良成普通貼片、膠囊與氣霧劑，解決了大部分藥物在使用上的問題，同時也提高了部分藥物的使用率。而後來開發出來的控釋劑型能夠使用藥人體內的藥物濃度的有效濃度能維持較長的時間而不需要頻繁的給藥，這改善了大部分需要長期服藥患者的生活，除了提高醫療品質同時也減少了患者藥物使用量的負擔。

藥物傳輸系統當前也致力於靶向給藥系統中的發展，靶向給藥是專門針對癌症患者的給藥模式，主要是將藥物的有效濃度集中在病人的患部，藉此提高療效並降低了抗癌藥物對全身有害的毒副作用；還有結合了生物技術的脈衝給藥，它是一種與生理脈動同步而能根據接收到的回饋訊號自動調整藥物釋放量的給藥技術 (Maria, 2007)。

藥物劑型的改變，使控制給藥(controlled-release)有突破性的發展，藥物新劑型也能統稱為藥物調控傳輸系統(drug controlled delivery system)，依不同的功能可分為速度性控釋、方向性控釋、時間性控釋和隨症調控式等個體化給藥系統，適當的給藥系統可以提高藥物的療效並且減少副作用，不只增加患者用藥的便利性，同時也提高了藥物的附加價值，使其更有競爭力(陳, 1989)。



1-3 奈米藥物技術的介紹

奈米藥物技術是融合了奈米科技同時改良傳統藥物技術，是一種新興的藥物技術，奈米科技帶來新的物質與材料與其新的物理、化學特性，將應用於藥物的設計、開發與製造。相較於傳統藥物，藉由對分子甚至原子層級物質的觀測與精確設計製造能力，奈米藥物技術更能精確的控制藥物作用機制、生理反應、改善藥物動力學與相關製造技術等特性，進而提升藥物的效率，便利性與安全性。

依照奈米藥物技術的應用方面來區分，可以分為奈米新藥與奈米藥物傳輸技術兩方面。奈米新藥是把奈米技術應用在新藥的開發上，將奈米物質特有的性質與致病分子、抑制治病機制與破壞病原體做結合，以減輕或消滅其致病能力；而奈米傳輸技術的發展較多元，主要的發展方向包括了微脂粒技術、高分子聚合應用與奈米碳球等。主要的應用方向就是針對藥物做劑型的改良，利用奈米技術使藥物能夠更有效的在人體中釋放。奈米藥物傳輸載體的材料及結構上也有許多的發展方向，例如載體型態的改變、藥物包覆、表面修飾、配位體(ligand)的結合與仿效材料包覆等，這些都能透過不同載體的設計來達到藥物的精確控制釋放與傳輸功能，還有良好的生物相容性。Fig 1-2 是奈米藥物傳輸載體的技术關聯圖，包含了目前主要的奈米藥物傳輸載體的分類，當中的”其他奈米粒子與奈米結構”這個項目包括了矽質奈

米結構(silicon based nanostructure)，正是本實驗要討論的藥物釋放所用的奈米矽材載體。

一般來說，大部分的矽質奈米結構不是利用奈米粒子，而是利用結構中的奈米孔道作為藥物儲存及釋放，這些奈米孔洞不只可以應用於小分子藥物，也可以裝載胜肽、基因和蛋白質等的大分子藥物。由於矽質奈米結構有著高比表面積與表面可以修飾成多種官能基團的優點，提高了與各式藥物結合的可能性及應用方面，同時也擁有優良的生物相容性，使矽質奈米結構材料的研究相當具有前瞻性（曾，2003）。

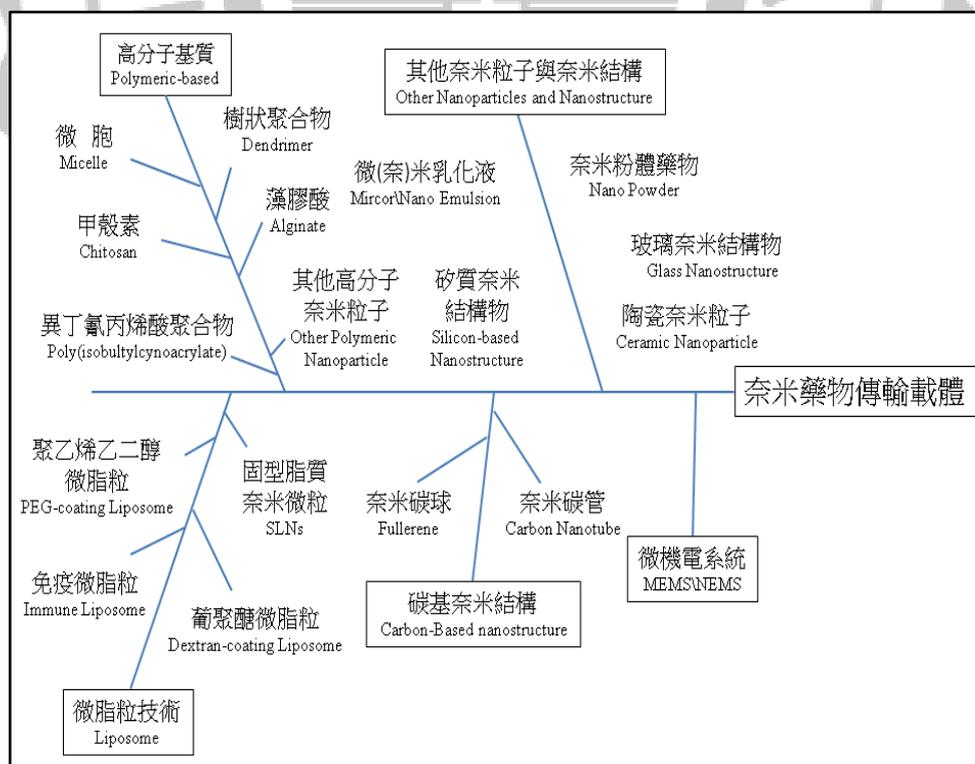


Fig. 1-2 奈米藥物傳輸載體技術關聯圖（曾，2003）。

1-4 蛋白質藥物的介紹

1-4.1 牛血清蛋白(BSA)的介紹

牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)，牛血清中的簡單蛋白，是一種球蛋白，血液中的主要成分(38 g/100 ml)，分子量為 66.430 kDa，等電點為 4.7，含氮量 16%，含糖量 0.08% (僅含已糖和已糖胺)，含脂量只有 0.2%。BSA 包含了 583 個氨基酸殘基，其中的 35 個半胱氨酸組合成 17 個雙硫鍵，一般用於限制酶或是修飾酶的保存溶液和反應液中做為穩定劑來使用，因為部分的酶在低濃度的狀態下不穩定或活性偏低，BSA 可以起到”保護”或”載體”的作用，不少酶類在添加了 BSA 之後能夠大幅度的增加酶的活性；當然，若此酶類不需要靠加入 BSA 來增加活性，添加 BSA 也不會對此酶類造成什麼不利的影響。

1-4.2 溶菌酶(Lysozyme)的介紹

溶菌酶 (lysozyme) ，又稱胞壁質酶 (muramidase) 或 N-乙醯胞壁質聚糖水解酶 (N-acetylmuramide glycanohydrilase) ，是一種能水解致病菌中黏多糖的鹼性酶。存在於人體多種組織中，鳥類和家禽的蛋清，哺乳動物的淚、唾液、血漿、尿和乳汁等體液以及微生物中也都含有此酶，其中以蛋清含量最為豐富。從雞蛋清中提取分離的溶菌酶是由 18 種 129 個氨基酸殘基構成的單一肽鏈。它富含鹼性氨基酸，有 4 對二硫鍵維持酶構型，是一種鹼性蛋白質，其 N 端為賴氨酸，C 端為亮氨酸。其分子量為 14.4 kDa，等電點約為 10~11 之間。溶菌酶的催化反應主要是藉由破壞微生物的細胞壁中的 N-乙醯胞壁酸和 N-乙醯氨基葡糖之間的 β -1,4 糖苷鍵 (β -1,4 glycosidic bond)，使細胞壁不溶性黏多糖分解成可溶性糖肽，導致細胞壁破裂內容物逸出而使細菌溶解。溶菌酶還可與帶負電荷的病毒蛋白直接結合，與 DNA、RNA、脫輔基蛋白形成複鹽，使病毒失活。因此，在醫學上溶菌酶也具有消炎消腫、抗菌、抗病毒、止血及加快組織恢復功能等作用。所以在臨床上也用來治療慢性鼻炎、急慢性咽喉炎、口腔潰爛、水痘、帶狀皰疹和扁平疣等疾病 (Harvey, 2002), (Neal, 2003)。

研究中選用溶菌酶與常見且便宜的 BSA 兩者來作為蛋白質藥物的模型，探討在不同 pH 環境下，SBA-15 對上述兩者的吸附量與藥物釋放速率之關係；也因兩者與 SBA-15 等電點的差異，分別做為高、低等電點的代表，探討載體與蛋白質分子之間的靜電作用力所造成吸附量的差異。Table 1-2 列出上述兩者作為藥物模型的蛋白質之物理性質，其分子量、大小與等電點都是很重要的參考性質。

Table. 1-2 牛血清蛋白(BSA)與溶菌酶(Lys)的物理性質。

Protein	Molecular mass	Isoelectric point	Dimension
BSA	66430	4.7	40Å*40Å*140Å
Lysozyme	14400	10~11	30Å*30Å*45Å

1-4.3 辣椒素(Capsaicin)的介紹

辣椒素(Capsaicin)，即反式-8-甲基-N-香草基-6-壬烯醯胺，是辣椒的活性成分。它對包括人類在內的哺乳動物都有刺激性並可在口腔中產生灼燒感，而灼燒感的程度是由史高維爾指數來做測定。辣椒素和與其相關一些的化合物並稱為辣椒素類物質(Capsaicinoids)，它們可能是辣椒為阻止草食動物啃食和真菌寄生而產生的次級代謝產物，一般鳥類都對辣椒素類物質不敏感。純的辣椒素是一種斥水親脂、無色無嗅的結晶或蠟狀化合物。Table 1-3 為史高維爾指數-辣度的指標。

辣椒素在醫學上也有很多貢獻，除了常見的消炎、止痛跟治療肌肉痠痛外，因為它能有效的降低血壓和膽固醇，進而能在大的程度上預防心臟病。更有研究小組在動物試驗中發現，辣椒素具有促進肌肉生長，抑制肌肉萎縮的作用，研究人員認為這發現有助於肌肉萎縮治療藥物的發展。但由於大量的辣椒素可成為致命毒物，人體在吸取過量辣椒素後，會出現呼吸困難、藍皮膚及抽搐等症狀。在可攝取量方面，兒童比成年人少得多。因此，有必要確認使用辣椒素的安全性，希望在確認安全性後，借助辣椒素開發新的肌肉萎縮治療藥物。本研究與台中榮總合作，利用 SBA-15 作為載體來進行辣椒素的包覆，並且在白老鼠上施行動物試驗 (Kuo;, 1994)。

研究中也利用 HPLC 來對辣椒素釋放測試所得之上清液進行定量分析，進而探討其釋放效果。HPLC 之管柱為 C18 色譜柱，流動相為乙晴與水(50:50)，流速 1 ml/min，檢測波長為 229 nm (張, 2007)。

Table. 1-3 部分辣椒的史高維爾指數。

種類	史高維爾指數
純辣椒素	16,000,000
軍用催淚瓦斯	5,300,000
特立尼達蠟子壯漢 T	1,460,000
朝天椒	30,000
普通辣椒	10,000
甜椒	0~5

1-5 中孔洞矽材 SBA-15 的介紹

1-5.1 嵌段共聚物溶液的自組裝

嵌段共聚物(block copolymer)是指將兩種或兩種以上不同性質的聚合物鏈段連在一起製備而成的一種特殊聚合物，它可以將多種聚合物的優良性質結合在一起，得到性能比較優越的功能聚合物材料。在奈米科技的發展上也興起了新的研究領域。在 1995 年 Zhang 與 Eisenberg 率先提出嵌段共聚物能在溶液當中進行自組裝(self-assembly)，並形成一系列型態迥異的微胞(micell)，主要是由含長鏈疏水鏈段的、非對稱的兩性嵌段共聚物聚合形成大核小殼的微胞，這種型態的微胞稱之為平頭微胞(crew-cut micell) (Zhang, 1995)，也展開了嵌段共聚物在各方面的發展與應用 (Gebhart, 2001), (Lim Soo, 2002)。

嵌段共聚物自組裝的原理主要是由於該分子在水溶液當中仍然保有不同嵌段間的不相容性，至少含有一個疏水鏈段跟一個或多個親水鏈段的兩性嵌段聚合物也是如此，藉由在水溶液中疏水鏈段的疏水性質來驅動聚合物鏈的聚集以形成微胞。然而，嵌段共聚物在水溶液當中需要達到一定量的濃度才能發生自組裝而形成微胞，此濃度稱之為臨界微胞濃度(critical micell concentration, CMC)。雖然組裝

的模式與一般的小分子介面活性劑相似，但嵌段共聚物的自組裝有更佳的可調控性，使我們可以藉由高分子聚合的技術來達到各種不溶性嵌段與可溶性嵌段的鏈長比，進而獲得一系列對稱(鏈段長相同)與不對稱(鏈段長不同)的嵌段共聚物。其中，主要影響嵌段共聚物形成的微胞型態，造成形態上的改變的是三種力之間的平衡，核與殼之間表面作用力、成核鏈段的伸展以及殼鏈段之間的排斥；嵌段共聚物的相對鏈長、聚合物濃度、溶劑組成和性質、添加劑和溫度等，只要是能夠影響這三種作用力的因素都能改變微胞的型態 (Wang, 2000)。

本研究中所使用的藥物載體 SBA-15，則是以一三嵌段共聚物 P123($\text{EO}_{20}\text{-PO}_{70}\text{-EO}_{20}$)所形成的微胞作為模板，並以四乙基矽氧(TEOS)作為矽源所合成的中孔洞矽材 (Kim, 2002)。對用來當作藥物載體的 SBA-15 粒子，要求其形貌、分散性與均一性的良好，而 SBA-15 是受到嵌段共聚物聚合成之微胞的影響。此外，額外添加的 TMB 能改變合成之 SBA-15 的孔徑大小，所以能改變 SBA-15 的孔徑來針對各種大大小小的蛋白質進行包覆。因此，研究中也探討合成因素對 SBA-15 的影響 (Desbaumes, 1998), (Shen, 1999)。

1-5.2 SBA-15 的介紹

國際純粹與應用化學聯合會(IUPAC)依照孔徑的大小，將多孔性材料(porous materials)分類成三種(詳見 Table 1-4)，微孔材料(microporous materials)、中孔材料(mesoporous materials)與大孔材料(macroporous material)，而 SBA-15 被歸類為中孔材料。

1998 年，美國加州聖巴巴拉大學(University of California, Santa Barbara, California, USA)由 Stucky 等學者合成出 SBA-15，利用三嵌段共聚高分子(Tri-block copolymer)Pluronic P123(E020-P070-E020)處於酸性環境中，不同區段碳鏈的親疏水性差異的特性，與 TEOS 提供帶正電荷的矽源(SiO_2)作結合，並且在靜電吸引力(Electrostatic force)、氫鍵作用力(Hydrogen-bonding)與凡得瓦力(van der Waals)，三種力之間的交互作用下，成功的合成出來具有六角形規則排列的中孔洞材料 SBA-15。與同樣是六角排列、一維孔道的中孔材料 MCM-41 比較，SBA-15 的優點是對於孔徑可調控的範圍(5~30 nm)比 MCM-41 來的大，孔壁也比較厚，因此在水熱穩定性、機械強度，以及在移除模板後分子在孔洞中的擴散速率，所以預期 SBA-15 的表現會比 MCM-41 來得優秀許多(Zhao, 1998)。

以兩性嵌段共聚物當作模板所合成的介孔氧化物(mesoporous oxides)材料，主要是由三種因素所構成，溶劑、模板與無機源。藉

由這三項條件彼此之間的相互作用，可以合成出各種型態的孔洞材料，Fig 1-3 顯示其三項條件之間的相互作用關係。先是溶劑與嵌段共聚物之間的相互作用，嵌段共聚物的親疏水鏈段在溶劑當中進行自組裝形成微胞而成為模板；再加入無機源後，模板的介面與無機源之間產生作用力，使無機源可以吸附在模板上。以 SBA-15 來看，P123 形成的微胞與二氧化矽之間產生作用力，跟 pH 有密切的關係，若溶液的 pH 低於二氧化矽的等電點(pI 2~4)，則模板的親水鏈段與二氧化矽的表面皆帶正電，這時候是利用溶液中的陰離子作為媒介來吸附於模板表面。當 pH 介於二氧化矽的等電點時，模板與其之間則是以氫鍵為作用力，詳情可看 Fig 1-4 的示意圖。同時，無機源在此溶劑中會進行聚合反應，最後再用鍛燒的方式將模板去除就能得到中孔材料 (Soler-Illia, 2003)。

Table. 1-4 多孔性材料之孔洞大小的分類。

孔洞材料	孔徑大小(直徑, nm)	實例
微孔材料	小於 2	ZSM-5 沸石、活性炭
中孔材料	在 2~50 間	MCM-41、SBA-15
大孔材料	大於 50	離子交換樹脂

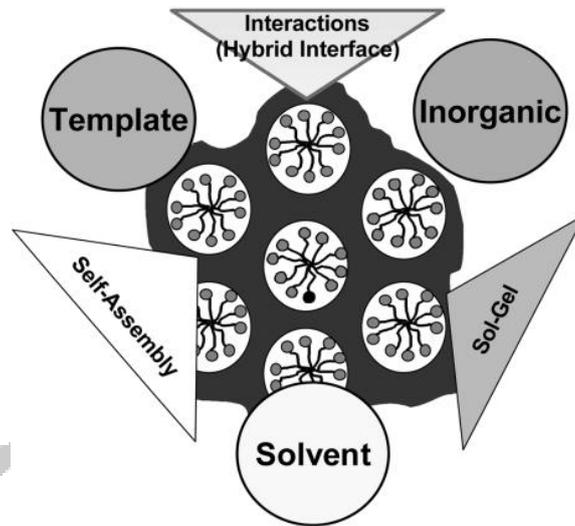


Fig. 1-3 溶劑、模版與無機源在合成介孔氧化物之主要關係圖 (Zhao, 1998)

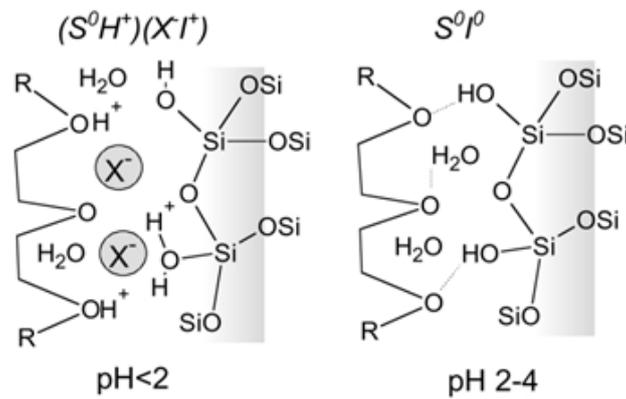


Fig. 1-4 不同 pH 環境下，表面活性劑與矽源在介面處的作用關係 (Soler-Illia, 2003)

研究中所使用的 SBA-15 就是由上述原理所合成出來的中孔材料，流程圖可以參考 Fig 1-5 (Soler-Illia, 2003)。兩性嵌段共聚物 P123 在溶液當中形成柱狀微胞，微胞與微胞之間因相互作用力而互相吸引靠近，這時加入的矽源(TEOS)會進入微胞與微胞之間的縫隙當中進行縮合聚合，反應完畢之後利用鍛燒的方式去除模板就可以得到中孔材料。可以參考 Fig 1-6 TEOS 水解聚合的反應機制，以氫離子作為催化劑，經過複雜的過度狀態後，生成取代過度狀態 $n=1$ 的產物，當 $n=1\sim 4$ 的起始取代物共混時，將會形成複雜的立體網狀多聚體的結構(sol-gel 過程) (汪, 2006)。

此外，在 SBA-15 合成的過程之中，有一個水熱(Hydrothermal)反應，是在移除模板之前，先將聚合完後的粒子置於高溫的環境當中；在這個高溫的環境下，嵌段高分子的親水鏈段的極性會減弱，相對會增加其疏水性，使得親水鏈段往內收縮，造成 PEO 鏈段與矽材分離，讓孔壁的結構可以更加的完整。若沒有進行水熱反應就移除模板，會造成孔壁上有隙縫的產生，進而會使孔道結構不穩定而造成崩塌。有無水熱反應的影響之差異可以詳見 Fig 1-7。

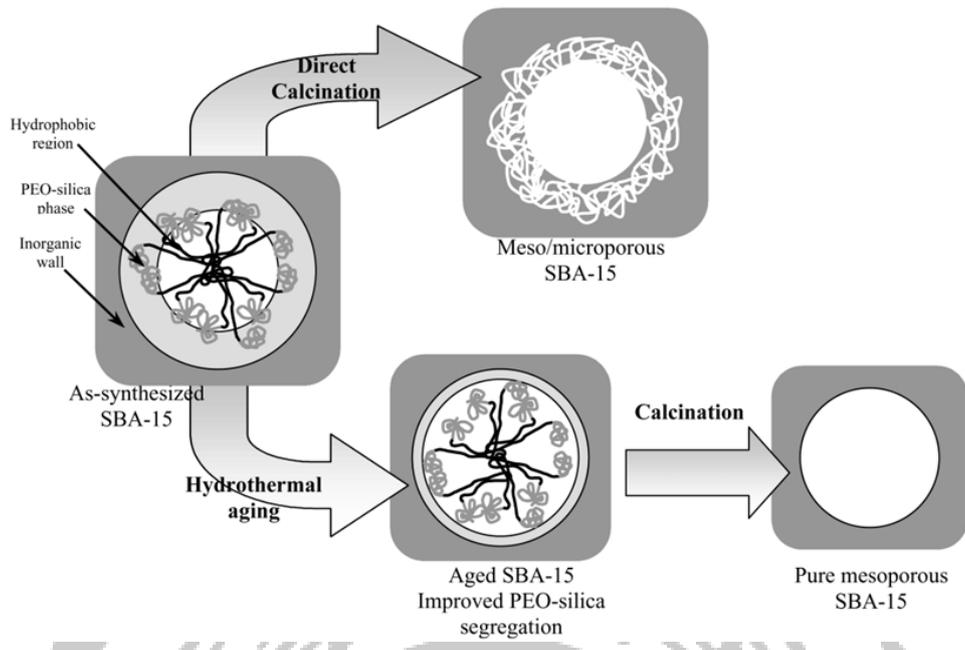


Fig. 1-7 水熱反應對 SBA-15 孔壁結構的影響(汪, 2006)。



1-6 蛋白質與載體的結合

在藥物調控釋放系統中，首先要考慮的就是蛋白質如何與載體作結合，而材料表面上的性質，對蛋白質的吸附與脫附有很大的影響。所以只要改變載體表面上的親疏水性、帶電性與特殊基團等性質，就會對蛋白質的吸脫附造成明顯的影響。另外，載體的立體空間結構 (steric structure) 與表面的粗糙度 (surface roughness) 也是需要多加考慮的因素之一。對於中孔材料來說，恰當且適合的孔徑大小能更有效的穩定蛋白質的結構，這就等於維持了藥物的活性；而適當的表面粗糙度則能夠增加載體與蛋白質之間的結合面積 (Temenoff, 2008)。材料表面性質與蛋白質的相互作用請參考 Table 1-5。

蛋白質主要的組成成分有 20 多種的胺基酸，而且組合序列多變，常使蛋白質的分子結構外圍同時會具有多種的化學作用力，如疏水作用區、極性作用區以及離子作用區等。因此，載體的表面性質可以配合所要包覆的蛋白質藥物分子來進行改質。研究中所使用的 SBA-15 的等電點較低，約在 2~4，所以其表面在中性溶液的環境下會帶負電，所以和 pI 值較高的蛋白質會以靜電吸引力來吸附。Fig 1-8 為載體表面與蛋白質相互作用的關係圖。

Table. 1-5 材料表面性質與蛋白質相互作用的關係(Temenoff, 2008)。

表面性質	作用
形貌(粗糙度)	多皺褶表面與蛋白質相互作用區域多
組分(修飾基團)	化學組成決定分子之間作用力的類型，進而控制材料與蛋白質間的作用力
疏水性	疏水表面能結合更多的蛋白質
異質性	表面特性的非均一性會產生與蛋白質相互作用於不同的區域
電位	表面電位影響溶劑中的離子分布以及與蛋白質的相互作用

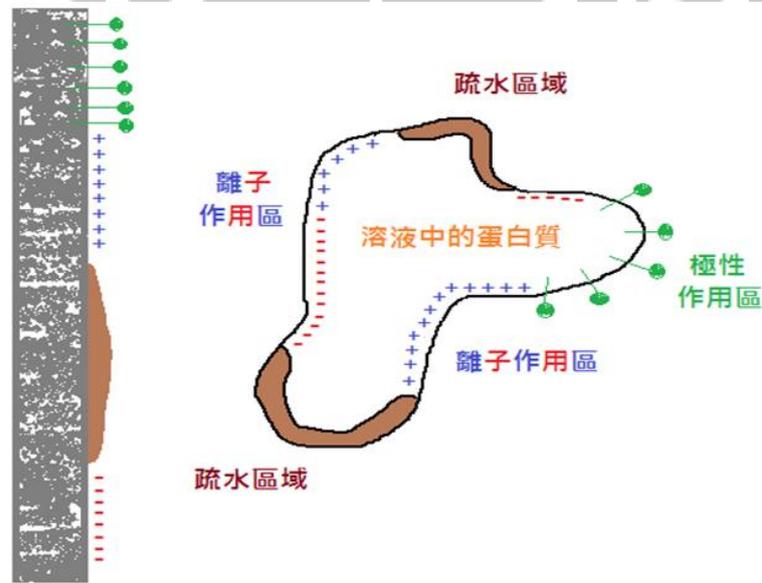


Fig. 1-8 材料表面與蛋白質的相互作用示意圖(Temenoff, 2008)。

1-7 SBA-15 表面修飾法的簡介

研究中所用的表面修飾法為無水有機溶劑法，使用乾甲苯作為有機溶劑，以一定的比例與官能基團試劑混和，並在高溫的環境下進行反應，再用乾甲苯清洗並收集後烘乾即可。表面修飾將針 SBA-15 對蛋白質(BSA 與 Lys)的吸附量上進行修飾，透過改變 SBA-15 上的官能基團，使其能夠與蛋白質之間產生新的鍵結而更能有效的結合。

由於無水有機溶劑法屬於後製備的修飾步驟，是在 SBA-15 製備完成之後才進行改質的實驗過程，這對 SBA-15 粒子的形貌影響較來得小，在能夠保持 SBA-15 之球形的形貌下才來修飾。官能基試劑選擇氯甲基(CMTS, chlormethyltriethoxysilane)、正辛基(OcTS, octyltriethoxysilane)與氨基(APTS, aminopropyltriethoxysilane)三種來進行修飾，並且探討其中與 BSA 及 Lysozyme 的包覆效果與釋放情形 (Russo, 2011), (Michal, 2012)。

對於 SBA-15 表面修飾的方法，主要可以分為下述三種：

1. 共結合法(co-condensation):

將矽烷與 TEOS 等的矽前驅物以一定的比例混合進行反應，再加入界面活性劑模板一併反應及結構形成，並且必須使用溶劑萃取法將模板取出，若使用高溫鍛燒法將會使原本結合並存在於管壁的有機官能基一併被燒毀。

2. 無水有機溶劑法(silylation):

將 SBA-15 與不含水的有機溶劑混合，加入矽烷反應即可得已修飾之 SBA-15。

3. 加水有機溶劑法(coating):

將矽烷加入反應前先加入適當水分使覆蓋於 SBA-15 表面，再加矽烷進行修飾反應。

第二章 文獻回顧與研究動機

2-1 文獻回顧

對於人類的身體保健來說，藥物控制釋放系統(Control drug-delivery system)是一門相當重要而且具有前景的研究，同時在生醫材料方面也是一門永續發展的領域。藥物控制釋放系統就是針對劑型作一些改變再加以應用，為了達到控制藥物的釋放時間以及速率，或是能針對患部來進行釋放，使藥效提高並減少副作用的產生。

近年來，由於奈米科技的進步，各種材料都朝著奈米化的發展，當然，這種奈米材料也被用於生物醫學之中。最初在 2001 年，中孔材料 MCM-41 第一次被用於藥物釋放系統中，此舉開拓了奈米材料在生醫之中的應用 (Vallet-Regi, 2000)；隨後，SBA-15、MCM-48 等材料也都被拿來進行藥物釋放系統的研究。而本研究中會使用 SBA-15 來做為藥物的載體，是基於 SBA-15 相較 MCM 系列的中孔材料，SBA-15 有著較大且可調控的孔徑範圍，可以用來作為大分子藥物的控制釋放系統。而孔洞材料之所以能夠應用在藥物控制釋放系統中，主要是有下列優點：1. 具有規則的孔道，均一的孔徑，在藥物儲存及釋放動力學上相較容易。2. 高孔洞體積，能夠儲存大量的藥物。3. 高比表面積，對於吸附藥物有相當大的幫助。4. 表面上的矽氫氧基團(Silanol

group)容易被修飾，使其在控制釋放以及藥物儲存上更有潛力。

應用於生醫中的中孔材料，必須要加以探討其生物相容性，而會影響生物相容性的參數主要包括植入部位、材料的形狀和大小，當然還有表面化學所造成的影響 (Park, 1996)。大部分以矽為主的植入性材料都已經被證實了具有良好的生物相容性 (Korteso, 2000)，但是在中孔洞矽材被大量的用於藥物控制釋放系統研究的同時，其顆粒大小、形狀以及表面性質的差異等，使中孔材料的生物相容性需要額外的探討。在2008年，Hudson等學者針對中孔洞矽材的生物相容性進行了研究，探討了不同粒徑與孔徑的中孔矽材在體內(in vivo)與體外(in vitro)的生物相容性。體外測試的部分，高濃度的中孔洞矽材對間質細胞(mesothelial cells)具有毒性。但是在大鼠(rat)的皮下注射測試方面卻展現了良好的生物相容性，殘留的矽材在三個月的時間內會逐漸地被分解，而且在各個時間點並沒有觀察到毒性現象的產生。在小鼠(mouse)方面，對腹膜內及靜脈內注射中孔洞矽材，卻發生了小鼠死亡的現象。雖然局部的組織對於中孔洞矽材的生物相容性是溫和的，但仍然有可能會引發嚴重的組織毒性；對於這樣的結果希望能藉由矽材的表面修飾來使毒性減弱，讓中孔洞矽材在生醫方面的應用更加完善 (Hudson, 2008)。

當然，在合成中孔洞矽材 SBA-15 的過程中，周遭環境的條件都會影響到最後 SBA-15 粒子的成形，例如 TEOS 與 TMB 的比例、鹽酸濃度、攪拌以及溫度等條件的不同，對所合成出來 SBA-15 的形貌上會有極大的差異。Fig 2-1，可以藉由此圖看出在不同條件的控制之下，所合成出來各種形狀的 SBA-15。另外，Fig 2-2 可以看出控制條件的差異，也會對 SBA-15 粒子間的分散性造成影響，圖中可以看出團聚現象相當明顯 (Che, 2005), (Lee, 2010)。

2002 年，Stocky 等學者進行模擬不同碳鏈長度的高分子所形成的微胞之差異，利用不同親水端與疏水端之鏈長比例的嵌段高分子來聚合成微胞，作為中孔洞分子篩的結構決定試劑，並且藉由嵌段高分子上的親水端與疏水端之間的平衡來達到微胞的堆積控制 (Micelle-packing control)，以至於可以設計出不同結構的中孔洞材料，進一步的研究微胞堆疊與中孔洞結構的關係 (Nguyen, 2008)。(Fig 2-3 可以看出不同親疏水端鏈段比例的差異與微胞堆積之關係。)

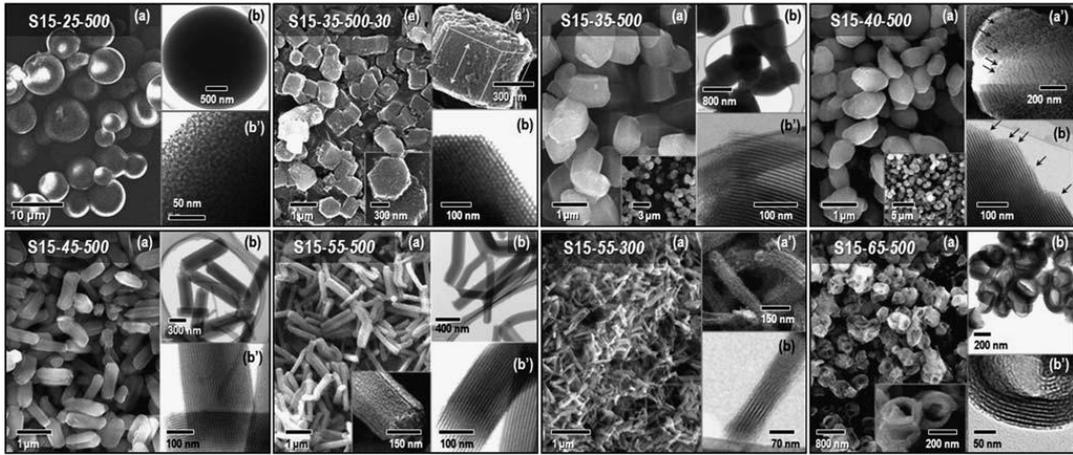


Fig. 2-1 合成溫度與攪拌速率影響 SBA-15 形狀之 SEM 圖 (Che, 2005)。

(S15-X-Y; X 為溫度, Y 為攪拌速率)。

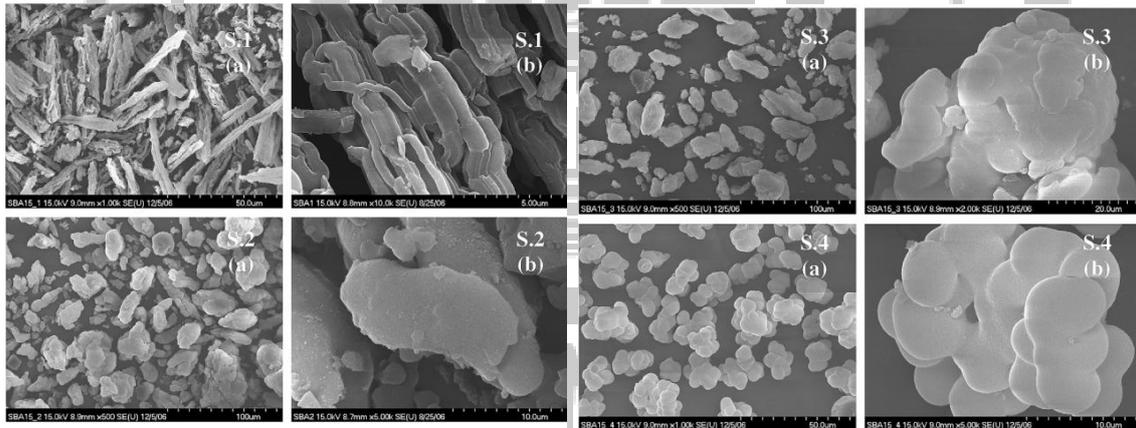


Fig. 2-2 TMB 含量影響 SBA-15 粒子分散性之 SEM 圖 (Lee, 2010)。

(合成條件參閱下表, 其中 S4 為 S3 修飾胺根)。

Sample	Weight ratio TMB:P123	Condensation reaction		Aging	
		Temp. (°C)	Time (h)	Temp. (°C)	Time (h)
S.1	0:1	35	24	80	24
S.2	1:1	35	24	120	72
S.3	1:1	35	24	120	144

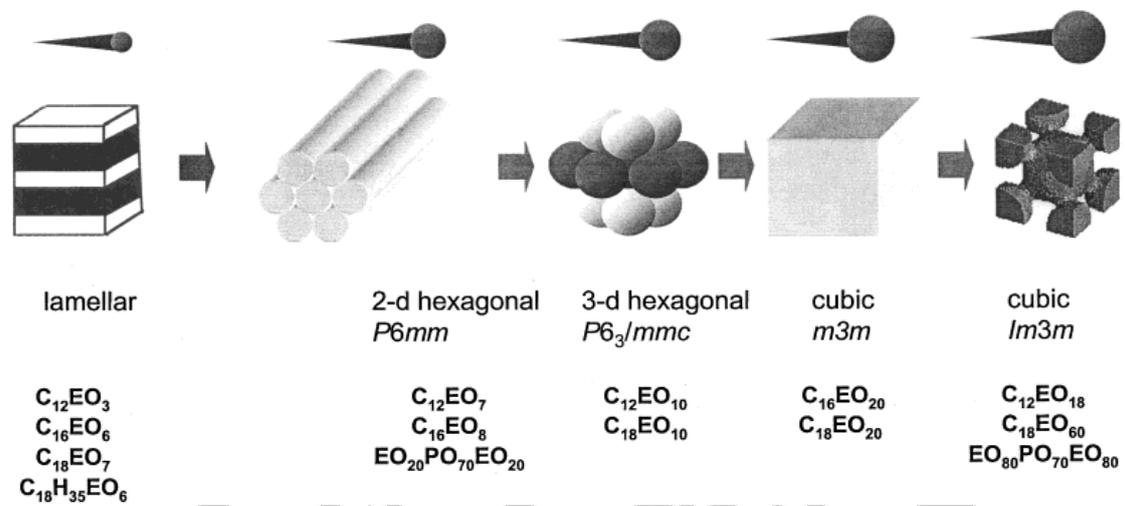


Fig. 2-3 兩性嵌段高分子親疏水鏈段比例之差異，對微胞堆積的影響示意圖 (Nguyen, 2008)。



而嵌段高分子共聚物的堆疊型態與其臨界堆積參數(critical packing parameter, CPP)有著密切關係，根據 Mitchell 和 Ninham 等人所提出的分子堆積模型理論來描述微胞堆積的形狀，並用一個簡單的數學式來預測微胞的形狀與可能堆疊的結構。

$$g=V_c/(a_0*L_c) \quad (2-1)$$

式(2-1)中的 g 為臨界堆積參數， V_c 為界面活性劑的疏水鏈段所佔的體積， a_0 為界面活性劑親水端的有效面積， L_c 為疏水性尾鏈的長度。計算出的臨界堆積參數與微胞形成的結構之關係可以參考 Table 2-1。

Table. 2-1 界面活性劑堆積參數(g)與微胞結構之關係。

堆積參數(g)	微胞結構
0~1/3	球狀微胞
1/3~1/2	柱狀微胞
1/2~1	柔性雙層或囊泡微胞
~1	平板層狀微胞
>1	反微胞

不同鏈段長度的兩性嵌段高分子，在相同的條件下進行聚合反應，得到了親疏水端鏈段長比例的差異與堆積參數及微胞之間的關係，隨著嵌段高分子鏈長的增加、溶液環境的改變可以得到多種的微胞型態。以 P123 來說，PEO 鏈段被溶劑充分包圍時，形成的微胞為球形；而溶液中含有鹽酸及極性較弱的分子(乙醇或疏水性分子)，鹽酸會使 PEO 鏈段脫水，極性較弱的分子會進入 PEO 鏈段，使微胞形成柱狀；若疏水性分子的含量增加，微胞會形成含有油核的微乳液滴。形狀的詳情請參考 Fig 2-4(Lettow, 2000)。

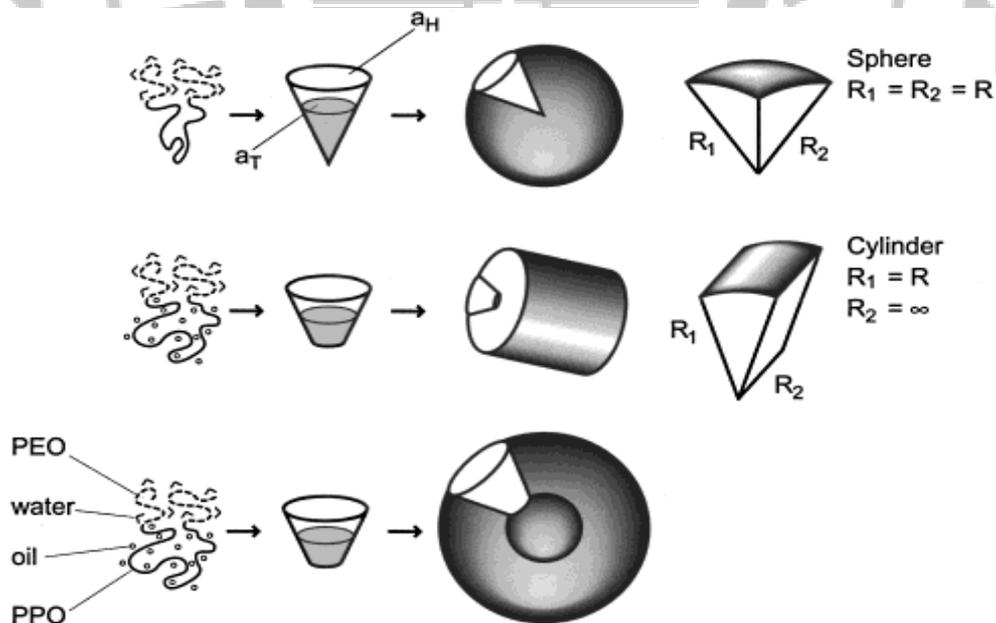


Fig. 2-4 P123 受到溶液影響而改變堆積參數所形成微胞的形貌(Lettow, 2000)。

2-2 研究動機

由於生物醫學技術的進步，應用於臨床醫學上的材料也有很大的發展，利用蛋白質藥物來進行治療也有新的方向。因此，在藥物控制釋放系統當中，可以針對蛋白質藥物的大小來調整孔徑的 SBA-15 有很大的發展空間。

考慮到生物相容性的問題，在 SBA-15 的製備上，我們要求分散性良好，球形且形貌均一的 SBA-15 粒子，因此，參考各文獻中對 SBA-15 的合成因素及條件，TEOS、TMB 的濃度與比例、合成溫度、鹽類濃度與攪拌情形等，綜觀實驗中的各種條件，並從中探討各項因素對分散性良好的球形 SBA-15 粒子合成之影響。

將製備出來的 SBA-15 粒子應用於藥物控制釋放系統的研究中，利用蛋白質作為大分子藥物的模型，進行藥物的包覆與釋放之分析。使用的蛋白質為 BSA 與 Lysozyme，包覆實驗中探討不同 pH 與蛋白質等電點的不同對包覆效果的影響；並且在釋放實驗中選擇 pH 7.4、37 °C 的環境下進行測試(正常人體內的環境 pH 與體溫)，探討其釋放效果。

研究中也與台中榮總醫院合作，對臨床上具有醫療效果的辣椒素 (Capsaicin) 進行包覆與釋放的實驗，並由榮總協助進行白老鼠的活體試驗，除了觀察到研究中合成的 SBA-15 粒子的生物相容性良好外，同時也證明了利用 SBA-15 粒子進行的藥物釋放控制實驗是可行的。

另外在 BSA 的包覆與釋放的實驗中，發現 BSA 不容易包覆於 SBA-15 之中，同時其釋放速度過快也不理想，為了改善這類型蛋白質藥物的包覆與釋放問題，針對 SBA-15 粒子上的官能基團進行修飾的研究是必要的。希望能改善 SBA-15 對 BSA 的包覆效果不佳的情況，同時也希望改善其是放速度過快而無法達到藥物控制的目的，並且能進一步的應用在對像是 BSA 這種不利於包覆的蛋白質藥物之中。研究中利用氯甲基(chloromethyl, CM)、氨基(aminopropyl, AP)與正辛基(octyl, Oc)等官能基團做修飾，並探討其中與蛋白質接合並影響包覆、釋放的關係，希望能夠優化藥物釋放控制的效果。

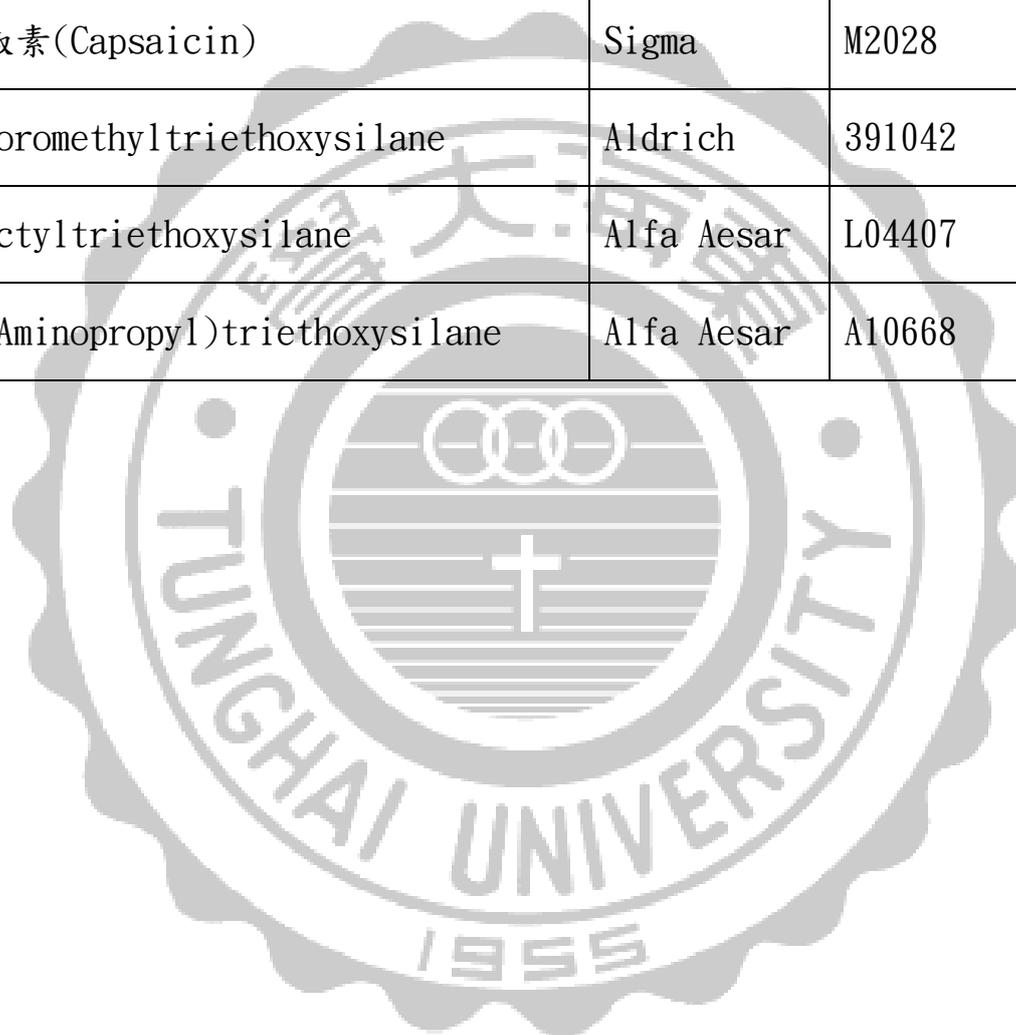
第三章 實驗材料與儀器原理

3-1 實驗藥品

本研究所使用的藥品皆是試藥級以上的純度，使用前不需要再經過純化步驟，其產品編號及供應廠商如下：

藥品名稱	廠商	產品編號
鹽酸(Hydrochloric)	Merck	1.00317.2500
甲苯(Toluene, 99.8 %)	Tedia	TS2132-001
磷酸二氫鉀 (Potassium phosphate monobasic)	USB	20227
磷酸氫二鉀 (Potassium phosphate diabasic)	USB	20274
氯化鈉(Sodium chlorid)	Merck	1.06404.1000
氯化鉀(Potassium chloride)	Merck	1.04936.0500
P123(poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide))	Aldrich	435465-250
TEOS(Tetraethoxysilicate)	Aldrich	s46886-158

TMB(1, 3, 5-Trimethylbenzene)	Aldrich	s29028
Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio Rad	1-800-424-6723
牛血清蛋白(BSA)	Sigma	A7030
溶菌酶(Lysozyme)	USB	E. C. 3. 2. 1. 17
辣椒素(Capsaicin)	Sigma	M2028
Chloromethyltriethoxysilane	Aldrich	391042
n-Octyltriethoxysilane	Alfa Aesar	L04407
(3-Aminopropyl)triethoxysilane	Alfa Aesar	A10668



3-2 實驗儀器

研究中所使用的儀器之出廠公司及型號如下：

儀器名稱	製造廠商名稱	型號
場發射掃描式電子顯微鏡 (FESEM)	JEOL (Tokyo, Japan)	JSM-7000F
磁石攪拌器 (Hotplate stirrer)	LabTECH (Beijing, China)	LMS-1003
微量電子天秤 (Micro-Electronic Balance)	OHAUS (New Jersey, USA)	AR1530
微量移液吸取器 (Micro-pipette)	Eppendorf (Hamburg, Germany)	Research 1000/200/100/10
烘箱 (Oven)	DENG YNG (Taipei, Taiwan)	DOV30
酸鹼度計 (pH meter)	Suntex (Taipei, Taiwan)	SP--701
一般冰箱(4 °C) (Refrigerator)	TECO (Taipei, Taiwan)	RE7222

低溫冰箱(-20°C) (Low temperature refrigerator)	Fisher&Paykel (Queensland, Australia)	Standard H160
超純水機 (Ultrapure water system)	Barnstead (Dubuque, Iowa , USA)	NANO Pure Dlamond™
試管震盪器 (Vortex-Mixer)	Scientific Industries (New York, USA)	VORTEX-2 GENIE
恆溫水浴槽 (Thermostat Bath)	FIRSTEK (Taipei, Taiwan)	B206
高溫爐	NEY (U. S. A.)	3-130
金屬濺鍍儀	JEOL (Tokyo, Japen)	1200
氮氣等溫吸脫附儀	Micrometrics (Norcross, U. S. A)	ASAP2020
紫外光/可見光分光光度儀	SHIMADZU	UVmini-1240
熱重分析儀	TGA (DuPont TA)	Q50

3-3 儀器原理

3-3.1 場發射掃描式電子顯微鏡(FFSEM)

一般的電子顯微鏡是利用高加速電壓的入射電子束(Electron beam)打擊在試片上，用產生出來的二次訊號來分析各種性質，Fig 3-1 是試片與電子束作用的原理。二次訊號包括了直射電子、散射電子、二次電子(Secondary electron)、背向散射電子(Backscattered electron)、Auger 電子及 X 射線。而場發射掃描式電子顯微鏡的成像原理則是利用一個強電場，使燈絲針尖端的電子受到電場吸引而射出，發射出來的電子束會經過柵極(Wehnelt Cylinder)靜電聚焦之後，形成一個約 10~50 μm 大小的點光源，在陽極加速電壓的作用下，經過 2 至 3 個電磁透鏡所組成的電子光學系統，將匯聚成直徑細小約 5~10 nm 的電子束，聚焦在樣品表面上。藉由裝在末端透鏡上的掃描線圈，使電子束在樣品上掃描，再經由二次電子或背向散射電子接收器的訊號轉換即可得到樣品表面之型態。

其中二次電子的成像原理是由電子束與試片撞擊，可將傳導能帶的電子擊出，其能量約小於 50 eV，由於是低能量的電子，所以只有距離試片表面 50~500 \AA 的範圍內產生的二次電子才有機會逃離試片表面被偵測到。二次電子產生的數量也受到試片表面起伏的情況影響，

所以二次電子影像可以觀察出試片表面形貌的特徵。

背向散射電子的成像原理是入射電子與試片原子核產生彈性碰撞而逃離試片表面的高能量電子，其動能約等於或略小於入射電子的能量。背向散射電子產生的數量會因試片元素的不同而有差異，試片中平均原子序越高的區域所釋放出來的背向散射電子就越多，背向散射電子影像也就越亮，因此背向散射電子呈現出來的影像有時又被稱為原子序對比影像。由於背向散射電子在距離試片 5000 Å 的範圍內產生，因此入射電子進入試片內部較深，電子束已被散射開來，導致背向散射電子影像的解析度不如二次電子的影像。

掃描式電子顯微鏡的基本構造可以參考 Fig 3-2，成像原理主要是由電子槍發射出電子束，經過一組磁透鏡聚焦，聚焦後用遮蔽孔徑來選擇電子束的尺寸，通過一組控制電子束的掃描線圈，再透過物鏡聚焦後將電子束打在試片上，經由試片上側裝的訊號接收器，可以擷取二次電子或是背向散射電子進而產生成像。

不同於光學顯微鏡利用玻璃透鏡來聚焦，電子顯微鏡的電子束需要透過由電磁線圈所產生的磁場來進行聚焦，稱為電磁透鏡。電磁透鏡能在電子束的方向形成局部軸向對稱的磁場，使電子束通過時就像光線通過玻璃透鏡一樣，區別就是電子束是受到磁場的作用，行進路線為螺旋狀。其旋轉方向可由佛萊明右手定則來確定。

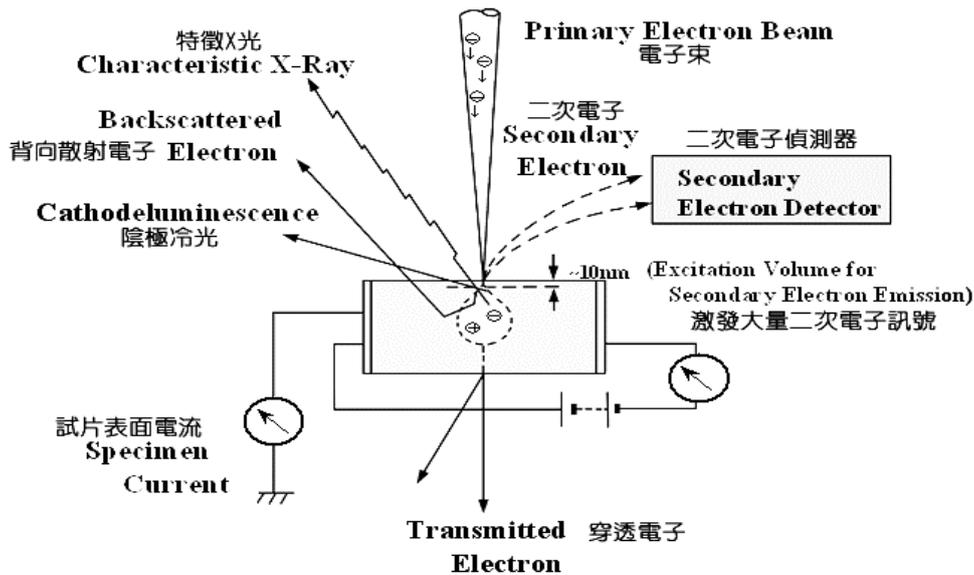


Fig. 3-1 電子束與試片的作用原理。

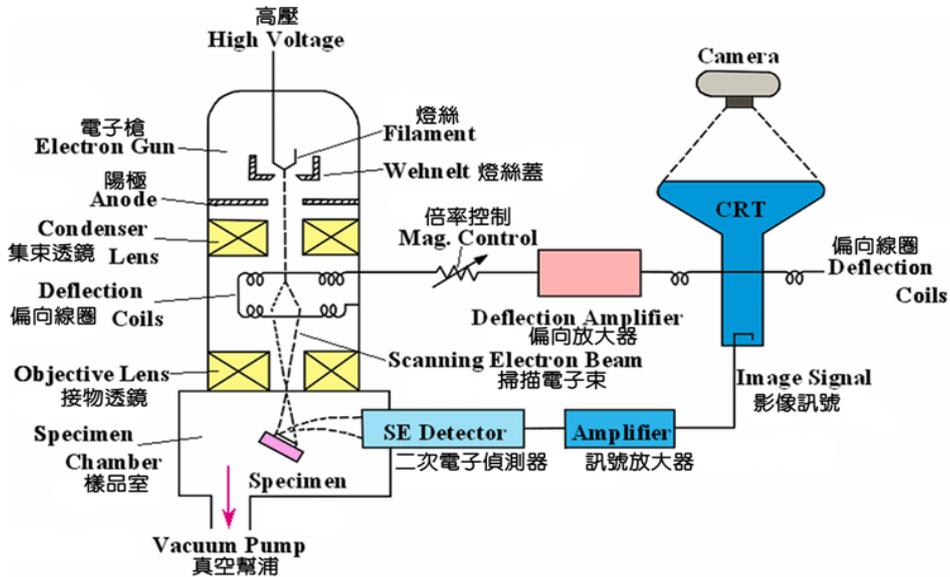


Fig. 3-2 掃描式電子顯微鏡之構造圖。

3-3.2 氮氣吸附

氮氣吸附的方法是利用液態氮在 77 K 的時候，對需要分析的多孔性材料進行物理吸附，在不同的分壓之下，對氮氣吸附量的差異進行運算，最後得到材料的等溫吸附曲線、比表面積、孔體積與孔徑分布等物理性質。

等溫吸附曲線：

等溫吸附曲線是利用在不同的分壓下氮氣吸附量的圖形，藉由等溫吸附曲線的形狀和數據上的處理，可以得到吸附劑與吸附分子之間相互作用力的大小、吸附劑表面積及孔徑分布等性質。例如 Fig 3-3(a) 所示，等溫吸附曲線主要分為六種類型，可依照這六種不同的類型作介紹。

I 型為 Langmuir(L)型等溫線，代表單分子層物理吸附及化學吸附。此類型的等溫線有一個特點，就是在低壓的部分是很陡的直線，這代表了吸附劑與吸附質間的親和力很強；而在高壓接近飽和蒸汽壓時，對微孔類型的吸附劑而言，吸附量達一定值(相當於孔體積大小)；當大孔或無孔微粒型的吸附劑在接近或達到飽和蒸汽壓時，吸附量又明顯增加，主要是因為大孔或微粒之間縫隙吸附造成的結果。相較之下，L 型的等溫線是最簡單且容易處理的等溫曲線。

II型和III型的等溫曲線則是非孔性的固體表面上發生多層吸附的結果，可以區別兩者的是前者吸附質與吸附劑親和力大，第一層的吸附熱會比之後的其他層來得大；後者則相反，第一層的吸附熱小，但是因吸附質間的親和力較大而開始出現大量的多層吸附。

IV型和V型等溫線與II、III型等溫線的表面與吸附質的作用相似，差別在於這兩型的材料具有不是很寬的孔洞分布，大孔洞跟小孔洞偏少，多的是中孔洞。這兩類型的等溫線有以下特點：(1)有遲滯環，就是吸附線與脫附線分離，在相對壓力大於0.4時會在吸附劑孔中發生液態吸附質的毛細冷凝現象 (capillary condensation)；(2)當相對壓力趨近於1的時候，吸附量(體積)趨於定值(約與孔體積相等)。

VI型也稱為梯形等溫曲線 (step-wise isotherm)，通常都發生在均勻固體表面的材料上。因為這種表面的材料並沒有特別能量大的吸附位，因此會先進行有序的單層吸附然後在進行第二層，依序下去。脫附也是逐層進行的，沒有明顯得遲滯環現象。

由IV型和V型可以知道典型的中孔洞材料物質的吸附等溫線有兩種特徵，一是毛細冷凝現象，會使某一段分壓範圍內的吸附量急遽上升；而另一種是遲滯環現象的產生，即吸脫附曲線的分離。由於遲滯環現象的型狀會受到孔洞結構的不同而有所改變，因此可以被用來討論孔洞的大小和形狀。

可以從 IUPAC 的報告中得知遲滯環現象主要分為四種型態，Fig 3-3(b)所示，H1 的吸附曲線與脫附曲線幾乎平行且與 X 軸垂直，主要是發生在具有規則直柱狀孔洞的材料；H2 在早期被認為是孔洞分布不均的多孔洞材料，典型的孔洞為墨水瓶孔隙(ink bottle pores)，但目前則認為孔洞內的網狀通路也會造成此現象的產生；H3 則在高分壓時沒有極限吸附，可在平板狀(plate like)排列的狹縫隙孔隙(slit-shaped pores)中觀察到此現象；H4 的型態與 H3 類似，差別在 H4 是由較窄的狹縫孔隙(slit-like pores)所引起的。

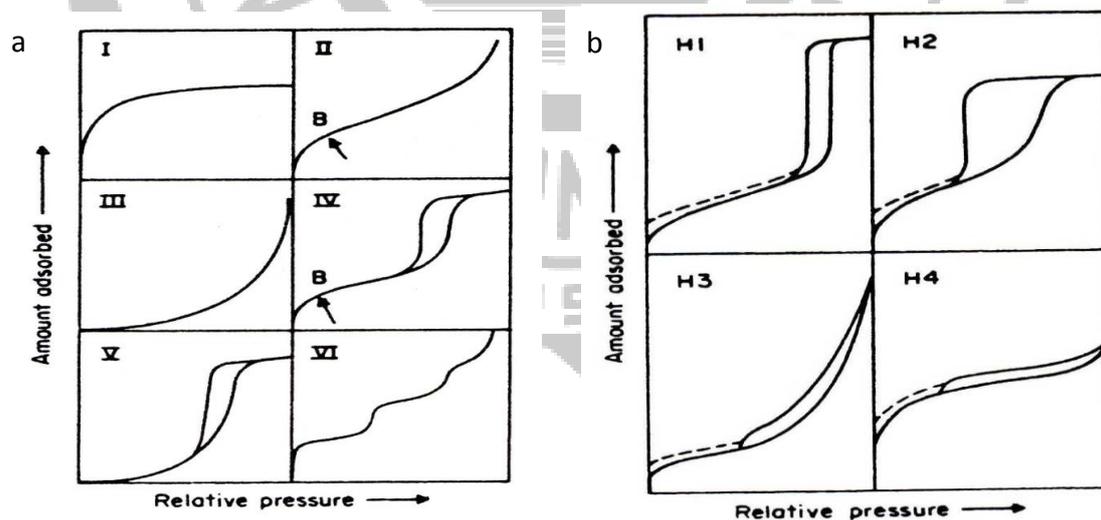


Fig. 3-3 IUPAC 氣體吸附等溫線與吸附遲滯環類型。

(a) 氣體吸附等溫線類型 (b) 吸附遲滯環類型。

BET 理論：

BET 吸附公式是由 Brunauer、Emmett 與 Teller 三位學者從 Langmuir 單分子層吸附模型出發，假設每一層吸附均遵守 Langmuir 模型而導出。相較於 Langmuir 理論的修改與假設如下：

- (1) 吸附可以是多分子層的，且不一定鋪滿一層才鋪另一層，在不同的吸附位置上也可以有不同層次的吸附行為。
- (2) 第一層的吸附熱(E_1)與之後各層不同(第二層以上各層吸附熱為吸附質的液化熱 E_L)，即吸附劑的 van der Waals 力的作用僅涉及吸附第一層。
- (3) 只有鄰近兩層的吸附分子處於動態平衡，即 n 層上的脫附速率等於 $n-1$ 層上的吸附速率。

堆導出來的公式如下：

$$\frac{p}{V(p_0-p)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{(C-1)p}{V_m C p_0} \quad (3-1)$$

其中 V 為氣體在壓力 P 時的吸附量； V_m 為氣體在固體上到達單層吸附時的吸附量； C 是第一層吸附熱 E_1 和吸附值液化熱 E_L 有關的常數。

由上述可知，利用 $P/V(P_0-P)$ 對 P/P_0 作圖，可以得到斜率 $(C-1)/CV_m$ 與截距 $1/CV_m$ ，由斜率與截距兩個方程式聯立可求得 C 與 V_m 值。一般的 P/P_0 測量範圍在 0.05~0.35 之間，會這樣限制是因為相對壓力過

高時，更層吸附分子間相互作用與孔隙凝結現象會造成更層間的吸附能有所差異，而與原本第二層或以上各層吸附能均相等的假設相抵觸；若相對壓力小於 0.05，會因為吸附量過低而造成量測上的偏差。

由 BET 公式所求出的單層吸附體積 V_m ，可以再藉由下列公式求出物質的表面積：

$$S_{\text{BET}} = N_m \delta = \frac{V_m N \delta}{v} \quad (3-2)$$

其中 N_m 為被吸附氣體的分子數， N 為亞佛加厥常數， δ 為單一吸附氣體分子之截面積， v 則為吸附氣體分子的莫爾體積。

BJH 理論：

BJH 理論是在 1951 年，由 Barrett、Joyner 與 Halenda 等人提出，主要是結合多孔性物質的毛細凝結現象及 BET 多層吸附理論，用來估計孔洞分布與大小。在低壓範圍時，吸附劑與吸附質進行物理吸附，並且形成表面吸附層，其厚度 t 可由 BET 理論而得

$$t = \left(\frac{W_a}{W_m} \right) \tau \quad (3-3)$$

其中 W_a 為任意層的吸附量， W_m 為 BET 理論的單層吸附量， τ 為單層吸附厚度，以氮氣分子而言 τ 值為 3.54 Å。當相對壓力到達一定程度的時候，孔洞物質的吸附行為就會開始出現毛細凝結現象，此時氣體的吸附行為可以用 Kelvin 方程式(3-4)表示：

$$\ln \frac{P}{P_0} = - \left(\frac{2\gamma v \cos\theta}{r_k RT} \right) \quad (3-4)$$

其中 P/P_0 為相對壓力， γ 為冷凝液體的表面張力， v 為吸附物冷凝在物質表面之莫爾體積， θ 為冷凝表面與孔壁的接觸角， r_k 為冷凝表面的曲率半徑。若以氮氣為吸附質，則方程式可改寫成：

$$r_k = \frac{4.15}{\log\left(\frac{P_0}{P}\right)} \quad (3-5)$$

根據 t 與 r_k 值可求得孔洞半徑 r ，即 $r=t+r_k$ 。針對不同的相對分壓下，可以計算出 t 值與 r_k 值，再根據這些數據並配合不同分壓下的吸附量作圖可獲得孔洞大小的分布圖。當分壓 (P/P_0) 小於 0.3 時，吸附尚未產生毛細凝結現象，所以在此範圍之下的 Kelvin 方程式並不適用，因此 BJH 理論所推估的孔洞大小僅適用於中孔洞材料 (2~50 nm) 的範圍，微孔洞材料的部分則不適用。

研究中所使用的比表面積儀主要是根據 BET 原理，Fig 3-4 是 BET 比表面積儀的實驗裝置圖。

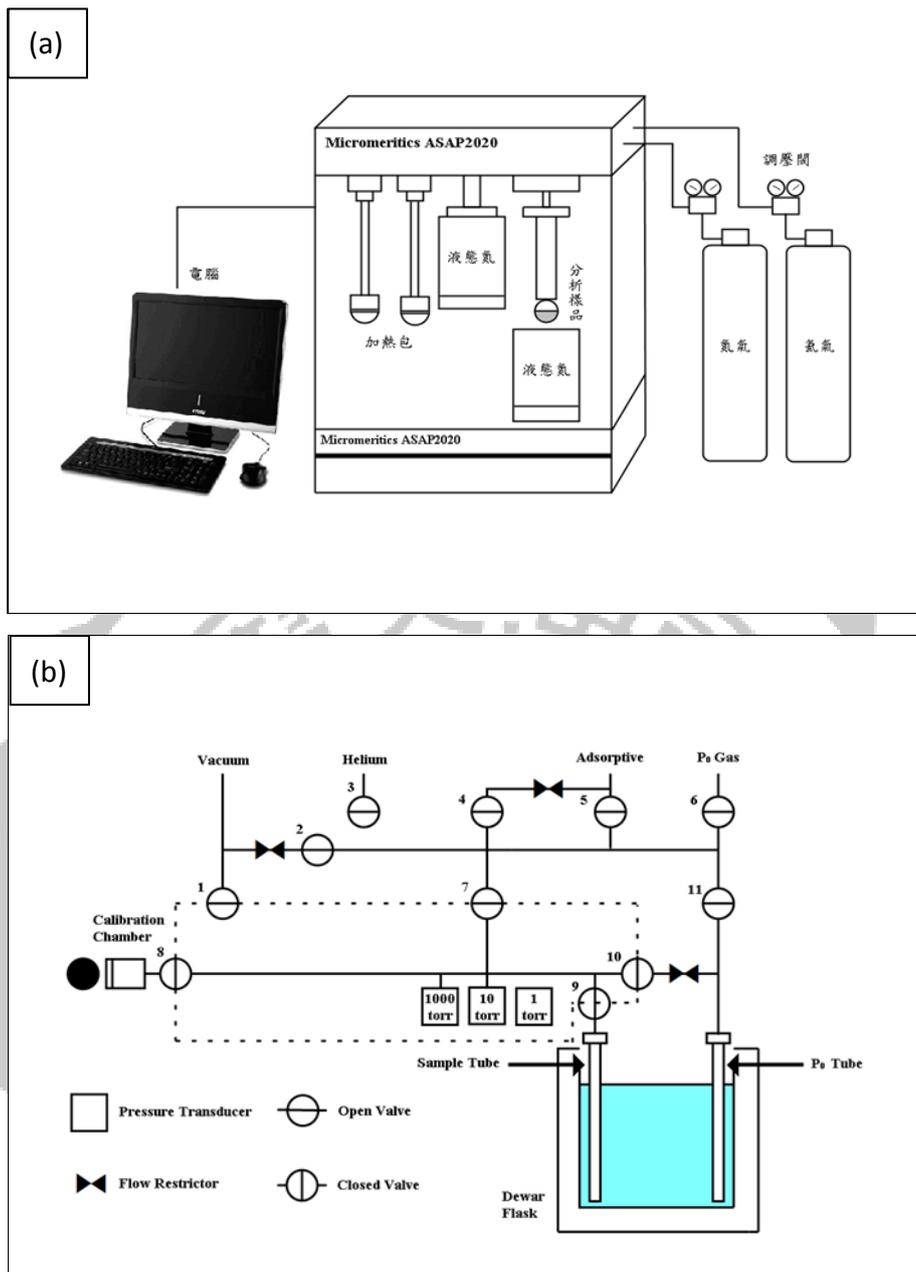


Fig. 3-4 Micromeritics ASAP2020 氮氣等溫吸脫附儀。

(a)儀器外觀全貌；(b)儀器內部解析圖

3-3.3 Bio-Rad 蛋白質定量分析

以 Bradford protein-binding assay 方法為基礎的 Bio-Rad 蛋白質分析試劑，利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 與蛋白質結合，G-250 會從紅棕色轉變成藍色，同時最大吸收波長會從 465nm 轉為 595nm，因此可以在 595nm 的波長下進行蛋白質的定量分析。

Fig 3-5 為其反應機制示意圖，Coomassie G-250 分子在酸性環境下與蛋白質側鏈上的鹼性或芳香基團形成複合物而有顏色上的變化，因此可以定量蛋白質。優點是 G-250 與蛋白質結合的反應時間短（約 2 分鐘），且結合後的複合物(complex)可以長時間(約 1 小時)的維持在溶液中，偵測靈敏度為 1 ug/ml 的蛋白質濃度。但是須注意蛋白質在溶液中的 pH，鹼性的環境會影響偵測結果。

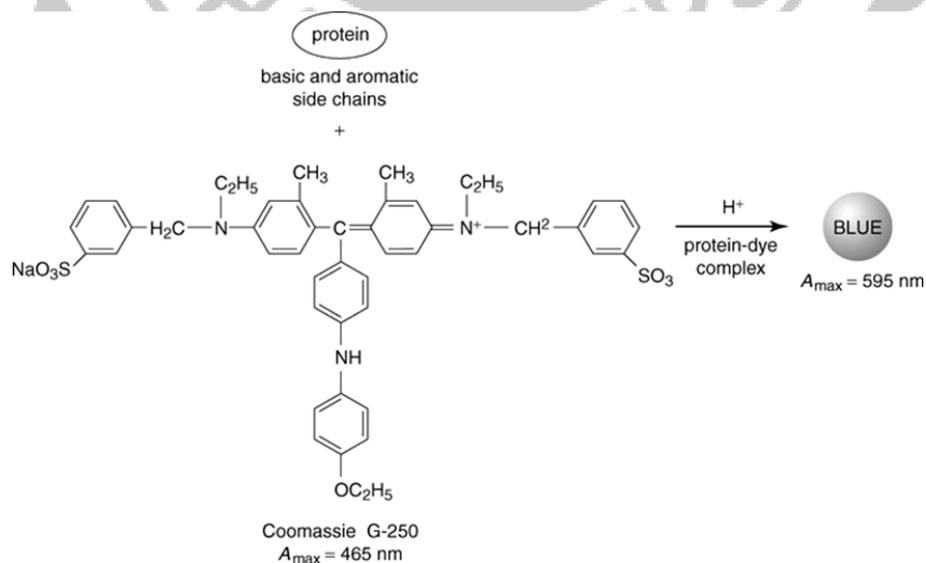


Fig. 3-5 Coomassie Blue G-250 與蛋白質結合反應示意圖。

3-3.4 熱重分析法

熱重分析法(thermogravimetric analysis, TGA)，這門技術是利用控制溫度的程序下，測量物質的質量與溫度間的關係。一般化合物在升溫狀態下，在氮氣的環境中會受熱分解，在空氣或氧氣中則是氧化燃燒，因此化合物會呈現質量減少的情形。將樣品置於特定的環境下，控制溫度升溫或是固定在一定溫度，觀察樣品的重量變化，進而推斷樣品的特性與組成。

研究中，為了探討在各種條件下的 SBA-15 吸附蛋白質的情形，因此利用熱重分析方法判斷。在進行熱重分析時，主要是將 SBA-15 處於氧氣的環境下，藉由高溫將蛋白質完全燃燒，再從 SBA-15 的質量改變來探討吸附蛋白質的劑量，這升溫過程中，我們將會探討水的熱重損失(約在 100 °C 左右)及蛋白質的熱重損失，而包覆量的算法可參考算式(3-6)。

$$\text{包覆量} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{蛋白質熱重損失}\%}{1 - \text{水熱重損失}\% - \text{蛋白質熱重損失}\%} \quad (3-6)$$

3-3.5 Zeta-potential

膠體粒子因表面解離或吸附溶液中的離子而帶電，在帶電固體的表面必會形成電場，在此電場作用下，溶液中離子在帶電表面附近屬於不均勻分布。為了保持帶電固體與介質的電中性，在表面電場作用下，介質中與固體表面帶電荷符號相反的離子（反離子）會靠近固體表面；與固體表面帶電符號相同的離子（同離子）則被電性排斥。若與溶液比較，在固體表面附近反離子濃度大，同離子濃度小。反離子的濃度會從固體表面逐漸往溶液中遞減，最後其濃度與同離子相同，而這種擴散狀的離子分布將形成擴散電雙層（diffuse double layer）。

由 Stern 提出的電雙層模型其基本假設為：粒子表面為無限大平面，表面電荷分布均勻；介質的介電常數均勻相等；擴散層中反離子呈現 Boltzmann 分布。根據此一模型，將在靠近固體表面一至二個分子厚度的區域內，反離子與表面形成牢固的吸附層稱為 Stern 層，在 Stern 層中反離子電荷中心連成的假想平面稱為 Stern 平面，該平面與表面的距離 δ 則為 Stern 層厚度。在外力作用下，固體與液體相對運動時，隨固體一同運動的除了 Stern 層內的離子外，尚有一定量與固體表面緊密結合的溶劑分子，其外界面稱為滑動面。而滑動面與溶液內部的電勢差則稱為 ζ 電位（zeta-potential）。詳見 Fig 3-6。

ζ 電位與一個顆粒在某種特定介質中所帶的總電荷有關，確切來說指的是滑動面處的電位。由於 SBA-15 在中性環境下帶負電可藉由靜電作用力吸引帶正電的蛋白質分子。因此，想藉由 ζ 電位的量測找出適當的 pH 環境，以提高載體與蛋白質之間的靜電吸引力，進而提高蛋白質藥物的吸附量。

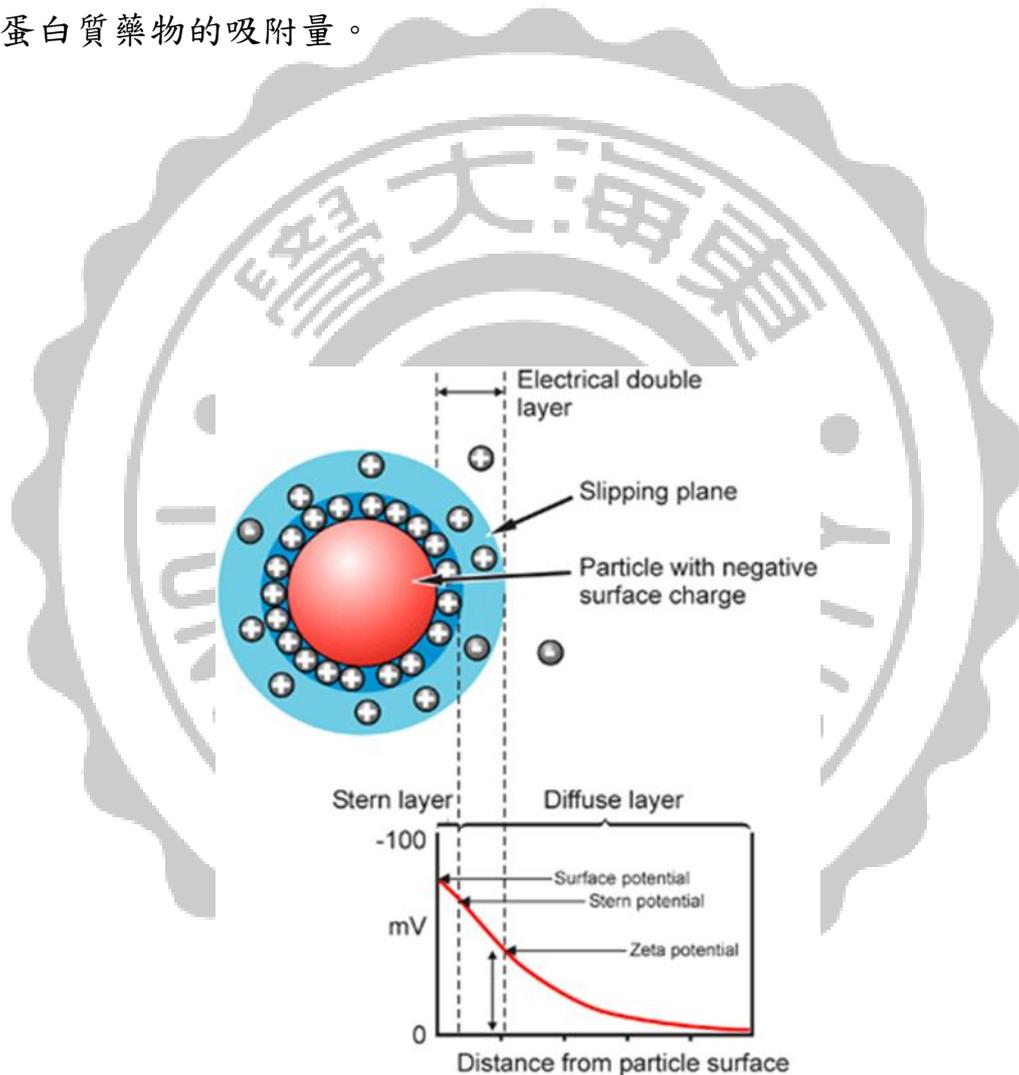


Fig. 3-6 擴散電雙層的 Stern 模型示意圖。

3-3.6 紫外光/可見光分光光度計

因 UV 具有非破壞性、無污染、快速與訊號清晰等優點，使得近幾年來紫外光/可見光光譜分析日趨重要，尤其在物理、光電、電子製程、光學元件、化學分析及線上監測等皆有許多的應用。

當分子中的電子間遭受到光線的照射時，會吸收特定的能量，一般而言，不同的光線能量會造成不同的電子躍遷，在紫外光/可見光的範圍，即形成 UV/VIS 光譜。由於每一特定的官能基，均會有特定波長的吸收，因此可藉由 UV 光譜做為分子官能基定量測量工作。而蛋白質與 BioRed 指示劑反應後，會在波長 595 時有明顯的吸收峰，因此研究中可以利用 UV/VIS 光譜儀來檢測蛋白質的含量。

第四章 實驗方法

4-1 分散性良好之球形 SBA-15 的製備

製備 SBA-15 過程中的環境等各種條件，皆會對 SBA-15 的形貌造成影響，綜合各種實驗結果以及考慮到本研究要求的球形 SBA-15、良好的分散性與生物相容性，因此歸納了幾種製備條件，合成過程中是否攪拌、鹽酸濃度的影響以及 TMB 對 SBA-15 之形貌的影響。

4-1.1 SBA-15 的製備過程中攪拌與否

1. 秤取 1.49 g 的 KCl 並加入 60 ml 2M 的 HCl 溶液於 100 ml 的血清瓶中，待 KCl 溶解後加入 2 g 的 P123，並將其置於 35 °C 的夾套式恆溫水浴中攪拌至 P123 完全溶解。
2. 加入 1.77 ml 的 TMB(98 %)並持續攪拌 2 小時。
3. 加入 4.65 ml 的 TEOS(98 %)並劇烈攪拌 10 分鐘後，於 35 °C 的環境下持續攪拌 24 小時。
4. 經過 24 小時的合成後，將其移至 100 °C 的烘箱中進行水熱反應 24 小時(須將瓶蓋旋緊避免水分散失)。
5. 將血清瓶移置抽風櫃中待其降至室溫，利用抽氣過濾，以大量的去離子水(約 800 ml)清洗並收集產物。

6. 將收集到的產物進行真空乾燥(60 °C，5 小時)。
7. 將乾燥後的產物移置鍛燒爐中利用鍛燒來去除模板，以 2 °C/min 的速率升溫到 500 °C 進行鍛燒 6 小時(需先將產物裝入氧化鋁坩鍋中，鍋蓋虛掩使氣體可以排出並防止異物掉入)。
8. 最後收集到的白色粉末即為 SBA-15 成品。
9. 將步驟 3 之持續攪拌 24 小時改為靜置 24 小時，重複步驟 1~8。



4-1.2 改變鹽酸濃度之 SBA-15 製備步驟

1. 秤取 1.49 g 的 KCl 並加入 60 ml 2 M 的 HCl 溶液於 100 ml 的血清瓶中，待 KCl 溶解後加入 2 g 的 P123，並將其置於 35 °C 的夾套式恆溫水浴中攪拌至 P123 完全溶解。
2. 加入 1.77 ml 的 TMB(98 %)並持續攪拌 2 小時。
3. 加入 4.65 ml 的 TEOS(98 %)並劇烈攪拌 10 分鐘後，於 35 °C 的環境下靜置 24 小時。
4. 經過 24 小時的合成後，將其移至 100 °C 的烘箱中進行水熱反應 24 小時(須將瓶蓋旋緊避免水分散失)。
5. 將血清瓶移置抽風櫃中待其降至室溫，利用抽氣過濾，以大量的去離子水(約 800 ml)清洗並收集產物。
6. 將收集到的產物進行真空乾燥(60 °C，5 小時)。
7. 將乾燥後的產物移置鍛燒爐中利用鍛燒來去除模板，以 2 °C/min 的速率升溫到 500 °C 進行鍛燒 6 小時(需先將產物裝入氧化鋁坩鍋中，鍋蓋虛掩使氣體可以排出並防止異物掉入)。
8. 最後收集到的白色粉末即為 SBA-15 成品。
9. 將步驟 1 加入之 HCl 濃度改為 0.3 M、0.6 M、0.9 M、1.2 M 以及 3 M，並重複步驟 1~8。

4-1.3 改變 TMB 濃度探討 SBA-15 孔徑的影響

1. 秤取 1.49 g 的 KCl 並加入 60 ml 2 M 的 HCl 溶液於 100 ml 的血清瓶中，待 KCl 溶解後加入 2 g 的 P123，並將其置於 35 °C 的夾套式恆溫水浴中攪拌至 P123 完全溶解。
2. 加入 0.442ml(3 mmol)的 TMB(98 %)並持續攪拌 2 小時。
3. 加入 4.65ml 的 TEOS(98 %)並劇烈攪拌 10 分鐘後，於 35 °C 的環境下靜置 24 小時。
4. 經過 24 小時的合成後，將其移至 100 °C 的烘箱中進行水熱反應 24 小時(須將瓶蓋旋緊避免水分散失)。
5. 將血清瓶移置抽風櫃中待其降至室溫，利用抽氣過濾，以大量的去離子水(約 800 ml)清洗並收集產物。
6. 將收集到的產物進行真空乾燥(60 °C，5 小時)。
7. 將乾燥後的產物移置鍛燒爐中利用鍛燒來去除模板，以 2 °C/min 的速率升溫到 500 °C 進行鍛燒 6 小時(需先將產物裝入氧化鋁坩鍋中，鍋蓋虛掩使氣體可以排出並防止異物掉入)。
8. 最後收集到的白色粉末即為 SBA-15 成品。
9. 將步驟 2 添加的 TMB 濃度改為 0.885 ml(6 mmol)、1.327 ml(9 mmol)、1.77 ml(12 mmol)，並重複步驟 1~8。

4-2 蛋白質的包覆

4-2.1 蛋白質溶液的製備

1. 配製 5 種不同 pH(5.8、6.4、7.0、7.4、8.0)0.1 M 的磷酸鉀緩衝溶液(溶液配方請參考 Table 4-2)。
2. 分別用 5 種 pH 配製濃度為 5 mg/ml 的蛋白質溶液。
3. 使用的蛋白質分別有 BSA、Lys 與 Capsaicin。

Table. 4-1 磷酸鉀緩衝溶液的製備(0.1 M)。

pH	Volume of 1M K_2HPO_4 (ml)	Volume of 1M KH_2PO_4 (ml)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

1. 分別配置 1M 的 K_2HPO_4 與 KH_2PO_4 溶液
2. 依照上述 pH 比例混合並以去離子水稀釋到 1000ml

4-2.2 不同 pH 環境 SBA-15 對蛋白質的包覆步驟

1. 秤取 20 mg 的 SBA-15 於 1.5 ml 的 eppendorf 試管中。
2. 加入 1ml 的蛋白質溶液，並置於 4 °C 的冰箱中旋轉攪拌 6 小時。
3. 將試管用桌上型微量離心機進行離心，上清液保留另做 UV 檢測。
4. 以 1 ml 的去離子水清洗並再次離心去除上清液。
5. 進行冷凍乾燥後得到的產物即為包覆蛋白質的 SBA-15 粉末。
6. 步驟 2 改加入其他 pH 的蛋白質溶液，重複步驟 1~6。

4-2.3 不同孔徑之 SBA-15 對 BSA 的包覆步驟

1. 秤取 TMB 3 mmol SBA-15 20 mg 於 1.5 ml 的 eppendorf 試管。
2. 加入 1ml 的 pH 5.8 之 BSA 溶液。
3. 置於 4 °C 的冰箱中旋轉攪拌 6 小時。
4. 將試管用桌上型微量離心機進行離心。
5. 以 1ml 的去離子水清洗並再次離心去除上清液。
6. 進行冷凍乾燥後得到的產物即為包覆蛋白質的 SBA-15 粉末。
7. 步驟 1 改秤取 TMB 濃度為 6 mmol、9 mmol 以及 12 mmol 之 SBA-15，
重複步驟 1~6。

4-2.4 不同包覆時間之 SBA-15 對蛋白質的包覆步驟

1. 秤取 20 mg 的 SBA-15 於 1.5 ml 的 eppendorf 試管中。
2. 加入 1 ml 的 pH 5.8 之 BSA 溶液。
3. 置於 4 °C 的冰箱中旋轉攪拌 6 小時。
4. 將試管用桌上型微量離心機進行離心。
5. 以 1 ml 的去離子水清洗並再次離心去除上清液。
6. 進行冷凍乾燥後得到的產物即為包覆蛋白質的 SBA-15 粉末。
7. 步驟 3 之包覆時間改為 12、24、48 小時，重複步驟 1~6。
8. 步驟 2 改加入 pH 8.0 之 Lys 溶液，重複步驟 1~7。



4-3 包覆蛋白質之 SBA-15 釋放速率步驟

根據不同的實驗目的來調整釋放條件，探討各種條件下的 SBA-15 於正常人體環境(pH 7.4)之釋放效果。

1. 取 10 mg 包覆蛋白質的 SBA-15 粉末，並置於 1.5 ml 的 eppendorf 試管中，取 8 管。
2. 加入 pH 7.4 的緩衝溶液 1 ml，並置於 37 °C 環境下取樣，取樣時間分別為 0.5、1、2、4、8、12、24、48 小時。
3. 取樣時先離心取上清液 100 ul 於 eppendorf 試管中，加入 700 ul 的去離子水及 200 ul 的 Bio-Rad 指示劑，反應 5 分鐘。
4. 反應後將溶液吸取至比色槽中，利用 UV/Vis 分光光度計檢測，在 595 nm 的波長下檢測蛋白質的吸收值。
5. 將吸收值經由蛋白質標準線換算即可知道釋放濃度。

4-4 SBA-15 的表面修飾

改變 SBA-15 表面上的官能基團來改善且優化蛋白質(BSA、Lys)的包覆效果，並希望能夠達到控制藥物釋放的目的。

1. 秤取 1 g 的 SBA-15 置於樣品瓶中
2. 加入 10 ml 的乾甲苯(dry toluene)作為溶劑
3. 依照比例加入試劑(參考 Table 4-1)，並劇烈攪拌 10 分鐘
4. 攪拌後將其置入烘箱中加熱 100 °C 持續 24 小時
5. 利用抽氣過濾，同時以乾甲苯清洗並收集產物
6. 將收集到的產物以 100 °C 下進行乾燥 19 小時
7. 最後收集到的產物即為表面修飾後的 SBA-15

Table. 4-2 表面修飾所用的試劑與其比例(1 g SBA-15:試劑)。

試劑	加入試劑之比例(ml)
CMTS	1.03
0cTS	0.75
APTS	0.60

4-4.1 修飾之 SBA-15 與蛋白質的包覆步驟

1. 秤取 20 mg 的修飾 SBA-15 於 1.5 ml 的 eppendorf 試管中，取 5 管。
2. 分別加入 1 ml、5 種不同 pH 的蛋白質溶液，並置於 4 °C 的冰箱中旋轉攪拌 24 小時。
3. 將試管用桌上型微量離心機進行離心，上清液保留另做 UV 檢測。
4. 以 1 ml 的去離子水清洗並再次離心去除上清液。
5. 進行冷凍乾燥後得到的產物即為包覆蛋白質的 SBA-15 粉末。
6. 步驟 1 改秤取不同比例試劑的修飾 SBA-15，重複步驟 1~6。



4-4.2 修飾之 SBA-15 包覆蛋白質後之釋放步驟

1. 取 10 mg 包覆蛋白質的 SBA-15 粉末，並置於 1.5 ml 的 eppendorf 試管中，取 8 管。
2. 加入 pH 7.4 的緩衝溶液 1 ml，並置於 37 °C 環境下取樣，取樣時間分別為 0.5、1、2、4、8、12、24、48 小時。
3. 取樣時先離心取上清液 100 ul 於 eppendorf 試管中，加入 700 ul 的去離子水及 200 ul 的 Bio-Rad 指示劑，反應 5 分鐘。
4. 反應後將溶液吸取至比色槽中，利用 UV/Vis 分光光度計檢測，在 595 nm 的波長下檢測蛋白質的吸收值。
5. 將吸收值經由蛋白質標準線換算即可知道釋放濃度。
6. 將步驟 2 加入的磷酸鉀緩衝溶液改為 pH 8.0 與 6.4，重複上述步驟 2~4。
7. 將步驟 1 使用的 SBA-15 粉末改成各種改質條件的 SBA-15，重複上述步驟 1~5。

4-5 辣椒素的包覆與釋放步驟

4-5.1 辣椒素的包覆步驟

1. 秤取 20 mg 的 SBA-15 於 1.5 ml 的 eppendorf 試管中。
2. 分別加入 1 ml 辣椒素溶液(融於 99.8 %之乙醇，5 mg/ml)。
3. 置於 4 °C 的冰箱中旋轉攪拌 6 小時。
4. 將試管用桌上型微量離心機進行離心，上清液保留做 UV 檢測。
5. 以 1 ml 的去離子水清洗並再次離心去除上清液。
6. 進行冷凍乾燥後得到的產物即為包覆辣椒素的 SBA-15 粉末。
7. 步驟 3 改變包覆時間為 24 小時，重複步驟 1~6。

4-5.2 辣椒素的釋放之實驗步驟

1. 取 10 mg 包覆辣椒素的 SBA-15 粉末，並置於 1.5 ml 的 eppendorf 試管中，取 8 管。
2. 加入 pH 6.0 的緩衝溶液 1 ml，並置於 37 °C 環境下取樣，取樣時間分別為 0.5、1、2、4、8、12、24、48 小時。
3. 取樣時先離心取上清液 100 ul 於 eppendorf 試管中，並且利用 HPLC 進行分析
4. 將吸收值經由辣椒素標準線換算即可知道釋放濃度。

4-6 分析儀器操作實驗步驟

4-6.1 BET 操作步驟

1. 秤取 0.2~0.5 g 的樣品置於石英管中，以專用的管塞塞住，防止樣品流入儀器內。
2. 將石英管放置於除氣(degases)處抽真空，並用加熱包加熱來去除樣品表面的水分與雜物。
3. 完成上述步驟，將樣品秤重並連接石英管至樣品分析處。
4. 將石英管慢慢浸入液態氮中。
5. 設定好裝置後，由電腦操作即可開始偵測。

4-6.2 SEM 樣品前處理

1. 將炭雙面膠黏貼於銅柱載台上。
2. 用牙籤抹取少量樣品沾附於雙面膠上，並用吹氣球將多餘、未沾附的樣品去除。
3. 樣品固定後，用濺鍍機將銅柱濺鍍上一層白金(濺鍍條件:20 mA、70 秒)。
4. 濺鍍白金後可將銅柱送置機台進行觀測。

4-6.3 Zeta potential

1. 準備 5 mg 各條件的 SBA-15(未修飾之 SBA-15，與 3 種修飾不同官能基團後的 SBA-15，共 4 種)，與欲檢測之蛋白質。
2. 分別溶於 30 ml 各 pH 的磷酸鉀緩衝液中(pH 分別為 5.8、6.4、7.0、7.4 和 8.0)。
3. 準備好針筒來注射樣品、去離子水與酒精(去離子水與酒精是清洗儀器管件用)。
4. 每一組樣品感測前後需先用酒精洗過管件，再用去離子水清洗，至少 3 次。
5. 注射 5 ml 欲檢測的樣品，由儀器檢測其濃度訊號是否恰當，若合宜則可以開始進行檢測，每個樣品檢測 3 次。
6. 所有樣品檢測完畢之後，需用大量的去離子水清洗管件避免樣品殘留，並且在最後注入酒精即可關閉儀器。

4-6.4 HPLC 樣品前處理

1. 將待測之溶液離心並稀釋 5 倍。
2. 利用小飛碟過濾溶液，避免有顆粒殘留。
3. 利用高效能液相層析儀(Algate, 1100 Series) 分析。

4-6.5 熱重分析(TGA)測量包覆量之操作步驟

TGA 開機程序:

1. 連結 TGA 的電腦主機先開啟。
2. 開啟氮氣氣體鋼瓶，流量設定為 100 cc/min(注意流量是否穩定)。
3. 打開 TGA 儀器開關，並與電腦連結。
4. 從電腦螢幕開啟 TGA 程式(Q-series Explorer，視窗顯示 Q50-0336 表示連線成功)。
5. 檢查 TGA 爐是否有異狀。

校正白金秤盤:

1. 用棉花棒沾溼擦拭白金秤盤。
2. 再用高溫打火機燒白金秤盤燒至通紅確定表面無水分。
3. 將白金秤盤掛上，按選 tare 進行校正(此過程需注意避免秤盤掉進火爐)。
4. 校正完退出秤盤後即可準備測樣品。

樣品操作:

1. 秤取樣品 10~20 mg 於秤盤上，並將秤盤掛上旋盤。
2. 由電腦程式操作火爐升降進行檢測(檢測條件為 10 °C/min，升至 500 °C，於 procedure 中按 editor 編輯條件)。
3. 所有條件設定完成之後，再次檢查氣體流量，確定穩定後按下 start 開始檢測。
4. 檢測完畢後，待其溫度降至 70 °C 以下才可將火爐降下。
5. 退出秤盤並清潔，重複上述步驟直到實驗結束。

關機程序:

1. 於程式中點選 control→shutdown instrument。
2. 等螢幕出現 889 及 888 的訊號後即可斷線離開程式。
3. 關閉電腦，關氣體鋼瓶，再關閉 TGA 儀器。

4-6.6 UV/Vis 分光光度儀

1. 開啟儀器熱機 30 分鐘。
2. 將儀器轉為 PC control。
3. 由電腦開啟程式 UVProbe2.33，並且與儀器連線。
4. 由電腦程式上面設定波長與檢測條件。
5. 將樣品放入樣品槽內，蓋上蓋子後即可掃描。
6. 樣品的處理步驟同 4-4 之實驗步驟。
7. 關機程序：電腦程式先與儀器斷線→關閉電腦程式→儀器上按 return 轉回儀器操作→關閉儀器電源。



第五章 結果與討論

5-1 製備球形 SBA-15 之條件與探討

由於 SBA-15 是將用於生物體中，因此在製備 SBA-15 時，我們首要考量到的是其生物相容性，而其中生物相容性是否良好則是跟 SBA-15 的形貌、大小及分散性息息相關。所以對製備 SBA-15 用的條件(合成過程中是否攪拌、TMB 等條件)加以探討。

這個部分將結合並引用學長郭華良之製備球形 SBA-15 研究部分，從中探討其製備之結果並比較各條件之優劣(郭華良, 2011)。

5-1.1 探討合成過程中攪拌之影響

在這裡將探討 SBA-15 的合成過程中是否進行攪拌，會不會對 SBA-15 的形貌及分散性造成影響。製備條件相同為 2 M HCl 溶液，加入 1.49 g KCl、2 g P123、1.77 ml TMB 及 4.65 ml 的 TEOS。由 Fig. 5-1，比較(a)靜置、(b)攪拌兩張圖，可以看得出合成 SBA-15 的過程中如果持續攪拌會造成粒子形狀不規則，而且有碎裂的情形發生，同時也發生嚴重的團聚現象，粒徑增加至數十微米；而合成 SBA-15 的過程是使其靜置，所得到的 SBA-15 粒子較趨於球形，粒徑較小也較均一，分散性也相較良好。

會造成上述現象推測是因為 SBA-15 在合成的過程當中，作為 SBA-15 主要矽源的 TEOS 會依附在微胞的周圍，進行縮合聚合的反應，而縮合聚合這個反應在 SBA-15 的合成過程當中是持續進行的，因此在合成的過程中攪拌造成了合成中的粒子彼此間碰撞的情形，而在碰撞的過程當中有縮合聚合反應的進行就引發了粒子與粒子間的聚集現象，此現象產生較大的粒子，也提供了較大的接觸面積，更增加了粒子間碰撞的機會，而過度碰撞的粒子會有破碎的情形出現。

而靜置的合成過程則能降低粒子之間的碰撞機會，讓粒子的合成主要能照微胞本身的聚集與 TEOS 依附在微胞上聚合的共同效應，這也降低了粒子之間的聚集現象，使合成的 SBA-15 粒子的形貌趨於球形、大小均一且分散性良好，當然也減少了粒子之間因為碰撞而產生破碎的情形。

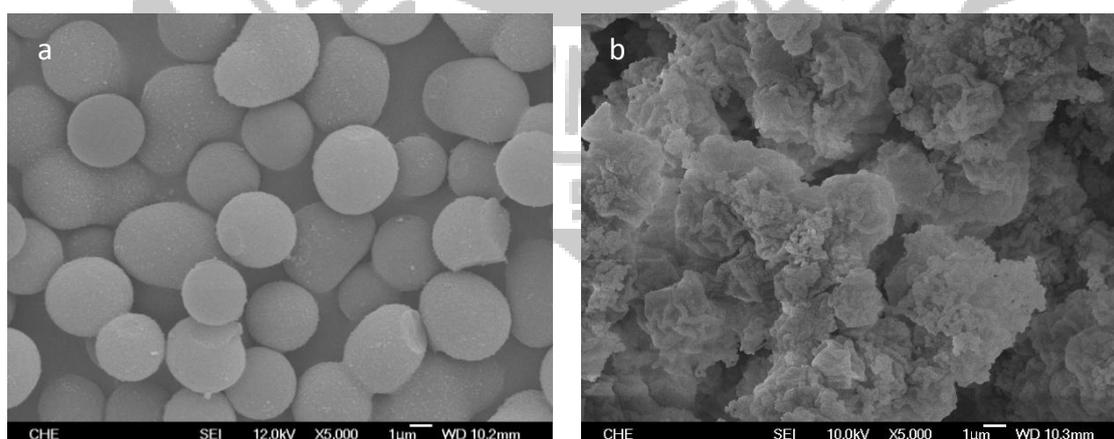


Fig. 5-1 合成過程中攪拌與否對 SBA-15 粒子之 SEM 圖。

(a)靜置，5000 倍；(b)攪拌，5000 倍

5-1.2 鹽酸濃度對合成 SBA-15 的影響

三嵌段高分子的親水鏈段 PEO 及 PPO 去溶劑化的程度會受到鹽酸濃度的影響，使其形成微胞之型態改變，進而影響到 SBA-15 粒子的形貌，因此在這裡將探討各種鹽酸濃度(0.3 M、0.6 M、0.9 M、1.2 M、2.0 M 及 3.0 M)對合成 SBA-15 之形貌所造成的影響。相同的合成條件為各濃度之 HCl 60 ml、1.49 g KCl、2 g P123、1.77 ml TMB 及 4.65 ml TEOS，合成過程為靜置。

根據郭華良，2011 之研究結果推測，圖 Fig. 5-2 可以很明顯的看出鹽酸濃度由 0.3 M 增加至 2.0 M 的時候，SBA-15 的形貌漸漸由多邊針狀且不規則的型態慢慢轉變為球形，由 Fig. 5-2(c)與(d)可以看出 SBA-15 的合成形貌已經漸漸的往球形發展，比較 Fig. 5-2(e)則更可以看出當鹽酸濃度達 2.0 M 時，SBA-15 粒子的成型已經是完整的球形；但是，當鹽酸濃度從 2.0 M 增加至 3.0 M 時，SBA-15 的合成發生了嚴重的團聚現象而導致分散性不佳。其中 Fig. 5-2(a)、(b)、(c)引用於郭華良，2011。

從這裡可以推斷鹽酸濃度的改變對合成 SBA-15 的形貌會造成巨大的影響，而這個影響判定是與三嵌段高分子溶於鹽酸當中自組裝而形成的微胞之形貌有關。在製備 SBA-15 粒子的實驗過程中，觀察出三嵌段高分子在溶於鹽酸的過程中，會受到鹽酸濃度的影響，濃度越

濃，三嵌段高分子溶解的速度越快。這是因為高濃度的鹽酸在溶解三嵌段高分子時，會使親水鏈段 PEO 上的氧原子質子化，並與水產生氫鍵而加速了三嵌段高分子溶解的速度；同時，因為親疏水鏈段性質的差異，會因為 PEO 鏈段的質子化與 PPO 鏈段的去溶劑化而明顯增加，這使三嵌段高分子形成微胞的驅動力增加，使微胞尺寸趨近微小化，也增加了微胞堆積的穩定性。較高濃度的鹽酸環境的離子強度較強，能讓疏水性的擴孔劑(TMB)快速且均勻分散的進入疏水鏈段 PPO 中，使微胞型態維持均一，並且穩定的堆積及 TEOS 縮合聚合後，能得到形貌趨於球形且較規則的 SBA-15 粒子。反觀，在較低濃度的鹽酸環境下進行合成的 SBA-15 會因為其三嵌段高分子型成之微胞因親疏水性鏈段之間的作用力不明顯，以及擴孔劑(TMB)不均勻的進入疏水鏈段 PPO，造成微胞型態不穩定，最後導致 SBA-15 粒子的形貌呈現不規則的形狀。

但是，由 Fig. 5-2(f)可以觀察到，當鹽酸的濃度高達 3 M 時，SBA-15 會產生嚴重的聚集現象，並且從 Fig. 1-6 矽氧烷於酸性環境下之反應機制圖可知氫離子作為催化劑，因此推測是高濃度的鹽酸環境下，TEOS 進行縮合聚合反應時的速率過快，在初期就產生了反應，而加入 TEOS 時攪拌的動作導致粒子產生了嚴重的碰撞進而出現聚集的現象，因此高濃度的鹽酸環境將會導致合成 SBA-15 粒子產生聚集

現象。

綜合以上的結果可以歸納出一個結論，合成 SBA-15 粒子所用的鹽酸的濃度高低會影響到形成微胞之型態與 TMB 是否均勻進入微胞中心的疏水部位的分散情形，進一步的影響到微胞型態的均一性以及微胞堆積的穩定性，更使後來 TEOS 依附在微胞上進行縮合聚合反應後形成的 SBA-15 粒子之形貌上會產生很大的差異。適當的鹽酸濃度 (2 M)，可以使合成之 SBA-15 粒子趨於球形且分散性良好；而過高的鹽酸濃度 (3 M) 則會因為加入 TEOS 後，矽源的縮合聚合速率過快，造成合成之 SBA-15 粒子因加入 TESO 攪勻的動作而產生嚴重的聚集現象，為了製備生物性良好的 SBA-15 粒子，因此選擇能讓 SBA-15 粒子趨近球形的鹽酸濃度 (2 M)。

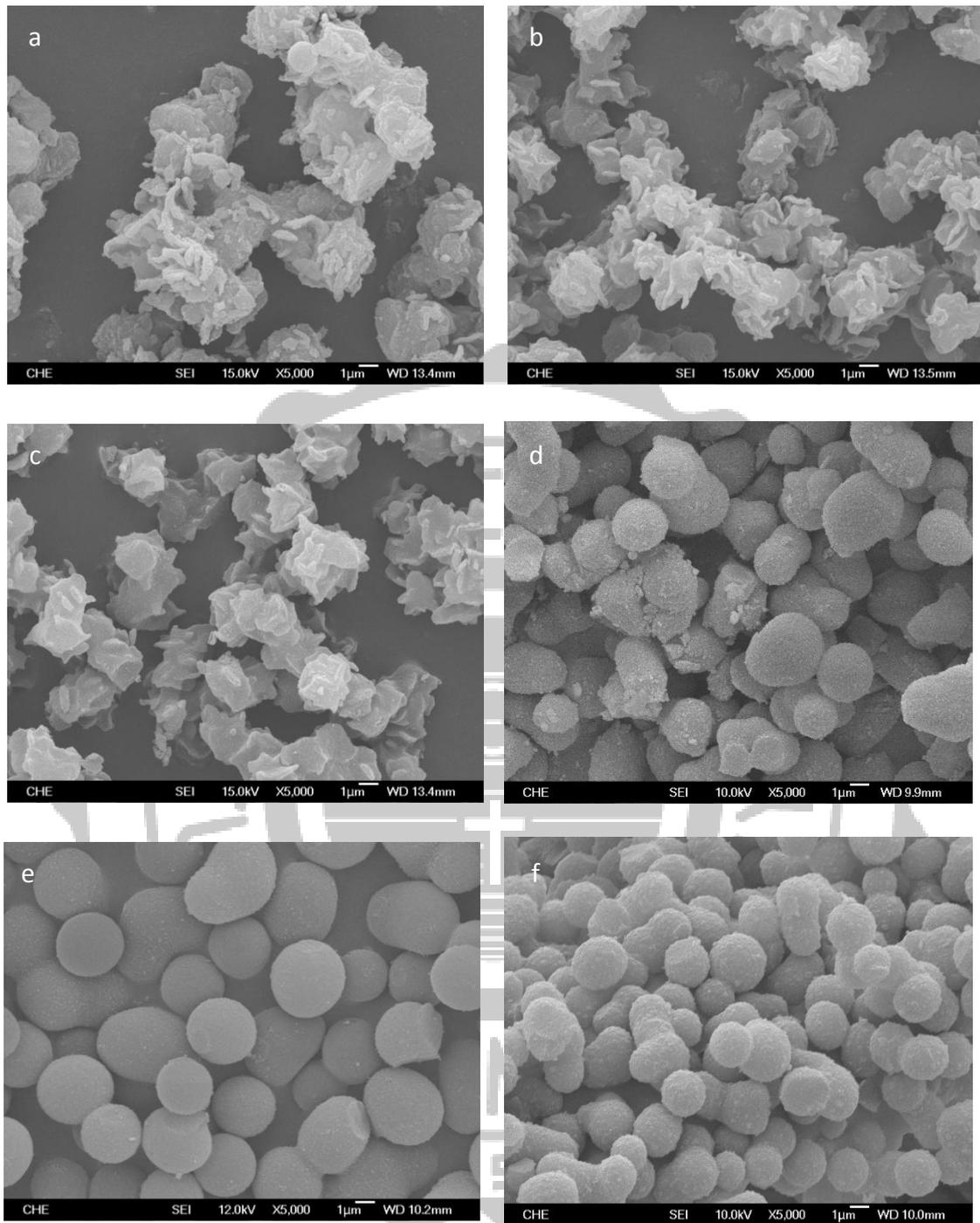


Fig. 5-2 不同鹽酸濃度合成的 SBA-15 之 SEM 圖。

(a)0.3 M (b)0.6 M (c)0.9 M (d)1.2 M (e)2.0 M (f)3.0 M

5-1.3 擴孔劑(TMB)濃度對合成 SBA-15 的影響

在合成 SBA-15 的過程中，加入擴孔劑能調整 SBA-15 粒子的孔徑大小，而 SBA-15 的孔徑大小在藥物控制釋放系統中也扮演著重要角色之一。因此，在這裡將探討不同擴孔劑的濃度(3、6、9、12 mmol)對合成 SBA-15 粒子的孔徑所造成的影響，反應條件為 2 M HCl 60 ml、1.49 g KCl、2 g P123 及 4.65 ml TEOS，合成過程為靜置。

可以從 Fig. 5-3 的 SEM 圖中觀察到，不同 TMB 濃度對合成 SBA-15 粒子之形貌的影響，TMB 的濃度越高，SBA-15 粒子越趨近於球形，由 Fig. 5-3(a)、(b)可以看出在低 TMB 濃度下合成的 SBA-15 粒子之形貌表面具有不規則的隆起，尤其在 TMB 濃度為 3 mmol 時更明顯，Fig. 5-3(c)、(d)也能明顯看到當 TMB 濃度增加至 9 mmol、12 mmol 時，SBA-15 粒子之形貌已經是相當完整的球形。

另外，根據郭華良, 2011 之 BET 測量結果，從 Fig. 5-4 氮氣等溫線與 Fig. 5-5 孔徑分布兩張圖中，可以推斷出當添加 TMB 濃度的高低會直接影響到 SBA-15 粒子的孔徑，當 TMB 濃度在較低的 3 mmol 時，合成的 SBA-15 粒子之孔徑分布較不均一，而 TMB 濃度漸漸增加至 6、9 及 12 mmol 時，孔徑則具有相當程度的均一性且分布較窄，其相對應的孔徑分別約為 18、20 以及 22 nm。上述可知當 TMB 在低濃度時會造成 SBA-15 粒子的孔徑分布不均，而造成這種原因推測是由於當

加入的 TMB 濃度過低時，無法充分均勻的進入每一個微胞中心內，使每個微胞內所含 TMB 的量較不平均，因此產生了孔徑分布不均的情形。

由此可知，當加入的 TMB 濃度過低而無法充分的均勻進入每一個微胞時，不只會使合成出來的 SBA-15 粒子之形貌較不規則而無法形成完整的球形而且孔徑分布較不均一，當 TMB 濃度增加至 6、9 及 12 mmol 的時候，SBA-15 粒子的形貌也漸漸趨向球形，且孔徑分布較均一，分別為 18、20 及 22nm。在未來可以利用 TMB 調控孔徑大小的特性來針對大型蛋白質藥物而調整孔徑的大小，例如為了調整 SBA-15 在藥物控制釋放系統上的應用而進行的表面官能基團的修飾，這會造成孔徑的縮小，因此事先選擇大孔徑的 SBA-15 來避免孔徑縮小後無法吸附大分子蛋白質藥物的問題。

Table. 5-1 不同 TMB 濃度對應之容積與孔徑。

TMB(mmol)	3	6	9	12
容積(ml)	0.442	0.885	1.327	1.770
孔徑大小(nm)	分布不均	18	20	22

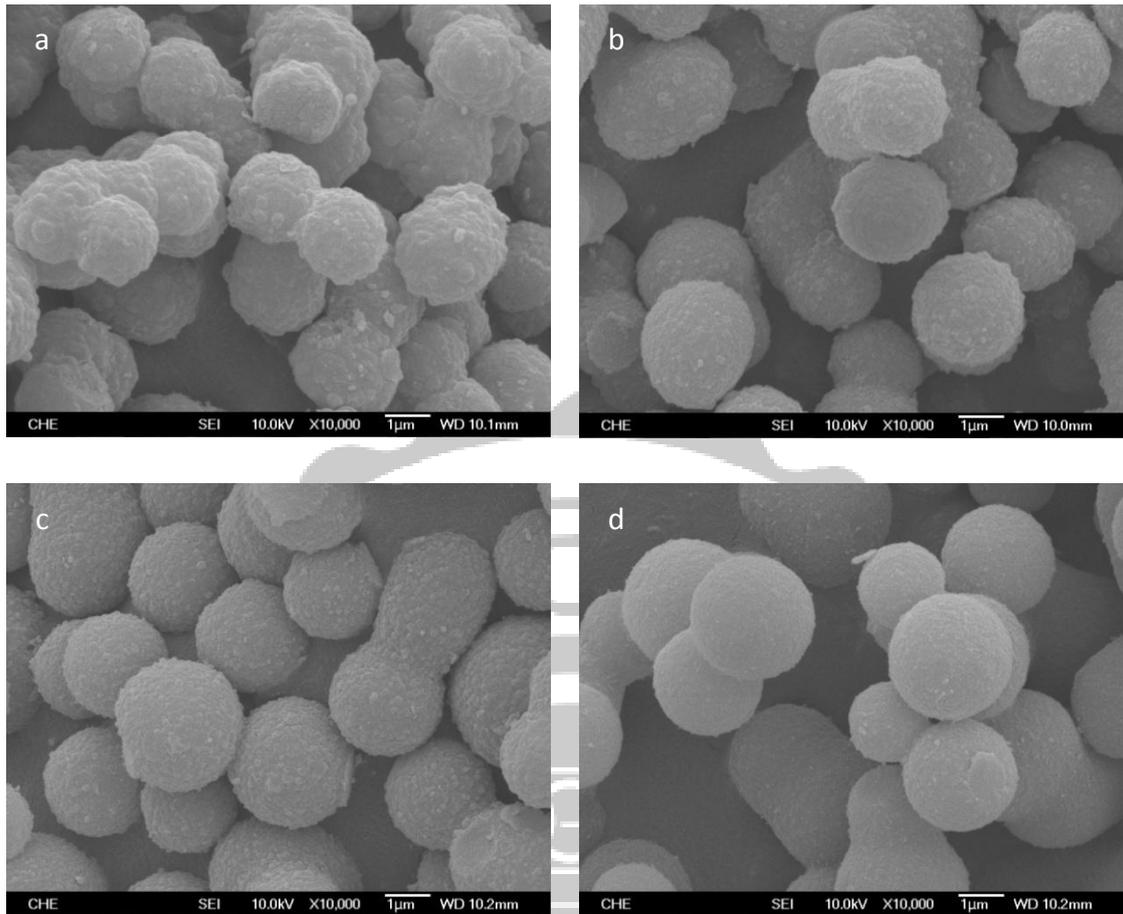


Fig. 5-3 不同 TMB 濃度在 2 M 鹽酸下合成 SBA-15 之 SEM 圖。

(a)TMB 濃度 3 mmol ; (b)TMB 濃度 6 mmol

(c)TMB 濃度 9 mmol ; (d)TMB 濃度 12 mmol

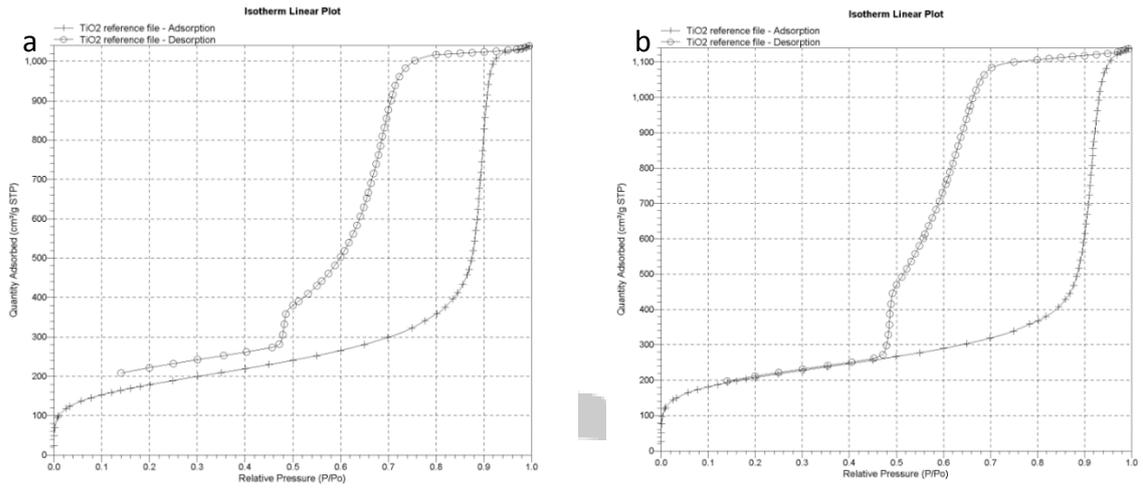


Fig. 5-4 不同 TMB 濃度下合成 SBA-15 之氮氣等溫吸脫附曲線。

(a) 9 mmol ; (b) 12 mmol

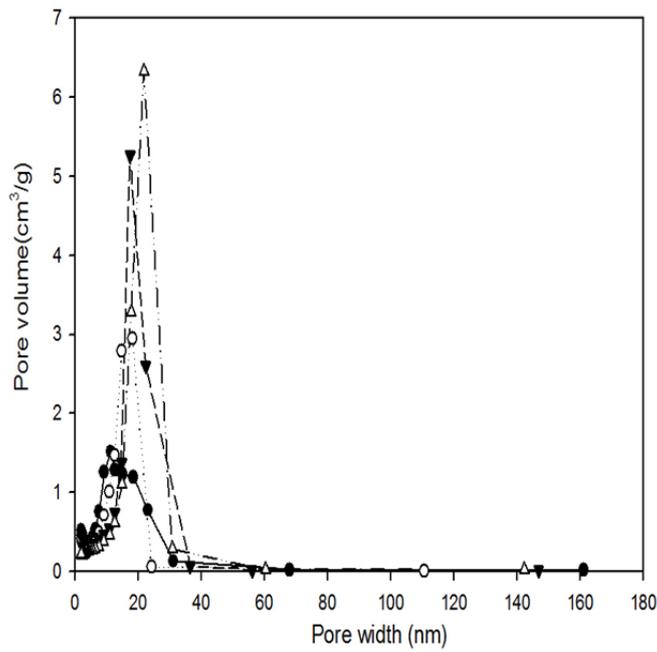


Fig. 5-5 不同 TMB 濃度下合成 SBA-15 之孔徑分布圖。

(●) 3 mmol ; (○) 6 mmol ; (▼) 9 mmol ; (△) 12 mmol

5-2 球形 SBA-15 對蛋白質的包覆效果

SBA-15 最終的目標是應用於藥物釋放控制系統當中，為了能應用在生物體當中，載體必須有良好的生物相容性，所以在合成 SBA-15 粒子時就必須探討各種合成條件對形貌的影響；而這裡將探討各種包覆環境條件下進行蛋白質的包覆與包覆量的關係，並且利用蛋白質 (BSA: 牛血清蛋白, Lysozyme: 溶菌酶) 作為分子藥物的模型，進而研究不同蛋白質類型的藥物的包覆效果。實驗中所用 SBA-15 粒子之合成條件為 2 M HCl、1.49 g KCl、2 g P123、1.77 ml (12 mmol) TMB 及 4.65 ml TEOS，聚合過程中為靜置。

5-2.1 不同 pH 環境下進行蛋白質的包覆

在這裡將會探討兩種蛋白質 (BSA 與 Lysozyme) 的包覆環境 (pH 5.8、6.4、7.0、7.4 以及 8.0) 對包覆量造成的影響，並且利用熱重分析法 (TGA) 來進行包覆量的分析。實驗條件為 20 mg 的 SBA-15 加入 1 ml 5 種不同 pH 的蛋白質溶液，並置於 4°C 環境中進行包覆 6 小時，蛋白質溶液的濃度為 5 mg/ml。

Fig. 5-6、Fig. 5-7 兩張熱重分析圖與 Table 5-2、Table 5-3 兩張熱重分析結果表顯示出 BSA 與 Lysozyme 兩種蛋白質的包覆情況，在進行熱重分析結果的計算時，必須同時考慮到蛋白質的熱重損失與

水的熱重損失(約在 100 °C 左右),在用包覆量的計算式子(算式 3-6) 運算,則可以推估出在各種 pH 環境下,每克的 SBA-15 能包覆蛋白質 的量(mg/g)。

這裡先以 BSA 來討論,可以從 Fig. 5-6 跟 Table 5-2 的 SBA-15 包覆 BSA 之熱重分析結果觀察到,純的 SBA-15(未包覆蛋白質)的熱 重損失只有些許的 1%,而這 1%都發生在初期升溫(室溫→約 50 °C) 階段,推測這些是屬於水的熱重損失,之後就沒有再發生任何的熱重 損失,用此組來對照進行包覆的 SBA-15 粒子,可以明顯看出在 100 °C 左右有明顯的熱重損失,剛好跟水的沸點相符合,因此推估在 100 °C 以前的熱重損失是水的熱重損失,當升溫到 250 °C 以後,有另一明 顯的熱重損失,這是純 SBA-15 粒子沒有的,因此推估第二段的熱重 損失為蛋白質的熱重損失,同時考慮水的熱重損失與蛋白質的熱重損 失並利用包覆率計算式子(算式 3-6)可計算出蛋白質的包覆率。在 Table 5-2 中,可以得知 SBA-15 粒子包覆 BSA 的最大量約為 57.2 mg/g (在包覆環境為 pH 5.8),而且比較各 pH 環境下的包覆量,還觀察到 一個現象,pH 環境會影響 BSA 的包覆效果,包覆量會隨著 pH 的增加 而減少,由表中可以看到當 pH 為 8.0 時的 BSA 包覆量只剩 40.55 mg/g ; 反觀 Lysozyme,可以從 Fig. 5-7 與 Table 5-3 中很明顯地觀察到包 覆量比 BSA 還要多上許多,最大包覆量高達 228.4 mg/g ,雖然這是

在 pH 7.0 環境下的包覆結果，但是 pH 8.0 環境的包覆結果也高達 225.5 mg/g，與 pH 7.0 差距不多。初步推測會造成 Lysozyme 的包覆量多過於 BSA 可能是由於 BSA 的分子較大(分子量:66430，尺寸: 40 Å *40 Å *140 Å)，Lysozyme 的分子較小(分子量:14400，尺寸: 30 Å *30 Å *45 Å)，再加上 SBA-15 粒子孔徑(22 nm)與空間障礙的關係，使 BSA 無法完全充分的進入且吸附於 SBA-15 粒子孔徑內。

由上述結果我們也觀察到一個與 BSA 完全相反的結果，除了包覆量多寡的差異，Lysozyme 在受到 pH 環境的影響是隨著 pH 的增加而提高包覆量。由於本實驗的條件是改變 pH 環境來進行蛋白質的包覆，而會受到 pH 最大影響的是物質本身帶有的電荷，因此會造成這種現象的原因是受到材料與蛋白質自身的等電點的影響，因為等電點的不同，所以在各種 pH 環境中 SBA-15 與蛋白質所帶的電荷量不一樣，SBA-15 的等電點為 2~4、BSA 為 4.7 而 Lysozyme 則是 11。從等電點的差異上可以推測出為什麼 Lysozyme 的包覆量會高於 BSA，改變的 pH 範圍在 5.8~8.0，而這個範圍會讓 BSA 帶負電荷、Lysozyme 帶正電荷，SBA-15 則是帶負電荷，因此跟帶有異性電荷的 Lysozyme 吸附能力較佳而包覆率較帶同性電荷的 BSA 來的高。

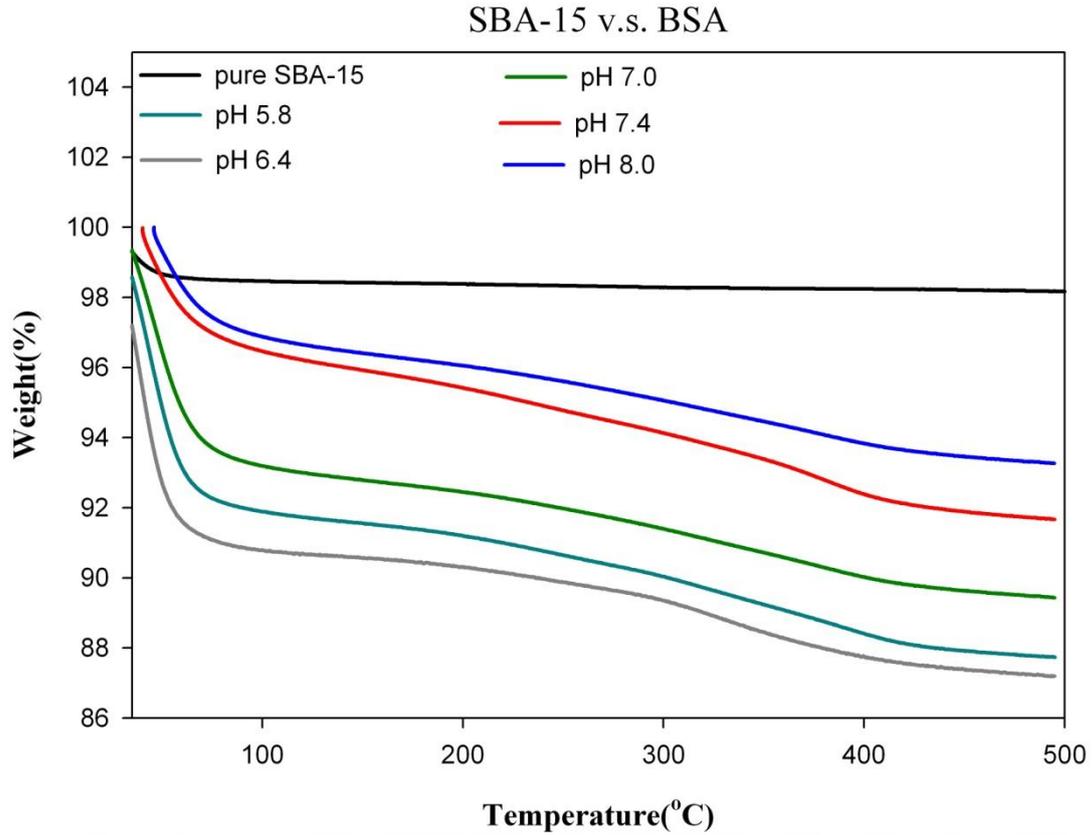


Fig. 5-6 不同 pH 下 SBA-15 包覆 BSA 之熱重分析圖。

Table. 5-2 不同 pH 下 SBA-15 包覆 BSA 之熱重損失與包覆率。

pH	5.8	6.4	7.0	7.4	8.0
蛋白質熱重損失(%)	4.96	4.62	4.44	4.65	3.78
水熱重損失(%)	8.34	8.68	6.42	3.83	3.02
包覆率(Wt%)	5.72	5.33	4.98	5.08	4.06
包覆量(mg/g)	57.20	53.30	49.81	50.80	40.55

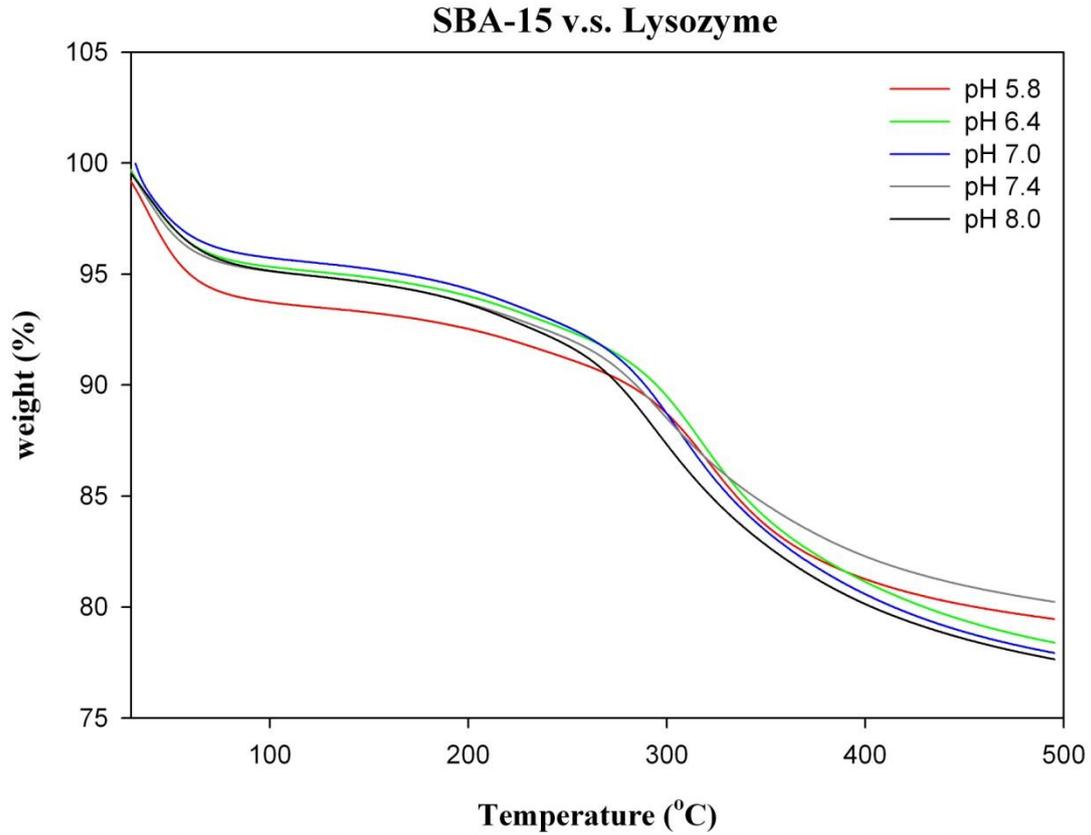


Fig. 5-7 不同 pH 下 SBA-15 包覆 Lysozyme 之熱重分析圖。

Table. 5-3 不同 pH 下 SBA-15 包覆 Lys 之熱重損失與包覆率。

pH	5.8	6.4	7.0	7.4	8.0
蛋白質熱重損失(%)	6.28	4.87	4.27	4.67	4.85
水熱重損失(%)	14.26	14.9	17.80	16.94	17.51
包覆率(Wt%)	17.95	18.57	22.84	21.61	22.55
包覆量(mg/g)	179.50	185.70	228.40	216.10	225.50

為了更進一步的了解 pH 環境對 SBA-15 粒子包覆蛋白質(BSA 與 Lys)的影響及其原因，這裡將對 SBA-15、BSA 及 Lysozyme 進行 Zeta 電位測試，Zeta 電位值的正負代表該物質在此 pH 環境下所帶的陽離子與陰離子的量，若 Zeta 電位值為正則該物質帶陽離子，Zeta 電位為負則該物質帶陰離子，數字大小則代表該物質帶陰/陽離子量的多寡，這數值可以表示材料表面的帶電程度。

由 Table 5-4 Zeta 電位分析的結果中，BSA 的等電點為 4.7，因此帶有大量的負電荷，而 Lysozyme 的等電點為 11，所以帶正電荷。也可以觀察到受測的三種物質之電位會隨著 pH 環境的改變而改變，當環境中的 pH 越高該物質所帶的陽離子越少、陰離子越多，可以大略的推測出因為帶電荷的改變，也影響了 SBA-15 與蛋白質之間的結合能力。

Table 5-5 是計算 SBA-15 與蛋白質之間的 Zeta 電位差，可以由 ΔZ 推算出 SBA-15 粒子與蛋白質之間的吸引力大小，當 ΔZ 為正值表示彼此間吸引，負值表示彼此間排斥。其中 $\Delta Z_{\text{SBA-15-BSA}}$ 為負值，這表示 SBA-15 與 BSA 之間都是帶負電荷的情況下，彼此之間是存在著排斥力的，造成在包覆量上偏低的情形，當 pH 慢慢降低使 SBA-15 與 BSA 所帶的負電荷減少，彼此間的排斥力也相較降低，因此在包覆量的表現上，低 pH 的環境是有利於 BSA 的包覆；而 $\Delta Z_{\text{SBA-15-Lys}}$ 為正值，這也

說明了與 SBA-15 帶著異性電荷的 Lysozyme 彼此之間是有吸引力的，電荷間的吸引力幫助了 SBA-15 對 Lysozyme 的吸附，使 SBA-15 在包覆 Lysozyme 的包覆量多過於與 SBA-15 帶同性電荷的 BSA；同時也觀察到，當環境中的 pH 提高， $\Delta Z_{\text{SBA-15-Lys}}$ 也跟著提高，表示 SBA-15 與 Lysozyme 之間的吸引力會因為 pH 增加而變強，也證明了高 pH 環境是有利 Lysozyme 的包覆。這裡也將 Zeta 電位分析的結果繪製成 Fig. 5-8，方便去比較其中之電位差。

綜合上述結果，可以知道包覆不同的蛋白質藥物時，SBA-15 孔徑的選擇與包覆環境的條件都是必須要納入考慮的，在這裡利用了 BSA 作為低 pI 值(4.7)的藥物模型，研究中說明了 BSA 適合低 pH 的包覆環境，因此往後再進行其他種低 pI 值或是在溶液中與 SBA-15 帶同性電荷的蛋白質藥物包覆時，必須選擇低 pH 的環境下進行包覆提高包覆效果；Lysozyme 在這裡則是扮演高 pI(11)的藥物模型，研究中也說明了對於這種高 pI 值的蛋白質藥物適合高 pH 的環境。所以在未來 SBA-15 於藥物釋放系統的應用當中，可以針對蛋白質藥物本身的性質，來選擇適合的包覆條件，除了可以提高 SBA-15 在這方面的應用之外，也能節省蛋白質藥物的用量，使 SBA-15 在藥物控制釋放系統當中更有其醫療價值。

Table. 5-4 SBA-15 與蛋白質在各 pH 環境下之 Zeta 電位測試。

pH	5.8	6.4	7.0	7.4	8.0
SBA-15	-13.20	-18.80	-19.90	-22.40	-25.00
BSA	-5.31	-6.10	-6.88	-8.14	-12.10
Lysozyme	11.10	8.52	6.50	6.00	5.56

Table. 5-5 SBA-15 與蛋白質之間的電位差。

pH	5.8	6.4	7.0	7.4	8.0
$\Delta Z_{\text{SBA-15-BSA}}$	-7.89	-12.70	-13.02	-14.26	-12.90
$\Delta Z_{\text{SBA-15-Lys}}$	24.30	27.32	26.40	28.40	30.56

ΔZ 為正值表示彼此間吸引，負值表示彼此間排斥

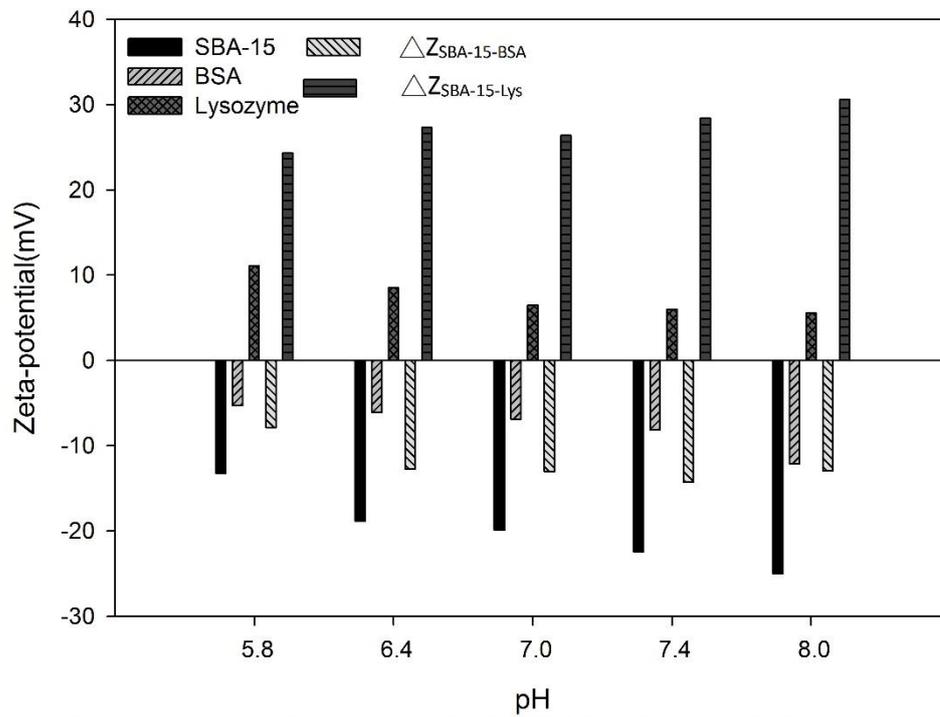


Fig. 5-8 SBA-15 與蛋白質在不同 pH 環境下之 Zeta 電位測試。



5-2.2 不同孔徑的 SBA-15 對 BSA 的包覆效果

在探討 pH 環境影響蛋白質的包覆效果之原因時，發現 BSA 的包覆量相較於 Lysozyme 的包覆量是低很多，由於蛋白質與載體的結合有很多方式，除了疏水作用、離子作用區與極性作用區外，在這裡也想探討蛋白質的大小與孔徑之間的空間阻礙對包覆效果造成的影響。

由於 BSA 的尺寸比 Lysozyme 大得許多，而大分子的蛋白質對於空間阻礙的影響較為敏感，因此在這裡選擇大分子的蛋白質 BSA 來做為大分子藥物的模型進行實驗，這也讓往後大分子藥物用於藥物控制釋放系統中的時候有個參考方向。因此在這裡將改變合成 SBA-15 粒子時添加的 TMB 濃度(3、6、9 及 12 mmol，其中各濃度的添加量以及對合成之 SBA-15 粒子的孔徑大小可以參考 Table.5-1)，另外在進行包覆蛋白質時的 pH 環境也選擇較適合 BSA 的 pH(5.8)。

使用之 SBA-15 的合成條件為 2 M HCl 60 ml、1.49 g KCl、2 g P123 及 4.65 ml TEOS，合成過程為靜置，蛋白質溶液為 pH 5.8 之 BSA 溶液(5 mg/ml)。各稱取 20 mg 的不同 TMB 濃度下合成之 SBA-15，各別加入 10 ml 的蛋白質溶液，並於 4°C 的環境中旋轉攪拌來進行包覆 6 小時。

從 Fig.5-9 熱重分析圖與 Table.5-6 分析結果中，可以觀察得出 BSA 的包覆效果會隨著孔徑的增大而提高 BSA 的包覆量，而其中 TMB 的濃度在 3 mmol 或 6 mmol 時的包覆效果明顯的較差，推測是由於在這個 TMB 濃度範圍的 SBA-15 粒子孔徑平均最大只到 18 nm，這個孔徑範圍並沒有大到足夠讓 BSA 能充分的進入孔徑中，在 BSA 無法充分的進入 SBA-15 粒子孔徑內的情況下，BSA 又與 SBA-15 帶同性電荷，導致 BSA 與 SBA-15 的結合可是難上加難；當 TMB 濃度增加至 9 mmol 使 SBA-15 粒子的孔徑擴大到 20 nm，可以看到 SBA-15 粒子對 BSA 的包覆量有明顯的提高，包覆量增加到 48.1 mg/g，TMB 濃度增加到 12 mmol (SBA-15 孔徑增加到 22 nm)，BSA 的包覆效果更是大幅提高至 57.2 mg/g。

會造成這種原因，推測是因為大分子的蛋白質受到的空間阻礙較為嚴重，孔徑較窄的空間中，容易使得大分子的蛋白質因為空間阻礙的關係而在孔徑的洞口就產生了堵塞的情形，導致 BSA 無法完全且充分的進入到 SBA-15 粒子內，進而使得低孔徑的 SBA-15 對 BSA 的包覆效果不佳；當 SBA-15 粒子的孔徑擴大，則能夠減少 BSA 因為空間阻礙的關係而在洞口產生堵塞的情況發生，讓 BSA 能充分進入 SBA-15 粒子內，也因此而提高了包覆效果。

綜合上述結果，可以知道對於大分子蛋白質藥物的包覆必須考慮到 SBA-15 粒子的孔徑大小是否會使其因為空間阻礙而產生了堵塞的現象，針對目標蛋白質藥物的大小而調整 SBA-15 粒子孔徑的大小，在配合 5-2.1 的實驗結果來選擇適合的包覆環境，使其提高蛋白質藥物的包覆效果，充分的使用該蛋白質藥物，這能讓 SBA-15 在往後的應用更加的全面，同時也能提高蛋白質藥物本身與 SBA-15 在藥物控制釋放系統之中的價值。



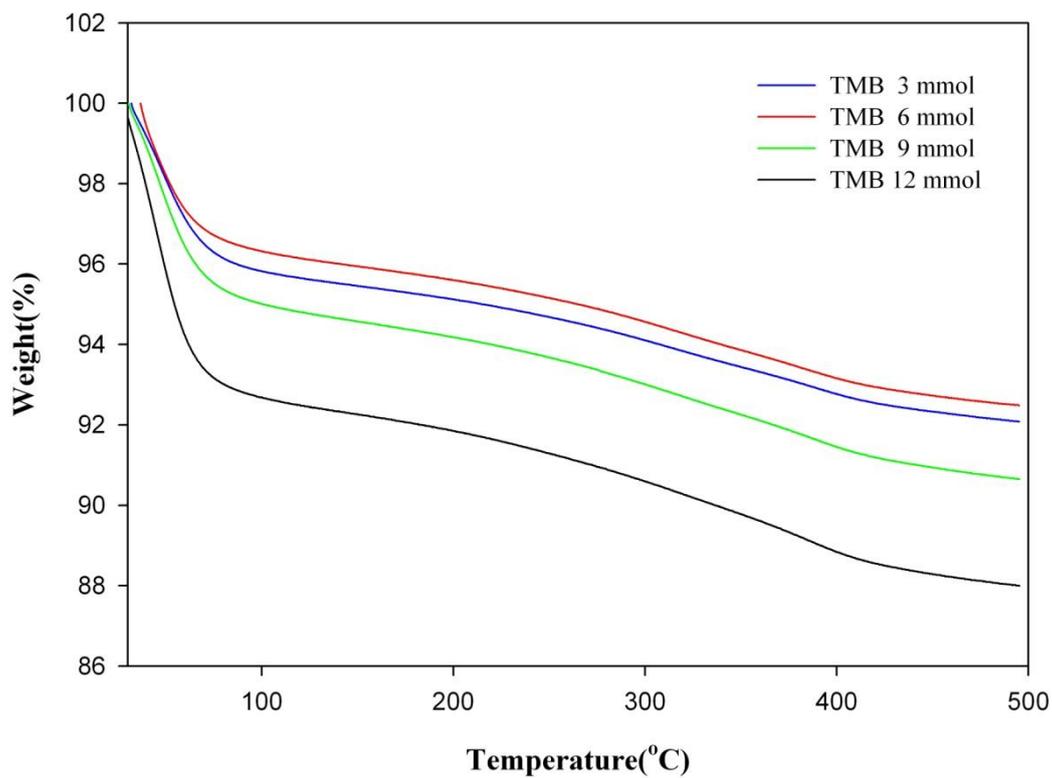


Fig. 5-9 不同 TMB 濃度下 SBA-15 包覆 BSA 之熱重分析圖。

Table. 5-6 不同 TMB 濃度下 BSA 之熱重損失與包覆率。

TMB 濃度 (mmol)	3	6	9	12
SBA-15 孔徑 (nm)	不均一	18	20	22
蛋白質熱重損失 (%)	4.18	3.68	4.99	8.34
水熱重損失 (%)	3.74	3.86	4.36	4.96
包覆量 (mg/g)	40.60	41.70	48.10	57.20

5-2.3 不同包覆時間對蛋白質包覆效果的影響

為了能夠充分且有效的運用蛋白質藥物，避免過多而浪費的情形發生，並且考量到藥物活性的保存前提下，探討包覆時間對蛋白質的包覆效果造成的影響。在這裡將蛋白質的包覆時間延長至 12、24 及 48 小時，使用之 SBA-15 粒子的製備條件為 2 M HCl、1.49 g KCl、2 g P123、1.77 ml(12 mmol)TMB 及 4.65 ml TEOS，合成過程為靜置，蛋白質溶液之濃度為 5 mg/ml(BSA 在 pH 5.8 之環境，Lys 在 pH 8.0 之環境)。

在 Fig. 5-10 熱重分析圖與 Table. 5-7 的包覆效果中，可以觀察到 BSA 的包覆效果會隨著包覆時間的增加而提高包覆量，當包覆時間提高到 48 小時，BSA 的包覆量也隨之提高到 64.2 mg/g。推測這是因為 SBA-15 與 BSA 的結合除了極性作用、空間阻礙外，還有疏水作用與離子作用等多種方式，即使 SBA-15 與 BSA 在包覆環境中帶有相同的電荷，使其之間具有排斥力不易結合，但在選擇 pH 5.8 的環境下降低了 SBA-15 與 BSA 之間的排斥作用，並且經由長時間的旋轉攪拌，讓其他的結合方式使 SBA-15 更能與 BSA 結合。

但是在包覆 Lysozyme 時，可以看到 Fig. 5-11 與 Table. 5-8，隨著時間的提高，Lysozyme 的包覆效果不但並沒有與 BSA 一樣會隨之提高，反而是包覆時間越長，Lysozyme 的包覆量越低，6 小時能有

225.5 mg/g 的包覆量，而 48 小時只剩 146.3 mg/g。初步推測是由於 Lysozyme 與 SBA-15 粒子長時間存在於磷酸緩衝溶液之中，會有鹽類反釋的情形發生，緩衝溶液當中所含有的鹽類成分在長時間的攪拌情況會進入到 SBA-15 的孔洞之中將吸附於孔壁上的 Lysozyme 代換出，因此包覆時間拉長的情況下，造成 Lysozyme 可能會受到鹽類的代換之影響而導致包覆效果呈現時間越長包覆量越差的情況。

以上述結果可以推論出對於本身粒子尺寸較大的 BSA 來說，利用長時間的攪拌來提高包覆效果可行的，但是對於 Lysozyme 則是會受到鹽類置換的可能，而進行長時間的包覆產生了反效果，而針對蛋白質藥物來探討其適合的包覆時間來改善包覆效果是可行的。

根據 5-2 球形 SBA-15 對蛋白質的包覆效果實驗總的來說，當 SBA-15 粒子對蛋白質藥物進行包覆時，需要考慮到的因素有很多，例如針對蛋白質藥物分子的大小來調節 SBA-15 粒子的孔徑、根據蛋白質藥物的 pI 值來選擇適當的包覆環境之 pH，甚至是包覆時間的考量，都能夠幫助提高藥物控制釋放系統的應用。結合種種因素來針對目標蛋白質藥物而選擇其最適的包覆條件，同時能節省在包覆過程中蛋白質藥物的用量與提高其包覆率，更可以充分的利用該蛋白質藥物於藥物控制釋放系統之中。

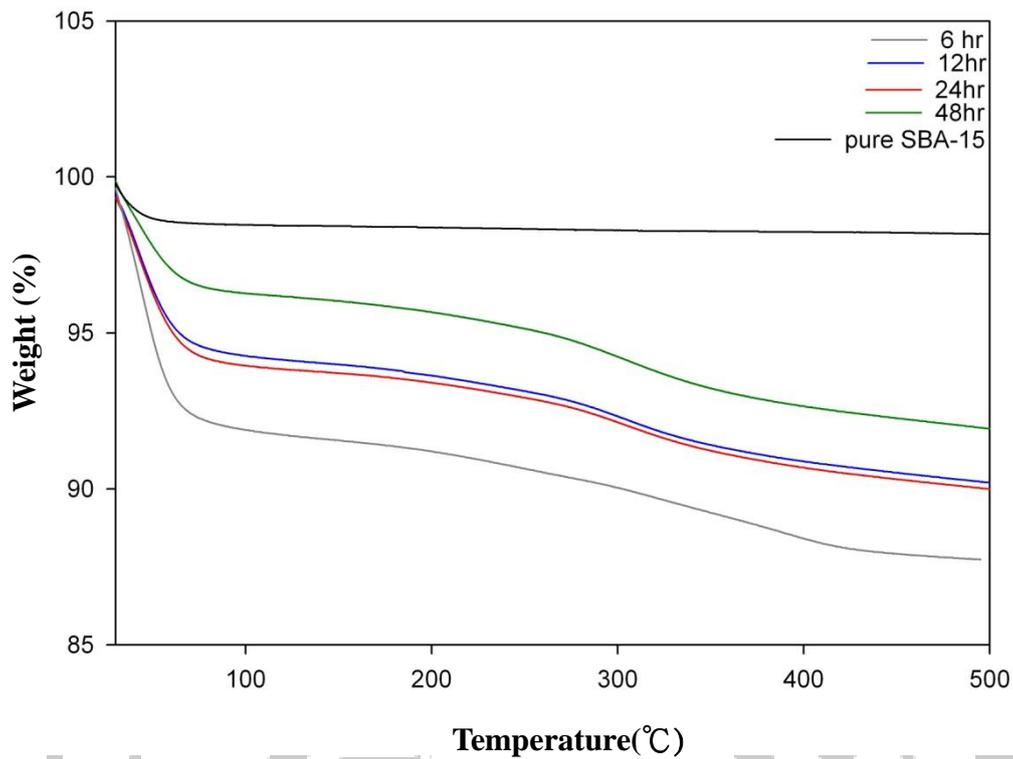


Fig. 5-10 不同包覆時間下 BSA 包覆之熱重分析圖。

Table. 5-7 不同包覆時間下 BSA 包覆之熱重損失與包覆率。

包覆時間	6	12	24	48
蛋白質熱重損失(%)	8.34	4.98	4.95	5.70
水熱重損失(%)	4.96	5.72	6.05	3.72
包覆率(Wt%)	5.72	5.58	5.56	6.42
包覆量(mg/g)	57.20	55.80	55.60	64.20

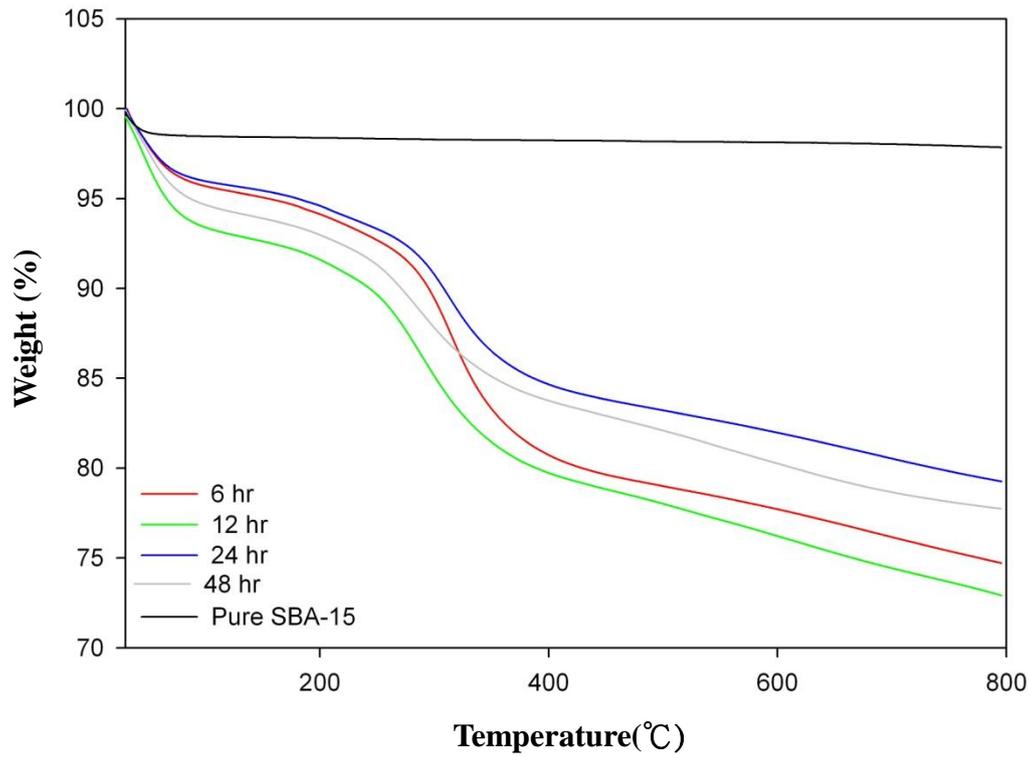


Fig. 5-11 不同包覆時間下 Lysozyme 包覆之熱重分析圖。

Table. 5-8 不同包覆時間下 Lysozyme 包覆之熱重損失與包覆率。

包覆時間	6	12	24	48
蛋白質熱重損失(%)	4.85	4.30	6.60	4.02
水熱重損失(%)	17.51	15.98	13.93	12.25
包覆率(Wt%)	22.55	19.95	17.53	14.63
包覆量(mg/g)	225.50	199.50	175.30	146.30

5-3 包覆蛋白質後的 SBA-15 之釋放測試

經過前面的實驗探討 SBA-15 粒子包覆蛋白質之包覆效果，因此，可以了解到蛋白質藥物在包覆時的各種條件，而在這裡將要探討包覆蛋白質之後的 SBA-15 之釋放效果。

在藥物控制釋放系統中，最重要的就是控制藥物釋放的速度，希望能在病人的患部當中進行緩釋，並且使藥物存在患部能維持在有效濃度，減少病人給藥頻率。而在這個部分將探討一般之 SBA-15 所包覆的蛋白質之釋放情形。實驗中使用之 SBA-15 用其目標蛋白質之罪加包覆條件，BSA 選擇 pH 5.8 之包覆環境，包覆時間為 48 小時；Lysozyme 選擇 pH 8.0 之包覆環境，包覆時間為 6 小時(蛋白質溶液配製濃度為 5 mg/ml)，而 SBA-15 粒子的製備條件為 2 M HCl、1.49 g KCl、2 g P123、1.77 ml(12 mmol)TMB 及 4.65 ml TEOS。

由於正常人體的環境中 pH 為 7.0~7.4，而且正常人的體溫為 36~37°C。因此，釋放條件選擇在 pH 7.4 且溫度為 37°C 的環境中進行釋放，分別在 0.5、1、2、4、8、12、24、48 小時進行取樣，經由離心取上清液 100 ul 加入 700 ul 的去離子水與 200 ul 的 Bio Red 指示劑，反應 5 分鐘後用 UV/Vis 光譜儀在波長 595 下偵測其吸收峰值，在用 Fig. 5-12 與 5-13 之蛋白質標準線換算其吸收峰下所對應的蛋白質濃度。

Fig. 5-14 與 5-15 分別為 BSA 與 Lysozyme 之釋放曲線圖，由兩個圖中分別可以觀察到 BSA 與 Lysozyme 之釋放情形，BSA 的釋放速度較快，大約在 480 min (8 hr) 釋放濃度高達 95%，而 Lysozyme 的釋放速度較為平緩，具有藥物控制釋放系統中所需求的緩釋效果，釋放濃度在 1440 min (24 hr) 時累積量才達到 95%，而且不管是 BSA 或是 Lysozyme 的釋放濃度都高達 95%，這幾乎接近 100% 的釋放，這讓 SBA-15 在藥物控制釋放系統中不必擔心會有蛋白質藥物無法正常釋放出來的情況發生。

造成這種 BSA 釋放速度過快的原因，推估是因為在 pH 環境在 7.4 時，SBA-15 與 BSA 因為 pI 值的關係而都帶著負電，導致 SBA-15 與 BSA 之間存在著排斥力而使得彼此之間的相互作用力減弱，而在沒有更強力的化學作用力(靜電吸引力、氫鍵、極性或疏水作用力)牽制吸附的條件下，使蛋白質會以濃度梯度的方式向外擴散，造成了 BSA 迅速的釋放出來。反觀有緩釋現象發生的 Lysozyme，在釋放環境為 pH 7.4 的情況下，SBA-15 與 Lysozyme 兩者因為 pI 值的關係而在此環境會帶有異性電，因此藉由帶著異性電的關係其之間的靜電吸引力能使其包覆效果處於一個較好的狀態，進而使得釋放速度緩慢而有緩釋現象的情形。

另外，由 Fig. 5-15 之中，可以觀察到 Lysozyme 的釋放過程，在初期的釋放速度較為快速，而隨著時間漸漸平緩下來，這是因為初期 Lysozyme 有突釋過程，而當 SBA-15 與 Lysozyme 之間因為靜電吸引力作用的關係，讓釋放速度開始緩慢下來而產生了緩釋現象。基於這種原因，可以知道 SBA-15 與蛋白質之間因 pH 而受到影響的帶電關係，不只會影響其蛋白質的包覆量，還會在釋放過程中影響到其釋放速度，因此在藥物控制釋放系統中能夠調整其 pH 環境而達到適當的釋放效果。



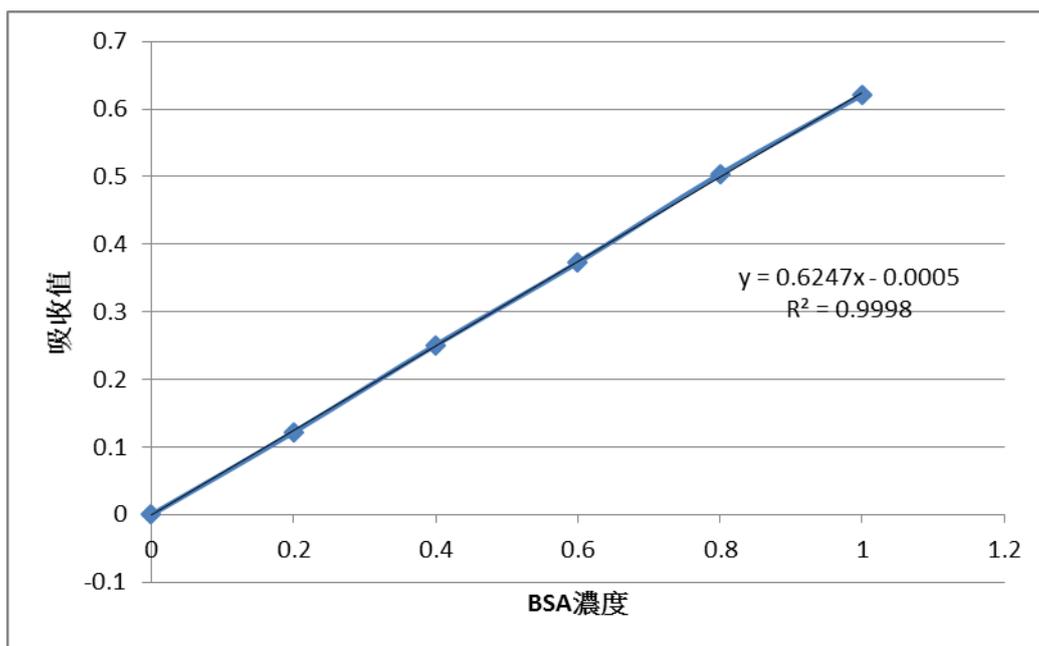


Fig. 5-12 BSA 濃度 v. s. 吸收值之標準線。

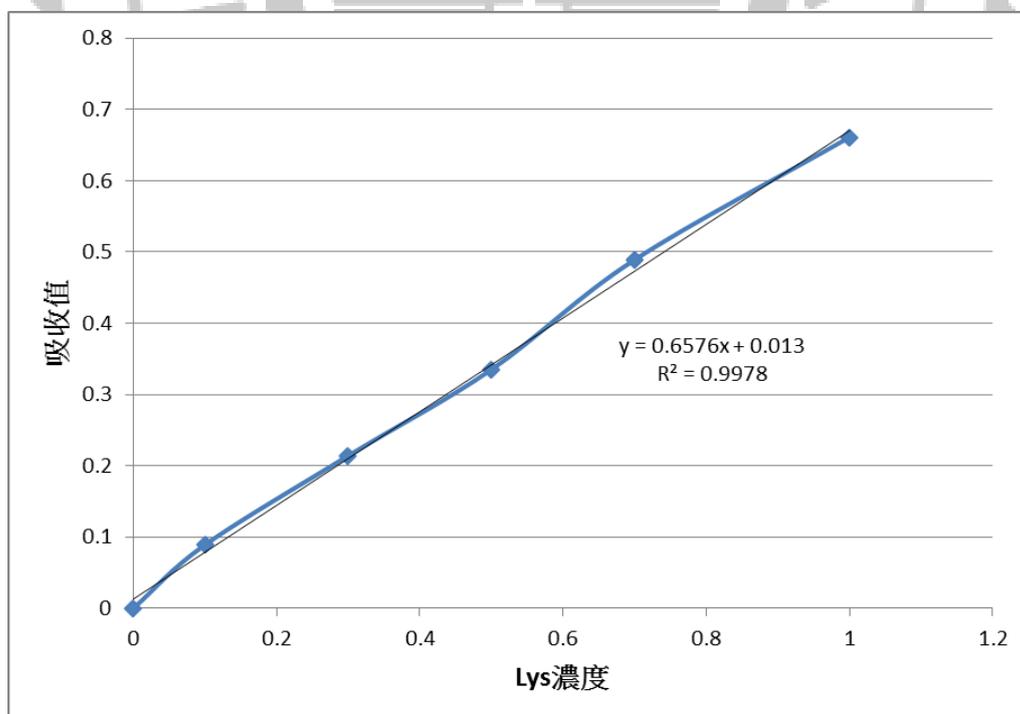


Fig. 5-13 Lysozyme 濃度 v. s. 吸收值之標準線。

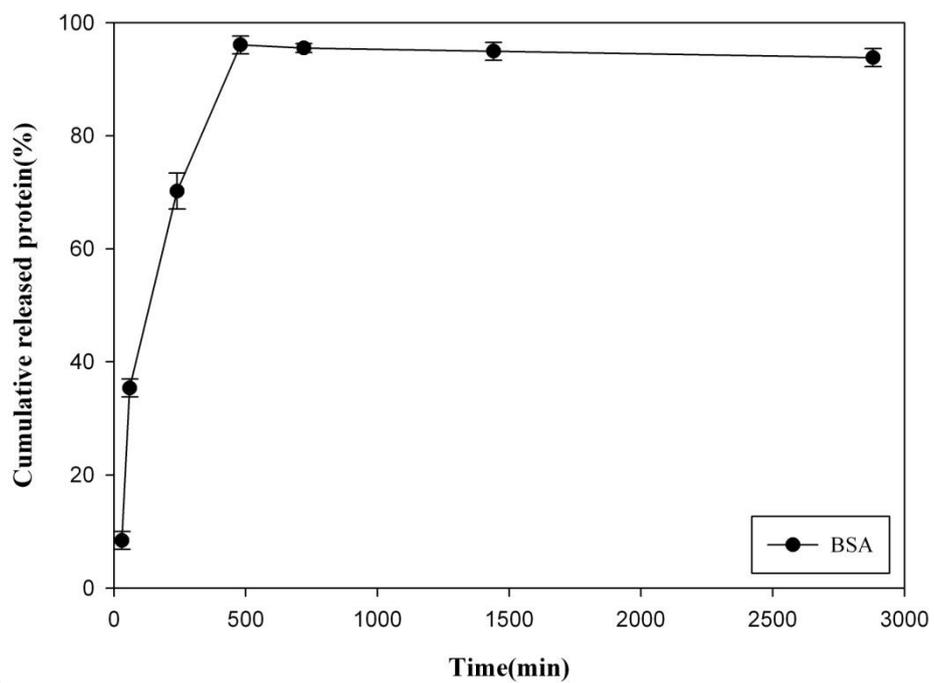


Fig. 5-14 BSA 釋放曲線圖。

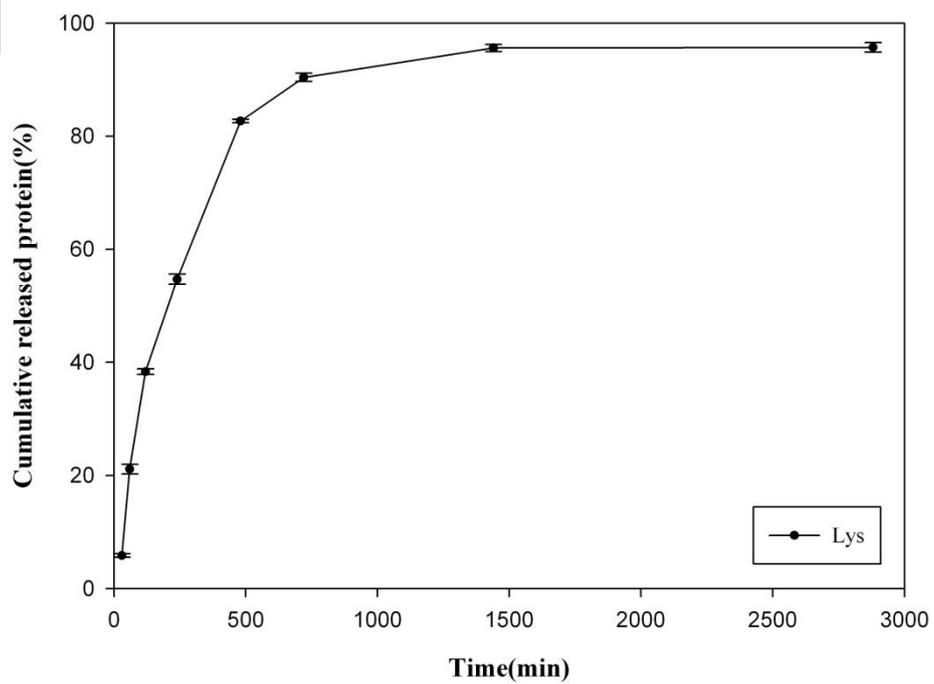


Fig. 5-15 Lysozyme 釋放曲線圖。

5-4 球形 SBA-15 的修飾與其對蛋白質包覆、釋放之情形

在藥物控制釋放系統中，需要考量的除了載體本身的生物相容性外，還有會影響蛋白質藥物與載體結合的因素以及其釋放效果。因此，將載體優化以利於在藥物控制釋放系統的應用是這個部分所要探討的主要目的，而針對載體進行優化或修飾的相關研究就開始受到各界的重視。

在這裡將會對 SBA-15 進行表面修飾，利用其他的官能基團來改質 SBA-15 的表面與孔道，使其能夠在包覆蛋白質藥物上能夠有更好的表現，並且在釋放過程中能夠緩慢的釋放以達到藥物控制的目的。研究中選擇三種試劑來修飾 SBA-15，分別是氯甲基(chloromethyl, CM)、氨基(aminopropyl, AP)與正辛基(octyl, Oc)，利用後製備法來進行修飾，並且將修飾完成的 SBA-15 用來包覆蛋白質藥物與釋放測試，探討修飾之 SBA-15 粒子在蛋白質藥物的包覆與釋放上的表現是否能夠優化其在藥物控制釋放系統之中的行為。

研究中使用之 SBA-15 粒子合成條件為 2 M HCl、1.49 g KCl、2 g P123、1.77 ml(12 mmol) TMB 及 4.65 ml TEOS，合成過程中靜置。

5-4.1 對 SBA-15 進行修飾之結果

經過表面修飾之 SBA-15 粒子，可以藉由 SEM/EDS 元素分析、X-ray diffraction 與氮氣等溫吸脫附的各種檢測方式來證明 SBA-15 上的官能基團是有被修飾的。

Fig. 5-16 為修飾之 SBA-15 的 SEM 圖，可以看出利用後製備法進行修飾的 SBA-15 粒子的形貌並沒有改變，還是維持在球形，雖然有部分碎塊的產生，推測是由於在製備過程中攪拌造成 SBA-15 粒子之間碰撞而破碎，但這也只有少量的發生，未來在製備時攪拌的轉速做些調整，是可以保持 SBA-15 粒子的完整性並不影響修飾的效果。另外，可以從 Fig. 5-17 元素分析圖與 Table. 5-9 中明顯得觀察到修飾後 SBA-15 的成分有明顯的變化，用氯甲基修飾的 SBA-CM 之成分明顯得多了正常 SBA-15 不會有的 Cl 元素，而正辛基修飾之 SBA-0c 的氧元素也明顯得比 SBA-15 多；雖然用氨基修飾的 SBA-AP 因為 N 元素的峰值會被兩旁峰值高的 Si 元素與 C 元素覆蓋而沒有辦法有利的分析，但還是可以經由 XRD 或是 TGA 來檢測。

在 Fig. 5-18 為 XRD 與氮氣吸脫附等溫線的檢測結果，在這裡面比較了修飾與未修飾的 SBA-15，可以看出其中峰值的差異，經過修飾之 SBA-15 的峰值強度有輕微的下降；另外在熱重分析的檢測中，由 Fig. 5-19 可以明顯觀察到，未修飾之 SBA-15 大約只有 2% 的熱重

損失，而經由不同官能基團修飾之 SBA-15 的熱重損失最多約達 12%；當溫度到 523 K (250 °C) 時，利用來進行官能基團修飾之 CMTS、OcTS 與 APTS 會因為高溫而產生分解，因此溫度升高到超過其沸點後，就會有熱重損失的情形出現。

經由上述各種檢測方式，可以知道研究中使用後製備法來進行 SBA-15 粒子之官能基團的修飾是可行的，並且在未來更深入的探討不同官能基團的修飾效果，其對蛋白質藥物的包覆與釋放之效果，讓 SBA-15 能夠優化於藥物控制釋放系統中之應用。



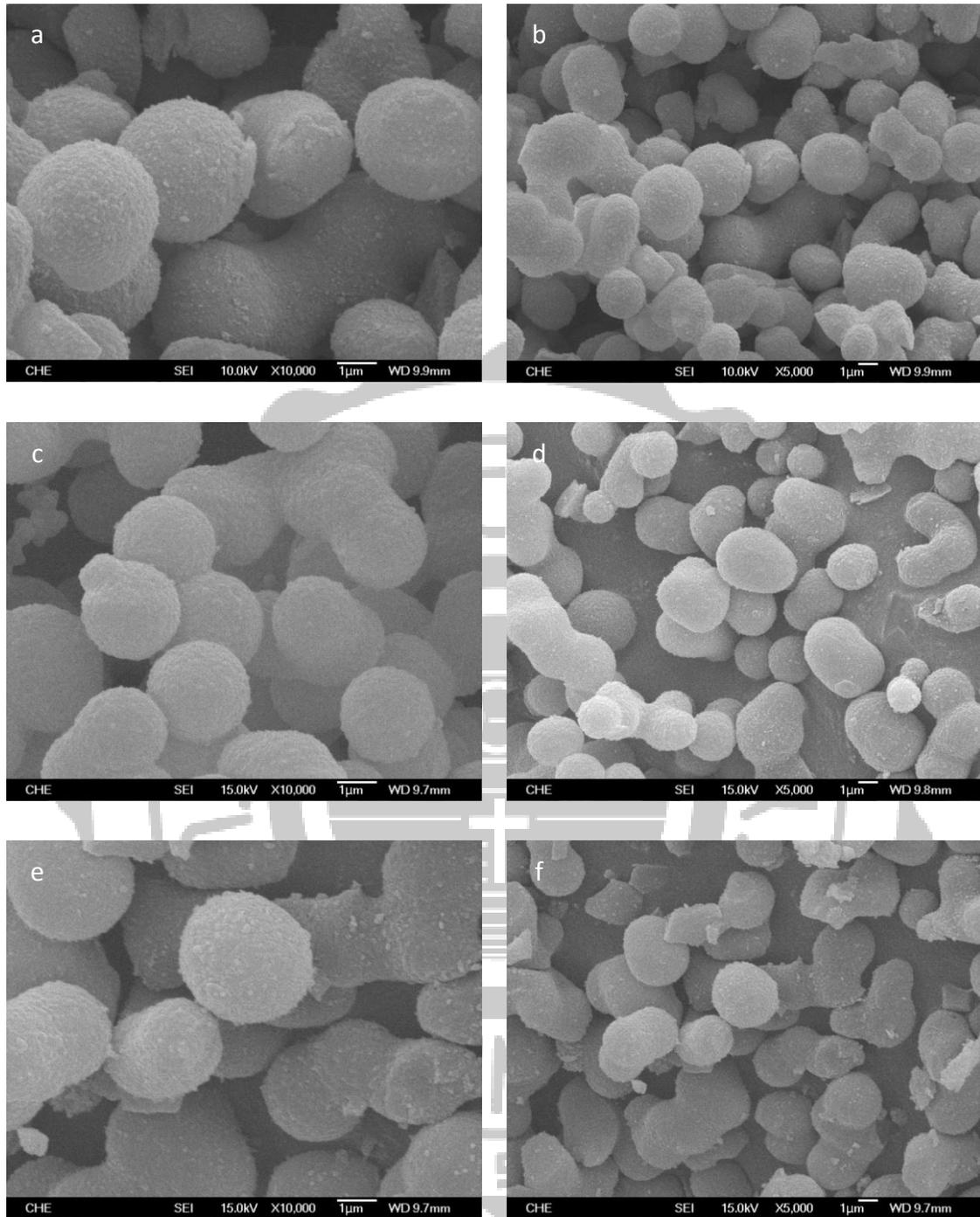


Fig. 5-16 修飾之 SBA-15 的 SEM 圖。

(a)SBA-CM，X10000；(b)SBA-CM，X5000；

(c)SBA-0c，X10000；(d)SBA-0c，X5000；

(e)SBA-AP，X10000；(f)SBA-AP，X5000。

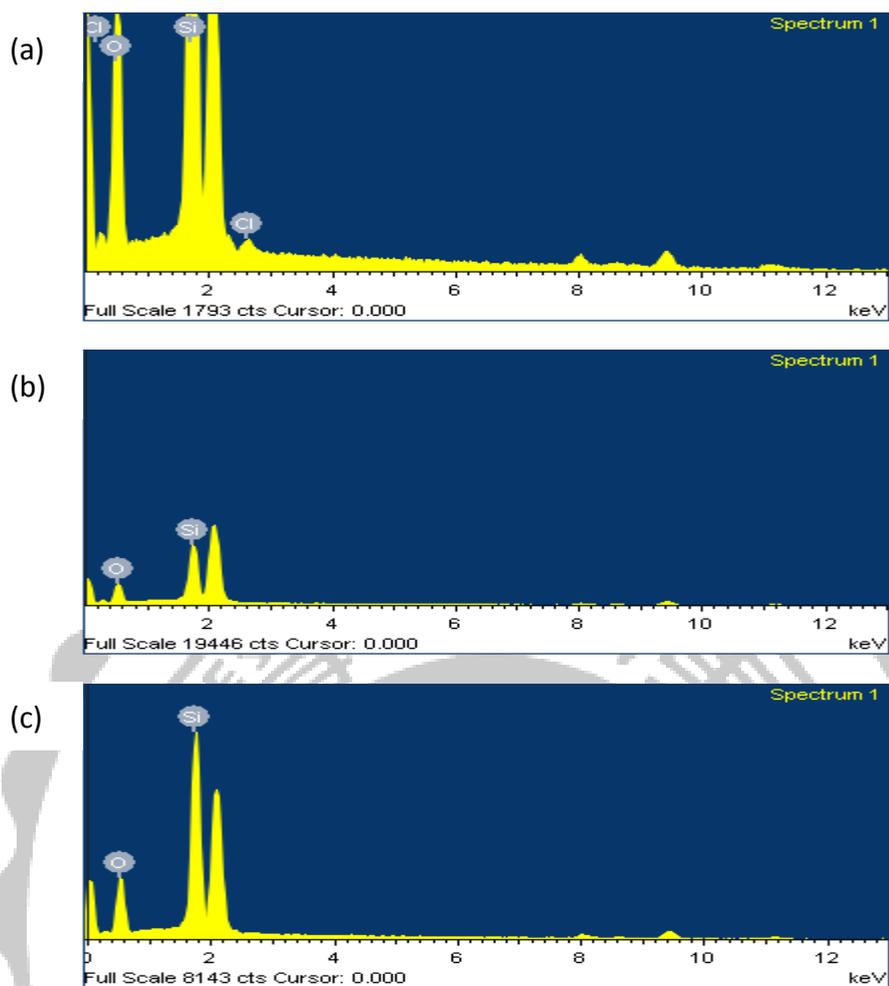


Fig. 5-17 修飾之 SBA-15 的 EDS 元素分析結果。

(a)SBA-CM; (b)SBA-0c; (c)SBA-AP

Table. 5-9 EDS 元素分析結果表。

element	0	Si	Cl	total
SBA-15	45.79	54.21	-	100.00
SBA-CM	41.45	55.60	2.94	99.99
SBA-0c	48.14	51.86	-	100.00
SBA-AP	由於氮根的 N 元素之峰值非常靠近 Si 且微量，因此無法分析			

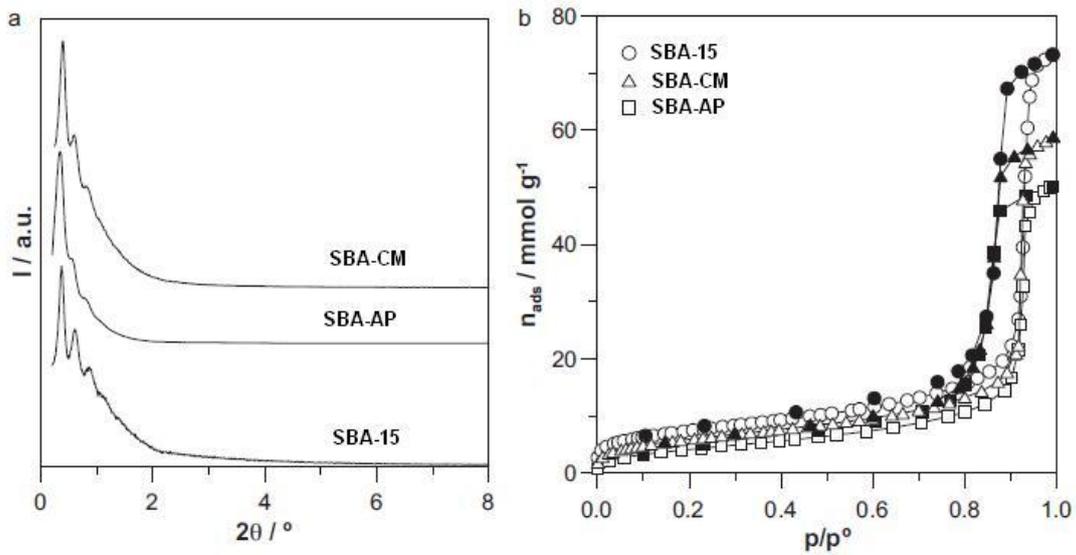


Fig. 5-18 (a)X-ray diffraction pattern ; (b)氮氣等溫吸脫附曲線。

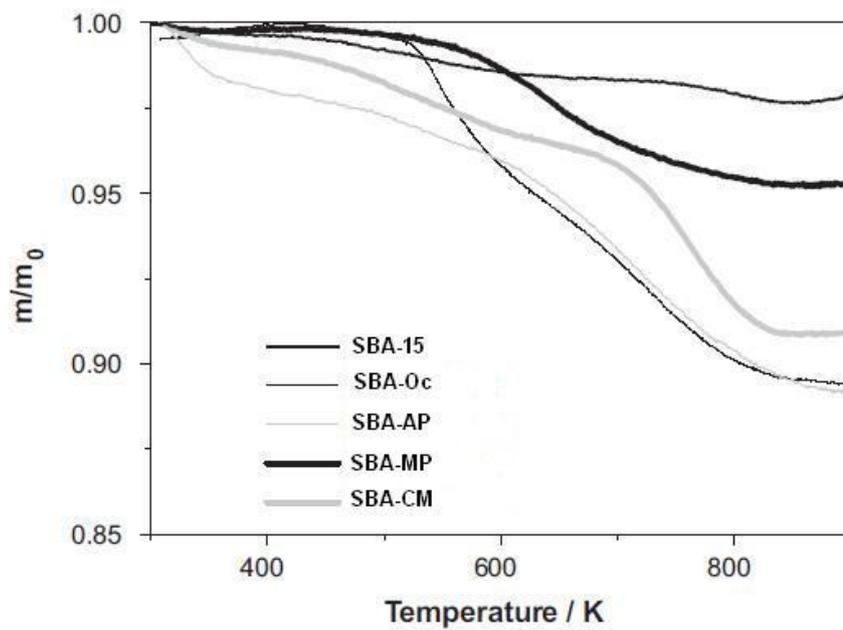


Fig. 5-19 修飾之 SBA-15 的熱重分析圖(TGA)。

5-4.2 修飾之 SBA-15 在不同 pH 環境下對蛋白質的包覆效果

這個部分進行的蛋白質包覆與 5-2.1 的實驗步驟一樣，選擇兩種性質差異很大的蛋白質 BSA 與 Lysozyme，並且在五種不同的 pH 環境 (pH 5.8、pH 6.4、pH 7.0、pH 7.4 及 pH 8.0) 中進行包覆 6 小時，不同的是這裡將使用修飾之 SBA-15 作為載體，用 SBA-CM、SBA-0c 及 SBA-AP 分別對 BSA 與 Lysozyme 進行包覆，並探討其包覆效果。由於在 5-4.1 的研究中，發現 CMTS、OcTS 與 APTS 等基團會受到高溫而裂解，這個溫度與其所包覆的蛋白質之熱裂解溫度相近，因此在 TGA 中無法準確的判斷其是否為蛋白質或是官能基團，所以在這將利用 UV/Vis 光譜儀來進行包覆量的檢測，測其包覆後之上清液中蛋白質的殘留量進而推斷 SBA-15 中的蛋白質包覆量。

包覆時使用之蛋白質的量並不會無故減少，只會殘留在溶液當中或是包覆於 SBA-15 上，所以溶液中的蛋白質含量與 SBA-15 上包覆蛋白質的量之和應該等於配置蛋白質溶液時用的蛋白質量。因此，這裡將利用測量上清液中蛋白質的含量來推算出 SBA-15 對蛋白質的包覆量，並且將其記錄成 Table. 5-10 與 Table. 5-11，其中 Table. 5-10 為修飾之 SBA-15 對 BSA 的包覆效果，並與未修飾之 SBA-15 比較；而 Table. 5-11 則是對 Lysozyme 的包覆效果，也同時比較修飾與未修飾之 SBA-15 的包覆情形。

可以清楚地從表中得知，經過修飾的 SBA-15，其最大的蛋白質包覆量比未修飾之 SBA-15 的蛋白質包覆量還高，修飾之 SBA-15 對蛋白質的包覆有很明顯的提升。BSA 的包覆量在 SBA-15 修飾之後大幅提高，從未修飾時的 57.2 mg/g 提升到 111.934 mg/g，Lysozyme 也從 225.5 mg/g 提升到 233.729 mg/g；其中可以明顯的看出 BSA 在包覆量上面有明顯的優化，包覆量最大約有一倍的提高。在不同官能基團修飾之 SBA-15 的表現上，對 BSA 的包覆效果 SBA-CM 最佳，SBA-0c 則是其次，而 SBA-AP 最差；剛好跟 Lysozyme 相反，SBA-CM 最差，SBA-0c 其次，SBA-AP 則是最佳。

除了不同官能基團會加強對不同蛋白質的包覆效果，各官能基團也會因為包覆環境之 pH 改變而在包覆率上明顯的反映出來，跟 5-2.1 研究中所探討的結果一樣，隨著環境 pH 的改變，BSA 與 Lysozyme 的包覆量變化之趨勢皆與前面的研究結果相符合，pH 越低，BSA 的包覆效果越好，pH 越高，Lysozyme 的包覆效果越好。為了能夠更進一步的了解其中與環境 pH 的關係，這裡也會進行 Zeta 電位分析，探討用來修飾之各種官能基團是否也會受到電位的影響其靜電作用力。

Table. 5-10 修飾之 SBA-15 對 BSA 包覆效果。

pH	5.8	6.4	7.0	7.4	8.0
SBA-15	57.20	53.29	49.81	50.8	40.55
SBA-CM	111.93	105.53	95.69	75.68	63.11
SBA-0c	88.48	79.12	125.06	72.96	71.11
SBA-AP	80.96	69.99	53.99	57.99	40.67

包覆量之單位為 mg/g

Table. 5-11 修飾之 SBA-15 對 Lysozyme 包覆效果。

pH	5.8	6.4	7.0	7.4	8.0
SBA-15	179.50	216.10	228.40	185.70	225.50
SBA-CM	143.78	156.17	177.46	186.59	195.71
SBA-0c	170.16	178.22	191.68	205.90	210.69
SBA-AP	190.69	198.75	206.36	228.71	233.73

包覆量之單位為 mg/g

利用 Zeta-potential 對修飾之 SBA-15 作電位分析，將其分析結果製成 Table. 5-12、5-13 與 Fig. 5-20。可以從中發現，即使經過官能基團修飾的 SBA-15，還是會受到 pH 的影響而改變其帶電荷，雖然修飾之 SBA-15 因為環境 pH 的影響而改變其電荷，進而影響到與蛋白質之間的靜電作用力，並且探討其中各官能基團對不同蛋白質之包覆效果造成的影響。

從 Table. 5-12 的電位差並與包覆量對照來看，包覆效果受到其靜電作用的影響並不強烈，在這裡面推測是修飾之 SBA-15 在對蛋白質包覆因為官能基團的不同而提供了另一個化學作用力使其能夠更有效的結合。不同官能基團對不同的蛋白質能加強其之間的化學作用力，在這裡可以觀察到其中 CMTS 能對 BSA 產生有效的化學鍵結而提升 SBA-CM 對 BSA 的包覆量，APTS 則能使 SBA-AP 對 Lysozyme 的包覆效果提高。由 Table. 5-13 這其中還是會受到靜電作用的關係，因此 BSA 在 pH 5.8 時的環境中排斥作用最小而能得到最有效的包覆效果，而 Lysozyme 在 pH 8.0 時的吸引力最大而使其包覆效果最好。

綜合上述之結果，對 SBA-15 粒子上的官能基團進行改質來提升其對蛋白質藥物的包覆效果是可行的，不過各蛋白質適合的官能基團不同，這需要進一步的研究才能知道蛋白質藥物適合之官能基團，本研究中 CMTS 適合 BSA，APTS 適合 Lysozyme，OcTS 則是對其兩者的包

覆效果沒有太大的影響。適合的官能基團能夠加強其對蛋白質的吸附作用，同時也考量其中因為包覆環境之 pH 不同而對靜電作用力的影響，選擇蛋白質適合的 pH 環境更能使包覆效果有效的提升。在蛋白質藥物的包覆上可以經由 SBA-15 粒子的修飾而有效的提升，能夠使其在藥物控制釋放系統中更能有效的應用，同時減少蛋白質藥物的浪費而提高其價值。



Table. 5-12 蛋白質與修飾之 SBA-15 於各 pH 的帶電關係。

pH	5.8	6.4	7.0	7.4	8.0
SBA-15	-13.20	-18.80	-19.90	-22.40	-25.00
SBA-CM	-23.40	-28.20	-29.60	-31.10	-32.90
SBA-0c	-16.90	-19.40	-25.20	-28.90	-31.80
SBA-AP	8.50	6.00	2.40	0.80	-12.80
BSA	-5.31	-6.10	-6.88	-8.14	-12.10
Lysozyme	11.10	8.52	6.50	6.00	5.56

Table. 5-13 蛋白質與修飾之 SBA-15 間的電位差。

pH	5.8	6.4	7.0	7.4	8.0
$\Delta Z_{\text{SBA-CM-BSA}}$	-18.09	-22.10	-22.72	-22.96	-20.80
$\Delta Z_{\text{SBA-0c-BSA}}$	-11.59	-13.30	-18.32	-20.76	-19.70
$\Delta Z_{\text{SBA-AP-BSA}}$	13.81	12.10	9.28	8.94	-0.70
$\Delta Z_{\text{SBA-CM-Lys}}$	12.30	19.68	23.10	25.10	27.34
$\Delta Z_{\text{SBA-0c-Lys}}$	5.80	10.88	18.70	22.90	37.36
$\Delta Z_{\text{SBA-AP-Lys}}$	2.60	2.52	4.10	5.20	18.36

ΔZ 為正值表示彼此間吸引，負值表示彼此間排斥

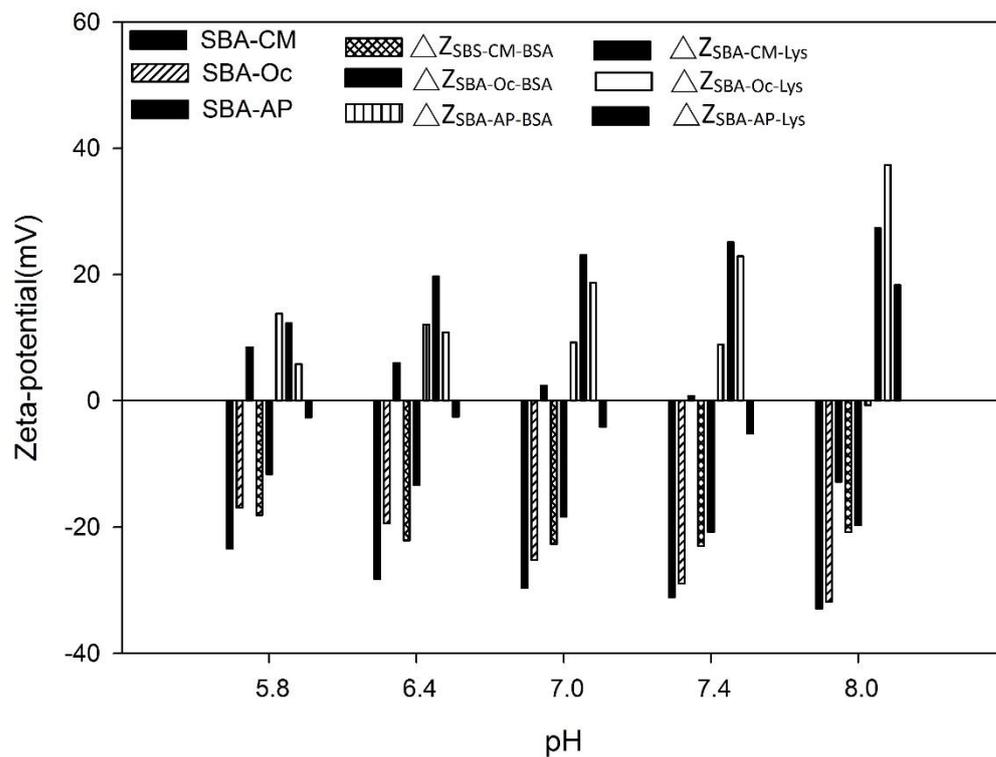


Fig. 5-20 修飾之 SBA-15 與蛋白質在不同 pH 環境下之 Zeta 電位測

試。



5-4.3 修飾之 SBA-15 包覆蛋白質後之釋放效果

藥物控制釋放系統中，除了蛋白質的包覆以外，最重要的就是釋放的效果，使蛋白質藥物能在患部中充分且緩慢的釋放，因此，在這個部分將探討修飾之 SBA-15 包覆 BSA 後的釋放效果，不同官能基團 (CMTS、OcT 與 APTS) 在不同 pH(6.4、7.4 與 8.0) 中的蛋白質釋放效果。

由 Fig. 5-21、5-22 與 5-23 中可以觀察到，經過修飾之 SBA-15 包覆 BSA 在釋放效果的表現上並沒有像未修飾之 SBA-15 能達到 95% 的釋放量，反而是 SBA-AP 在 BSA 的釋放上達到 90%，推估是因為 SBA-AP 並不能與 BSA 之間產生強力的作用力而有效的結合，而在 pH 8.0 的環境下又增加了 SBA-AP 與 BSA 之間的排斥作用力，才導致 SBA-AP 的釋放效果最佳，不過在考慮包覆量的前提下，在藥物控制釋放系統中並不希望低包覆率的 SBA-AP 來進行 BSA 的包覆與釋放。

因此，同時考慮好的包覆量又有良好的釋放效果來看，SBA-0c 來進行 BSA 的包覆與釋放是個不錯的選擇，因為經過官能基團修飾之 SBA-15 加強的其與 BSA 之間的鍵結能力，因此在釋放的時候解決了未修飾之 SBA-15 在釋放 BSA 時過快的釋放速率，SBA-0c 能夠在釋放 BSA 的效果上有緩釋現象而達到藥物控制的目的。另外，考慮包覆 BSA 有最佳表現的 SBA-CM 在進時釋放的情況，在這裡將 SBA-CM 的釋放情

況繪製成 Fig. 5-24，圖中可以清楚的看到 SBA-CM 在各種 pH 環境的釋放情形，在較低 pH 的環境中釋放效果並不理想，pH 7.0 與 6.4 時，最大的釋放量連 40 % 都不到，不過在 pH 8.0 的環境中釋放量則有 80 %，推測其中原因是因為 SBA-CM 本身就與 BSA 產生了強力的化學作用力，而在較低的 pH 環境中其之間的靜電作用力又較強，造成了釋放效果不佳的情況；當釋放環境為 pH 8.0 的時候，因為排斥力的增強，使其之間的靜電作用減弱，才讓 BSA 能夠有效的釋放出來，若釋放環境在 pH 8.0 時，選用 SBA-CM 當載體是可行的。

在藥物釋放的效果中，為了達到有效的控制效果，使蛋白質藥物能在患部長時間的維持在有效濃度，對其釋放速度的控制就是主要的研究目標，而在這部分的實驗中發現了經過修飾的 SBA-15 在對 BSA 這種結合作用力偏弱而釋放速度過快的蛋白質藥物上，能夠有效的改善其包覆與釋放效果，不但能提高蛋白質的包覆量，同時也能在釋放時有緩釋的效果。針對目標蛋白質藥物來選擇載體是否需要修飾，以及蛋白質的包覆與釋放條件來達到最佳的效果是很重要的一環，也值得在未來能更深入的研究與探討。

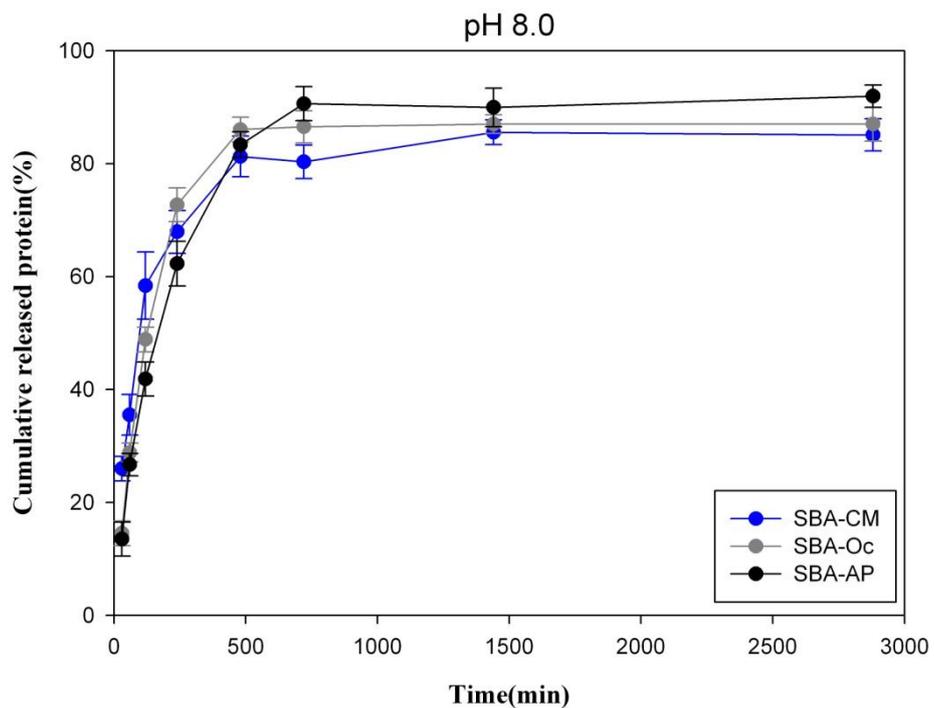


Fig. 5-21 修飾之 SBA-15 包覆 BSA 於 pH 8.0 中釋放情形。

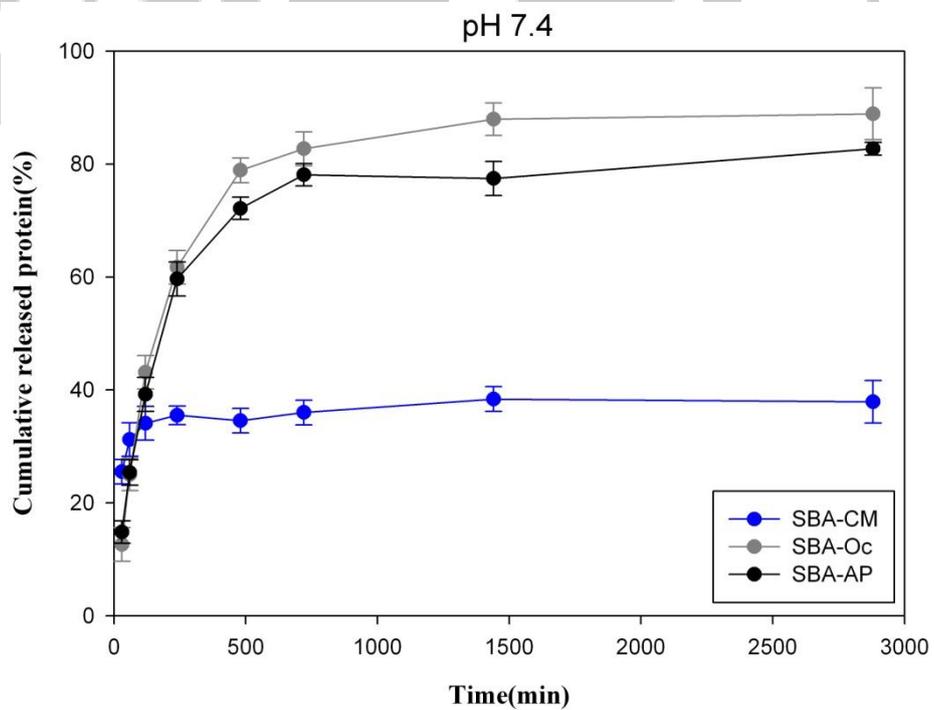


Fig. 5-22 修飾之 SBA-15 包覆 BSA 於 pH 7.4 中釋放情形。

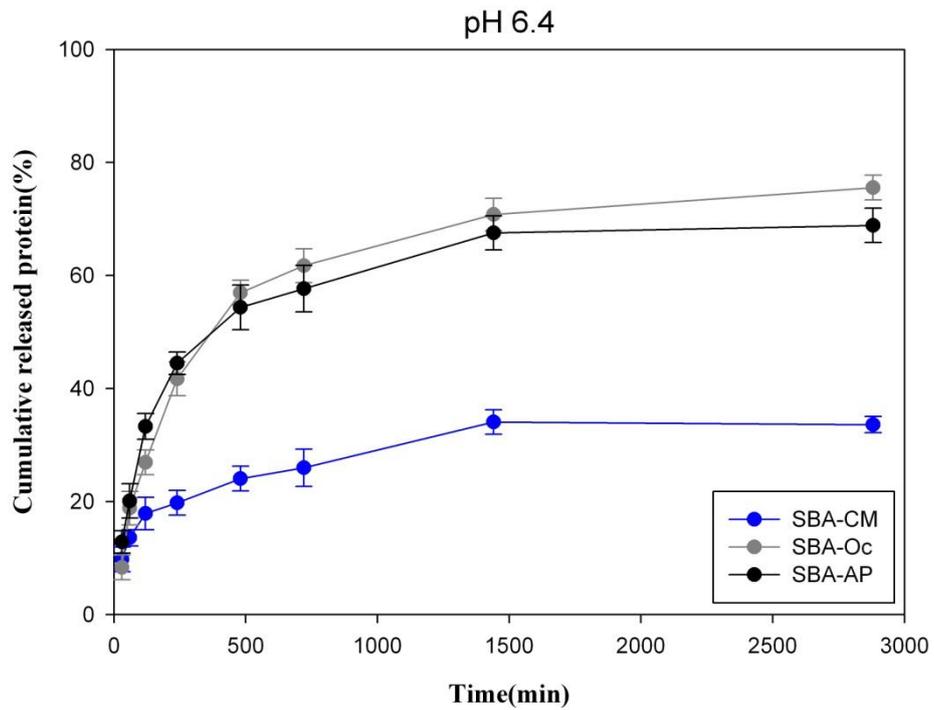


Fig. 5-23 修飾之 SBA-15 包覆 BSA 於 pH 6.4 中釋放情形。

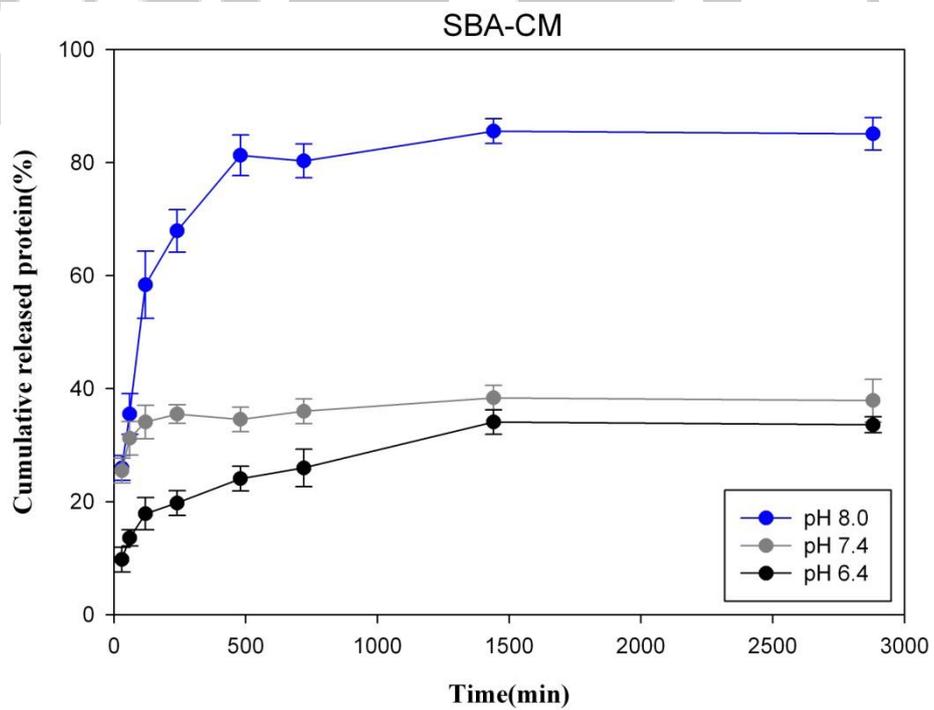


Fig. 5-24 SBA-CM 包覆 BSA 於各 pH 環境中的釋放情形。

5-5 辣椒素(Capsaicin)的包覆與其白老鼠動物試驗

各項研究中發現，辣椒素具有許多醫療上的效果，常見的有消炎、止痛與舒緩肌肉痠痛，也能夠有效的降低血壓和膽固醇，因此在治療心臟病方面也有很好的效果。更有其他的研究在動物試驗中發現，辣椒素具有促進肌肉生長、抑制肌肉萎縮的作用，這項發現有助於治療肌肉萎縮之藥物的發展。本研究也與台中榮總醫院合作，將辣椒素包覆於 SBA-15 中，並且交由院方進行白老鼠之試驗。研究是針對膀胱萎縮而導致頻尿的患者，主要是利用辣椒素能抑制肌肉萎縮的功能來達到治療膀胱萎縮的問題。

本研究中將著重於辣椒素的包覆與釋放的測試，由於辣椒素有斥水親脂的特性，先前進行蛋白質包覆之緩衝溶液無法溶解辣椒素，基於生物相容性的考量，在這裡選擇改用 99.8 %的乙醇(酒精)，乙醇能夠有效地溶解辣椒素，並且在包覆完成後容易去除乾淨，不殘留於 SBA-15 中。Fig. 5-25 辣椒素於乙醇中進行不同時間的包覆結果中可以清楚的觀察到其包覆效果，最高的包覆量為 48.5 mg/g，雖然量並不多，但是考量到辣椒素的刺激性相當強大，而且過量的辣椒素會有致命的危險，人體在吸入過量的辣椒素會造成呼吸困難、藍皮膚甚至抽蓄等症狀，兒童的攝取量比成年人少，因此微量的包覆會比較有利於在動物試驗之中劑量的調整。

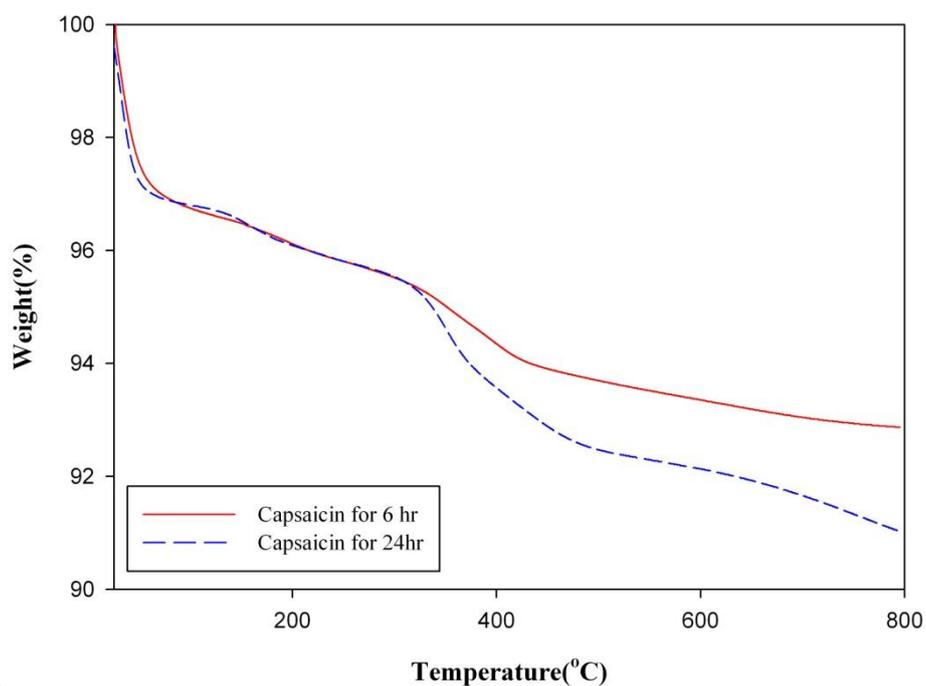


Fig. 5-25 辣椒素於乙醇中進行不同時間包覆之 TGA 圖。

Table. 5-14 辣椒素於乙醇中之包覆結果。

包覆時間(hr)	6	24
辣椒素熱重損失(%)	3.88	4.48
水熱重損失(%)	3.25	3.20
包覆率(%)	4.18	4.85
包覆量(mg/g)	41.80	48.50

而在釋放方面，由於是用於膀胱之藥物，因此選擇與正常尿液接近之 pH 環境(pH 6.0)中進行釋放，正常尿液為弱酸性，其 pH 約為 6.0，不過範圍在 4.5~8.0 都算是正常值，由 Fig. 5-26 可以觀察到辣椒素的釋放非常緩慢且微量，這可以避免因為突釋而瞬間造成攝取量超標而產生負面效果，只要在患部滯留的時間夠，確實是可以使藥物長時間的維持在有效濃度而達到藥物控制的效果。

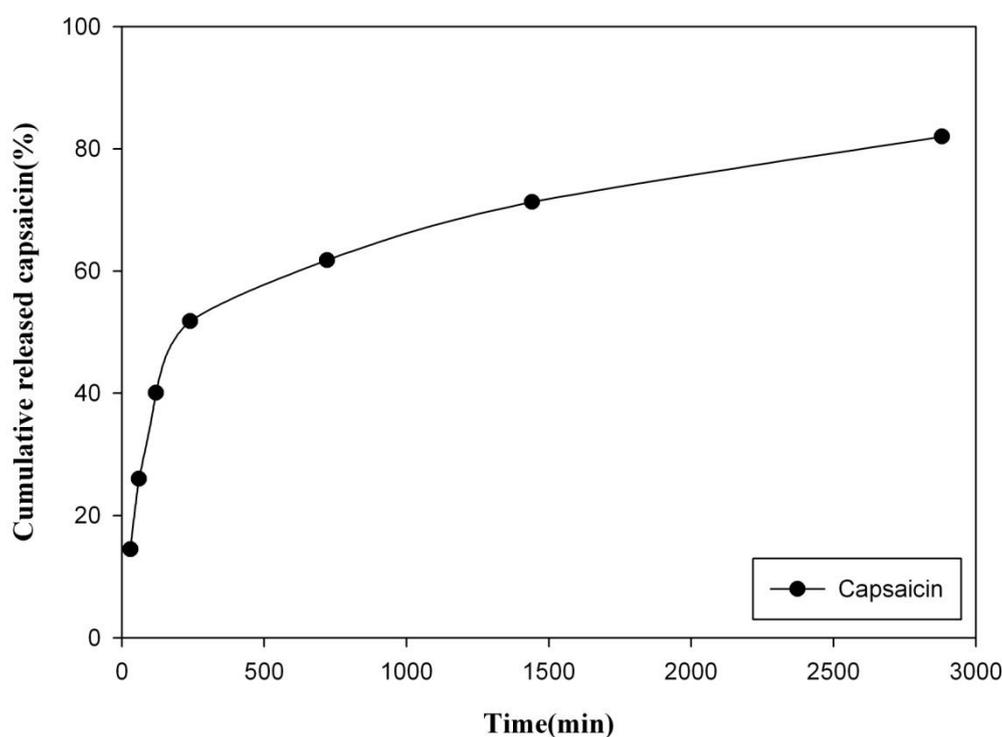


Fig. 5-26 辣椒素之釋放曲線圖。

另外，在動物試驗方面交由榮總醫院進行，受測的白老鼠其症狀有明顯的改善，這再次證明利用 SBA-15 作為載體來進行藥物釋放控制是可行的。受測的老鼠沒有死亡，也沒有因為注入 SBA-15 而產生異變，這可以說明了研究中所製備的 SBA-15 之生物相容性相當良好，而且在生物體當中確實能夠釋放出蛋白質藥物來對患部進行治療，並且在老鼠體內觀察到有長時間的藥物濃度維持。不過由於是用於膀胱的治療，因此在 SBA-15 的滯留時間會受到尿液排泄的影響，造成 SBA-15 無法長時間的滯留於患部內持續釋放藥物。

綜合上述結果，可以得知利用 SBA-15 來進行蛋白質藥物的包覆並且用於老鼠試驗之中相當成功，這證明了 SBA-15 對其他蛋白質藥物的包覆是可行的，而且在藥物釋放控制系統之中是能夠有效的達到其治療的效果。

第六章 結論與建議

6-1 分散性良好之球形 SBA-15 的製備條件結論

根據各項實驗之結果，SBA-15 之形貌最主要是依據三嵌段高分子 P123 在溶液中形成之微胞型態來決定其合成形貌，而鹽酸濃度、TMB 濃度以及合成中是否攪拌都會影響 P123 形成微胞的型態，綜合各實驗結果並整理出最佳分散性之球形 SBA-15 的製備條件。

就微胞而言，鹽酸的濃度會改變溶液中的離子強度，進而影響三嵌段高分子 P123 之親水鏈段 PEO 質子化的程度與疏水鏈段 PPO 去溶劑化的程度，隨著鹽酸濃度的增加，P123 的親疏水鏈段 (PEO、PPO) 會因上述的影響而改變親疏水鏈段之間的作用力，導致形成微胞的驅動力增加，並且因為離子強度提高而使後續添加的擴孔劑 TMB 能充分均勻的進入微胞中心，因此可以得到結構穩定且分散性良好的球型 SBA-15 粒子，但若鹽酸濃度過高 (3 M) 會造成加入 TEOS 後縮合聚合濃度過快，使聚合中的 S 粒子容易因為碰撞而產生聚集，導致合成之 SBA-15 會有嚴重的團聚現象。

另外，TMB 也能夠調整 SBA-15 的孔徑大小，以利往後能針對大型蛋白質藥物做調整。不過在 TMB 添加的濃度除了會影響孔徑，也會影響 SBA-15 粒子的成型。TMB 進入微胞中心的均勻度、分散性以及

是否充分，都會影響到微胞型態的均一性，會導致合成出不同型態的 SBA-15。TMB 進入微胞中心的程度主要是受到鹽酸濃度的影響，添加的濃度也是關鍵之一，研究中發現當 TMB 濃度過低(3 mmol)會無法形成完整球形的 SBA-15，當添加的量達到能充分且均勻的進入每一個微胞中心時，就能合成出球形 SBA-15 粒子。

上述所討論的各種條件，都是合成分散性良好的球形 SBA-15 的重要條件，最主要是因為 P123 形成之微胞型態的影響。由於 SBA-15 的合成是基於 P123 形成之微胞，並且在其堆積後藉由 TEOS 所提供的 Si 源依附在微胞上經過縮合和反應後合成之。研究結果證明了微胞型態的差異是影響 SBA-15 之形貌的重要因素，而經由上述結果可以得知，製備分散性良好之球形 SBA-15 的條件需要在 2 M 的鹽酸濃度、足夠的 TMB 濃度以及在加入 TEOS 縮合聚合時靜置反應，並且合成之 SBA-15 粒子大小分布在 2~4 μm 。

6-2 SBA-15 對蛋白質的包覆與釋放之結論

經由前面之結論所合成分散性良好之球形 SBA-15，其等電點約為 2~4，因此在研究的 pH 緩衝溶液中皆帶負電，而與其進行包覆之蛋白質 BSA 帶負電(pI 4.7)、Lysozyme 帶正電(pI 11)。根據研究結果可以得知，載體與蛋白質之間會受到其帶電性的影響，其之間靜電作用力會影響到蛋白質的包覆效果。SBA-15 與 BSA 帶有同性的電荷(皆是負電)，因此隨著 pH 的改變，其之間的帶電量會因為 pI 值的關係，當 pH 增加(5.8→8.0)使其遠離等電點時，兩者的帶電量會提高，導致其之間的排斥力增加而使包覆量降低；Lysozyme 則是與 SBA-15 帶著異性電，因為兩者之間靜電作用力較強的關係而包覆效果最佳。因此，在針對目標蛋白質選擇最適的 pH 環境，可以利用 Zeta 電位分析來測其在該 pH 中與載體所帶的電荷來做為篩選條件。

另外在釋放方面，也會因為載體與蛋白質之間的靜電作用的關係，而影響其釋放速度。BSA 與 SBA-15 之間因為帶同性電的關係，彼此之間存在排斥力，使其釋放速度過快，500 分鐘釋放量以達到 95%；Lysozyme 與 SBA-15 之間帶有異性電，使其之間因靜電作用吸引力較強，在釋放的時候有觀察到緩釋現象的產生，在 1440 分鐘釋放量才達到 95%。

6-3 SBA-15 的修飾以及其包覆與釋放之結果

研究結果顯示，SBA-15 的修飾可以經由各式的檢測來證明其有成功的將不同的官能基團修飾。而研究結果也證明，修飾之 SBA-15 在蛋白質的包覆上有明顯的改善，修飾之 SBA-15 的官能基團會與蛋白質之間除了靜電作用外還有其他的作用力，如凡得瓦力、氫鍵及親疏水性等作用力，使 SBA-15 與蛋白質能夠有效的結合。這可以明顯的在包覆 BSA 上看到，由於 BSA 原本與 SBA-15 之間存在排斥力而導致包覆效果不佳，經過修飾之 SBA-15 能與 BSA 有效的結合，其中包覆效果 $CM > AP$ 。Lysozyme 本身就與 SBA-15 很有效的包覆，因此在修飾之 SBA-15 的包覆上面雖然有提高包覆效果，但是並沒有像 BSA 那樣特別突出的表現，包覆效果 $AP > CM$ 。

在釋放方面，針對與載體之間帶有排斥力而釋放速度過快的 BSA 進行研究，結果顯示其因為與修飾之 SBA-15 之間產生了其他的作用力，如凡得瓦力、氫鍵及親疏水性等作用力而有效的鍵結，造成其釋放不易，尤其是 SBA-CM，不過其在 pH 8.0 的環境中卻因為靜電作用的關係排斥力增加，使其能夠有效且緩慢的釋放。因此，將修飾之 SBA-15 用於藥物控制釋放系統當中，利用 pH 的改變來調整其之間的靜電作用力進而調整到蛋白質的釋放效果是值得深入探討的。

綜合研究結果，可以知道對 SBA-15 表面官能基團的修飾不只能夠優化其在包覆上面的表現，還可以讓釋放能夠達到緩釋的效果，進而達到藥物控制的目的。另外也發現一個結果，蛋白質藥物在釋放時可以針對其靜電作用的關係選擇適合的釋放環境(pH)來達到有效釋放的結果。



6-4 SBA-15 包覆辣椒素進行動物試驗之結論

經由實驗結果可以證明，SBA-15 在藥物控制釋放系統當中的應用是可行的，SBA-15 對其他非蛋白質藥物的包覆與釋放之效果都有良好的表現，而且能對其進行修飾來優化其包覆與釋放效果，並且在白老鼠動物試驗之中能夠有效的治療患部，這都充分證明了 SBA-15 在藥物控制釋放系統之中的應用是可行的。

由於這次只是初步的動物體試驗，而且注入於膀胱內會因為排泄而影響到其滯留時間，因此無法觀察到是否能夠有效的改善患者用藥的便利性，希望未來能更深入的研究 SBA-15 在生物體當中的是否能夠有充分的時間來進行釋放的動作，並且在動物試驗之中能夠有很好的展現。

6-5 未來建議

研究中以經探討各種製備 SBA-15 的條件，並合成出分散性良好的球形 SBA-15，並且在蛋白質的包覆與釋放方面也有著墨，也有很好的研究結果；另外對 SBA-15 也有初步的表面官能基團修飾，修飾之 SBA-15 也改善了原本 BSA 包覆效果不好、釋放速度過快的情況。

在藥物釋放控制系統的應用方面，未來可以更深入的研究其他不同官能基團的修飾，針對不同的蛋白質藥物進行優化的動作，若是想包覆低等電點的蛋白質，如 BSA，可以像研究中提到的進行氨基(CMTS)的修飾；若是針對非水溶性蛋白質則可以將表面改質成疏水性的基團，如硫醇基、苯環。利用本研究所製備的大孔徑之 SBA-15 來進行修飾，可以避免因為修飾造成的孔徑縮小導致大分子藥物不易進入的情況。

另外，SBA-15 也可以與奈米鐵進行結合，使球形 SBA-15 能藉由磁性控制來達到標把給藥的效果。除了藥物控制釋放方面，做為載體的 SBA-15 還可以有很多方面的應用，包覆 HRP、做為分子篩、做為層析的固定相等等，都是在未來可以多加研究的方向。

參考文獻

- Arruebo, M.; Galan, M.; Navascues, N.; Tlelez, C.; Marquina, C.; Ibarra, M. R.; Santamaría, J. (2006). Development of Magnetic Nanostructured Silica-Based Materials as Potential Vectors for Drug-Delivery Applications. *Chemistry of Materials*, 18(7), pp. 1911-1919.
- Che, S.; Sakamoto, Y.; Terasaki, O.; Tatsumi, T. (2005). The structure and morphology control of mesoporous silica under acidic conditions. *Microporous and Mesoporous Materials*, 85(3), pp. 207-218.
- Desbaumes, L; Eisenberg, A. (1998). Single-Solvent Preparation of Crew-Cut Aggregates of Various Morphologies from an Amphiphilic Diblock Copolymer. *Langmuir*, 15(1), pp. 36-38.
- Gebhart, C. L.; Kabanov, A. V. (2001). Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *Journal of Controlled Release*, 73(2-3), pp. 401-416.
- Hann-Chorng Kuo;. (1994). *Treatment of Hypersensitive Bladder and Interstitial Cystitis by Intravesical Instillation of Capsaicin*. (Vol. 6). Tzu-Chi Med.
- Harvey, R. A. (2002). 簡明圖解藥理學. 藝軒圖書出版社.
- Hudson, S. P.; Padera, R. F.; Langer, R.; Kohane, D. S. (2008). The biocompatibility of mesoporous silicates. *Biomaterials*, 29(30), pp. 4045-4055.
- Izquierdo-Barba, I.; etc. (2009). Influence of mesoporous structure type on the controlled delivery of drugs: release of ibuprofen from MCM-48, SBA-15 and functionalized SBA-15. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 50(3), pp. 421-429.
- Kim, J. M.; Sakamoto, Y.; Hwang, Y. K.; Kwon, Y.-U.; Terasaki, O.; Park, S.-E.; Stucky, G. D. (2002). Structural Design of Mesoporous Silica by Micelle-Packing Control Using Blends of Amphiphilic Block Copolymers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(10), pp. 2552-2558.

- Kortesuo, P.; Ahola, M.; Karlsson, S.; Kangasniemi, I.; Yli-Urpo, A.; Kiesvaara, J. (2000). Silica xerogel as an implantable carrier for controlled drug delivery--evaluation of drug distribution and tissue effects after implantation. *Biomaterials*, 21(2), pp. 193-198.
- Lee, H. I.; Kim, J. H.; Stucky, G. D.; Shi, Y.; Pak, C.; Kim, J. M. (2010). Morphology-selective synthesis of mesoporous SBA-15 particles over micrometer, submicrometer and nanometer scales. *Journal of Materials Chemistry*, 20(39), pp. 8483-8487.
- Lettow, J. S.; Han, Y. J.; Schmidt-Winkel, P.; Yang, P.; Zhao, D.; Stucky, G. D.; Ying, J. Y. (2000). Hexagonal to Mesocellular Foam Phase Transition in Polymer-Templated Mesoporous Silicas. *Langmuir*, 16(22), pp. 8291-8295.
- Lim Soo, P.; Luo, L.; Maysinger, D.; Eisenberg, A. (2002). Incorporation and Release of Hydrophobic Probes in Biocompatible Polycaprolactone-block-poly(ethylene oxide) Micelles: Implications for Drug Delivery. *Langmuir*, 18(25), pp. 9996-10004.
- María, V.-R.; Francisco, B.; Daniel, A. (2007). Mesoporous Materials for Drug Delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(40), pp. 7548-7558.
- Michal Moritz; Marek Laniecki. (2012). SBA-15 mesoporous material modified with APTES as the carrier for 2-(3-benzoylphenyl)propionic acid. *Applied Surface Science*, 258, pp. 7523-7529.
- Neal, M. J. (2003). 藥理學精義. 藝軒圖書出版社.
- Nguyen, T. P. B.; Lee, J.-W.; Shim, W. G.; Moon, H. (2008). Synthesis of functionalized SBA-15 with ordered large pore size and its adsorption properties of BSA. *Microporous and Mesoporous Materials*, 110(2-3), pp. 560-569.
- P.A. Russo; M.M.L. Ribeiro Carrott; P.A.M. Mourao; P.J.M. Carrott. (2011). Tailoring the surface chemistry of mesocellular foams for protein adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochem*, 386, pp. 25-35.

- Park, H.; Park, K. (1996). Biocompatibility Issues of Implantable Drug Delivery Systems. *Pharmaceutical Research*, 13(12), pp. 1770-1776.
- Shen, H; Eisenberg, A. (1999). Morphological Phase Diagram for a Ternary System of Block Copolymer PS310-b-PAA52/Dioxane/H₂O. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(44), pp. 9473-9487.
- Soler-Illia, G. J. d. A. A.; Crepaldi, E. L.; Grosso, D.; Sanchez, C. (2003). Block copolymer-templated mesoporous oxides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8(1), pp. 109-126.
- Song, S. W.; Zhong, S. P.; Hidajat, K.; kawi, s.; Dongyuan Zhao, S. Q. Y. T.; Chengzhong, Y. (2007). Effect of surface functional groups on adsorption and release of bovine serum albumin on SBA-15. *In Studies in Surface Science and Catalysis, Elsevier.*, 165, pp. 471-474.
- Temenoff, J. S.; Mikos, A. G. (2008). Biomaterials The Intersection of Biology and Materials. *Science Prentice Hall*.
- Vallet-Regi, M.; Ramila, A.; del Real, R. P.; Perez-Pariente, J. (2000). A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials*, 13(2), pp. 308-311.
- Vallet-Regi, M.; Balas, F.; Colilla, M.; Manzano, M. (2007). Bioceramics and pharmaceuticals: A remarkable synergy. *Solid State Sciences*, 9(9), pp. 768-776.
- Wang, H.; Wang, H. H.; Urban, V. S.; Littrell, K. C.; Thiyagarajan, P.; Yu, L. (2000). Syntheses of Amphiphilic Diblock Copolymers Containing a Conjugated Block and Their Self-Assembling Properties. *Journal of the American Chemical Society*, 122(29), pp. 6855-6561.
- Yiu, H. H. P.; etc. (2001). Enzyme immobilisation using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 15(1-3), pp. 81-92.
- Zhang, L; Eisenberg, A. (1995). Multiple Morphologies of "Crew-Cut" Aggregates of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Block Copolymers. *Science(New York, N.Y.)*, 268(5218), pp. 1728-1731.

Zhao, D.; Feng, J.; Huo, Q.; Melosh, N.; Fredrickson, G. H.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. (1998). Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science*, 279(5350), p. 548.

王大維. (2005). 全球仿效藥發展現況與未來切入策略探討. 工業技術研究院 產業經濟與資訊服務中心.

汪信; 劉孝恆. (2006). 奈米材料化學. 五南圖書出版股份有限公司, 頁 241-243.

張俐; 吳媽艷. (2007). HPLC 法測定辣椒浸出液中辣椒素的含量. 15(2), 頁 158-160.

郭華良; 顧野松. (2011). 探討影響製備分散性佳之球型 SBA-15 之因素及其於蛋白質藥物釋放系統之應用. 東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論文.

陳中天; 張天鴻. (1989). 藥物控制釋放劑型與市場分析. 生物技術開發中心.

曾念國. (2003). 全球奈米藥物產業現況與發展趨勢. 經濟部.