

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 從魷魚軟骨製備幾丁聚醣智慧型水膠與其在藥物控制釋放 上的應用(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-032-002-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：淡江大學化學工程與材料工程學系

計畫主持人：董崇民

共同主持人：周秀慧

計畫參與人員：岑翰儒，方裕榮，鍾政裕，余虹德

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 25 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告

## 從魷魚軟骨製備幾丁聚醣智慧型水膠與其在藥物控制釋放上的應用(I)

### The Synthesis and Characterization of Chitosan Smart Hydrogel from Squid Pen and It's applications in Controlled Drug Release (I)

計畫編號：NSC- 93-2313-B-032-002-

執行期限：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

主持人：董崇民 副教授 淡江大學化材系

#### 一、中文摘要

本研究以幾丁聚醣為材料，以甲酸為溶劑，進行均相的化學反應修飾，利用馬來酸酐與幾丁聚醣的胺基反應，控制酸酐的比例及反應時間以獲得不同取代度的產物，結果顯示於室溫反應下，幾丁聚醣確實與馬來酸酐有化學反應，且隨著酸酐量的增加而有轉化率增加的趨勢；再加入光起始劑與不同比例的 N-異丙基丙烯醯胺單體，利用 UV 光聚合得到幾丁聚醣接枝聚氮-異丙基丙烯醯胺的薄膜。由於反應後產物共同擁有胺基及羧基，亦擁有聚氮-異丙基丙烯醯胺的溫度敏感性質，因此可藉由控制反應量的不同，令其擁有不同的 pH 值及溫度敏感性。針對產物作結構分析、熱分析性質測試。

關鍵字：幾丁聚醣、馬來酸酐、聚氮-異丙基丙烯醯胺

#### Abstract

Graft copolymers of chitosan (CS) and poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) were successfully synthesized through a two-step reaction. Chitosan was first modified with maleic anhydride in formic acid through the reaction of amino group with anhydride, thus having vinyl groups. In the second step, PNIPAAm was grafted onto CS via this vinyl groups initiated by UV radiation. The structures of graft copolymers were confirmed by FTIR and NMR analysis. The grafting efficiency increased with the added amount of NIPAAm monomer and reached a plateau value about 55%. In the

mean time, grafting ratio increased linearly with the added amount of NIPAAm. A two-stage thermal degradation behavior was observed for the copolymer samples, which confirmed the structure of graft copolymers.

Keywords: chitosan、maleic anhydride、Poly(N-isopropylacrylamide)

#### 二、緣由與目的

幾丁質在自然界是僅次於纖維素的豐富有機物質，廣泛的存在於無脊椎動物如蝦、蟹的外殼，昆蟲的硬殼及各種真菌的細胞壁中。若幾丁質經去乙醯作用可成為幾丁聚醣(CS)。幾丁質及幾丁聚醣具有多種特殊的功能性質，被開發成多方面的用途，更已經有很多於人工披覆膜的相關製程發展。又由於其擁有無毒性、良好的生物相容性、抗菌性、凝血性、生物可分解性及生物體內無排斥性，所以幾丁聚醣及其衍生物目前已經廣泛應用於醫療保健[1]、食品加工[2]、農業[3]、吸附金屬[4]、化妝品[5]、金屬抗蝕[6]等方面。針對此一特點，本研究先在幾丁聚醣上增加可利用的雙鍵，在盡量不影響其本身的特性下，增加其應用性。Poly N-isopropylacrylamide (PNIPAAm)為一感溫型高分子，溶於水時其相轉換溫度(Lower Critical Solution Temperature, LCST)約為 32 。當溫度低於 LCST 時高分子鏈與週遭的水分子以分子間氫鍵存在，呈柔軟狀可溶於水中；溫度高於 LCST 時則因分子內氫鍵及末端基疏水性作用，使分子鏈凝集而呈收縮相分離，利用此特性 PNIPAAm 有許多相關的應用[7]。近來亦有學者結合了幾丁聚醣與

PNIPAAm。研究各種性質與應用。Lee[8]利用乳化聚合法使用陰離子及陽離子型兩種起始劑將 CS 及 NIPAAm 共聚合形成複合的微粒，發現利用陰離子型起始劑所合成的微粒型態呈均勻相，但是利用陽離子型起始劑聚合的微粒型態則呈現核殼狀。Kim[9]利用  $Ce^{4+}$  離子與戊二醛合成 CS 與 PNIPAAm 的接枝與交聯共聚物，探討其 pH 及溫度的敏感性質，結果顯示在  $pH > 6$  和溫度  $> 30$  時，所有經過交聯的樣品膨潤度皆大幅下降，而在所有的 pH 值及溫度下，摻混的樣品膨潤度皆比接枝的樣品要大。Verestiuc[10] 利用 ammonium persulphate 和 sodium bisulphite 為起始劑，tetraethyleneglycoldiacrylate(TEGDA) 為交聯劑，利用自由基聚合 CS 及 PNIPAAm 的 semi-IPN 結構的共聚物，研究共聚物的相轉換行為和藥物(pilocarpine hydrochloride)的控制釋放。在 CS 比例較多和交聯密度較高的樣品中，相轉換溫度會較低。在藥物釋放方面，他初步認為在酸性條件下似乎是可行的。本研究則是先改質幾丁聚醣，令其擁有反應性雙鍵後，再與 NIPAAm 進行 UV 光聚合，形成幾丁聚醣接枝 PNIPAAm 的薄膜，探討樣品的性質並評估其細胞培養的生物相容性。

### 三、實驗方法

本研究第一部份係甲酸(formic acid)當溶劑，馬來酸酐(maleic anhydride)當作反應物，針對幾丁聚醣的胺基與酸酐反應進行研究。利用甲酸當溶劑除了將酸酐的水解降到最低以外，亦提高了幾丁聚醣的溶解度，第二部分則利用 UV 光聚合的方法將聚氮-異丙基丙烯醯胺與幾丁聚醣鏈上的雙鍵反應，得到幾丁聚醣接枝聚氮-異丙基丙烯醯胺的薄膜。期望得到擁有 pH 及溫度敏感特性的產物。

#### 幾丁聚醣去乙醯度的測定

由於本研究主要是利用幾丁聚醣的胺基與酸酐反應，與胺基的數量息息相關，因此先針對去乙醯度進行測定。利用 N-乙醯基葡萄糖胺在 203nm 紫外光吸收光譜的一次微分值和乙醯基葡萄糖胺濃度成正比之

特性來推算乙醯化程度。首先以 HCl 為溶劑，配製不同濃度的 N-乙醯基-D-葡萄糖胺標準溶液。利用紫外線光譜測其在 203nm 的一階導數值，作一階導數值對濃度的檢量線。之後再精秤樣品，同樣以 HCl 溶解，定容於定量瓶中，測其 203nm 波長下測量其一階導數值，代入檢量線算出 N-乙醯基的濃度。

#### 幾丁聚醣與馬來酸酐的反應

秤取幾丁聚醣 0.75g 與甲酸 30g，配置成 2.5%(w/w)的濃度，混合於 45ml 的樣品瓶中，利用旋轉混合，於室溫下充分溶解。再加入不同比例的馬來酸酐同樣於室溫下反應。待反應結束後，將其反應後的甲酸溶液倒入過量攪拌中的氫氧化鈉水溶液中，使其完全沉澱成一鹼性懸浮水溶液。最後將此懸浮溶液倒入透析袋中，透析後的產物加入大量丙酮中，置換水分，利用水流抽氣幫浦過濾、乾燥，即可得到馬來酸酐改質幾丁聚醣。

#### 取代度的測定

##### 秤重法

(1)馬來酸酐轉化率(Conversion, %)

$$X_{MA}(\%) = (\text{馬來酸酐取代重}/\text{加入的馬來酸酐重}) \times 100(\%)$$

(2)胺基轉化率(%)

$$X_{NH_2}(\%) = (\text{取代的馬來酸酐莫耳數}/\text{幾丁聚醣胺基莫耳數}) \times 100(\%)$$

(3)馬來酸酐取代度(Degree of substitution)

$$DS = (\text{取代的馬來酸酐莫耳數}/\text{幾丁聚醣環莫耳數})$$

#### 紫外光/可見光光譜測定

取 50mg 馬來酸(順丁烯二酸)溶於 HCl 中，再將其稀釋成不同濃度的標準溶液，以 190nm~300nm 掃描，取 210nm 吸收值強度作出吸收度對濃度的檢量線。精秤樣品 10mg，用 HCl 溶解，再用蒸餾水稀釋，作紫外線掃描光譜測出吸收值強度，代入檢量線中求出幾丁聚醣上之馬來酸濃度。

#### 聚氮-異丙基丙烯醯胺的接枝反應

將馬來酸取代幾丁聚醣之水溶液加入不同比例的氮-異丙基丙烯醯胺單體，並加

入光起始劑，充分攪拌均勻溶解後，倒入鐵氟龍盤中以 50 預烤 2 小時，再以 750mJ/cm<sup>2</sup> 的 UV 光能量照射 120 秒進行光聚合反應，將反應後的高分子溶液放入 50 烘箱中烘乾得到乾燥的薄膜，最後將此薄膜分別用 50 及 15 的熱水、冷水清洗，烘乾後得到最終產物。

### 接枝量的測定

- (1) 接枝效率 (Grafting efficiency, %)
 
$$= (\text{接枝 PNIPAAm 重} / \text{PNIPAAm 總重}) \times 100 (\%)$$
- (2) 接枝比值 (Grafting ratio)
 
$$= \text{接枝 PNIPAAm 重} / \text{改質幾丁聚醣重}$$
- (3) NIPAAm 轉化率 (Conversion, X %)
 
$$= (\text{PNIPAAm 總重} / \text{單體重}) \times 100 (\%)$$

### 結構鑑定

#### 傅氏紅外線吸收光譜 (FTIR)

掃描範圍 4000~400cm<sup>-1</sup>，掃描次數 32 次，解析度設定為 4cm<sup>-1</sup>。將烘乾後的馬來酸酐反應的樣品浸泡於 1N 鹽酸水溶液中，PNIPAAm 接枝的樣品則不需浸泡，將樣品置於烘箱中烘乾，再取部分樣品與 KBr 粉末充分混合，以瑪瑙研鉢磨細壓錠後，置於樣品座中進行穿透式掃描。

#### <sup>13</sup>C-固態核磁共振分析

以固態 <sup>13</sup>C 核磁共振法測定幾丁聚醣及樣品之化學結構。

#### 熱重分析 (Thermal Gravimetric Analysis)

將欲測樣品秤取 5~8mg 置入白金樣品盤中，在氮氣的環境下自室溫以 20 /min 升溫速率加熱至 600，樣品重量損失隨溫度上升而變化，由此可觀察材料的熱裂解溫度及熱穩定性質。

## 四、結果與討論

### 幾丁聚醣去乙酰度之測定

將 N-乙酰基葡萄糖胺標準樣品的紫外光一階微分吸光度值對濃度作圖可得檢量線，此檢量線的關係係數高達 0.99994。圖一為幾丁聚醣試樣在相同測試條件下的一階微分光譜圖，其去乙酰度經計算後為

85.6%。

### 馬來酸酐與幾丁聚醣反應研究

本實驗中，馬來酸酐參與反應的量及其取代度分別利用重量法及光譜學方法測定。在光譜學方法上是測量馬來酸在 210nm 吸收峰之吸光度值。圖二顯示不同樣品在 210nm 之吸光度值，將其帶入檢量線中，可以得到馬來酸濃度。表一為利用重量法與 UV 法所得到的取代度值比較，可以印證重量法所得的取代度與 UV 光譜相去不遠。

表一 由重量法與紫外光光譜法所得到的馬來酸取代值

	M1	M2	M3	M4	M5
DS(%) (wt.)	5.86	9.95	39.86	44.74	53.83
DS(%) (UV)	5.04	11.44	31.04	44.56	56.98

表二為不同反應時間下的馬來酸酐轉化率。由表中可知，大約反應到 6 小時以後幾乎不再上升，因此之後的樣品皆為 24 小時反應，可確保反應到達最大轉化率。

表二 不同反應時間下馬來酸酐轉化率

CS(g)	FA(g)	MA(g)	t (h)	X <sub>MA</sub> (%)
0.7506	30.008	3.0170	1	4.33
0.7504	30.014	3.0081	2	4.56
0.7507	30.034	3.0085	3	4.62
0.7504	30.006	3.0112	6	5.32
0.7507	30.034	3.0046	9	5.35
0.7512	30.034	3.0027	12	5.35
0.7512	30.017	3.0027	15	5.36
0.7504	30.023	3.0065	18	5.39
0.7501	30.023	3.0053	21	5.37
0.7506	30.097	3.0029	24	5.39

表三為不同馬來酸酐添加量於室溫反應 24h 下之馬來酸酐取代重(W<sub>MA</sub>)、馬來酸酐轉化率(X<sub>MA</sub>)及胺基轉化率(X<sub>NH2</sub>)。將結果作進一步計算，可以得到馬來酸酐的取代度(DS<sub>MA</sub>)。由表可知，隨著馬來酸酐量的增加，其取代度亦隨之增加，以本實驗來說，最高可到達 0.46 的馬來酸取代度。

表三 不同馬來酸酐添加量的反應結果

	M1	M2	M3	M4	M5
MA (g)	0.3746	0.7498	2.2537	3.0096	3.7511
W <sub>MA</sub> (g)	0.0218	0.037	0.1483	0.1665	0.2004
X <sub>MA</sub> (%)	5.819	4.934	6.58	5.532	5.342
X <sub>NH2</sub> (%)	5.859	9.946	39.861	44.743	53.83
DS <sub>MA</sub>	0.0501	0.0851	0.3412	0.3830	0.4608

圖三為純幾丁聚醣及樣品 M1、M2 之 FTIR 光譜圖，由圖中可觀察到經過化學修飾後的樣品除了擁有基本幾丁聚醣的特性峰外，在  $1710\text{cm}^{-1}$  左右的位置亦擁有羧基的 C=O 特性吸收，證明產物擁有幾丁聚醣的胺基外，亦擁有馬來酸的羧基。另外樣品 M5 之  $^{13}\text{C}$  NMR 吸收光譜圖，樣品的的光譜除了純幾丁聚醣的位置不變以外，另外多了 C=C 雙鍵( $120.6\text{ppm}$ ,  $140.3\text{ppm}$ )及羧基上的碳( $168.1\text{ppm}$ )等三個波峰，因此可以判斷馬來酸酐確實與幾丁聚醣有反應，且保留了雙鍵的特性。

### PNIPAAm 的接枝

將前面 M5 樣品加入不同比例的 NIPAAm 單體，利用 UV 進行接枝聚合反應，表四為接枝後樣品的接枝效率、接枝比值及單體的轉化率，由表中我們可以了解到，隨著單體的添加量增加，接枝效率亦隨之增加，但是單體的轉化率大約於 94.5% 到達平衡，且接枝比值亦變化不大。

表四 M5 樣品的接枝效率及單體轉化率

	NIPAAm (g)	GE(%)	GR	X (%)
P1	0.2688	20.1	0.17	86.4
P2	0.5376	46.5	0.85	91.1
P3	0.8064	55.6	1.55	93.1
P4	1.0752	56.7	2.14	94.3
P5	1.3440	52.2	2.47	94.6

圖四為樣品 P1、P2、P3 之 FTIR 光譜圖，和圖三比較，可以清楚看到 amide I 和 amide II 的吸收峰都有明顯的增強和往較高波數移動，這是由於接枝了 PNIPAAm 的關係，而且隨著接枝量的增加有增強的趨勢。另外在  $2973\text{cm}^{-1}$ 、 $2877\text{cm}^{-1}$  有明顯

的甲基峰吸收， $1385\text{cm}^{-1}$ 、 $1366\text{cm}^{-1}$  亦有異丙基的分裂特性吸收峰，證明確實有 PNIPAAm 共聚合的特徵。

另外樣品 P3 之  $^{13}\text{C}$  NMR 吸收光譜中可以觀察到甲基吸收峰明顯增強許多，這是來自於接枝的 PNIPAAm 上的異丙基上的兩個甲基，另外在  $41.9\text{ppm}$  的吸收峰為異丙基上和氮鍵結的碳吸收峰。而醯胺上的碳與 M5 上羧基及幾丁聚醣的醯胺重疊在  $175.4\text{ppm}$ ，另外除了幾丁聚醣的基本吸收峰以外，雙鍵的位置 ( $120.6\text{ppm}$ ,  $140.3\text{ppm}$ ) 已經消失，因此可以判斷經過 UV 照射後雙鍵確實沒有殘留。

### 熱重分析

圖五為純幾丁聚醣及樣品 M1、M3、M5 的 TGA 圖形，我們可以觀察出純幾丁聚醣的熱裂解溫度在  $280^\circ\text{C}$  左右，隨著馬來酸酐取代度的增加，裂解溫度隨之提高，以本研究來說，樣品 M5 的裂解溫度可以到達  $298^\circ\text{C}$ ，約提高了  $18^\circ\text{C}$ ，且 char yield 也比幾丁聚醣少了 10% 左右。推測應為馬來酸酐的取代使幾丁聚醣帶有部分的羧基，增加了分子內的離子作用力所造成的。圖六為 PNIPAAm 及樣品 P1、P3、P5 的 TGA 圖形，PNIPAAm 的熱裂解溫度在  $413^\circ\text{C}$ 。樣品的裂解行為大概可以分為兩段，由此可以初步斷定產物應該為接枝共聚合物，第一段為幾丁聚醣主鏈裂解部分，第二段為 PNIPAAm 接枝鏈的裂解，在樣品 P1 接枝量較少的部分，第一段  $T_d$  為  $302^\circ\text{C}$  較未接枝前為高，第二段為  $388^\circ\text{C}$  較 PNIPAAm 為低，但是在 P5 接枝量較高的部分，第一段  $T_d$  為  $309^\circ\text{C}$  比 P1，更高第二段為  $422^\circ\text{C}$  便較 PNIPAAm 為高。因此可以看出，隨著 PNIPAAm 的接枝量越高亦更提高了樣品的  $T_d$  值。

### 五、計畫成果自評

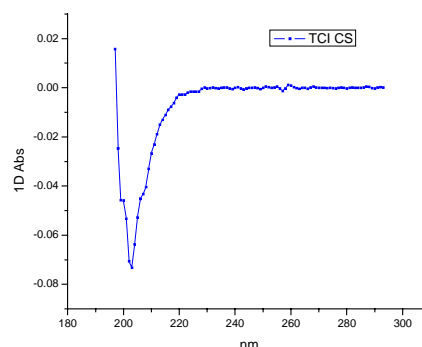
本計畫成功的以幾丁聚醣為材料，甲酸為溶劑，進行均相的化學反應修飾，利用馬來酸酐與幾丁聚醣的胺基反應，控制酸酐的比例及反應時間以獲得不同取代度的產物，再加入光起始劑與不同比例的 N-

異丙基丙稀醯胺單體，利用 UV 光聚合得到幾丁聚醣接枝聚氮-異丙基丙稀醯胺的薄膜。針對產物作結構分析、熱分析性質測試。由於反應後產物共同擁有胺基及羧基，亦擁有聚氮-異丙基丙稀醯胺的溫度敏感性質，因此可藉由控制反應量的不同，令其擁有不同的 pH 值及溫度敏感性。

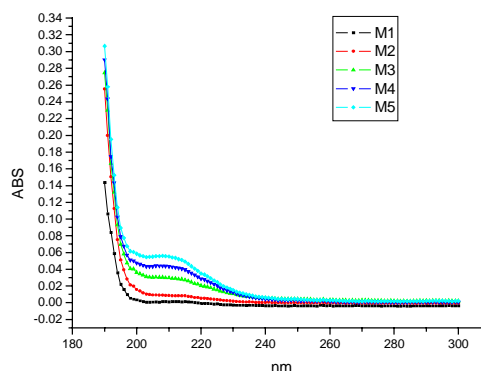
部分研究成果已經在 2004 年十月於日本舉行的第十屆亞太化工會議中發表，題目為”以馬來酸酐修飾幾丁聚醣及合成幾丁聚醣接枝聚異丙基丙稀醯胺”，Modification of Chitosan with Maleic Anhydride and Synthesis of Chitosan-g-Poly(N-isopropylacrylamide), 另外也已經將重要成果整理投稿到”Carbohydrate Polymers”期刊，目前已被接受，可說是進行相當順利，符合計畫預期目標。

## 六、參考文獻

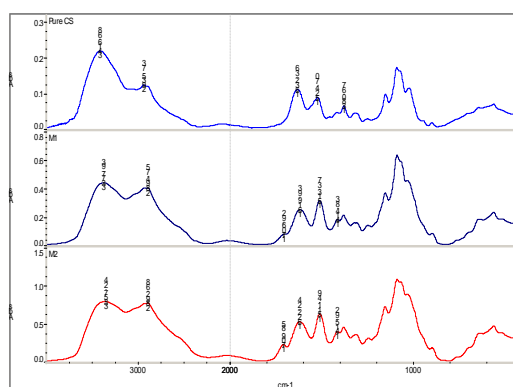
1. Tararel, A. Demard, *Biomaterials*, V14, 928 (1993).
2. J. Tsai, Z. Y. Wu, W. H. Su, *J. Food Prot.*, V63, 747-752 (2000).
3. P. M. Sardinha, M. H. Gil, J. V. Mercader, A. Montoya, *Journal of Immunological Methods*, V260, 173-182 (2002).
4. Tanja Becker, Michael Schlaak, Henry Strasdeit, *Reactive & Functional Polymers*, V44, 289-298(2000).
5. V. M. Ramos, N. M. Rodríguez, M. S. Rodríguez, A. Heras, E. Agullø, *Carbohydrate Polymers*, V51, 425-429 (2003).
6. T. Sugama, M. Cook, *Progress in Organic Coatings*, V38, 79-87(2000).
7. 張根源, 智慧型材料之生物醫學應用, 化工, V48, 53-62(2001)。
8. Chia-Fen Lee, Chia-Jen Wen, Wen-Ten Chiu, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, V41, 2053-2063 (2003).
9. So Yeon Kim, Sung Min Cho, Young Moo Lee, Seon Jeong Kim, *Journal of Applied Polymer Science*, V78, 1381-1391(2000).
10. Liliana Verestiuc, Claudia Ivanov, Eugen Barbu, John Tsibouklis, *International Journal of Pharmaceutics* V269, 185-194(2004).



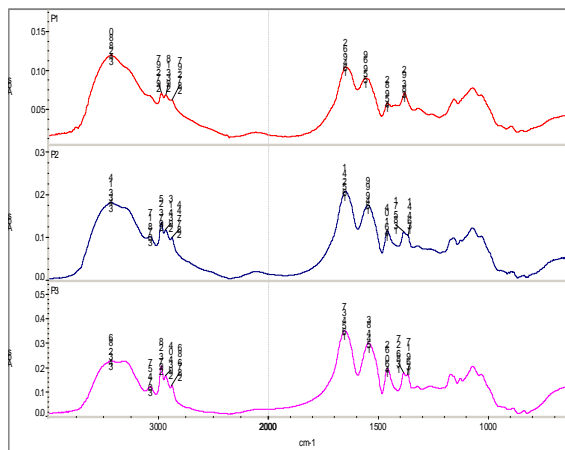
圖一、純幾丁聚醣 1D 吸光值



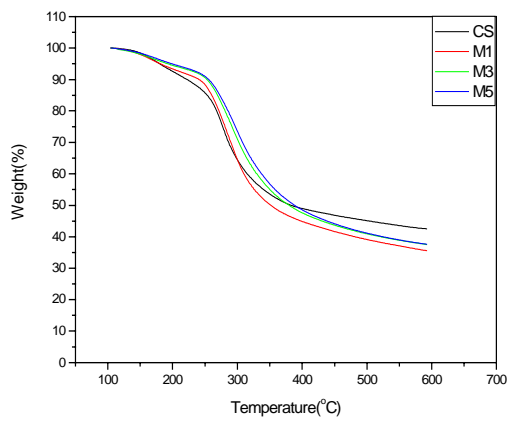
圖二、不同樣品在 210nm 之吸光度值



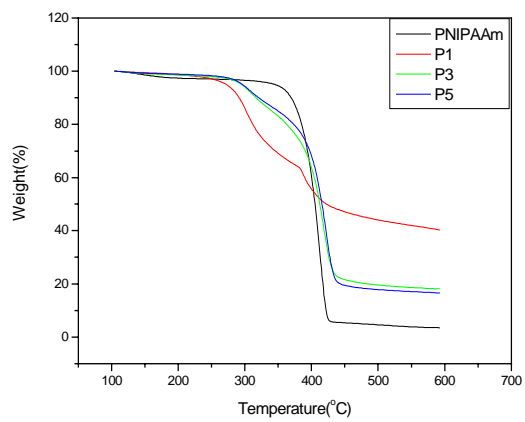
圖三、純幾丁聚醣及樣品 M1、M2 之 FTIR 光譜圖



圖四、樣品 P1、P2、P3 之 FTIR 光譜圖



圖五、純 CS 及樣品 M1、M3、M5 之 TGA



圖六 PNIPAm 及樣品 P1、P3、P5 之 TGA