

# 第一章 緒論

## 1-1 前言

### 生物醫學材料

目前現在被應用在生物醫學的天然材料包括白蛋白、幾丁質、幾丁聚醣、膠原蛋白、透明質酸、明膠及多醣類等。在合成材料方面包括PAA、PGA、PLG及PLGA等。

一般常見的生物可吸收高分子應用有：韌帶重建、手術縫線、骨移植材料、人工皮膚、藥物釋放載體、生物黏膠、組織支架等。生物可分解性及生物可吸收性是指高分子材料植入人體後經過一段時間可被人體分解，降解後的小分子經由體內的代謝作用排除人體，不需日後再以手術將植入物取出。選擇這類材料時最重要要考量生物相容性，即無毒性、不與血液接觸形成血栓、血漿蛋白與酵素不產生不良反應、無負面免疫反應、無致癌性、無毒性。

細胞或血液對生物醫學材料的反應受材料表面性質影響，如表面粗糙度、濕度、帶電性、化學組成、表面紋路、孔隙度及分子親疏水比等。目前已有許多研究針對材料表面做各種物理或化學性之修飾，來改變表面性質進而掌握材料之生物相容性。

## 幾丁聚醣在生醫材料上的特性

幾丁聚醣(chitosan)是一種具抗菌性、無生物毒性、生物相容性高又可降解的材料，具有生物活性且分子結構可變性大，如聚合長度、聚合鍵結方式等，所以生物醫學上引起許多學者的注意和研究。幾丁聚醣在生醫方面的特點有：

1. 幾丁聚醣能刺激血液中血小板分泌凝血因子達到止血的功能。
2. 幾丁聚醣之化學結構與透明質酸(hyaluronic acid)類似。幾丁聚醣具有促進傷口癒合的功效，且幾丁聚醣能有效地刺激成骨細胞分化以及促進骨骼之形成。
3. 因為幾丁聚醣同時具備陽電荷及形成膠體和薄膜之特性，故可以運用在藥物輸送上。
4. 幾丁聚醣分子上具amino和hydroxyl group，可易於化學修飾成其他衍生物，因此極具發展潛力。



幾丁聚醣因只能溶解於稀酸水溶液中，故本研究即以幾丁聚醣為基礎，利用接枝羧甲基酸、己醯基使成為同時具有親水/疏水性質，化學修飾為特殊的兩性幾丁聚醣衍生物，可完全溶解於中性水溶液，大幅增加應用性。兩性高分子材料是一直以來被商業與學術上所注意，現在許多研究將兩性幾丁聚醣利用微胞這樣結構將疏水性藥物包覆在內，期望能安定油性藥物的hydrophobic interaction，以微球形式攜帶藥物進入人體，達到藥物釋

放控制。且因羧甲基酸可產生負電荷，加上己醯基可穩定親疏水界面，血液相容性期望能提升。兩性幾丁聚醣衍生物還有不輸給透明質酸的保濕能力，不論在醫藥方面都能有更多應用。

## 1-2 研究動機及目的

幾丁聚醣雖然擁有許多優點，但因其只能溶解於稀酸水溶液中，這一大缺點造成幾丁聚醣應用上的限制。所以利用化學合成方式改質幾丁聚醣，改善其衍生物的溶解度。我們新合成出同時具有親水基/疏水基的兩性材料，可包覆雙性藥物。特別是不同於未改質的幾丁聚醣，兩性幾丁聚醣可溶解於中性純水中。另外還有合成出可溶解在有機溶劑的幾丁聚醣衍生物 O-hexanoyl chitosan、N,O-hexanoyl chitosan，更可用來包覆油性藥物。

水溶性N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC)材料被研究已久。利用羧甲基酸及己醯基新開發出兩性性質的生醫材料，且希望仍保有原NOCC的pH敏感性，hexanoylated NOCC有更加顯著的pH敏感，可作為智慧型生醫材料。期望比原有NOCC更具驚人保水能力，做為可經由注射攜帶藥物入人體的新材料，同時在中性環境下仍有膨潤態，適合應用做軟骨組織工程細胞培養及藥物載體。在此論文研究裡變換不同羧甲基酸及己醯基的接枝率，研究材料化學、物理及熱穩定性，加上化學改質後對材料分子間氫鍵影響，進而探討材料基本性質與吸濕、保濕能力。

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 幾丁聚醣的介紹及其應用

#### 幾丁聚醣的介紹

1811年法國植物學家Braconnot 以氫氧化鈉的稀溶液加熱處理洋菇時發現有不溶物而命名為“fungine”。1823 年Odier又於昆蟲表皮堅硬部位發現類似物質，乃命名為幾丁質（Chitin），學名為2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ (1-4)-D-glucopyranose。1859 年Rouget 發現經過氫氧化鉀濃液加熱後，可將幾丁質轉變為溶於有機酸之物質。1894 年Hoppe—Seyler 將此物質命名為幾丁聚醣（Chitosan，學名為N-amino-2-deoxy-  $\beta$ (1-4)-D-glucopyranose [1]。

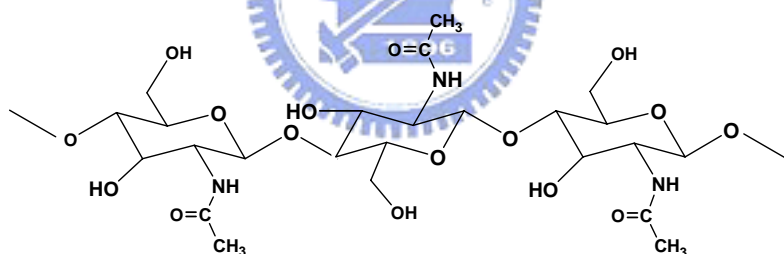


Fig.2-1 Molecular structure of chitin.

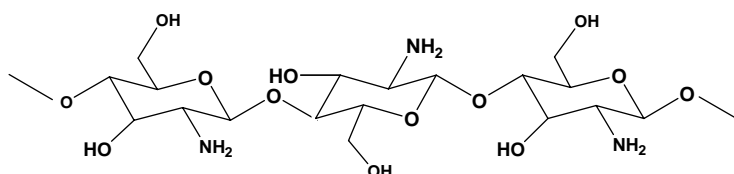


Fig.2-2 Molecular structure of chitosan.

幾丁質(chitin)是和纖維素(cellulose)相似的天然多醣類，主要來源來自甲

殼類生物例如蝦、蟹等中而萃取出，在大自然中蘊涵量豐富，被大量運用來做生醫材料。幾丁聚醣是幾丁質去乙醯基後的產物，分子量約為兩百萬左右(視其來源及製造方法而有所差異)。幾丁質及幾丁聚醣的判別方法是以去乙醯程度之高低來決定。然而其分界點並沒有明確的數值。Aiba [2] 等學者在1992 年提出當幾丁聚醣分子內部之乙醯基含量少於40%以上，並且可溶在微酸性的溶劑中，即可稱為幾丁聚醣。另外Roberts及Rinaudo [3, 4]等提出只要幾丁質類物質可以溶解在微酸性溶液中，即可稱之為幾丁聚醣。

### 幾丁聚醣的應用

幾丁質/幾丁聚醣高分子之特色：天然的高分子材料、蘊藏量豐富(僅次於纖維素)、良好生物相容性、生物可分解性、非毒性、非過敏性、抗細菌性、抗真菌性、抗病毒性、促進止血功能、促進傷口治癒、強吸濕性、保濕效果良好、不易變性、機械強度良好、易於改質修飾。

其應用領域很廣，包括醫藥、食品、農業、化工、環境保護等領域。醫藥及生物技術領域方面目前有應用於醫用紗布、手術縫合線、創傷敷料、止血棉、牙周病治療、人工皮膚、人工血管、藥物釋放載體、酵素及細胞固定載體、分離及純化蛋白質、離子交換樹脂等。

### 2-2 幾丁聚醣之製備

幾丁質的製備工業上是直接利用水產加工業的廢棄蝦蟹殼，經過酸液脫

鈣及鹼液脫蛋白處理後，再經氧化脫色，得到幾近全白的幾丁質粉末。目前商業上用以生產幾丁聚醣的方式乃是將幾丁質除去蛋白質及碳酸鈣之後，在高溫(100°C~150°C)高濃度約50%NaOH的水溶液中反應，目的是將其氮上的乙醯基脫去只留下胺基，經過不同反應時間處理，可達到去不同乙醯度的幾丁聚醣。在製備幾丁聚醣的過程中，酸鹼的反應時間是一個必須考量的重要因素，因為酸可造成多醣主鏈的斷鍵，降低幾丁質的分子量，鹼則會脫除幾丁質上的乙醯基，降低乙醯化程度，相對的也提高了幾丁質在酸性溶液中的溶解度，形成分離產物上的困難。除此之外，在生產過程中所使用的大量酸鹼，也必須經過再處理，以免造成二次污染。

## 2-3 幾丁聚醣物理與化學性質 [5]

### 物理性質

幾丁質是長鏈高分子化合物，由於具有一級羥基、二級羥基及一級胺基的存在，形成很強的分子內及分子間氫鍵，有利於結晶的形成，在加工上，可以製成強度較高的纖維材質和膜材料。

1963年Rundall根據X-Ray光譜得到的結果，提出幾丁質具有 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 三種晶型。

(a)  $\alpha$ 型為斜方晶系 (rhombic)，每個晶格由八個N-乙醯葡萄糖胺呈反方向平行 (anti-parallel) 排列而成，其羰基及羥基會形成分子間/分子內氫鍵，



所以在水中較不易膨潤[6]，構形緻密且堅硬，為自然界最穩定、普遍之構造，大部分昆蟲及甲殼類屬的外骨骼屬之。

(b)  $\beta$ 型為單斜晶系（monoclinic），每個晶格由兩個 $N$ -乙醯葡萄糖胺呈平行（parallel）排列，結構與纖維素相似，組織較為鬆散，烏賊軟骨中之幾丁質屬之[7]。

(c)  $\gamma$ 型則為 $\alpha$ 型及 $\beta$ 型之混合體，如藻類或真菌中之幾丁質。

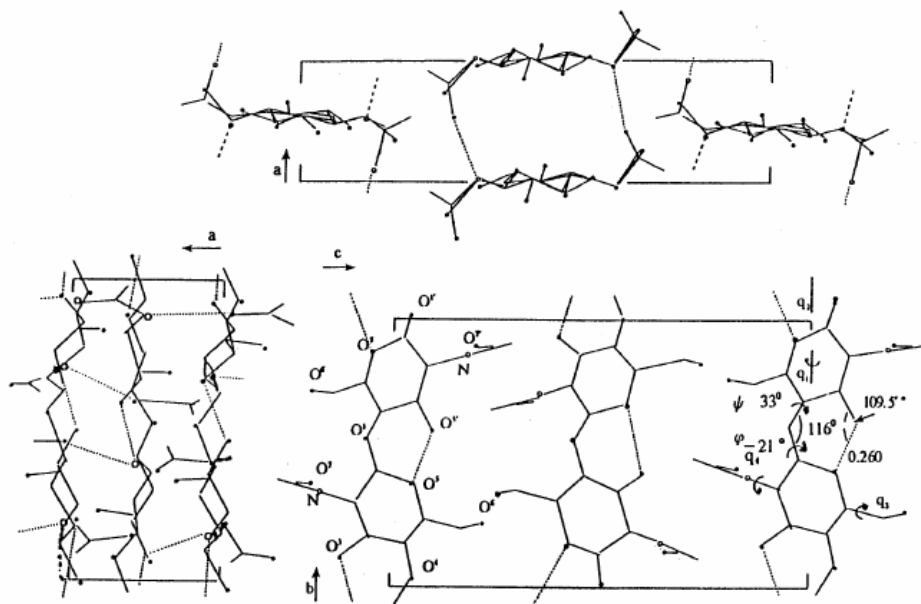


Fig.2-3  $\alpha$ -chitin conformation.

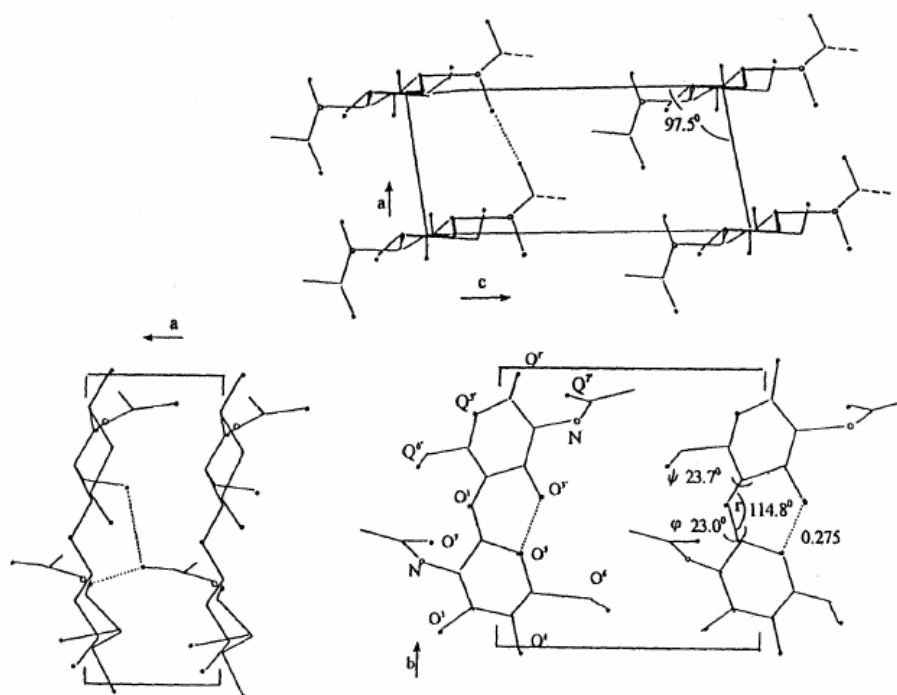


Fig.2-4  $\beta$ - chitin conformation.

## 化學性質

在溶解性質上，幾丁聚醣的一級胺基在弱酸中可和 $\text{H}^+$ 形成帶 $\text{NH}_3^+$ 的陽離子聚合物，因此可溶於弱酸中，如甲酸、醋酸、檸檬酸、丙酮酸及乳酸等，但不溶於中性純水、鹼液或有機溶劑。且在鹼性溶液中則會凝聚形成膠狀，其中又以甲酸為幾丁聚醣最佳溶劑。1977年Austin [8]提出了利用N,N-二甲基乙醯胺(DMAc)或N-甲基-2-四氫吡咯(NMP)加入2%以上的氯化鋰做為甲殼素的溶劑，使得幾丁聚醣有適當的溶劑來利用紫外光譜(UV)進行溶液性質的研究，但是此一溶劑也會隨著甲殼素來源的不同而有不同的溶解度，並非完全適用於所有種類的甲殼素。

同時分子量及去乙醯化程度也會影響到幾丁聚醣的溶解程度，去乙醯化



程度高的幾丁聚醣會顯現出較佳的溶解性質，低分子量的幾丁聚醣也有較佳溶解性。影響幾丁聚醣溶解度的因子有：乙醯基含量與分佈方式、氫鍵、分子量等，茲分述如下：

#### (a) 氫鍵

幾丁聚醣分子鏈上的乙醯胺基團 ( $-\text{NHCOCH}_3$ )、羥基 ( $-\text{OH}$ ) 及胺基 ( $-\text{NH}_2$ ) 彼此間形成很強烈的分子間和分子內氫鍵，導致細微結晶區域 (microcrystalline regions) 的產生，此乃造成幾丁聚醣不溶於水的主要原因 [9, 10, 11, 12]。

#### (b) 乙醯基含量與分佈

Sannan [9, 13] 等指出，若以均相鹼水解處理 (homogeneous alkaline hydrolysis) 進行幾丁質去乙醯化作用，當幾丁質去乙醯化程度達到 48~55 % 時，在酸性的條件下可溶解於水中，這是因為均相鹼水解處理會改變幾丁質之二級結構 (secondary structure)，切掉乙醯基使胺基露出，使親水性增加，並產生分子量之降解。

Kurita [14] 以 X 光繞射光譜 (X-ray diffraction spectrum) 來探討均相與非均相鹼處理 (heterogeneous alkaline hydrolysis) 所得幾丁聚醣之乙醯基含量與分佈對其的分子結構與溶解性質之影響，發現以非均相鹼處理所得的幾丁聚醣 (DD: 45~81%) 有結晶區產生，此時幾丁聚醣不溶於水中；而以

均相鹼處理所得的幾丁聚醣（DD：48~55%）無結晶區域產生，此時幾丁聚醣可溶於水中，其差異可能來自於幾丁聚醣分子二級結構與幾丁聚醣分子鏈上葡萄糖胺及*N*-乙醯葡萄糖胺的排列分佈不同有關。Shigemasa與Ottøy [15,16]指出，用非均相之鹼液處理而得之幾丁聚醣，其*N*-乙醯葡萄糖胺與葡萄糖胺會以區段（block）方式各自聚集在一起形成聚集區；若使用均相鹼液處理而得之幾丁聚醣，其*N*-乙醯葡萄糖胺與葡萄糖胺會以不規則方式（random）排列不會形成聚集區，因此可溶於水溶液當中。

Kurita [17, 18]等與Kubota and Eguchi [19]等亦以乙醯化法進行幾丁聚醣之*N*-乙醯化作用，亦發現乙醯化所得去乙醯程度為50%的幾丁聚醣具有良好的水溶性質。



### (c) 分子量

分子量的大小影響著幾丁聚醣的溶解特性。利用高溫的鹼性溶液將幾丁質去除乙醯基，當處理幾丁質的時間越長，其幾丁質上所接的乙醯基含量越少就會形成幾丁聚醣。分子量也會隨著高溫的鹼性溶液處理的時間增加而下降。另外幾丁聚醣若是經過像是強酸、超音波、剪力及微射流處理之後，其分子量下降的程度會增加，方式如下：

#### 強酸水解

Hasegawa [20]以85% 磷酸水解幾丁聚醣1~6 週，以製備不同分子量的幾

丁聚醣，發現當降解物以重量平均分子量計算其聚合度為7.3時，可溶於純水；聚合度為16.8時，不溶於純水。

鹽酸降解法是採用強酸以及熱鹼先將幾丁聚醣純化後，再添加濃鹽酸反應。在添加濃鹽酸反應48 小時之後即可得到聚合度小於10 的幾丁寡醣-鹽酸鹽( $C_8H_{11}O_5N-HCl$ )<sub>n</sub>，以此種方法反應後的分子量分布範圍比較廣泛。而酸-亞硝酸鹽降解法則是將幾丁聚醣溶於稀酸中，再將亞硝酸鹽加入之後即可製得平均分子量2000Da~3000Da 的低聚合物水溶性醣。

### 氧化降解法

1979 年日本學者等學者採用過氧化氫( $H_2O_2$ )來將高分子量的幾丁聚醣降解成低分子量之幾丁聚醣。至目前為止氧化降解法仍是目前研究比較多的一種降解幾丁聚醣的方法。氧化降解法包括有 $H_2O_2$ 、 $H_2O_2-HCl$ 、 $H_2O_2-NaClO_2$ 氧化法以及其他的氧化降解法。

$H_2O_2$  氧化法即是將 $H_2O_2$  加入1%幾丁聚醣醋酸溶液中，在pH3~pH5 的酸性條件下進行反應。其中在pH3.5、50℃下添加20%的 $H_2O_2$ ，分子量最低可製備出6000Da。

另外， $H_2O_2-NaClO_2$  氧化法是在pH=8 之下加入0.004%~10%的 $NaClO_2$ 與0.01%~3.5%的 $H_2O_2$  反應，在反應過程之中添加適量的鹽酸參與反應的進行。此種方法可製備出可溶於中性溶液的幾丁聚醣。


日本學者分別於1989 年以及1997 年提出 $H_2O_2-HCl$ 氧化法從幾丁聚醣製

備幾丁寡糖，將10 g 幾丁聚糖溶於250 ml 的水中，添加5 ml 的鹽酸及1 ml 28%的 $H_2O_2$ 分別在50°C~80°C攪拌反應2 小時。

### 酵素法製備

主要是利用酵素的轉糖或直接水解等反應，配合各酵素本身的基質專一特性來製備寡糖。而目前大約有三十多種酵素，其中有包括專一性酵素如幾丁聚糖以及非專一性酵素如脂肪酶、溶菌酶、蛋白酶、木瓜酵素、纖維素分解酶等等。因此利用此法所製備出的寡糖，其聚合度較化學法來的高且易控制。

## 2-4 化學修飾幾丁聚糖



由於幾丁聚糖只能溶於酸性溶液使其應用性受限，如何改善幾丁聚糖溶解度一直被許多學者研究。故許多人在幾丁聚糖結構上的一級、二級羥基與胺基進行化學改質，以改變幾丁聚糖的溶解性質，或進一步作為其他反應的前驅物，以增加其應用性。

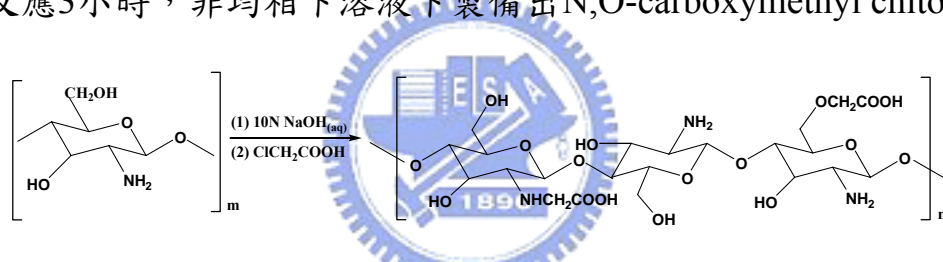
### 2-4-1 親水性幾丁聚糖

為改善原有幾丁聚糖只可溶解在酸性水溶液的缺點，利用接枝親水性基團如 $-COOH$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-PO_4H_2$ 等，使幾丁聚糖溶解度大幅提升，而可溶解於中性水溶液甚至更廣的pH值範圍，增加其在生物醫學材料方面的應用。

### 2-4-1-1 Carboxymethyl chitosan

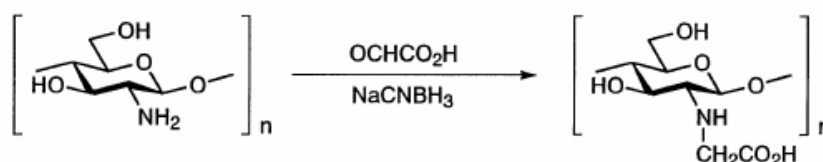
1937年Rigby [21]發表carboxymethyl chitosan，因具有螯合金屬能力、高黏度、高液動體積、低細胞毒性、有生物相容性等特殊化學、物理及生物性質，特別是化學結構和透明質酸相似，所以其保濕能力幾乎能夠媲美透明質酸，且價格低廉製程簡易[22，23]，所以被使用在食品、醫藥及化妝品等方面。

Hayes及Muzzarelli [24，25]提出在幾丁聚醣的2-propanol懸浮溶液中加入NaOH濃鹼液來使幾丁聚醣膨潤又使胺基、羥基去氫後，再添加氯乙酸加熱至60°C反應3小時，非均相下溶液下製備出N,O-carboxymethyl chitosan。



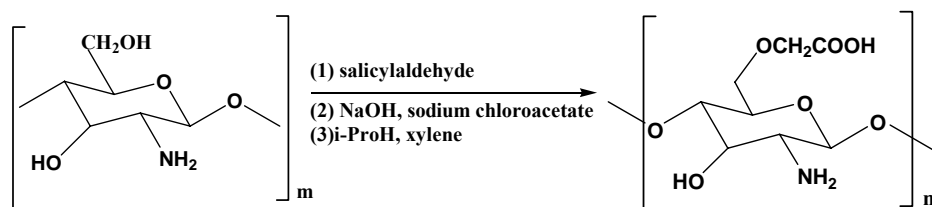
Scheme 1. Synthesis of N,O-carboxymethyl chitosan.

Muzzarelli [26]等人將幾丁聚醣的稀酸水溶液和glyoxylic acid快速反應形成Schiff base後，加入NaCNBH<sub>3</sub>還原所形成的imine，得到N-carboxymethyl chitosan，產物可溶在pH3~pH11 水溶液。



Scheme 2. Synthesis of N-carboxymethyl chitosan.

Nudga [27]等利用幾丁聚醣在乙醇中加入salicylaldehyde反應，接著又以NaOH、sodium chloroacetate、2-propanol與對二甲苯的混合溶劑在80°C下反應即可得O-carboxymethyl chitosan。



Scheme 3. Synthesis of O-carboxymethyl chitosan.

#### 2-4-1-2 N-methylene phosphonic chitosan

Herasa, Rodri'guez [28]等人新發展出幾丁聚醣以稀酸溶解後滴入磷酸又加入甲醛後加熱迴流7小時，得到N-methylene phosphonic chitosan。相較未改質chitosan可溶解於更廣的pH值範圍，同時磷酸根可和二價金屬形成螯合物吸附金屬能力大增。

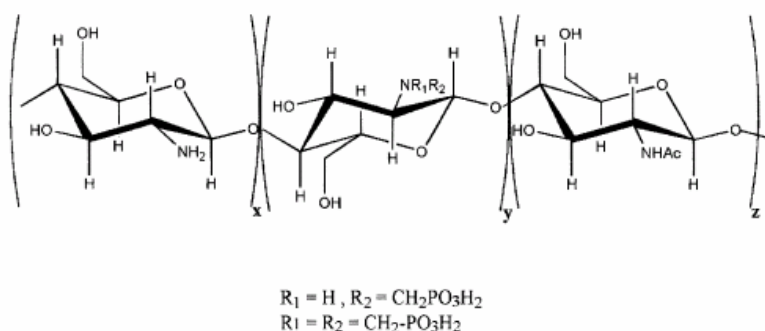


Fig.2-5 Molecular structure of N-methylene phosphonic chitosan

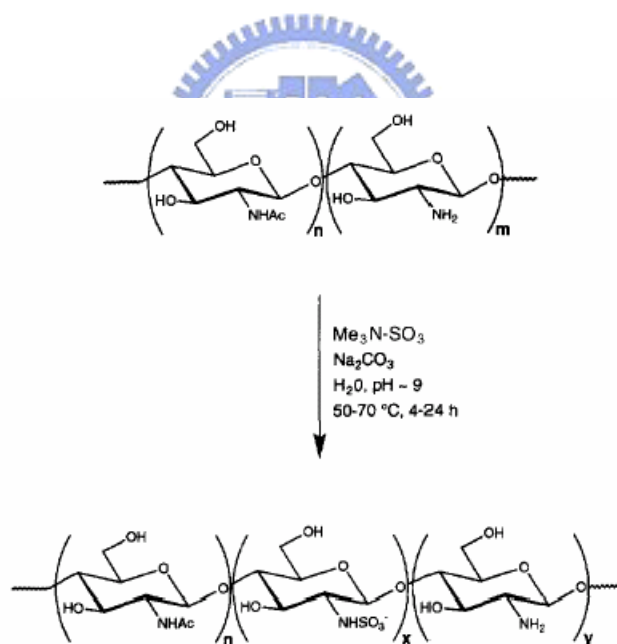
#### 2-4-1-3 Sulfate chitosan

Chen等人發現幾丁聚醣磺酸化後可以增加幾丁聚醣在水中的溶解度，研



究在不同溫度、pH 值及硫含量之下，對於幾丁聚醣水溶性的影響，他們並發現磺酸化幾丁聚醣的抗菌性較未磺酸化幾丁聚醣有顯著的改進，且其抗菌性會受到磺酸化幾丁聚醣硫含量的影響[29，30]。另外，Fong等人研究發現羥乙基幾丁聚醣磺酸鹽( hydroxyethyl chitosan sulfonate )擁有好的水溶性，且由IR 光譜的結果顯示其具有類肝磷脂( heparin，具抗凝血性)結構，而預期這樣類肝素( heparin-like )材料在未來具有發展成類肝素藥物的潛力，有希望製成新型抗凝血劑[31]。

Holme [32]等合成出N-sulfate chitosan。另外Focher等人也做出O-sulfate chitosan[33-36]。

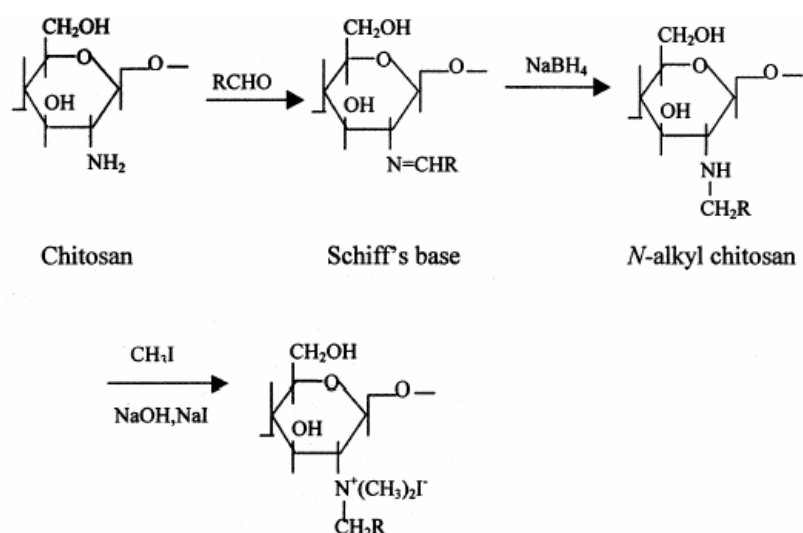


Scheme 4. Synthesis of N-sulfate chitosan.

#### 2-4-1-4 N-trimethyl chitosan

Muzzarelli、Tanfani、Kim、Zhishon [37]等發展出呈陽離子性的高分子電解質N,N,N-trimethyl chitosan (TMP)，可溶在酸性和鹼性水溶液。幾丁聚醣

以1%AcOH溶解後加入甲醛室溫下反應一小時形成Shiff base，將pH值調至4.5以NaBH<sub>4</sub>進行還原反應。之後在鹼性環境下以N-甲基-2-四氫吡咯(NMP)當溶劑，以CH<sub>3</sub>I在胺基上做甲基化。

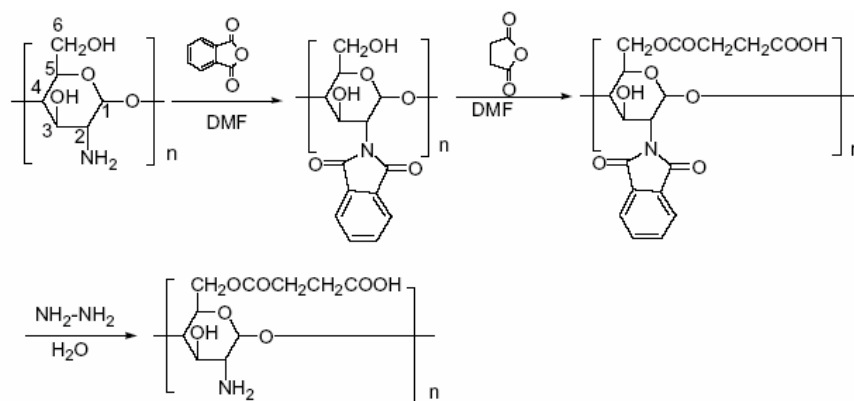


Scheme 5. Synthesis of quaternized *N*-trimethyl chitosan.

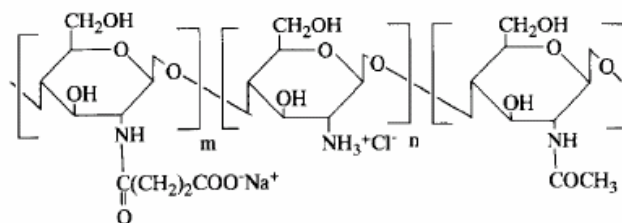
*N*-trimethyl chitosan有促進強效吸收能力，能開啟緊閉上皮細胞通道讓藥物通過，在in vitro實驗中發現可降低Caco-2細胞單層的皮膜離子通道電阻值，這可以增進藥物運輸進入腸的上皮細胞，另外*N*-trimethyl chitosan還能夠提昇親水性藥物滲透通過細胞單層[38]。

#### 2-4-1-5 Succinyl chitosan

Zhang [39]等人利用phthalic anhydride保護胺基只讓succinyl group接上羥基，以降低幾丁聚醣分子間氫鍵和結晶結構，因有carboxyl group而對水溶性更佳。



Scheme 6. Synthesis of O-succinyl group.



Scheme 7. Synthesis of N-succinyl group [40].

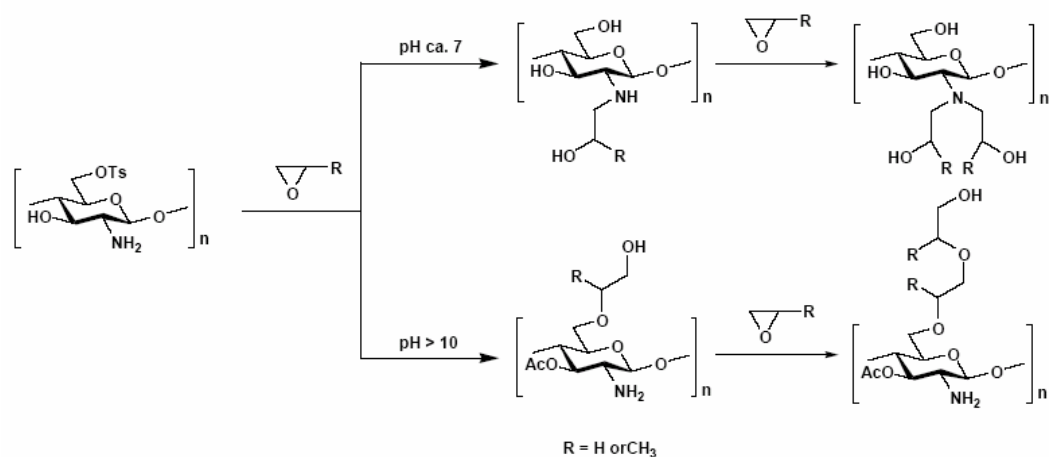
N-succinyl-chitosan具有生物相容性、低細胞毒性和能經由靜脈注射後長時間停滯在人體，所以適合用來做為攜帶藥物。雖然N-succinyl-chitosan一開始是被發展做為傷口敷材，也有應用在化妝品方面和用在關節炎治療[41]。

## 2-5-2 疏水性幾丁聚醣

改質幾丁聚醣使可溶在有機溶劑，進而包覆親油性藥物，或做為不易降解的身體植入物，還可同時攜帶治療效果藥物及細胞成長因子，成為多功能智慧型生醫材料。

### 2-4-2-1 Alkyl chitosan

2-羥乙基幾丁質(2-hydroxyethyl-chitin)是種已商業化、能溶於水中且常用來當作檢驗幾丁質細胞溶解酵素(chitinolytic enzyme)的基質。製備方法是幾丁質與環氧乙烷在鹼性的環境下反應而得到[42]，但會有副反應發生，主要是因為環氧乙烷在鹼性環境中會發生陰離子聚合，若改用2-氯乙醇(2-chloroethanol)也可得到相同產物。當在酸性環境中，幾乎只發生N-烷化反應，而在鹼性環境中，O-烷化反應速率則較快[43，44]。



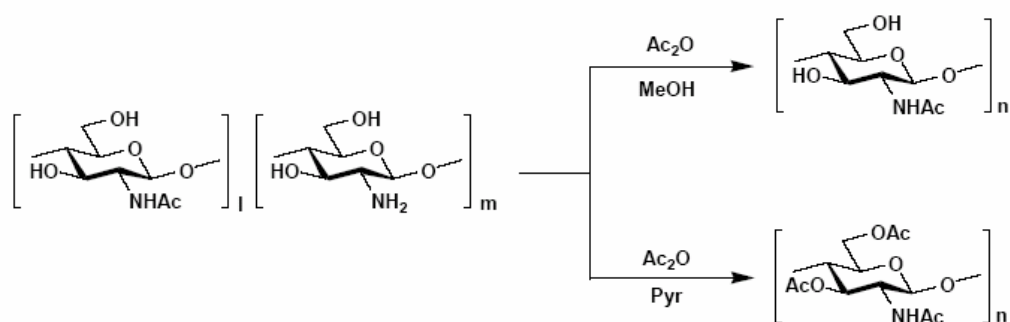
Scheme 8. Synthesis of alkyl chitosan.

### 2-4-2-2 Acyl chitosan

$\beta$ 形式的幾丁聚醣雖無法和一般的有機溶劑互溶，但可和許多溶劑例如在甲醇中產生膨潤現象。故Kurita等人將 $\beta$ 形式幾丁聚醣與醋酸酐置於甲醇中，在胺基位置進行乙醯化反應，產生單一結構的幾丁聚醣(N-乙醯-D-葡萄糖) [45]。若將 $\beta$ 形式的幾丁聚醣和醋酸酐置於中，以4-二乙基氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine)當催化劑，可生成全乙醯化的幾丁聚醣(scheme

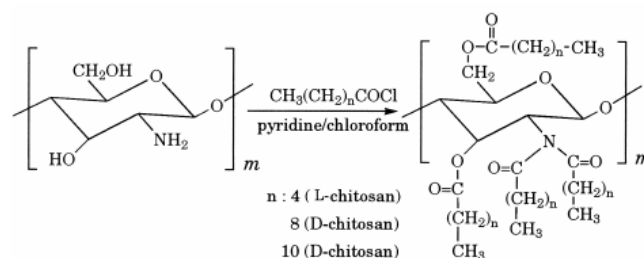
9.)。然而在相似的條件下， $\alpha$ 形式的幾丁聚醣卻無法進行此類反應。由此可知， $\alpha$ 形式的幾丁聚醣因為質地堅硬，不易溶解，而 $\beta$ 形式的幾丁聚醣則對水和有機溶劑有較高的親和力，造成在改質反應進行上， $\beta$ 形式的幾丁聚醣會是一個較好的選擇[46]。但無論是使用醋酸酐或乙醯氯進行乙醯化反應，胺基的反應速率皆快於羥基。

醯化幾丁聚醣增添疏水性也會改變原有結構性質。己醯化幾丁聚醣在水中有膨潤現象，但當碳鏈增長至 $C_8$ – $C_{16}$ 卻反而有收縮行為[47]。N-acyl chitosan也表現出好的血液相容性，尤其相較下N-hexanoyl chitosan有最好血液相容性，N-acyl chitosan也比未改質幾丁聚醣更易被溶菌酶降解[48]。



Scheme 9. Synthesis of acetyl chitosan.

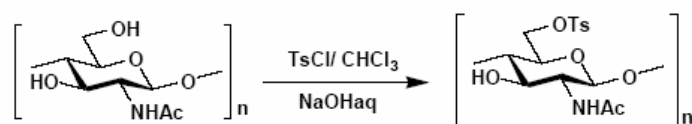
除了乙醯化，幾丁聚醣尚可進行其他的醯化反應，如Fujii等人就將幾丁聚醣與長碳鏈的醯氯，如己醯氯(Hexanoyl chloride)、十四醯氯(tetra- decanoyl chloride)溶於氯仿和吡啶混合溶劑中進行醯化反應，製備出可溶於氯仿的醯化產物[49]。



Scheme 10. Synthesis of acylated chitosan.

### 2-4-2-3 Tosylation

為了改善幾丁聚醣的溶解性，Kurita 等人將巨大的官能基團如甲苯磺醯基(tosyl group)導入幾丁聚醣結構中，主要是因為巨大的官能基團能有效地破壞多醣體緊密的晶格排列所造成。一開始是將幾丁聚醣和甲苯磺醯氯(Tosyl chloride)置於吡啶中進行異相反應，即使加熱至100°C，反應依舊緩慢。於是改成在零度下將溶於氯仿的甲苯磺醯氯，滴入鹼性的幾丁聚醣溶液中，則反應會在兩者混合物的界面溫和地進行[50] (Scheme 11.)。當O-甲苯磺醯化幾丁聚醣的接枝率小於0.3，具有高度的親水性且可微溶於水中。但當接枝率大於0.4，開始變得疏水且只能溶於極性的有機溶劑中如dimethylsulfoxide (DMSO)，N,N-dimethyl acetamide (DMAc) [51]。

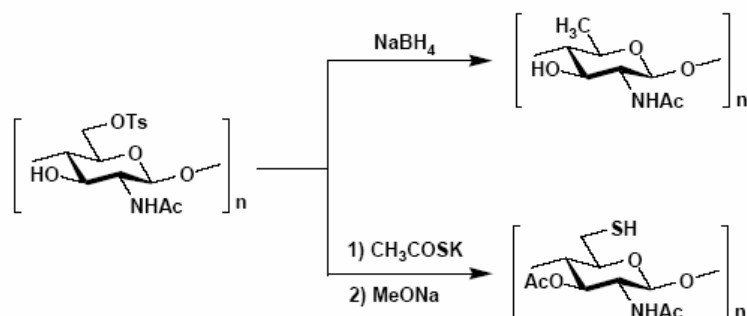


Scheme 11. Tosylated chitosan.

對於更進一步改質反應而言，O-甲苯磺醯化幾丁聚醣是個不錯的中間反應物。如在80度下將溶於DMSO的O-甲苯磺醯化幾丁聚醣和NaBH<sub>4</sub>進行還原



反應，得到脫氧幾丁聚醣[51]。或者將O-甲苯磺醯化幾丁聚醣和硫代乙酸乙酯鈉(potassium thioacetate)反應，將乙醯硫基導入，接著加入MeONa得到有硫醇基的幾丁聚醣。此產物可用來當固定酵素的載體，或當自由基共聚合反應的起始劑[52]。



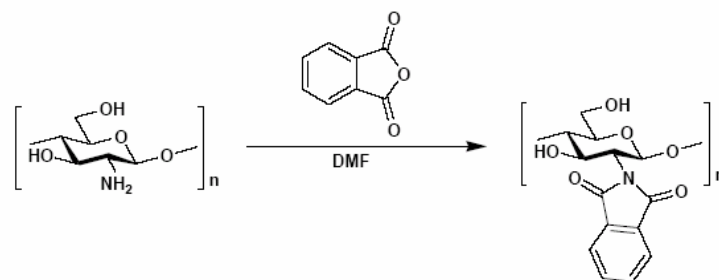
Scheme 12. Modified synthesis of tosyl chitosan.

#### 2-4-2-4 Phthaloylation

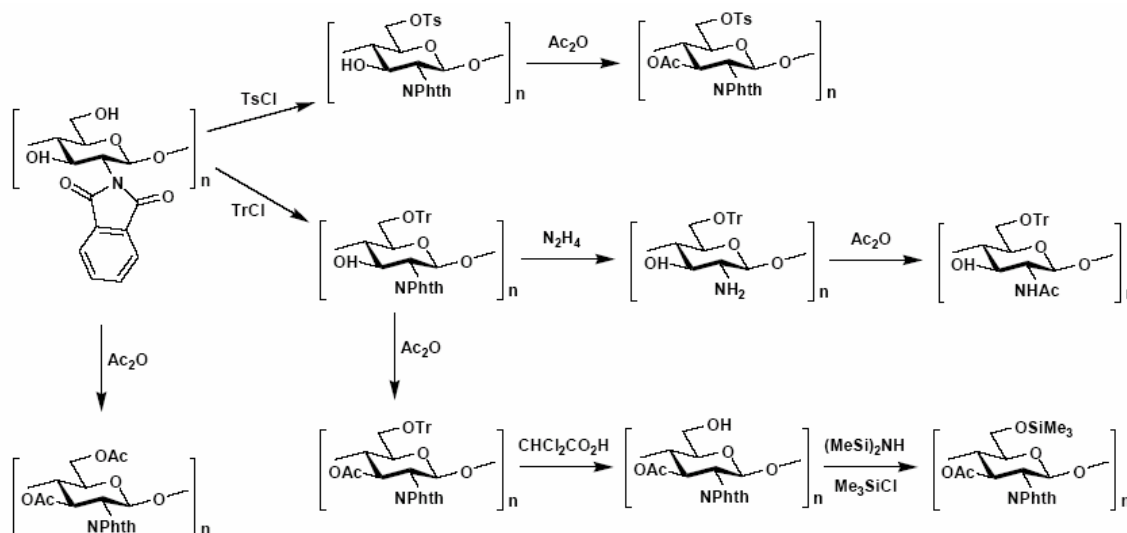
Nishimura [53]等人將幾丁聚醣懸浮於N,N-二甲基甲醯胺(DMF)中，在120°C到130°C下加入過量的酞酐(phthalic anhydride)進行反應(Scheme 13.)，由於酞酐會對自由胺基進行保護，得到可溶於DMSO的N-苯二甲醯化幾丁聚醣，除了保護作用外，另一方面也因氮上接了苯二甲醯基而無法形成分子間氫鍵，而提高了幾丁聚醣在有機溶劑中的溶解度。

由於以上的特性，使得N-苯二甲醯化幾丁聚醣可更進一步進行其他的改質反應，如當進行三苯基甲烷化反應(triphenylmethylation)或甲苯磺醯化反應(tosylation)時，由於一級胺基已被保護，故只會和第六個碳上的羥基發生反應，於是接下來的反應便可在第三個碳上的二級羥基進行，最後使用聯

胺(hydrazine,  $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$ )脫去苯二甲醯基，即可恢復成為自由胺基。



Scheme 13. Synthesis of phthaloyl chitosan.

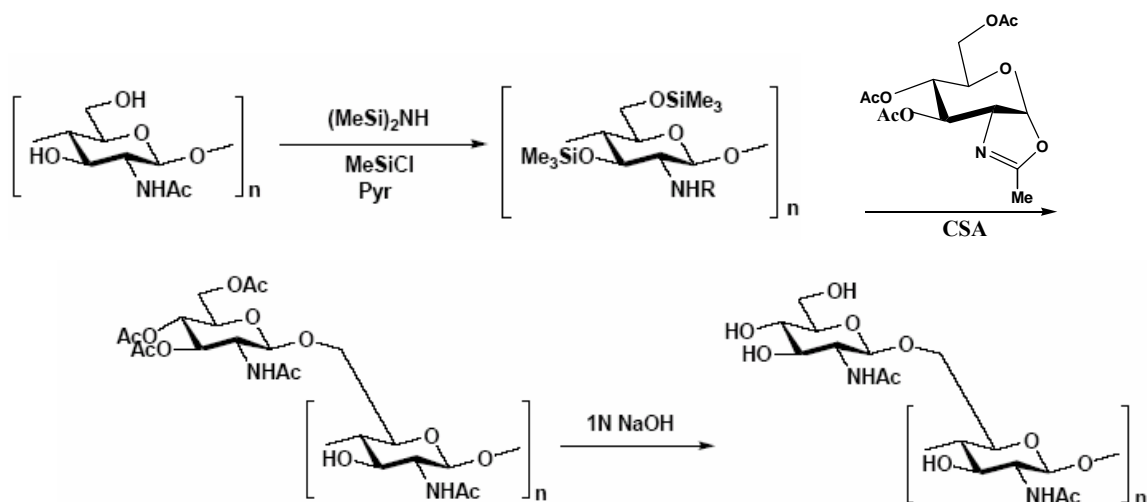


Scheme 14. Modified synthesis of phthaloyl chitosan.

## 2-4-2-5 Silylation

三甲基矽烷化幾丁聚醣因破壞了分子間的氫鍵，所以可溶於丙酮、吡啶或在其他有機溶劑中膨潤；而由於良好的溶解性加上矽烷基容易移除，故經常用其溶液來成膜或當作反應的前驅物。如將三甲基矽烷化幾丁聚醣以 10-樟腦硫酸 (10-camphorsulfonic acid) 當催化劑進行醣化改質 (glycosylation)，在羥基位置上導入具有藥物活性的多醣體，接著加鹼移除

氧-乙醯基的保護[54]。



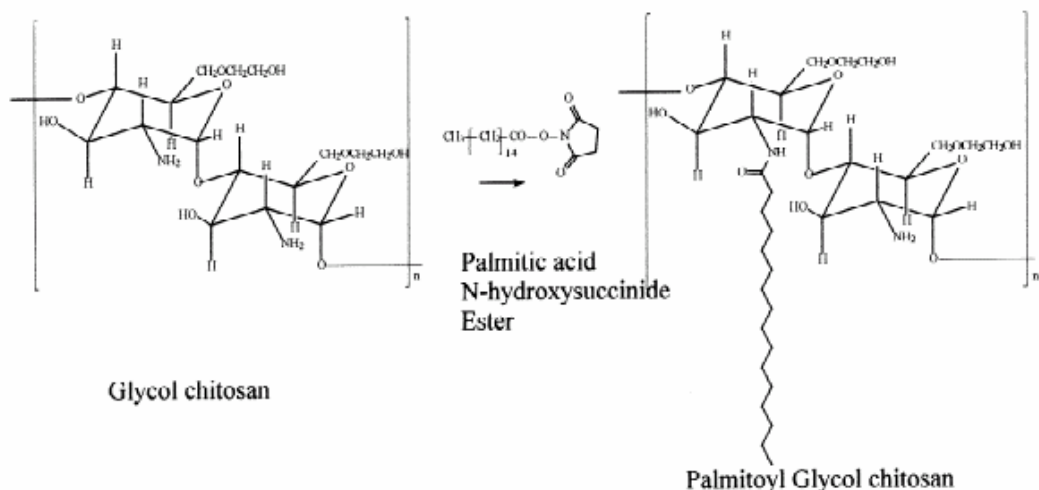
Scheme 15. Modified synthesis of silyl chitosan.

### 2-4-3 兩性幾丁聚醣

同時具有親水基/疏水基的兩性高分子材料是一直以來被商業與學術上所注意，低分子量的雙性高分子通常用來當乳化劑平衡油水性的界面。

#### 2-4-3-1 Palmitoyl glycol chitosan [55]

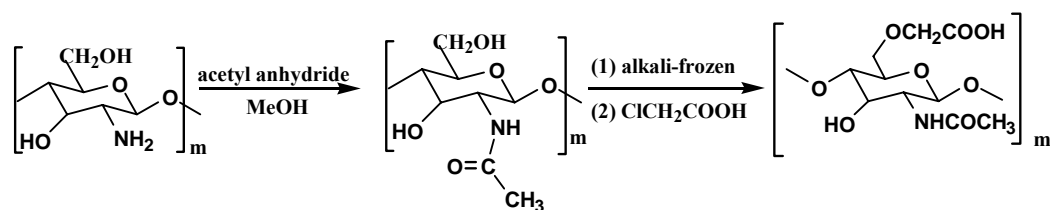
現在有人將兩性幾丁聚醣利用微胞這樣結構將疏水性藥物包覆在內，期望能安定油性藥物的 hydrophobic interaction，以微球形式攜帶藥物進入人體，達到藥物釋放控制[56]，特別是因含有疏水端的幾丁聚醣更易把油性藥物攜帶通過磷脂層進入細胞中 Martina [57]等人也是利用 palmitoyl glycol chitosan 包覆油性藥物。



Scheme 16. Synthesis of palmitoyl glycol chitosan.

### 2-4-3-2 Carboxymethylation of acetyl chitosan

Acetyl chitosan即是將幾丁聚醣乙醯化成chitin，carboxymethyl chitin是水溶性甲殼質衍生物，已成功應用來做藥物載體、攜帶免疫抗體、吸附鈣離子 [58-60]。Feng [61] 等人發現alkali-frozen方式將chitin浸置50%NaOH溶液-22℃下三天，可破壞chitin結晶使更能完全進入分子內部進行反應。

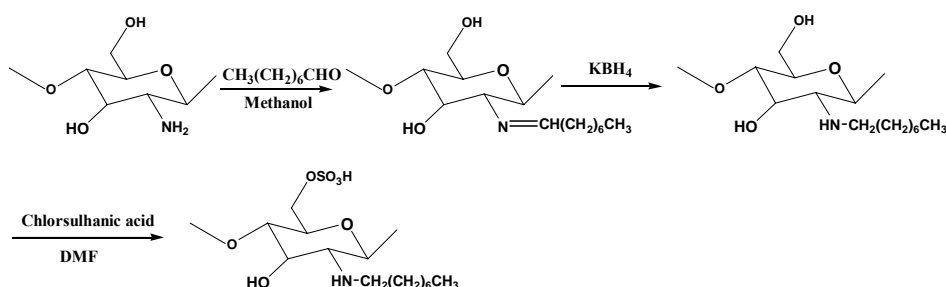


Scheme 17. Carboxymethylated reaction of acetyl chitosan.

### 2-4-3-3 N-alkyl-O-sulfate chitosan

Zhang [ 62]等將這樣的兩性幾丁聚醣衍生物製備成約100~400 nm大小的微胞，攜帶包覆疏水抗癌藥物紫杉醇。紫杉醇是由提煉出新型抗癌藥物，因不溶於水應用上一直受限於其溶解性問題，目前還未能找到對人體無毒

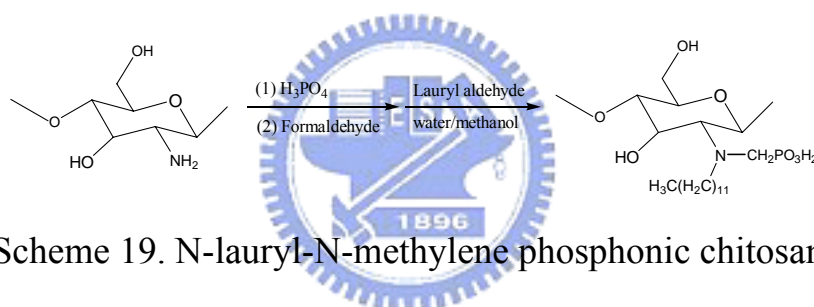
害又是對紫杉醇的很好溶劑



Scheme 18. Synthesis of N-alkyl-O-sulfate chitosan.

#### 2-4-3-4 N-lauryl-N-methylene phosphonic chitosan

Ramos, Rodri'guez [63]將原本水溶性N-methylene phosphonic chitosan又接枝上長鏈烷基以提供溶於有機溶劑，可做為乳化劑應用於醫藥及化妝品。



Scheme 19. N-lauryl-N-methylene phosphonic chitosan.

## 2-5 水膠

### 2-5-1 水膠的定義

最早的水膠是由Wichterle 與Lim [64]於1960 年所提出的PHEMA (poly( 2-hydroxyethyl methacrylate ))，由於其親水性與生物相容性，帶起日後人們對於水膠生醫發展潛力的興趣。Lim和Sun [65]成功地將藻酸鈣 (Calcium Alginate)應用在cell encapsulation；Yannas [66] 等人將膠原蛋白與鯊魚軟骨導入水膠中，作為治療燙傷的人工敷料。種種成功的案例促使人

們在開發新水膠方面的研究絡繹不絕，水膠種類也跟著日漸繁多，範圍橫跨人工合成親水性高分子與天然物。

水膠是指親水性的單體或高分子經化學或物理鍵結後，產生交聯現象 (Crosslinking) 進而形成3-D 網狀結構如Fig. 2-6所圖示，此類網狀結構高分子置於水中，不會崩塌溶解，反而吸水膨脹至一平衡狀態[67，68]如Fig. 2-7所圖示。

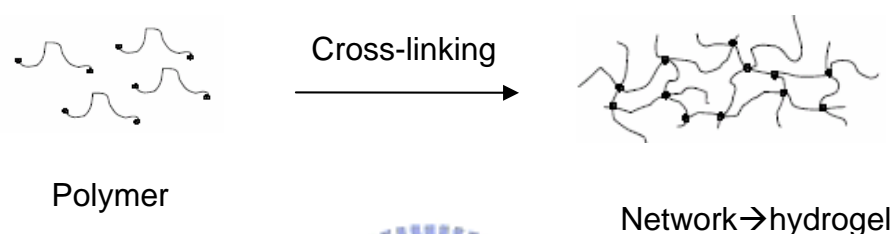


Fig.2-6 Crosslinked hydrogel.

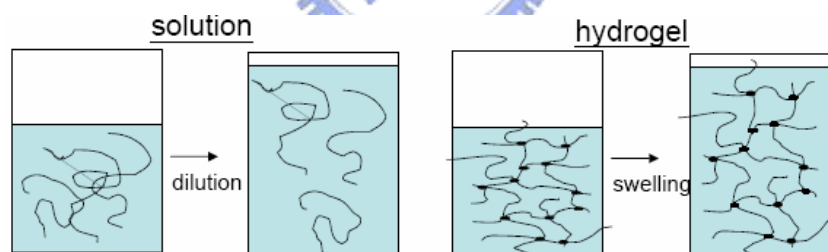


Fig.2-7 Hydrogels are insoluble network of polymer chains that swell in aqueous solution.

分子間作用力以網狀般纏繞糾結在一起或第二引力作用如離子鍵、氫鍵或疏水性鍵結的水膠，則稱為物理性或可逆性水膠。物理性水膠為非均一相，是由不同分子纏繞糾結的clusters、疏水性連結或離子力鍵結區域則產



生的水膠內有不均勻相。Alginate(褐藻酸鹽)其交聯作用力是來自於本身羧酸根與酸根鈣離子的靜電吸引力而成。

若是由交聯劑產生分子間共價鍵來維持網狀結構，則稱作化學性交聯所形成的水膠為化學性水膠(Chemical hydrogel)，如：PNIPAAm 水膠，便是以N,N'-methylenbisacrlamide (MBAAm)兩端的C=C 與NIPAAm 上C=C 反應，在分子鏈間形成共價鍵結。一般來說當吸水性高分子可吸水達原先乾燥狀態時總重20%以上即可被稱為水膠(Hydrogel)，若吸水量可達乾重時的20 倍以上，即可稱為超吸水性高分子[69]。

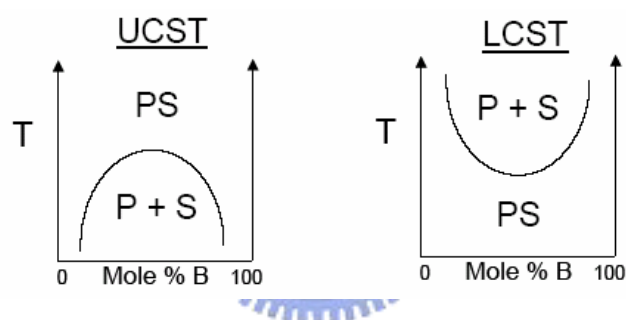
### 2-5-2 功能性水膠

水膠可以依外在環境的變化而可逆地改變本身的體積，根據不同物理與化學刺激可分為溫度敏感性、酸鹼敏感性、電敏感性、光敏感性、葡萄糖敏感性等。

#### 溫度敏感性材料：

溫度敏感性材料都帶有一個疏水基，如：甲基、異丙基等，疏水基會與材料中的親水基(或是氫鍵)競爭，當溫度較低時，水分子與高分子間有氫鍵作用，高分子可在水中完全展開形成均勻溶液，但當溫度高於LCST (lower critical solution temperature) 以上時，分子間氫鍵變弱，疏水基在水中聚集，使的高分子變成不溶於水中，產生渾濁不溶的現象，此類溫度敏感型分子

的LCST大多介於25~32°C，調整材料結構組成可以控制相轉移溫度與應答速度，其原因為當低溫時水膠的親水鏈段與水分子間的氫鍵作用力較強，所以能溶於水中，當溫度提升後水膠的疏水鏈段彼此間的作用力提高，而與水分子間的氫鍵變弱降低溶解性，如Fig. 2-8所圖示。若增加其親水鏈長會提高相轉移溫度，反之疏水基增多會降低；相較於原本無序排列吸水網狀結構，具有巨孔(Macroporous structure)與梳狀結構 (Comb-like structure) 溫感型水膠能夠更迅速地對環境做出應答。



PS = polymer solution

P + S = two-phase region: polymer-rich, polymer-poor

溫度敏感型高分子如三團聯共聚物poly-oxyethylene-polyoxypropylene-polyoxyethylene (PEO-PPO-PEO, Pluronics®)；PEG- PLGAPEG為兼具生物可分解性的溫感性材料；NIPAAm 為生物可相容性的溫感性材料 [70]。

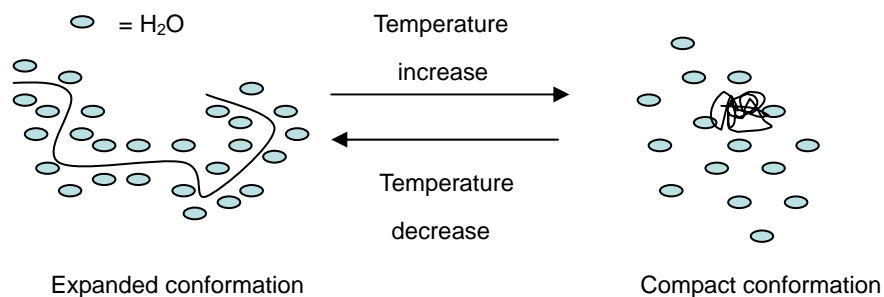


Fig.2-8 溫度敏感型高分子(PNIPAAm)可逆式型態變化圖

### 酸鹼敏感性水膠：

酸鹼敏感性水膠是利用水膠周遭環境中pH值的變化來控制水膠體積變化，此類材料上必帶有一酸基或是鹼基，可以接受或是放出質( $H^+$ )，如聚甲基丙烯酸(Polymethacrylic acid, PMA)與聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)的接枝共聚物，當共聚物處於低pH值環境時，PMA與PEG之間形成氫鍵，使的水膠體積收縮，高pH值時，PMA上的質子放出形成離子化，造成分子間氫鍵消失體積會變大[71]。

### 電致動高分子：

當高分子被施加一個電場於其上便產生形變彎曲，即可稱之為電致動高分子(Electroactive polymer, EAP)，目前對於此類形變仍未有一個完整理論，但普遍認為導致電致動高分子形變是來自於電場誘發的離子移動，更具體的說，是溶液中離子移動令高分子兩側產生滲透壓差，此滲透壓差造成高分子兩側膨潤程度不同，使高分子水膠本身產生彎曲現象(如圖2-3 所

示)。Kim [72]使聚丙二醇(Polypropylene glycol, PPG)與聚丙烯酸(Polyacrylic acid, PAA)形成電敏感性互穿式網狀結構高分子(Interpenetrating polymer network, IPN)，在0.6wt% NaCl(aq)時有最大彎曲角度與彎曲速度，此水膠有發展類肌肉組織收縮結構、電控式藥物釋放的潛力。

### 光敏感性高分子：

光敏感性高分子顧名思義就是會對光產生應答的高分子，此類高分子經過光照後轉換光能為機械能而產生形變，根據Irie [73] 的研究指出，帶有leucocyanides 的棒狀聚丙醯胺水膠，經UV 光照射後會膨脹，若放置黑暗處則會回復至原先尺寸，若照光時再施加電場於水膠上，水膠負極面會膨脹的比正極面多，造成水膠雖然不移動，但是會彎向負極，照光所產生水膠應答現象可由leucocyanides的光分解解釋，當leucocyanides 照光後會分解出CN<sup>-</sup>，此舉會造成水膠內外滲透壓差異與高分子鏈間正電荷排斥，使已達平衡水膠再度吸水，而且外加電場則會造成CN<sup>-</sup>移動，令CN<sup>-</sup>靠向正極，相較於排斥力較小的水膠正極面，負極面由於高分子鏈上大量正電荷會彼此排斥，故水膠負極面會澎潤程度較大，水膠進而彎向負極。

### 葡萄糖敏感性高分子：

葡萄糖敏感性高分子開發目的是在於控制胰島素在糖尿病患者體內釋放的速度與劑量，以往胰島素注射不容易掌控到人體實際需要的劑量，容易

有過量的情形，導致患者血糖含量嚴重下降，所以如果能夠應用葡萄糖敏感性分子到糖尿病療法上，控制胰島素的釋放，這樣對病人而言不僅省時省力，也可減少治療的風險，Matsumoto [74] 等人令帶有低pKa {4-(1,6-dioxo-2,5-diaza-7-oxamyl)phenylboronic acid, DDOPBA} 與 NIPAAm 或 N-isopropylmethacrylamide (NIPMAAm) 行共聚合反應生成一具有葡萄糖與pH敏感性高分子，DDOPBA可與葡萄糖上的雙醇官能基形成可逆的共價鍵錯合物，當葡萄糖濃度上升，使帶有負電硼酸錯合物增多，此錯合物相較於先前中性DDOPBA具有更高親水性，而且帶有負電高分子水膠亦會誘發正離子流動造成滲透壓增加，使得水膠膨潤變大釋放胰島素，反之則萎縮變小停止釋放藥物；單從LCST來看，葡萄糖存在會產生高親水性的硼酸錯合物，使共聚物親水性較先前中性狀態時更高，LCST會隨親水性提升而提升，故LCST會因為加入葡萄糖而升高，以含有18.4 M 硼酸根共聚物 PNIPM-D-18.4 為例，在pH=7.4時，加入葡萄糖會使PNIPM-D-18.4的LCST從22°C 升到34°C。

### 2-5-3 水膠之應用

組織工程是一種結合細胞、基材、特定生長因子的新興醫學技術，這項技術被認為能夠有效地解決器官來源短缺的問題，還能避免捐贈者與病患間的免疫排斥問題，使眾多病人從病痛中解脫，最終將使人類壽命突破以

往的侷限。

基材是組織工程三要素之一，沒有基材輔助，細胞無論是在體內或體外培養都只會分裂增生而不會形成所需的立體組織。而基材本身所具有的物理性質(如：降解性、孔隙度、機械強度)及生物表現性質(細胞貼附性與生物相容性)都會影響基材的適用與否。與基材適用性相關的決定要素中，以生物相容性最為重要，持續引起發炎反應的基材既不適用於細胞培養，更遑論後續組織的生成，合成高分子容易引起人體排斥，在使用上較天然高分子受限；基材降解性必須配合所需組織生長速率，理想狀態下基材能夠適時地分解產生孔洞，讓細胞逐漸進駐，待基材完全分解，即生成全新組織取代患部；從機械強度方面來看，基材需維持一定的空間形狀供細胞增生與組織發展，而且細胞貼附與基因表現也會跟基材的機械強度有關；細胞貼附會影響到細胞增生、轉移與分化，而基材與細胞間的互動又與細胞貼附息息相關，對於與細胞間互動性低的基材，可導入具生物活性分子，增進基材與細胞間的互動。目前開發作組織工程細胞培養用的水膠種類很多，主要可分作三類：(I)人工合成高分子水膠(II)天然高分子水膠(III)人工與天然高分子共聚物[67, 75, 76]。水膠擁有許多適用作組織工程基材的優點：

- (1) 高含水量：膨潤水膠內部的含水通道可供養分、廢物及特定分子傳輸。
- (2) 水溶液環境：與生物組織環境相仿，有利於細胞、DNA、蛋白質及藥物



保存。

- (3) 生物相容性佳：人體排斥反應低，不易發炎。
- (4) 易於化學改質：可接上特定細胞活性分子(如：RGD-peptide.)增進基材適用性。
- (5) Minimally invasive application：將溶液狀水膠注入患部，再經離子、溫度及光等刺激，即可在體內形成固態水膠，不需繁瑣的外科手術。水膠的技術從Whichterle 到現在累積了許多經驗與技術，可是水膠仍存在一些有待改進的缺點，如：機械強度弱不易使用、不易消毒滅菌，這些缺點將會是未來努力的重點。



### 第三章 實驗方法

#### 3-1 藥品

1. 幾丁聚醣(chitosan)     $MW=21$  萬，去乙醯度=91.3%，誠麗實業股份有限公司。
2. 異丙醇(isopropanol)     $CH_3CH_2OHCH_3$ ,  $FW=61$ ，ACS grade，TEDIA。
3. 氫氧化鈉(sodium hydroxide)     $NaOH$ ， $FW=40$ ，SHOWA。
4. 氯乙酸(chloroacetic acid)     $ClCH_2COOH$ ， $FW=94.5$ ，J.T Baker。
5. 甲醇(methanol)     $CH_3OH$ ,  $FW=32$ ，ACS grade，TEDIA。
6. 乙酸酐(acetic anhydride)     $(CH_3CO)_2O$ ， $FW=102.09$ ，100% purity，ACROS。
7. 己酸酐(hexanoic anhydride)     $(CH_3(CH_2)_4CO)_2O$ ,  $FW=214.31$ , 99% purity，ACROS。
8. 乙酸(acetic acid)     $CH_3COOH$ ， $FW=60$ ，99.9% purity，Riedel-deHaën。
9. 乙醇(ethanol)     $CH_3CH_2OH$ ， $FW=46$ ，ACS grade，TEDIA。
10. 氯仿(chloroform)     $CHCl_3$ ,  $FW=119.5$ ，ACS grade，TEDIA。
11. 吡啶(pyridine)     $C_5H_5N$ ,  $FW=79.1$ ，anhydrous，TEDIA。
12. 五氧化二磷(phosphorus pentoxide)     $P_2O_5$ ， $FW=141.94$ ，ACS reagent，

98.0% purity , powder , Aldrich 。

13. 氫化鈣(calcium hydride)  $\text{CaH}_2$  , FW=42.09 , powder , 99.99% purity , Aldrich 。

14. 己醯氯(hexanoyl chloride)  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COCl}$  , FW=134 , 97% purity , Aldrich 。

15. 二氯甲烷(dichloromethane)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  , FW=97 , ACS grade , Riedel-de Haën 。

16. 氫氯酸(hydrochloric acid)  $\text{HCl}$  , FW=36.46 , 37% aqueous , Riedel-de Haën 。

17. 甲磺酸(methanesulfonic acid)  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$  , FW=96.11 , 98% purity , Lancaster 。



18. 碳酸氫鈉(sodium hydrogencarbonate)  $\text{NaHCO}_3$  , FW=84.01 , Aldrich 。

19. 透析膜(dialysis tubing cellulose membrane) avg. flat width 33 mm (1.3 in.) , Retains>90% of cytochrome C (M.W. 12,400) in solution over a 10-hour period , Sigma 。

20. 硫酸胺(ammonium sulfate)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  , FW=132.14 , SHOWA 。

21. silica gel 230~400mesh 。

22. Buffer solution pH7 , TEDIA 。

23. Buffer solution pH10 , Riedel-de Haën 。

24. Deuterium oxide 99.9%D     $\text{D}_2\text{O}$  , Aldrich .
25. Chloroform-D 99.8%D     $\text{CDCl}_3$  , Aldrich .
26. Trifluoroacetic acid-D     $\text{CF}_3\text{COOD}$  , Aldrich .
27. 碳酸鉀(potassium carbonate)     $\text{K}_2\text{CO}_3$  , FW= 138.21 , ACS,    Scharlau .
28. 氯化銅(copper(II) chloride)     $\text{CuCl}_2$  , FW=134.45 , SHOWA .
29. Genipin , FW=226 , 嘉年生化科技 .
30. Buffer solution    pH4 , Riedel-de Haën .
40. Buffer solution    pH1 , TEDIA .
41. Buffer solution    pH6 , Riedel-de Haën .
42. Albumin bovine serum(BSA)    98% purity , Sigma .
43. Palmitic anhydride     $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})_2\text{O}$  , FW=494.83 , TCI .

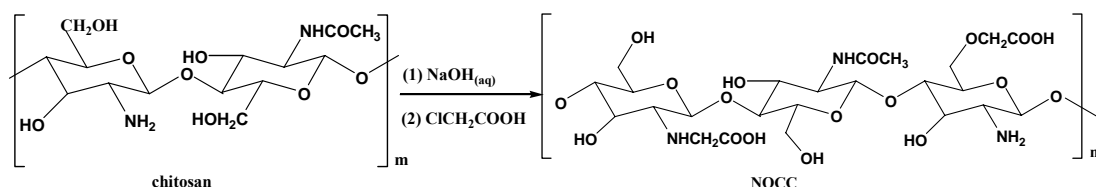
### 3-2 儀器設備

1. 紫外-可見光光譜儀(UV-Vis):Metertech UV/Vis SP8001
2. 傅立葉紅外光譜儀 (FTIR): Nicolet PROTE'GE'<sup>TM</sup> 460 MAGNA TECHNOLOGY
3. 全反射傅立葉紅外光譜儀(FTIR-ATR): 加拿大Bomem, DA8.3
4. 高磁場核磁共振光譜儀 (NMR): VARIAN UNITYINOVA 500  
NMR SPECTROMETER ;  
VARIAN UNITYINOVA 300  
NMR SPECTROMETER
5. 熱重分析儀器(TGA): TA Instrument TGA Q500
6. 示差掃描熱卡分析儀(DSC): Perkin Elmer Diamond DSC
7. 微拉力機(MTS): MTS Tytron<sup>TM</sup> 250
8. 場發射掃描式電子顯微鏡(FESEM): JSM-6500F
9. 恆溫震盪培養箱: YIH DER TU-400 orbital shaker incubator
10. 低溫培養烘箱: YEONG SHIN DB45
11. 細胞超音波碎質機: Cole-Parmer 500-Watt Ultrasonic processors
12. 數字式厚薄計: Mitutoyo 543-128F5
13. 數字式溫溼度計: Matsutek HTM-120CK
14. 數字式游標尺: Mitutoyo 500-171
15. 偏光顯微鏡:OLYMPUS

### 3-3 改質幾丁聚醣

#### 3-3-1 親水性幾丁聚醣合成

#### ◆ Synthesis of N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC)



(a)

1. 在 250 ml 單頸圓底瓶中放入 5g chitosan，加入 50 ml 異丙醇攪拌 30 min，呈懸浮溶液。
2. 加入 12.5 ml 的 10 N NaOH(aq)，要分成五等份一次 2.5 ml 每隔五分鐘分別加入反應瓶中。
3. 固定氫氧化鈉濃度下加入不同當量濃度氯乙酸：  
而後攪拌三十分鐘後，再將 25 g(或 7 g)氯乙酸分五等份在五分鐘之內倒入瓶中。
4. 油浴加熱至 60°C。
5. 4 小時後待冷卻以抽氣過濾方式收集產物，以水/甲醇(體積比 1:9)把產物邊過濾邊洗淨。
6. 在 65°C 烘箱乾燥 24 小時，產物成淡白色粉末，可溶於水。
7. 與 7 g 氯乙酸反應得到的產物為 NOCC-1。

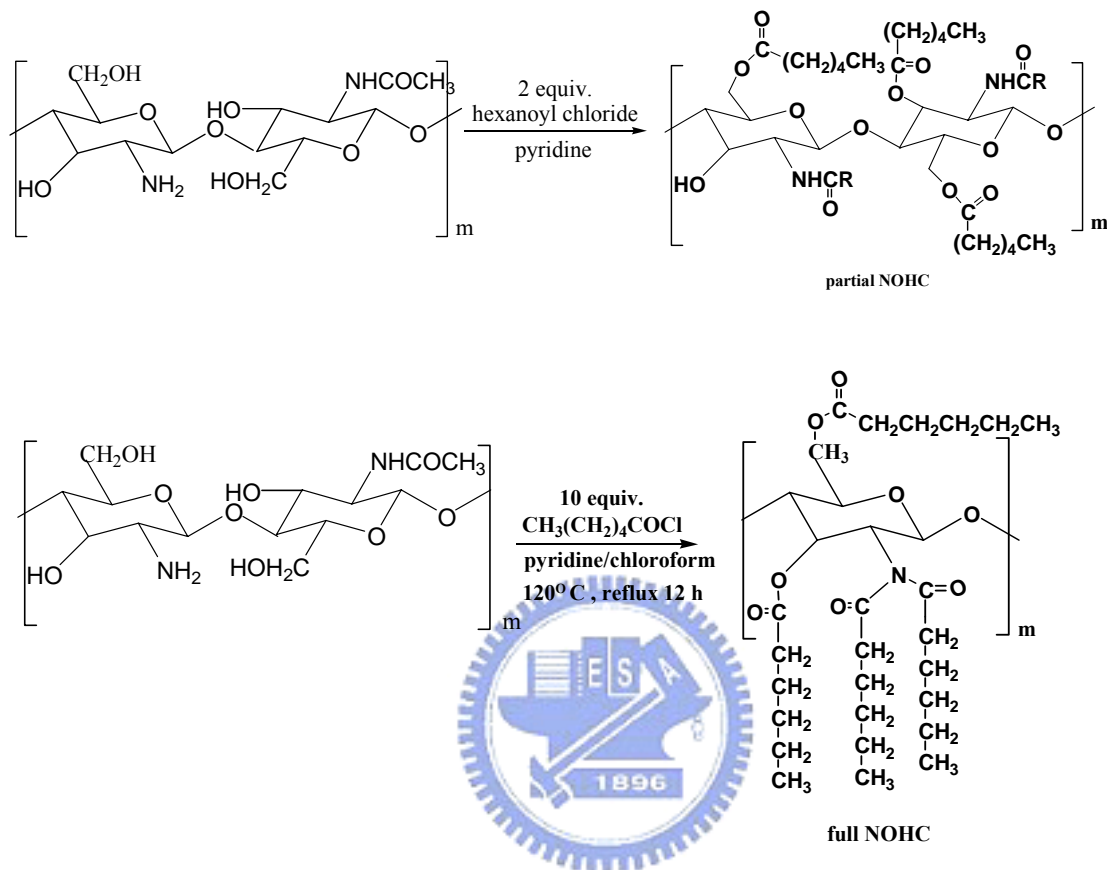
(b)

1. NOCC 的合成步驟已在論文[77,78]有詳細說明。在 250 ml 單頸圓底瓶中放入 5g chitosan(白色粉末)，加入 50 ml 異丙醇攪拌 30 min，呈懸浮溶液。
2. 兩種氫氧化鈉濃度的變數被加入：  
加入 12.5 ml 的不同濃度的 10 N(或 13.3 N) NaOH(aq)，要分成五等份一次 2.5 ml 每隔五分鐘分別加入反應瓶中。整個過程是非均相反應，幾丁聚醣因氫氧化鈉的加入變得有點膨潤糊狀，會讓更易進入分子內部反應，同時拔去 -OH、-NH<sub>2</sub> 上的 H 來加速反應。Xi-Guang Chen, Hyun-Jin Park [79] 提到當氫氧化鈉和異丙醇的體積比 1:4 時可達最高的產率。
3. 而後攪拌三十分鐘後，再將 25 g 氯乙酸分五等份在五分鐘之內加入。
4. 油浴加熱至 60°C。
5. 4 小時後待冷卻以抽氣過濾方式收集產物，以水/甲醇(體積比 1:9)把產物邊過濾邊洗淨。
6. 在 65°C 烘箱乾燥 24 小時，產物成淡黃色粉末，可溶於水。
7. 低羧甲基酸接枝率的命名為 NOCC-2；高羧甲基酸接枝率的命名為 NOCC-3。



### 3-3-2 油性幾丁聚醣合成

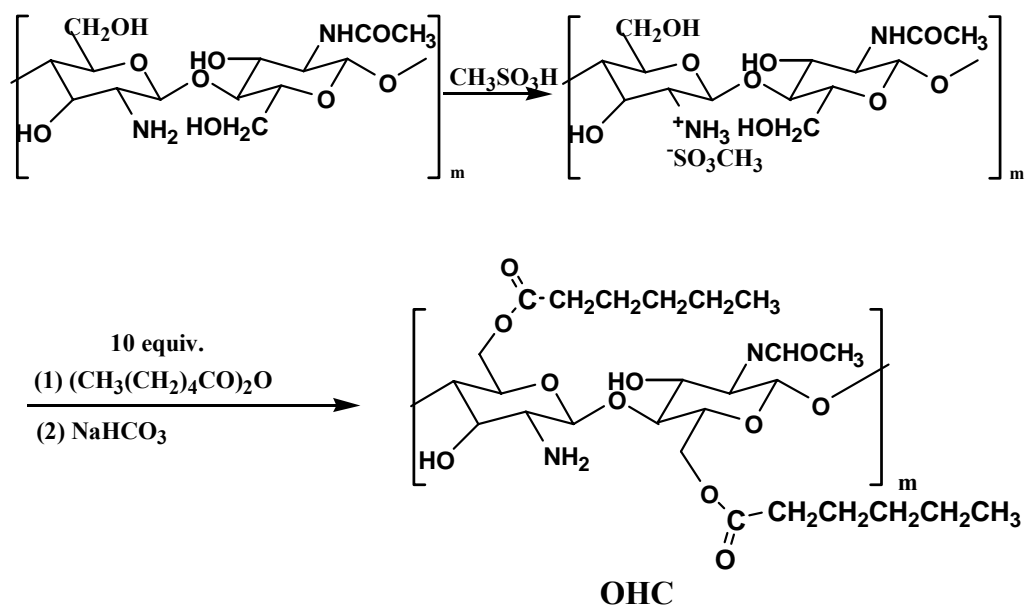
#### ◆ Synthesis of N,O-hexanoyl chitosan



- 實驗步驟根據Zong等人在2000年發表論文中提及acylated chitosan做法[80]。pyridine及chloroform事先分別添加以 $\text{CaH}_2$ 、 $\text{P}_2\text{O}_5$ 完全攪拌除水一天，再將溶劑通氮氣下蒸餾冷凝出來密封放在乾燥箱保存。
- 取一個 500 ml 三頸圓底瓶內置一磁石，秤取 3.2g chitosan 放入瓶中，在氮氣下抽取 45ml pyridine 注入瓶後浸置一星期。
- 一星期後將上述 2.的反應瓶以玻璃針筒注入 90 ml chloroform，攪拌一天。整個實驗過程都要在氮氣下，水氣存在會讓實驗失敗。

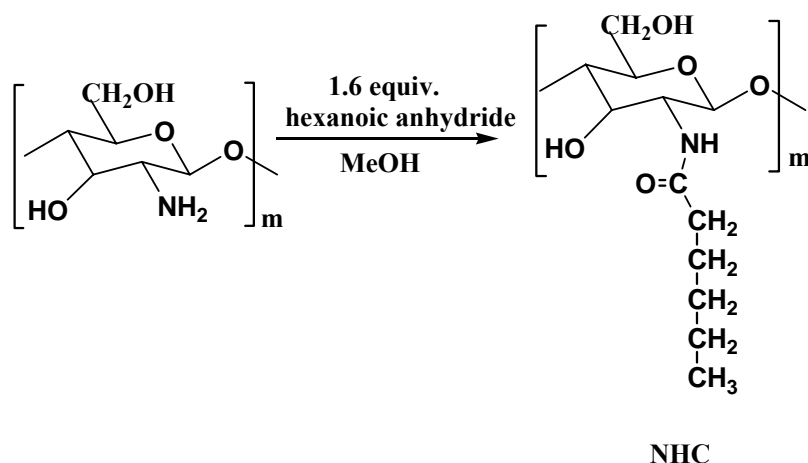
4. 在冰鹽浴下約-10~-22°C下以很慢速率慢慢滴入不同當量濃度 hexanoyl chloride (97% purity, 約 30 ml, 10 equiv.; 約 6.6 ml, 2.2 equiv.), 需時約三十分鐘。此時會大量放熱冒煙要很小心, 整個溶液會因 hexanoyl chloride 添加量逐漸增加而逐漸由橘色變深褐色。等白煙不在出現就可移除冰浴。
5. 室溫下攪拌二小時。
6. 然後氮氣下油浴加熱迴流至 115°C 穩定反應 8 小時。
7. 等溫度冷卻後冰浴下在反應溶液中加入大量 300ml 冰甲醇, 會有黃色產物析出。
8. 抽氣過濾收集產物, 以甲醇洗淨。再將產物以二氯甲烷溶解, 又加入大量甲醇析出產物, 再次過濾洗淨, 期望去除雜質。
9. 而後產物又以索氏脂肪連續萃取器連續以甲醇洗淨一天。
10. 產物在 70°C 烘箱中烘乾。
11. 如此又再從步驟 1. 按步操作, 重複 3~4 次直到產物能完全溶解於 chloroform, 產物呈黃色, 命名為 full NOHC; 但添加 2.2 當量濃度 hexanoyl chloride 的反應只需做一次 cycle, 命名為 partial NOHC。

## ◆ Synthesis of O-hexanoyl chitosan (OHC) [81]



1. 取2 g chitosan置入250 ml反應器中，滴入40 ml甲磺酸，室溫下均勻攪拌至呈現黃褐色均勻相，約一小時。再滴入28.64 ml hexanoyl anhydride(98% purity, 10 equiv.)，在60℃下反應六小時。
2. 反應時間結束後，加入約50克的冰塊終止反應。將反應物在流動水中透析三天，移除己醯酸及甲磺酸。
3. 然後使用濃度為1N的氫氧化鈉水溶液進行中和，利用變色範圍為pH=1~14的石蕊試紙來進行測定，將反應物滴定至pH=7的終點。  
中和完畢之後，過濾出沈澱物，再將沈澱物置入二次水中透析一天天以移除殘留酸及離子。
4. 過濾出產物放入烘箱乾燥至少二天，再取出保存於乾燥箱中。

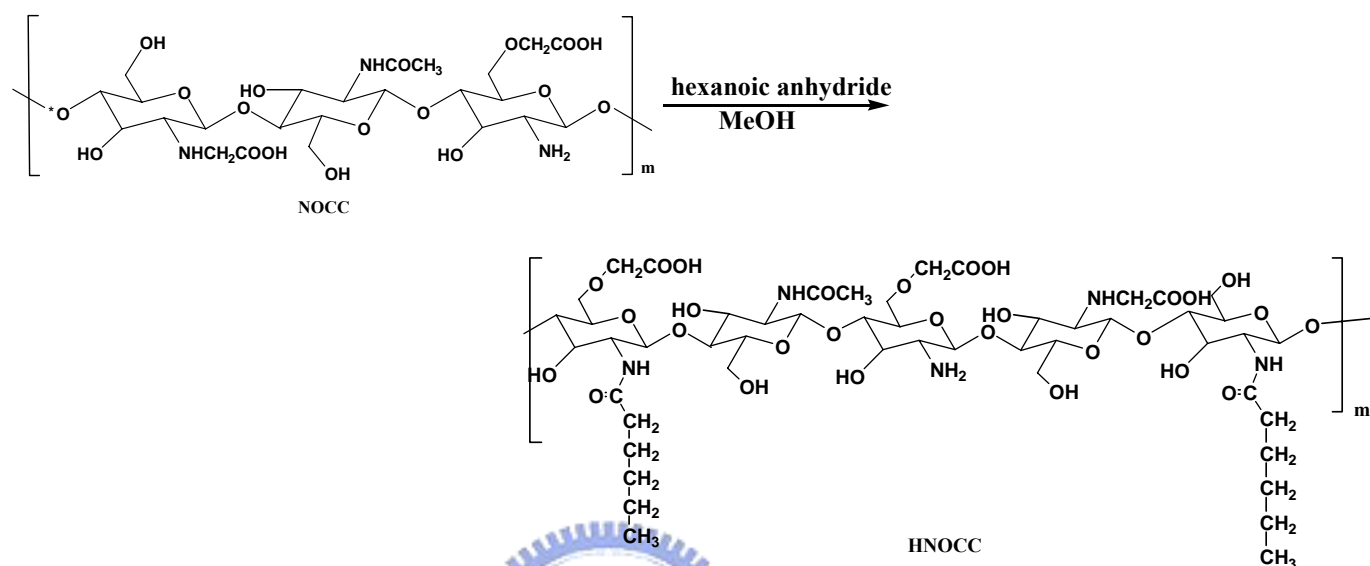
◆ Synthesis of N-hexanoyl chitosan (NHC)



1. 根據[82]中所描述，取 3 g chitosan 溶於 150 ml 1%醋酸水溶液，加入 150 ml 甲醇混合均勻。
2. 加入 5.6 ml hexanoyl anhydride(98% purity, 1.3 equiv.)，攪拌一陣子即變成不透明 gel 果凍狀，這是因溶解度變差關係。加熱至 40℃反應 4 小時。
3. 以氫氧化鈉水溶液中中和後，又以乙醇萃取出過量未反應的 hexanoyl anhydride。再以純水透析三天。
4. 抽氣過濾產物，以乙醇洗淨後，在 70℃烘箱乾燥。
5. 所得產物 NHC 材料堅硬。

### 3-3-3 兩性幾丁聚醣合成

#### ◆ Synthesis of Hexanotlated NOCC (HNOCC)



1. 分別取 2 g 兩種不同羧甲酸基接枝率的 NOCC 於 150 ml 反應瓶，內置一磁石，添加 50 ml 純水完全攪拌溶解一天。
2. 加入 50 ml 甲醇混合均勻後，再加入不同當量濃度的 hexanoyl anhydride (99% purity, 約 0.7 ml, 0.3 eqive.; 約 1.4 ml, 0.5 eqive.)，在不同反應時間條件的控制上，分別為六小時與十二小時。
3. Hexanoyl anhydride 雖會與所使用的溶劑水、醇類反應，但與幾丁聚醣上的胺基反應速率較快。
4. 而後反應溶液以透析袋收集，對純水和乙醇混合液(1:4)透析一天去除酸及離子，再以純乙醇透析一天。
5. 產物可完全溶於純水溶液及水/乙醇(2:3, v:v)混合溶液。

### 3-4 代號命名及膜的製備

#### 代號命名

對不同羧甲基酸接枝量和己醯基接枝率的幾丁聚醣衍生物簡化名稱，之後將以代號命名代表不同種的幾丁聚醣衍生物。

Table 1. Degree of the substitutions of carboxymethyl groups and hexanoyl groups on nitrogen and oxygen.

	DS		DH		FW.
	N-	O-	N-	O-	
Chitosan	0	0	0	0	165.654
NOCC-1	0.070	0	0	0	169.644
NOCC-2	0.157	0.159	0	0	183.894
HNOCC-2A	0.157	0.159	0.259	0	209.374
HNOCC-2B	0.157	0.159	0.441	0	227.014
NOCC-3	0.246	0.251	0	0	194.154
HNOCC-3A	0.246	0.251	0.232	0	216.658
HNOCC-3B	0.246	0.251	0.445	0	237.319
Full NOHC	0	0	2	2	541.879
Partial NOHC	0	0	0.896	0.773	358.654
NHC	0	0	0.861	0	240.344
OHC	0	0	0	0.920	253.894

#### 膜的製備

##### (A) 未交聯過薄膜

將 chitosan 溶於 0.5% (v/v) 乙酸水溶液以配置成 1.3% (w/v) 的幾丁聚醣溶液，取約 18.27 g 的上述幾丁聚醣溶液倒入直徑 9 cm 塑膠培養皿，在通風處靜置一天後換置到 50°C 烘箱中直達乾燥成膜，自皿中輕輕取下成膜的試樣以備之後量測材料性質使用；而其他化學改質而成的衍生物也同樣配置成 1.3% (w/v) 水溶液，並在直徑 9 cm 塑膠培養皿乾燥成膜，可得具強度的



黃色半透明薄膜，膜厚約 0.076 mm。

## (B) 水膠

將 chitosan 溶於 0.5% (v/v) 乙酸水溶液以配置成 1.3% (w/v) 的幾丁聚醣溶液，取約 2.763 g 的上述幾丁聚醣溶液，接著與 1% (w/v) genipin 水溶液混合使(chitosan 單體 mole : genipin mole=1 : 300)，之後倒入直徑 3.5 cm 塑膠培養皿並密封緊閉，放進 50°C 烘箱中進行交聯反應二天，再在 50°C 烘箱中乾燥成膜，自皿中輕輕取下成膜的試樣以備之後量測膨潤度使用；而其他化學改質而成的衍生物也同樣配置成 1.3% (w/v) 水溶液，並在直徑 3.5 cm 塑膠培養皿交聯成膜，可得具強度的淡藍色半透明薄膜，膜厚約 0.076 mm，保存於乾燥箱。



## 3-5 攜藥水膠的製備

### 3-5-1 膨潤度測試

欲了解不同水膠在不同酸鹼環境下膨潤度的差異及變化。

#### 膨潤度測試

把將上述 3-4 小節製備所得之不同種交聯過水膠置放進不同 pH 值的緩衝溶液(pH=1、pH=4、pH=6、pH=7、pH=10)，經歷平衡一天後將水膠拿出，以吸水紙吸去水交表面多餘的水，精確量秤水膠溼重。

### 3-5-2 Ibuprofen 釋放實驗

欲了解不同水膠包覆油性藥物 ibuprofen 後，在 PBS 緩衝液(pH=7)的生理環境下 ibuprofen 釋放情形。

#### (A) 製備水膠

將化學改質而成的衍生物配置成 1.3% (w/v)水溶液，加入預先準備 ibuprofen 水溶液，使 ibuprofen 在總溶液中濃度達 1.2 mg/ml 並加熱至 60°C 攪拌，以期 ibuprofen 完全溶解，文獻上 ibuprofen 在 pH=1.4 下的飽和濃度為 0.036 mg/ml，pH=7.4 下的飽和濃度為 6.14 mg/ml。接著與 1% (w/v) genipin 水溶液混合使(chitosan 單體 mole : genipin mole=1 : 114)，之後倒入直徑 3.5 cm 塑膠培養皿並密封緊閉，放進 50°C 烘箱中進行交聯反應二天，再在 50°C 烘箱中乾燥成膜，自皿中輕輕取下成膜的試樣置入，保存於乾燥箱。

#### (B) Ibuprofen 釋放實驗

把將上述製備所得之不同種包覆 ibuprofen 的水膠置放進 20 ml PBS 緩衝液，固定時間間隔抽取釋放溶液，以 UV/Vis 光譜儀量測波長在 264.4 nm 之吸收值，再代入 ibuprofen 檢量線進而算出 ibuprofen 的釋放量。

Ibuprofen 蛋白質檢量線:

(1) 首先配製 ibuprofen 的 PBS 溶液之標準溶液 1.2 mg/ml，依數列稀釋方式得到 ibuprofen 溶液濃度為 0.6 mg/ml、0.3 mg/ml、0.15 mg/ml、0.075µg/ml。

(2) 分別取上述不同 ibuprofen 濃度的標準溶液利用 UV/Vis 光譜儀量測波長在 264.4 nm 之吸收值(以 PBS 為 blank)

(3) 將 UV 吸收值對 ibuprofen 溶液濃度做圖可得檢量線。

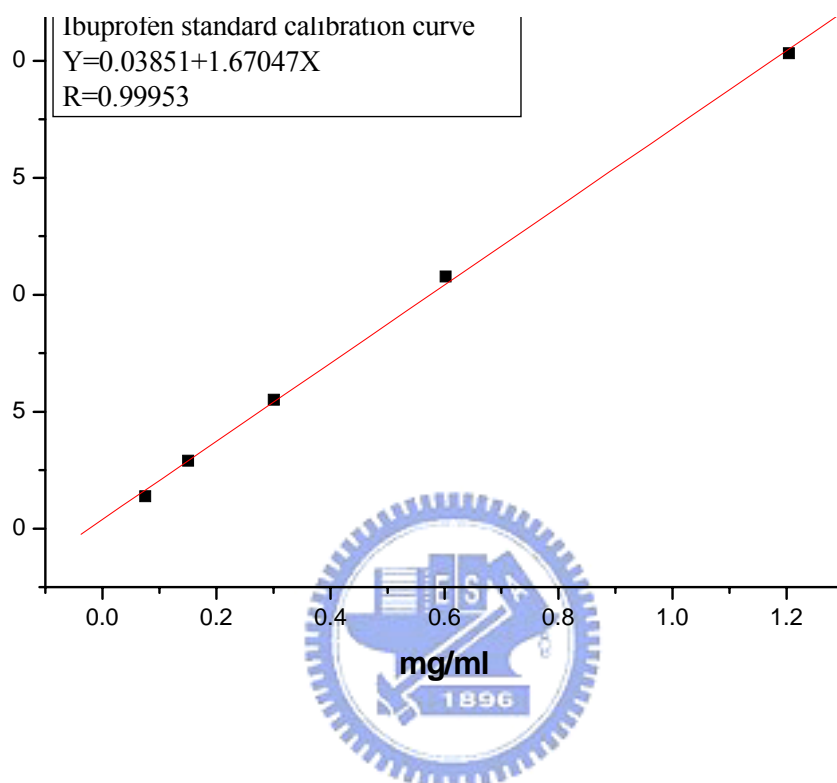


Fig.3-1 Ibuprofen standard calibration curve.

### 3-6 材料分析

#### 3-6-1 基本性質分析

##### 3-6-1-1 傅立葉紅外光譜(FTIR)

紅外線吸收光譜是種常見來鑑定各種有機或無機分子結構的方法，主要原理是不同型態的分子鍵結中，會造成不同的振動頻率，而產生特定頻率的紅外光吸收，可判斷樣品中具有哪些特殊的官能基。

目的:

以FTIR光譜鑑定分析合成出的幾丁聚醣衍生物之化學結構，及從中探討分析其氫鍵效應與計算己醯基接枝率。

方法:

將在烘箱乾燥一天過後試樣粉末與KBr混合研磨10分鐘以上，之後以直徑一公分的模具壓成厚度均勻半透光的鹽片。但某些樣品因不是粉狀亦不易研磨，必須將樣品溶液滴在事先壓好的純KBr鹽片上，再經完全乾燥後才能測量測穿透式FTIR。以純KBr鹽片做背景值，掃描次數48次，解析度4  $\text{cm}^{-1}$ 。掃描的波長範圍從400~ 4000  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 3-6-1-2 減弱全反射-傅立葉轉換紅外光譜儀 (FTIR-ATR)

一般是用在少量的薄膜、液態、氣態樣品或IR光無法穿透之樣品的定性分析。ATR的樣品測量的好處，主要來自於樣品測量的路徑較短或IR光進入樣品的滲透深度較小，如此才可控制IR的吸收值在適當的範圍，分析材料表面分子結構之振動行為。

目的:

幾丁聚醣衍生物所製作的薄膜雖呈淡黃半透明，但以一般FTIR做分析時大部分的紅外線皆被薄膜所吸收，造成吸收光強度超過偵測範圍，不易分別出薄膜中官能基變化的狀況。

方法:

將製備好的薄膜裁成大小約4 cm × 0.5 cm，掃描次數200次，解析度2 cm<sup>-1</sup>。掃描的波長範圍從400~4000 cm<sup>-1</sup>。

### 3-6-1-3 高磁場核磁共振光譜(NMR)

核磁共振光譜對於鑑定有機化合物的結構是相當有用的工具，可解析出不同化學環境的氫原子構。除了鑑定氫核外，會產生核自旋的<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>19</sup>F、<sup>31</sup>P 等元素也可藉由核磁共振光譜檢測出來，利用光譜中的化學位、主峰面積、自旋-自旋分裂(spin-spin splitting)、耦合常數(coupling constant)等，可用來鑑定有機化合物的結構、或做定量分析及化學動力學的研究。

目的:

利用高磁場核磁共振儀得到H<sup>1</sup>-NMR光譜，以鑑定分析幾丁聚糖衍生物化學結構，同時獲得特徵訊號之積分面積來計算羧基接枝量與己醯基接枝率。

### 3-6-1-4 熱重分析(TGA)

熱重力分析儀即是用來觀察試樣在不同溫度條件下，重量損失變化情況，所得數據可用來判斷高分子的裂解溫度、裂解速率、脫水量以及不同成分的差異。

目的:

量測幾丁聚糖衍生物的熱重損失，以判斷改質後產物的熱裂解溫度及熱

穩定性。

方法:

以 TGA 專用的白金坩鍋做重量歸零後，試樣置入白金坩鍋約 7 mg~18 mg，平衡氮氣流量 40.0 ml/min；樣品氮氣流量 60.0 ml/min；升溫範圍 36 ~900 ；升溫速率 10 /min。

### 3-6-1-5 微拉力機(MTS)

Tytron微拉力試驗機是MTS 公司專為測試微小位移與微小力量所開發之材料試驗機，由線性馬達驅動，可做靜態之拉伸或壓縮，也可進行動態之疲勞實驗。

目的:



利用微拉力儀對薄膜帶進行微拉力測試，以正向拉伸方式測試材料的強度，可得薄膜帶拉力與位移量的關係，藉此可以計算出應力與應變的關係。

方法:

將膜裁成3 mm×0.07 mm×40 mm的長條狀，長條膜的兩端以快乾膠黏上一小塊砂紙，在將膜兩端固定好在MTS夾具上，砂紙可讓膜確實固定夾好於夾具中，拉伸速率為30 mm/50 min。

### 3-6-2 含水材料分析

#### 3-6-2-1 示差掃描熱卡分析(DSC)



示差掃描熱卡儀所觀察的是高分子對溫度變化的吸放熱狀態。高分子在不同溫度下存在有玻璃態、彈態、液晶態等不同型態，在這些狀態轉換之際，會產生吸放熱的現象，藉由此儀器的觀察可得到試樣高分子的玻璃轉移溫度、熔點、比熱、轉化熱等資訊，對於高分子的應用上有相當大的幫助。

目的:

在這裡是要利用 DSC 掃描觀察含水高分子內部水分子的狀態，此外還要計算材料內部鍵結水的含量。

方法:

在 DSC 鋁製樣品盤中置入試樣約 3.5 mg~4.0 mg，分別滴入不同水量於上述樣品中，使材料達到有不同含水量，再確實秤重並紀錄所紀錄水量及乾樣品重量，以模具壓錠密封且保存於密封的樣品瓶中平衡一天。首先掃描溫度由 25 降至 60，在 60 平衡 10 分鐘後，以升溫速率 5 /min 掃描至 25；氮氣流量 20 ml/min。

### 3-6-2-2 吸水及持水能力

#### Moisture-absorption

將改質過產物薄膜在 65 烘箱以  $P_2O_5$  乾燥後，放入含有不同種鹽類過飽和溶液的密閉乾燥器，使膜暴露在 20 下不同相對濕度環境中經過 48 小時，再秤重計算吸水率。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的過飽合水溶液可使密閉環境達相對溼度 81% ； $\text{CuCl}_2$  的過飽合水溶液可使密閉環境達相對溼度 68% ； $\text{K}_2\text{CO}_3$  的過飽合水溶液可使密閉環境達相對溼度 43% 。

### Moisture retention

分別在以  $\text{P}_2\text{O}_5$  乾燥過的膜中加入相對膜重 10% 的純水並確實秤重。放入含有 silica gel 的乾燥器中在 20 °C 下長達 48 小時，再秤重計算持水率 。



## 第四章 化學合成反應條件對幾丁聚醣衍生物影響

### 4-1 親水性幾丁聚醣

#### 4-1-1 改變氫氧化鈉濃度對接枝率的影響

幾丁聚醣粉末在異丙醇溶劑中形成非均相懸浮溶液，為了加速反應而添加高濃度氫氧化鈉水溶液，幾丁聚醣變得有點膨潤糊狀且破壞了其結晶性，同時拔去幾丁聚醣上一級-OH、-NH<sub>2</sub>的 H 成為 Lewis base，這會使異丙醇及可溶於異丙醇的氯乙酸更易進入幾丁聚醣分子內部反應加速幾丁聚醣和氯乙酸反應，而氫氧化鈉溶液的濃度就是影響和氯乙酸反應程度的因素之一。



#### 4-1-1-1 化學結構鑑定與分析

##### 高磁場核磁共振光譜 H<sup>1</sup>-NMR

接枝在幾丁聚醣一級羥基及胺基上的 carboxymethyl group 可以 H<sup>1</sup>-NMR 光譜鑑定其 methylene (-CH<sub>2</sub>-COOH)部分，確定 N,O-carboxy- methyl chitosan 化學結構。Fig.4-1 是未改質前幾丁聚醣的 H<sup>1</sup>-NMR 光譜，圖中清楚分別標出每一個官能基的化學位移，所使用的溶劑 D<sub>2</sub>O 的參考化學位移在 4.67 ppm；在 1.88 ppm 訊號是由於殘留乙醯基 (-COCH<sub>3</sub>)；H<sub>2</sub>是在 3 ppm，在這根 peak 左邊還有一個 broad shoulder，這是胺基所造成的；醣的六元環上之 H<sub>3</sub>~H<sub>6</sub> 重疊夾雜出現在 3.25~4 ppm；H<sub>1</sub> 及 H<sub>1</sub>'分別大約在 4.9 ppm、5.13

ppm。

幾丁聚醣在不同氫氧化鈉濃度(37.7%、50%)下，分別和過量 25 g 氯乙酸反應所得產物為 NOCC-2、NOCC-3。Fig.4-2~3 分別是 NOCC-2、NOCC-3 的  $H^1$ -NMR 光譜，圖中清楚分別標出每一個官能基的化學位移，所使用的溶劑  $D_2O$  的參考化學位移在 4.67 ppm。N,O-carboxymethyl chitosan 化學結構因 carboxymethyl groups 同時會接在一級醇及胺基上， $H^1$ -NMR 光譜鑑定其 methylene ( $-CH_2-COOH$ )部分也會因氮、氧化學環境不同產生不同化學位移 methylene ( $-OCH_2COOH$ )化學位移在 4.4 ppm；methylene ( $-NCH_2COOH$ )在 4.2 ppm。還有幾丁聚醣本身醣環性質，在 1.88 ppm 訊號是由於殘留乙醯基( $-COCH_3$ )； $H_2$  是在 3 ppm，在這根 peak 左邊還有一個 broad shoulder，這是胺基所造成的；醣的六元環上之  $H_3\sim H_6$  重疊夾雜出現在 3.25~4 ppm。

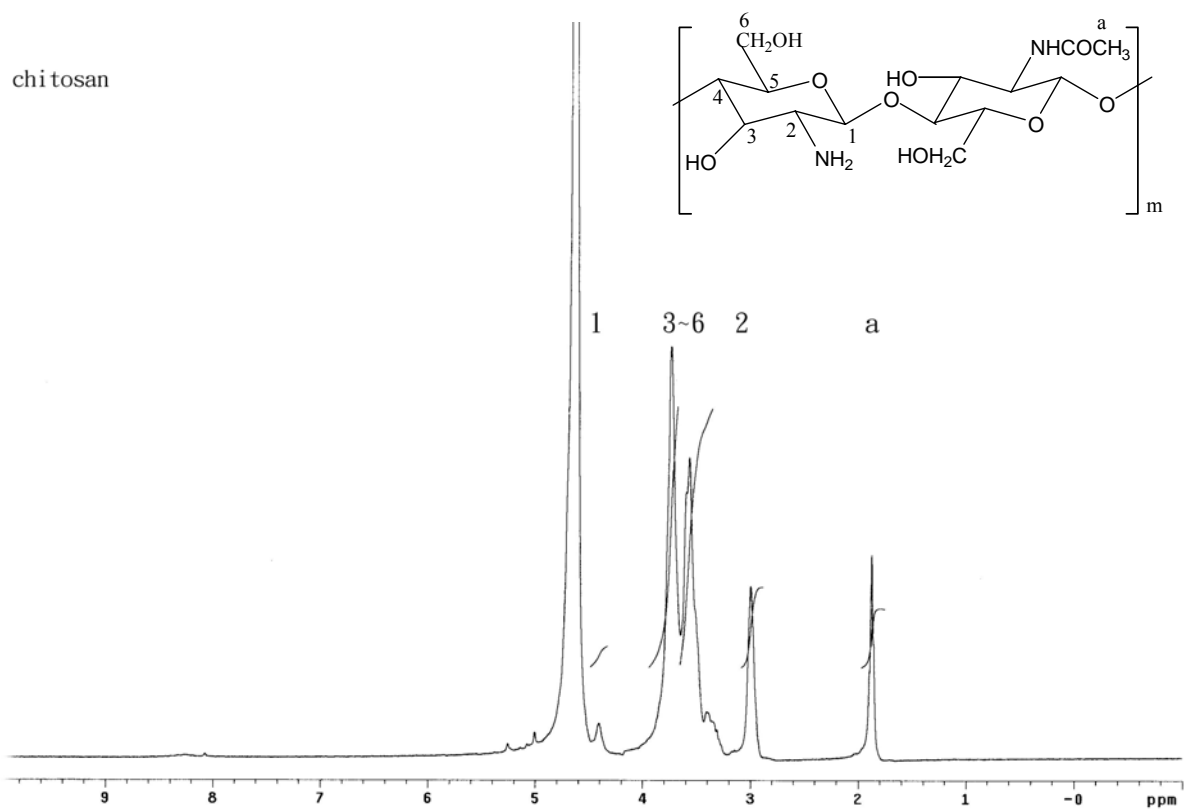


Fig. 4-1 <sup>1</sup>H NMR spectra of chitosan in D<sub>2</sub>O+F<sub>3</sub>CCOOD.

NOCC-2

Fig. 4-2 <sup>1</sup>H NMR spectra of NOCC-2 in D<sub>2</sub>O.

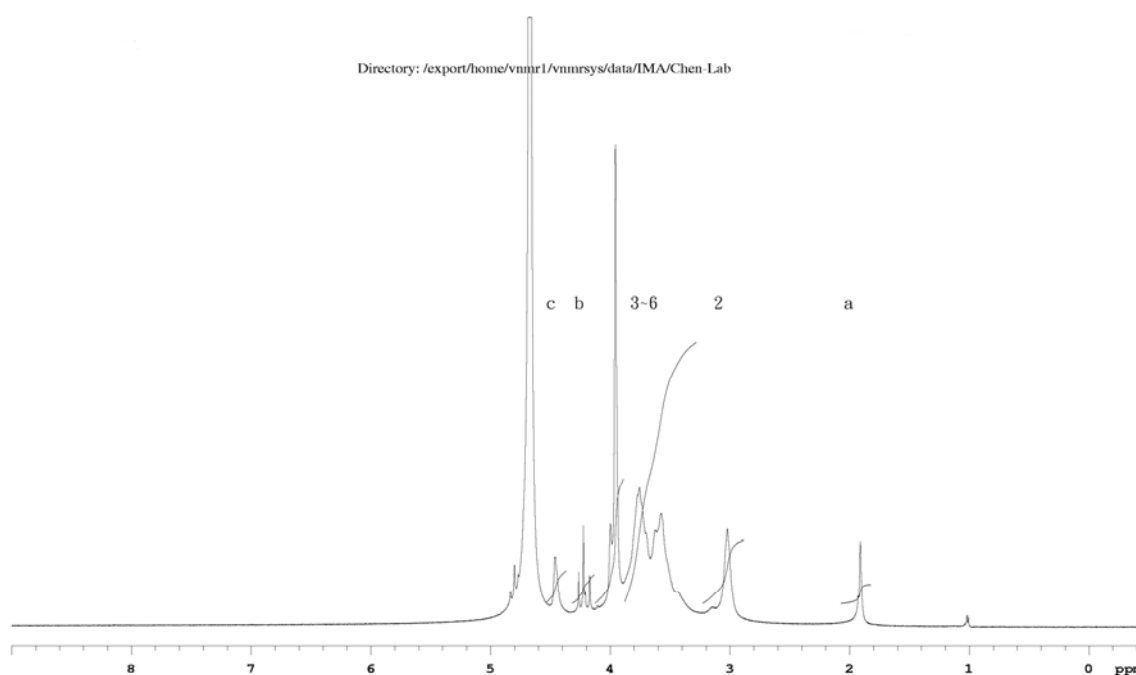


Fig. 4-3  $^1\text{H}$ -NMR spectra of NOCC-3 in  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 傅立葉紅外光譜FTIR

Fig.4-4 是 Chitosan 之 FTIR 光譜分析， $1029\text{ cm}^{-1}$ (C-O stretching，出現  $\text{C}_6$  上一級醇的 -C-OH 吸收峰)； $1085\text{ cm}^{-1}$ (C-O stretching，出現  $\text{C}_3$  上二級醇的 -C-OH 吸收峰)； $1420\text{ cm}^{-1}$  (C-O-H bending)； $1135\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C asymmetry)； $1385\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}_2$  上乙醯的 amide III (-N-C=O))； $1325\text{ cm}^{-1}$ ( $\text{C}_2$  連接胺基的 C-NH 吸收)； $1550\sim 1590\text{ cm}^{-1}$  出現乙醯的 amide II (-NH-C=O)及  $\text{C}_2$  上 amine (-NH<sub>2</sub>)吸收峰； $1650\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}_2$  上乙醯的 amide I (C=O)吸收峰)； $2880\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{sp}^3\text{ C-H}$ )； $3200\sim 3300\text{ cm}^{-1}$  出現 N-H 吸收峰； $3450\text{ cm}^{-1}$  (O-H)。

Fig.4-5~6 是 NOCC-2、NOCC-3 之 FTIR 光譜分析，同樣出現上述幾丁聚醣本身 IR 吸收位置，乙醯基的  $1640\text{ cm}^{-1}$  (amide I)， $1545\text{ cm}^{-1}$  (amide II)，



1395  $\text{cm}^{-1}$  (amide III)的吸收；還因 carboxymethyl group 的  $\text{-C=OOH}$  產生在 1743  $\text{cm}^{-1}$  吸收峰。且值得注意一級醇因部份接上 carboxymethyl, 所以一級醇之  $\text{C-OH}$  在 1029  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰削減，相對比二級醇之  $\text{C-OH}$  在 1085  $\text{cm}^{-1}$  訊號強度小許多，NOCC-3 又因羧酸甲基接枝率比 NOCC-2 高的緣故，在 1029  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰相對削減更多。

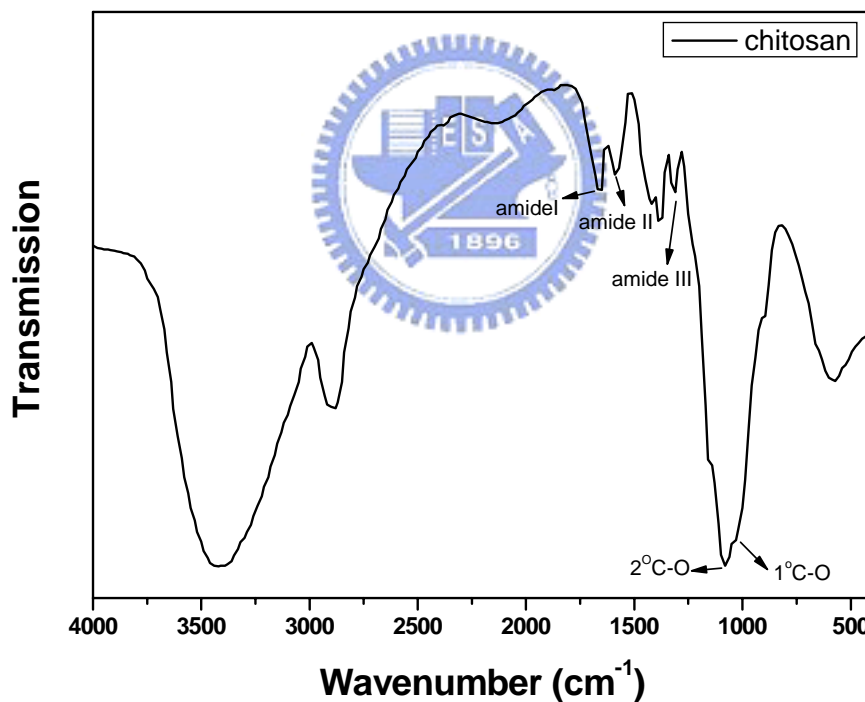


Fig.4-4 FTIR spectra of chitosan.

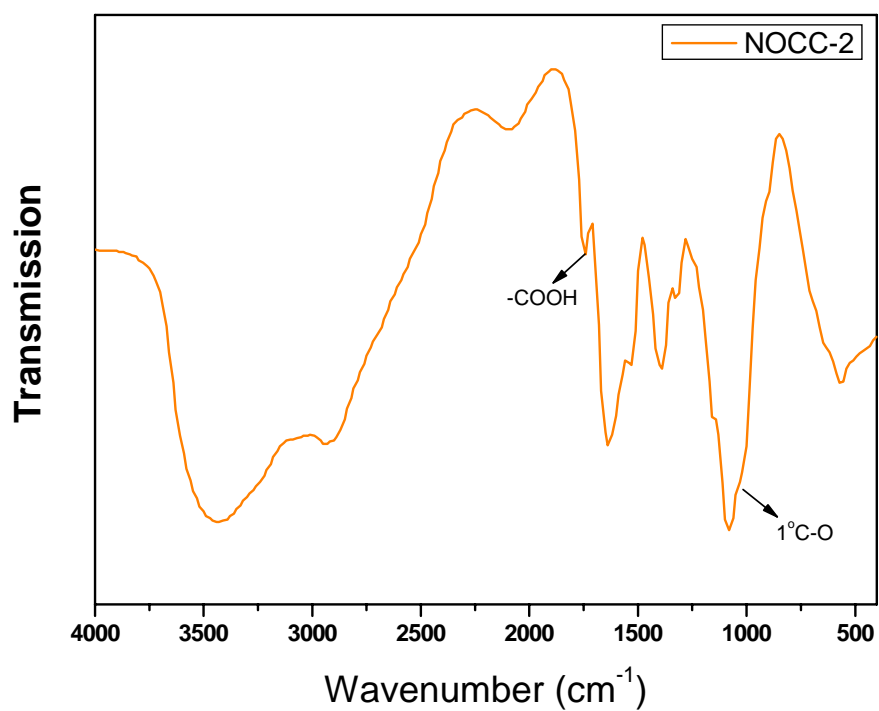


Fig.4-5 FTIR spectra of NOCC-2.

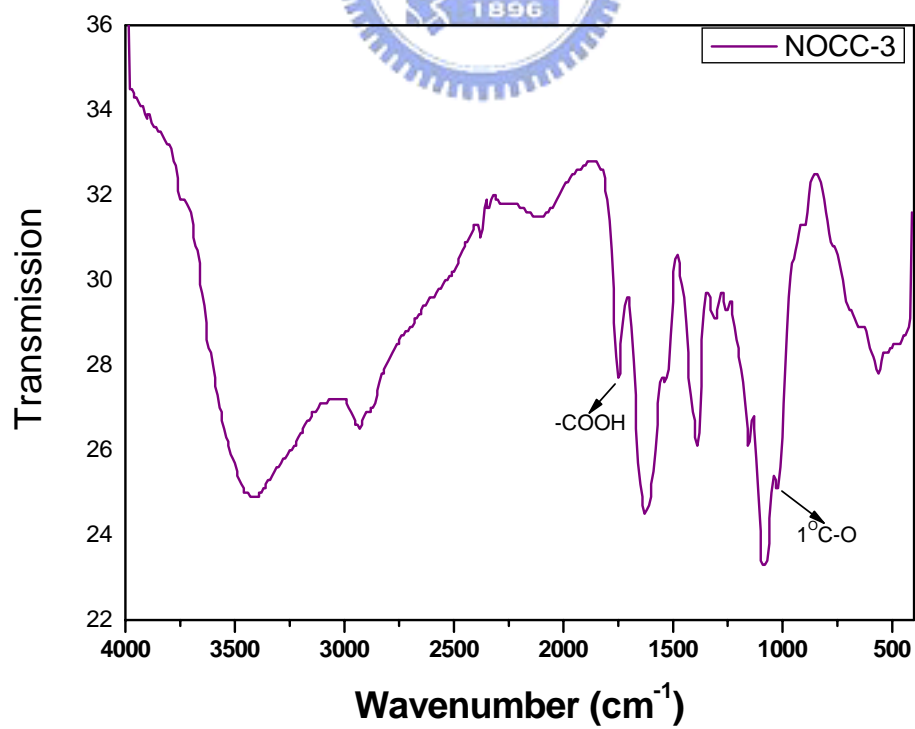


Fig.4-6 FTIR spectra of NOCC-3.

#### 4-1-1-2 羧酸甲基接枝率

接枝在幾丁聚醣一級羥基及胺基上的 carboxymethyl group 可以 NMR 光譜鑑定其 methylene ( $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) 部分，除了鑑定化學結構還可計算光譜中特徵 peak 的積分面積，進而分別算出羧甲基酸在幾丁聚醣的氮、氧上的接枝率(DS)。

$$\text{N-上羧甲基酸接枝率(DS)} = \left( \frac{\text{Methylenen積分面積(4.2 ppm)}}{\text{H}_2\text{積分面積(3 ppm)}} \right) \div 2 \quad (1)$$

$$\text{O-上羧甲基酸接枝率(DS)} = \left( \frac{\text{Methylenen積分面積(4.4 ppm)}}{\text{H}_2\text{積分面積(3 ppm)}} \right) \div 2 \quad (2)$$

所以

NOCC-2 在 N-上羧甲基酸接枝率 DS= 0.157

O-上羧甲基酸接枝率 DS= 0.159

Total DS = 0.316

NOCC-2 在 N-上羧甲基酸接枝率 DS= 0.246

O-上羧甲基酸接枝率 DS= 0.251

Total DS = 0.497

改質合成實驗初始會添加氫氧化鈉脫去一級醇-OH 及胺基-NH<sub>2</sub> 的 H，因 O 的陰電性比 N 大傾向形成陰離子，所以-OH 較容易被拔 H，相較下有較多-O<sup>-</sup>陰離子可以和羧甲基酸反應，在氧上接枝量會比氮上高。但是 N 因陰

電性較高， $-N^-$ 也易提供電子去反應，所以 N-反應性比 O-好。

我們可清楚知道改變氫氧化鈉濃度就可得到不同羧甲基酸接枝率的產物，鹼濃度越高接枝率越高，只是在[85]中有提到當氫氧化鈉濃度高達 50% 以上後，NaOH 會與氯乙酸有不被期望的額外作用；若是重覆做羧甲基酸化幾丁聚醣實驗二次以上，接枝率就可達 1。

#### 4-1-1-3 熱重分析比較

每一樣品在量測之前都會預先烘乾，但由於材料本身對水親和性好，會殘有無法去除的鍵結水在材料中，或短時間暴露在台灣潮濕環境中而吸水。Fig.4-7 是水溶性幾丁聚醣與改質前幾丁聚醣的熱重分析結果，一開始是水份散失階段(30 ~120 °C)，發現比較水份散失程度是 chitosan(9.4%) > NOCC-2(4.0%)  $\cong$  NOCC-3(4.5%)，預測水較易存在 chitosan 中，儘管 NOCC-2、NOCC-3 是屬水溶性高分子。第二階段(120 ~900 °C)是醣類的裂解，chitosan 裂解溫度約 245 °C，120 ~200 °C 並無明顯重量變化，高於 200 °C 後逐漸重量減少，至裂解溫度開始有明顯急劇重量損失。

接枝上羧甲基酸後的幾丁聚醣衍生物 NOCC-2 之裂解溫度約 199 °C，明顯地 NOCC-2 的裂解溫度比未改質幾丁聚醣低許多，表示羧甲基酸化會使幾丁聚醣衍生物熱穩定性變差，及由於改質過程中使用高濃度鹼液也會有使高分子聚合度變差因素。提升羧甲基酸接枝量得到的 NOCC-3 的裂解溫度

約 191 °C，裂解溫度比 NOCC-2 低一些且熱穩定性又更差，在 120 ~200 °C 就開始有少量的重量損失。

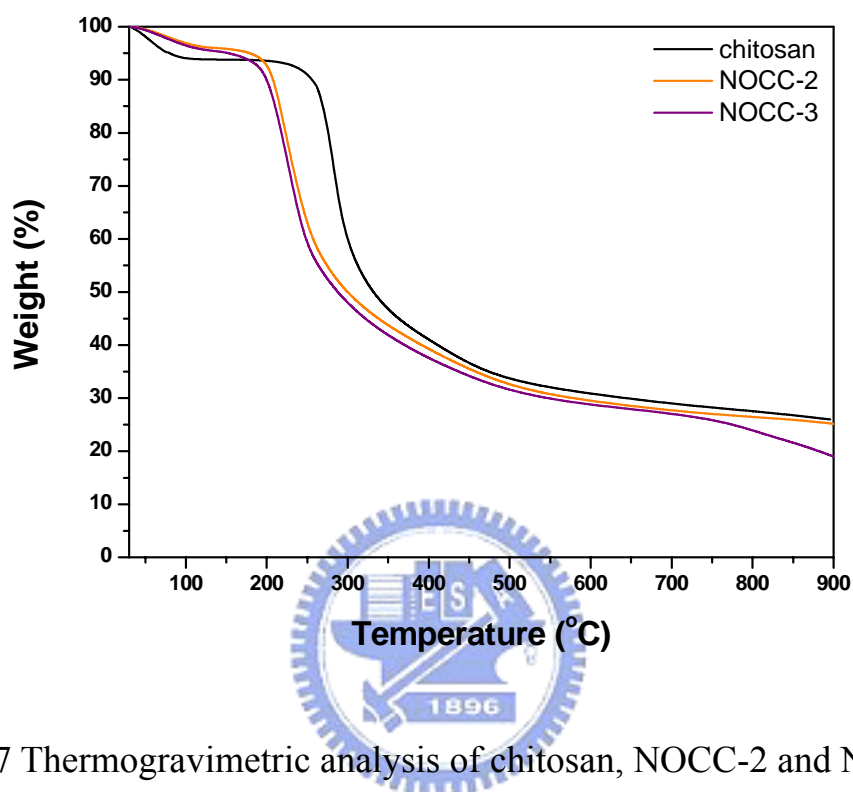


Fig.4-7 Thermogravimetric analysis of chitosan, NOCC-2 and NOCC-3.

#### 4-1-2 改變反應當量數對接枝率的影響

固定 37.7% 氫氧化鈉濃度下，改變氯乙酸的反應當量數(7 g、25 g)，對羧基接枝量影響，前者產物命名為 NOCC-1，與後者 NOCC-2 (已在 4-1-1 提到過)一起比較討論。

##### 4-1-2-1 化學結構鑑定與分析

高磁場核磁共振光譜  $H^1$ -NMR

幾丁聚醣在 37.7% 氫氧化鈉濃度下，和 7 g 氯乙酸反應所得產物為 NOCC-1。Fig.4-8 是 NOCC-1 的  $^1\text{H}$ -NMR 光譜，圖中清楚分別標出每一個官能基的化學位移，所使用的溶劑  $\text{D}_2\text{O}$  的參考化學位移在 4.67 ppm，因只添加 7 g 氯乙酸且-N'的反應性較好所以羧甲基酸大多接枝在氮上， $^1\text{H}$ -NMR 光譜中看到 methylene ( $-\text{NCH}_2\text{COOH}$ ) 在 4.35 ppm。還有幾丁聚醣本身醣環性質，在 1.91 ppm 訊號是由於殘留乙醯基 ( $-\text{COCH}_3$ )； $\text{H}_2$  是在 3.24 ppm；醣的六元環上之  $\text{H}_3\sim\text{H}_6$  重疊夾雜出現在 3.4~4.1 ppm。和 NOCC-2 的  $^1\text{H}$ -NMR 光譜比較是差別在 4.35 ppm 之 methylene ( $-\text{NCH}_2\text{COOH}$ ) 積分面積所算出的接枝量，在這樣實驗條件下做的 NOCC-1 會呈鹼性(約 pH=9)，所以才使整個圖譜也向 down-field 移一點(ex:  $-\text{NCH}_2\text{COOH}$  原在 4.2 ppm  $\rightarrow$  4.35 ppm)。

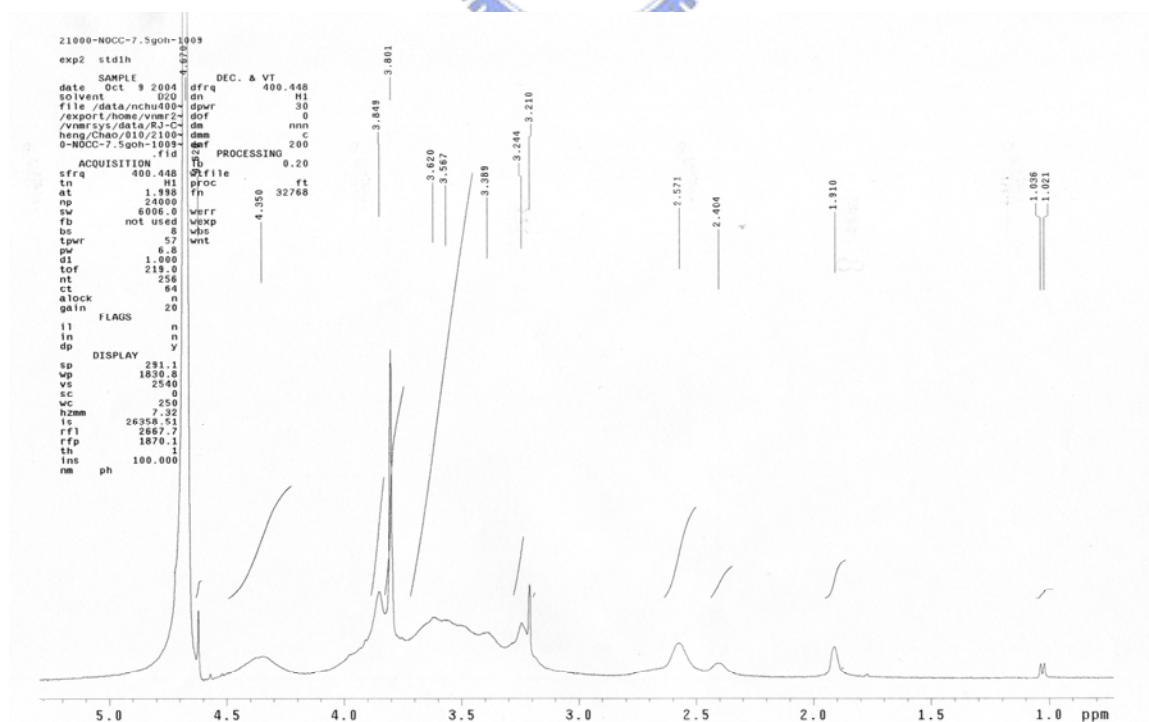



Fig. 4-8  $^1\text{H}$ -NMR spectra of NOCC-1 in  $\text{D}_2\text{O}$ .

## 傅立葉紅外光譜FTIR

Fig.4-9 是 NOCC-1 之 FTIR 光譜分析， $1029\text{ cm}^{-1}$  (C-O stretching，出現  $\text{C}_6$  上一級醇的 -C-OH 吸收峰)； $1085\text{ cm}^{-1}$  (C-O stretching，出現  $\text{C}_3$  上二級醇的 -C-OH 吸收峰)； $1420\text{ cm}^{-1}$  (C-O-H bending)； $1135\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C asymmetry)； $1325\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}_2$  連接胺基的 C-NH 吸收)； $1600\text{ cm}^{-1}$  (羧甲基酸鹽之  吸收峰)。由 NOCC-1 在  $1600\text{ cm}^{-1}$  的羧甲基酸之  $\text{-COO}^-$  吸收峰，及 NOCC-2 在  $1743\text{ cm}^{-1}$  的羧甲基酸之  $\text{-COOH}$  吸收峰，就可知道 NOCC-1 是呈現陰離子性質。

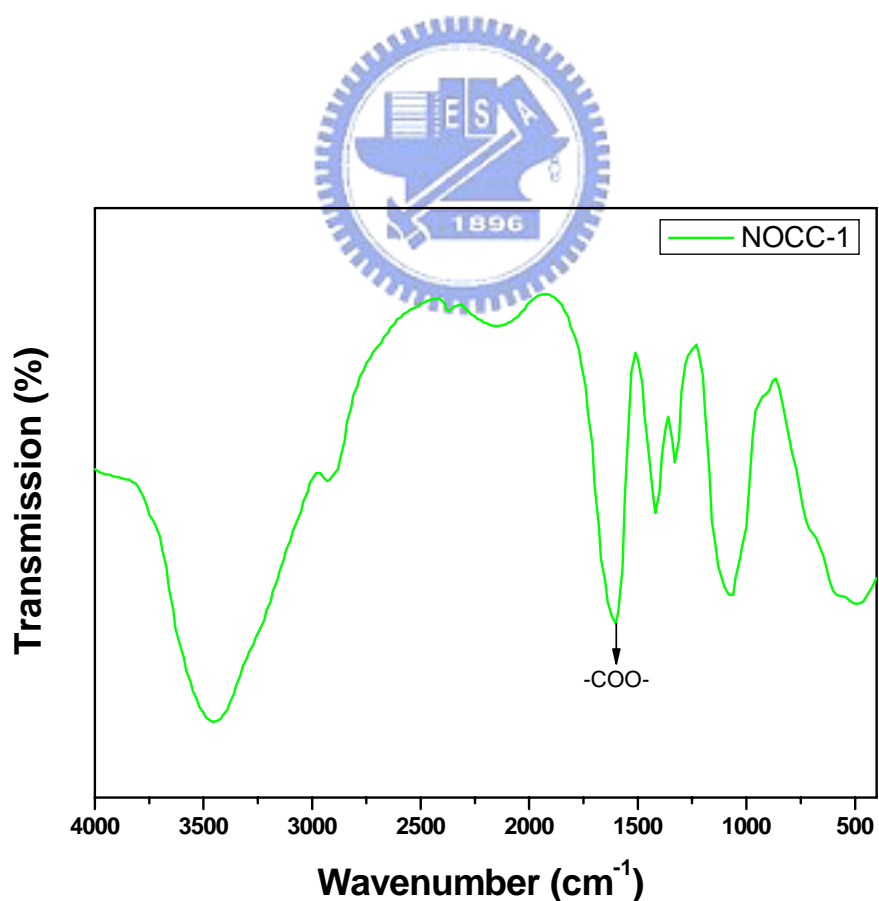


Fig.4-9 FTIR spectra of NOCC-1.



#### 4-1-2-2 羧酸甲基接枝率

接枝在 NOCC-1 之胺基上的 carboxymethyl group 可用  $H^1$ -NMR 光譜計算 methylene ( $-NCH_2COOH$ ) 在 4.35 ppm 的積分面積，進而利用公式(1)算出羧基酸在幾丁聚醣上的接枝率(DS)。

所以

NOCC-1 在 N-上羧基酸接枝率  $DS=0.07$

#### 4-1-2-3 熱重分析比較

Fig.4-10 是 NOCC-1、NOCC-2 與 chitosan 的 TGA 重量損失圖。水份散失階段(30 ~120 )發現比較水份散失程度 NOCC-1 (3.5%)  $\cong$  NOCC-2 (4.0%)  $\cong$  NOCC-3 (4.5%)，預測水滯留在以上這三種水溶性幾丁聚醣的能力是相差不多的。第二階段(120 ~900 )是醣類的裂解，NOCC-1 裂解溫度約 254 ，而 290 ~900 時有不同階段的裂解情形。

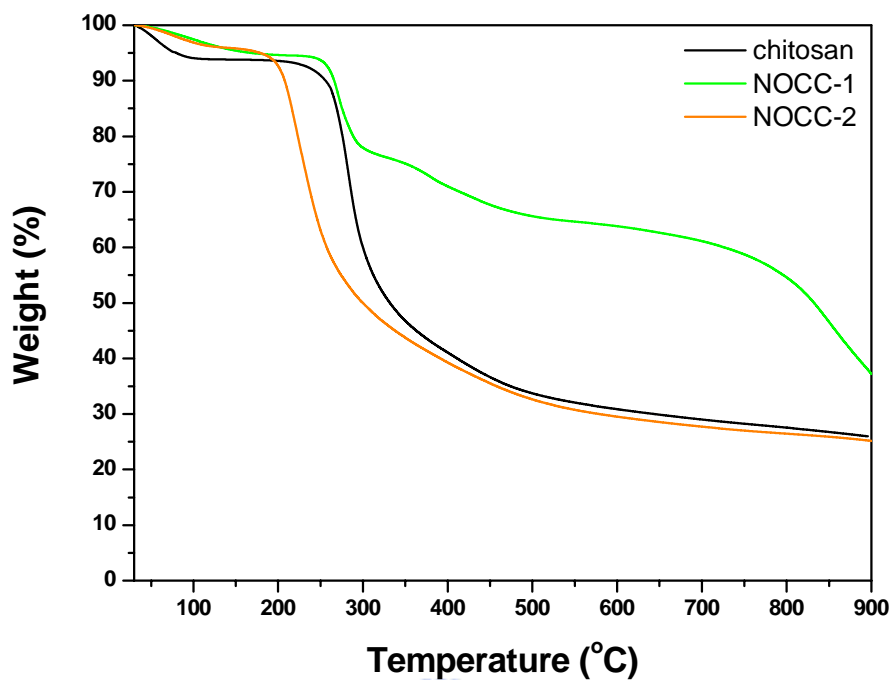


Fig.4-10 Thermogravimetric analysis of chitosan, NOCC-1 and NOCC-2.

## 4-2 油性幾丁聚醣

在幾丁聚醣上接枝疏水官能基-己醯基，改變反應條件探討己醯接在不同取代位置及其接枝率對溶解度影響。

### 4-2-1 化學結構鑑定與分析

#### 高磁場核磁共振光譜 $^1\text{H}$ -NMR

Fig.4-11 是 N,O-hexanoyl chitosan 的  $^1\text{H}$ -NMR 光譜，在一級羥、二級羥、胺基的二個氫一共四個取代位置都將氫置換為己醯基，命名為 full NOHC，此反應是 pyridine 及 chloroform 的混合溶劑和添加 10 當量濃度己醯氯條件

下進行，pyridine 是高極性有機溶劑也可廣泛溶解許多有機化合物，且屬 Lewis base 能拔除化學反應中心位置上多餘的氫而有催化反應效果，因此才能有己醯接枝率高達 3.8 以上的結果，能夠完全溶解在二氯甲烷中。Fig.4-11 之  $^1\text{H}$ -NMR 光譜清楚標出每一個官能基的化學位移，使用溶劑  $\text{CDCl}_3$  的參考化學位移在 7.24 ppm, 0.86 ppm ( $-\text{CH}_3$ )、1.28 ppm ( $-\text{C}_\delta\text{H}_2-$ )、1.4 ppm~2 ppm ( $-\text{C}_\beta\text{H}_2-\text{C}_\gamma\text{H}_2-$ )、2 ppm~3 ppm ( $-\text{CO}-\text{C}_\alpha\text{H}_2-$ )都是己醯基碳鏈上的氫； $\text{H}_1$  在 5.55 ppm； $\text{H}_2$  在 2 ppm~3 ppm； $\text{H}_3$  在 5.22 ppm； $\text{H}_4$  在 4.26 ppm； $\text{H}_5$  和  $\text{H}_6$  在 3.1 ppm~4 ppm。

O-hexanoyl chitosan 是利用甲磺酸保護  $-\text{NH}_2$ ，只讓己醯基取代  $-\text{OH}$  上的位置，當己醯基接枝率到達 0.92 以上時，產物就可溶解於 DMF、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  等有機溶劑。Fig.4-12 是 O-hexanoyl chitosan 的  $^1\text{H}$ -NMR 光譜，使用溶劑  $\text{CDCl}_3$  的參考化學位移在 7.24 ppm, 0.86 ppm ( $-\text{CH}_3$ )、1.28 ppm ( $-\text{C}_\delta\text{H}_2-$ )、1.42 ppm~1.4 ppm ( $-\text{C}_\beta\text{H}_2-\text{C}_\gamma\text{H}_2-$ )、2.3 ppm ( $-\text{CO}-\text{C}_\alpha\text{H}_2-$ )都是己醯基碳鏈上的氫；2.6 ppm~5.2 ppm ( $\text{H}_1\sim\text{H}_6$ )。

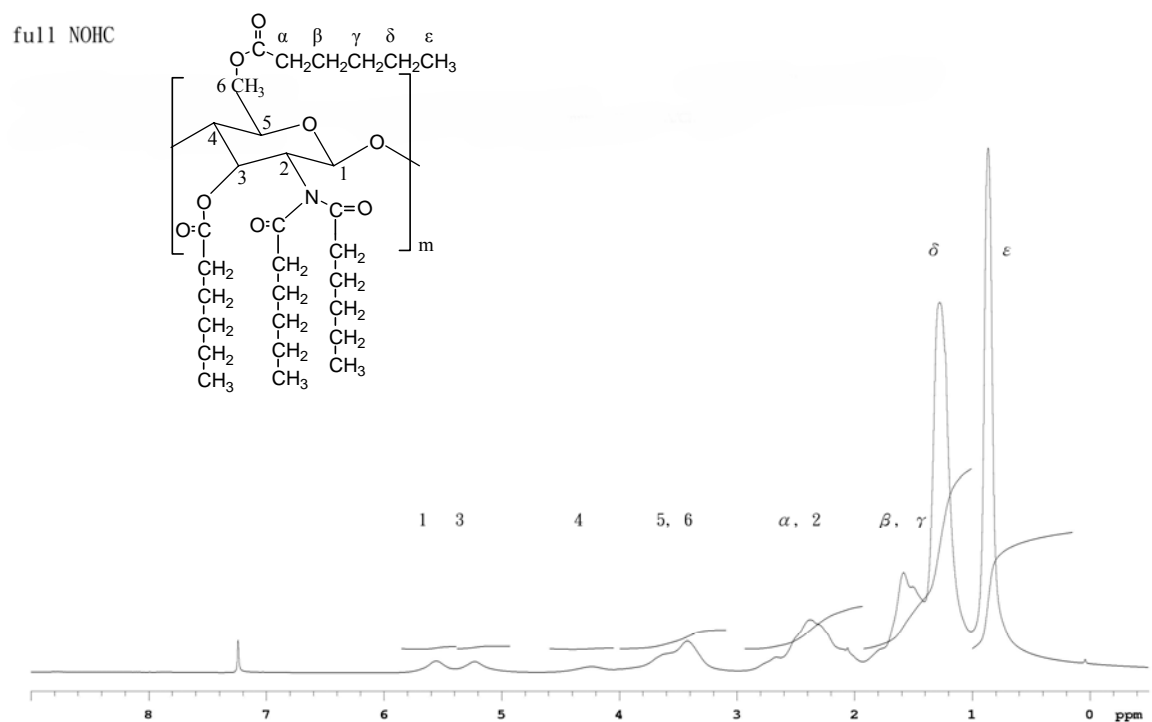


Fig.4-11  $^1\text{H}$ -NMR spectra of full NOHC in  $\text{CDCl}_3$ .

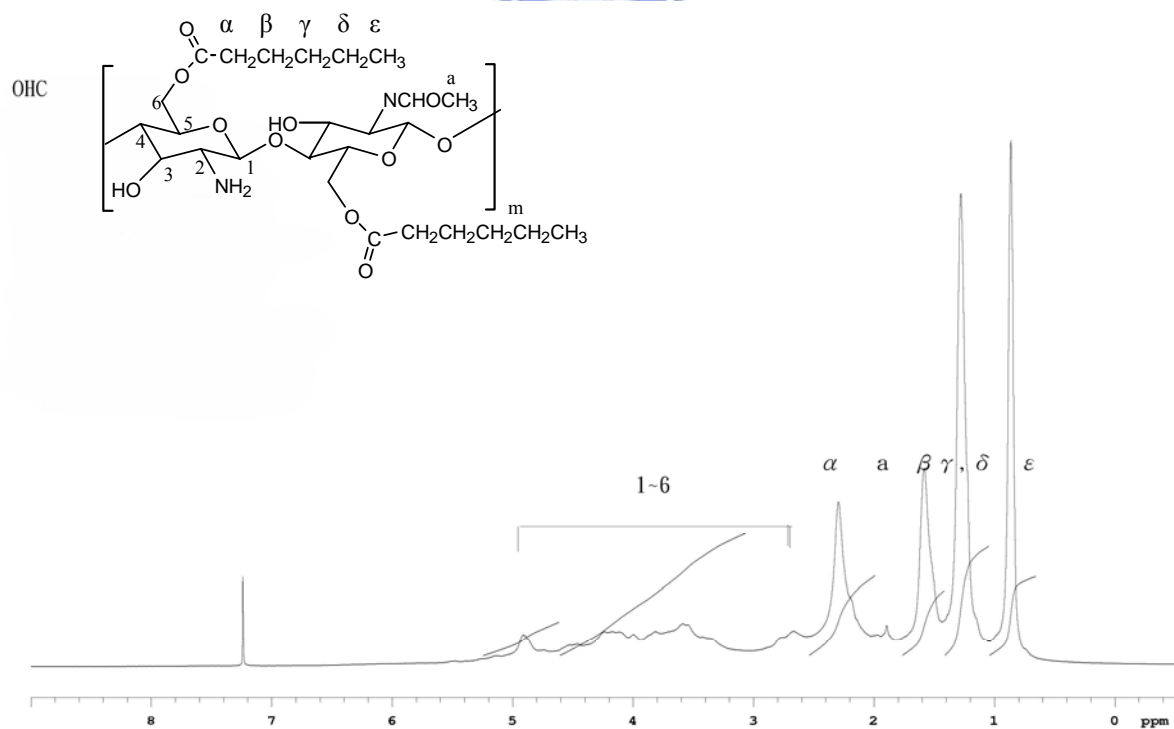


Fig.4-12  $^1\text{H}$ -NMR spectra of OHC in  $\text{CDCl}_3$ .

## 傅立葉紅外光譜FTIR

幾丁聚醣有一級羥、二級羥、胺基的二個氫一共四個取代位置，但因這四個取代位置反應性差異，要改不同反應條件下才能達到己醯基接在不同反應中心位置。以傅立葉紅外光譜FTIR鑑定油性幾丁聚醣化學結構。

Fig.4-13 是 full NOHC 的 FTIR 圖譜，己醯接枝率大於 3.8, 所以 FTIR 光譜中原有幾丁聚醣的 $\text{-NH}_2$ 、 $\text{-OH}$  殘留量很少， $\text{-NH}_2$ 、 $\text{-OH}$  在  $3200\text{ cm}^{-1}\sim 3700\text{ cm}^{-1}$  訊號強度相對不強；另外有新吸收峰出現在  $720\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ，碳鏈之 long-chain band)； $1370\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-CH}_3$ ，bending)； $1450\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ，bending),  $1710\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C=O}$  of imide  $\text{N}(\text{COR})_2$ )， $1740\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C=O}$  of ester  $\text{OCOR}$ )；還有相當強而明顯的 $\text{-CH}_2\text{-}$ ， $\text{-CH}_3$  stretching 吸收峰在  $2840\sim 2950\text{ cm}^{-1}$ 。

Fig.4-14 是 partial NOHC 的 FTIR 圖譜，幾丁聚醣上的四個取代位置只有一級醇、胺基上一個位置共二個氫被置換為己醯基，命名為 partial NOHC，此反應是 pyridine 及 chloroform 的混合溶劑和添加 2.2 當量濃度己醯氯條件下進行。 $720\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ，碳鏈之 long-chain band)；沒看到一級醇的  $1029\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C-O}$ ，stretching)，表示已被己醯取代； $1065\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C-O}$  stretching，出現  $\text{C}_3$  上二級醇的 $\text{-C-OH}$  吸收峰)； $1135\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C-O-C}$  asymmetry)； $1315\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}_2$  連接胺基的  $\text{C-NH}$  吸收)； $1370\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-CH}_3$ ，bending)； $1465\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ，bending)； $1746\text{ cm}^{-1}$  (一級醇位置上 $\text{-O-C=OR}$ )； $1174\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-O-C=OR}$ ，stretching)； $1550\text{ cm}^{-1}$  (己醯的 amide II ( $\text{-NH-C=O}$ )吸收峰)； $1665\text{ cm}^{-1}$  (己醯

的 amide I ( $\text{C=O}$ ) 吸收峰); 還有相當強而明顯的  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_3$  stretching 吸收峰在  $2840\sim 2950\text{ cm}^{-1}$ 。

Fig.4-15 是 N-hexanoyl chitosan 的 FTIR 光譜，幾丁聚醣上的四個取代位置只有胺基的一個氫被置換為己醯基，幾丁聚醣懸浮在甲醇和添加 1.6 當量濃度己醯酐的非均相反應條件下進行，命名為 NHC，此材料堅硬無溶劑可用。 $1035\text{ cm}^{-1}$ 、 $1065\text{ cm}^{-1}$  的一級醇、二級醇 C-O stretching 吸收強不減，表示羥基上無被取代； $1375\text{ cm}^{-1}$  (己醯之  $-\text{CH}_3$ , bending)； $1460\text{ cm}^{-1}$  (己醯之  $-\text{CH}_2-$ , bending)； $1420\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C-O-H}$  bending)； $1325\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}_2$  連接胺基的  $\text{C-NH}$  吸收)； $1555\text{ cm}^{-1}$  (己醯的 amide II ( $-\text{NH-C=O}$ ))； $1655\text{ cm}^{-1}$  (己醯的 amide I ( $\text{C=O}$ ))； $2840\sim 2940\text{ cm}^{-1}$  成長( $\text{sp}^3\text{ C-H}$ , stretching) 成長； $3200\sim 3300\text{ cm}^{-1}$  出現 N-H 吸收峰； $3450\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{O-H}$ )。

Fig.4-16 是 O-hexanoyl chitosan 的 FTIR 光譜，幾丁聚醣上的四個取代位置只有一級醇的氫被置換為己醯基，命名為 OHC，以甲磺酸將幾丁聚醣完全溶解後加入 6 當量濃度己酸酐，甲磺酸能提供保護胺基不被反應，只讓一級醇位置被己醯取代。 $720\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2-$ , 碳鏈之 long-chain band)；沒看到一級醇的  $1029\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C-O}$  stretching)，表示以被己醯取代，留下  $1070\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C-O}$  stretching，出現  $\text{C}_3$  上二級醇  $-\text{C-OH}$ )； $1370\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_3$ , bending)； $1465\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2-$ , bending)；很強的  $1200\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{O-C=OR}$ , stretching)； $1742\text{ cm}^{-1}$  (一級醇位置上  $-\text{O-C=OR}$ )； $1550\text{ cm}^{-1}$  (乙醯的 amide II ( $-\text{NH-C=O}$ ) 吸收峰)； $1660$

$\text{cm}^{-1}$  (乙醯的 amide I ( $\text{C}=\text{O}$ )吸收峰)；還有明顯的 $-\text{CH}_2-$ ， $-\text{CH}_3$  stretching 吸收峰在  $2840\sim 2950\text{ cm}^{-1}$ ； $3300\text{ cm}^{-1}$  出現 $-\text{NH}$  吸收峰； $3470\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{O}-\text{H}$ , stretching)。

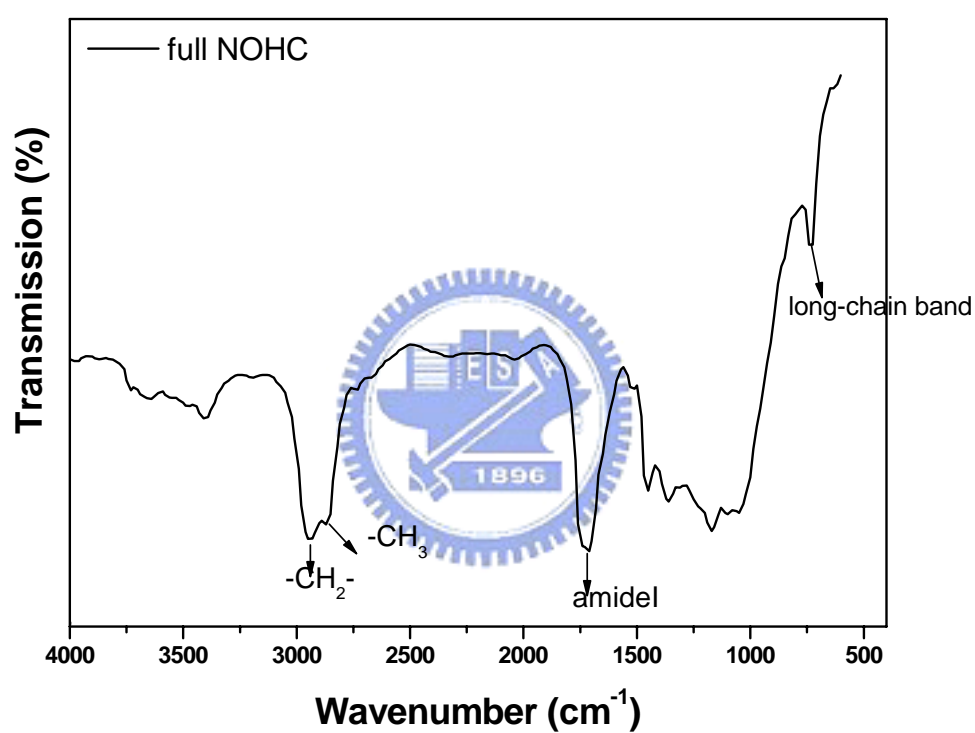


Fig. 4-13 FTIR spectra of full NOHC.



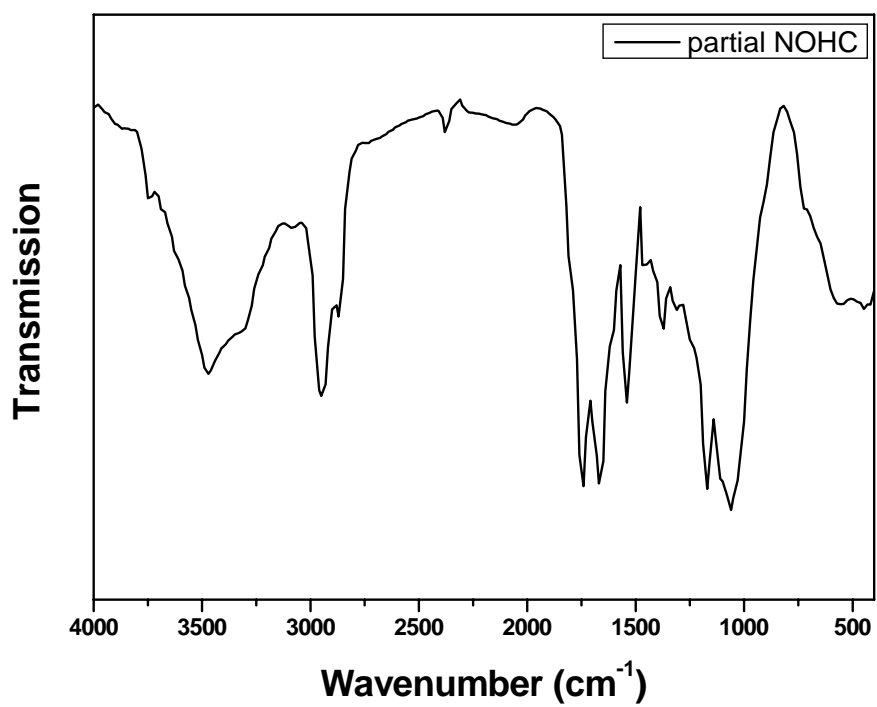


Fig. 4-14 FTIR spectra of partial NOHC.

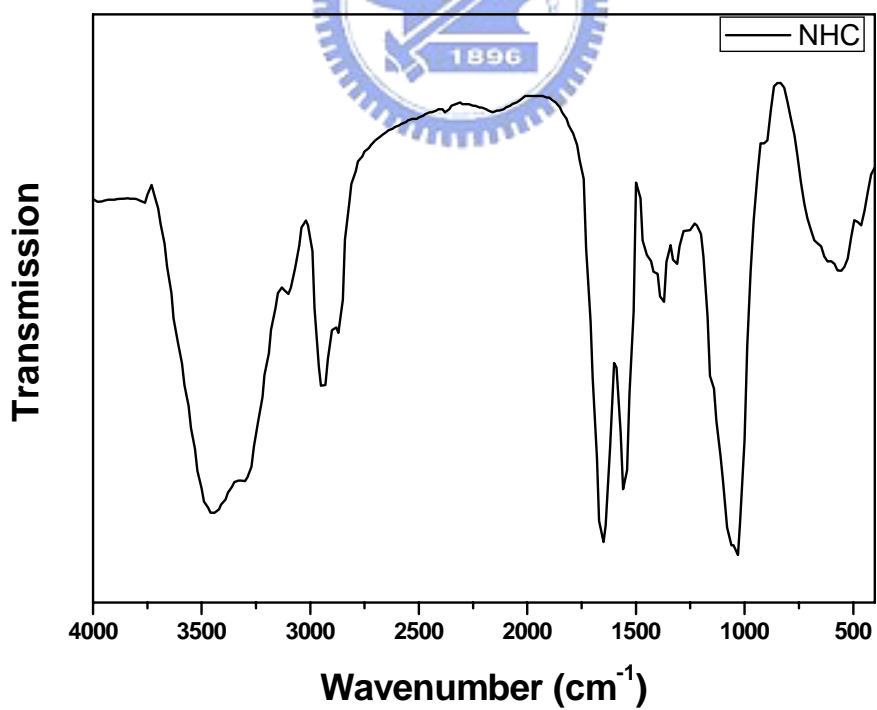


Fig. 4-15 FTIR spectra of NHC.

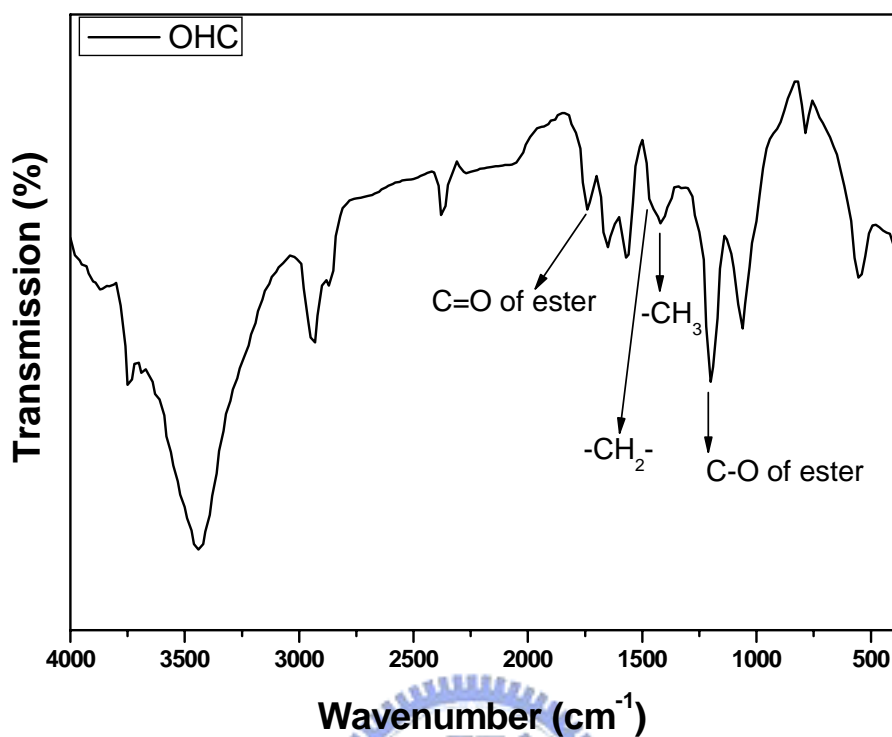


Fig. 4-16 FTIR spectra of OHC.

#### 4-2-2 己醯接枝率(DH)

以  $^1\text{H}$ -NMR 光譜鑑定雙性幾丁聚醣化學結構，及計算光譜中己醯基的  $-\text{CH}_3$  之 peak 積分面積後，分別算出在幾丁聚醣的己醯基接枝(DH)。

$$\text{N-上己醯基接枝率(DH)} = \left( \frac{-\text{CH}_3 \text{積分面積}(0.75 \text{ ppm})}{\text{H}_2 \text{積分面積}(3 \text{ ppm})} \right) \div 3 \quad (3)$$

所以

$$\text{full NOHC 己醯接枝率(DH)} = 3.8$$

$$\text{OHC 己醯接枝率(DH)} = 0.92$$

此外根據[83]利用傅立葉紅外光FTIR光譜官能基特徵吸收值代入公式

(3)、(4)計算partial NOHC及NHC之己醯基接枝率。

$$\text{N-上己醯基接枝率(DH)} = \left( \frac{\text{C=O (amide I)之}A_{1650\sim}}{\text{C-O之}A_{1070\sim}} - 0.087 \right) \times 100\% \quad (4)$$

$$\text{O-上己醯基接枝率(DH)} = \left( \frac{\text{C=O (ester)之}A_{1745\sim}}{\text{-NH之}A_{1070\sim}} - 0.087 \right) \times 100\% \quad (5)$$

$A_{1650\sim}$  = Amide的C=O約在1650  $\text{cm}^{-1}$ 處吸收值

$A_{1745\sim}$  = Ester的C=O約在1740  $\text{cm}^{-1}$ 處吸收值

$A_{1070\sim}$  = 一級羥基C-O約在1070  $\text{cm}^{-1}$ 處吸收值

所以

partial NOHC 在 N-上己醯基接枝率(DH) = 0.803

O-上己醯基接枝率(DH) = 0.896

Total DH = 1.699

NHC 在 N-上己醯基接枝率(DH) = 0.861

Total DH = 0.861

#### 4-2-3 熱重分析比較

Fig.4-17 是 partial NOHC 和 full NOHC 的 TGA 重量損失圖。full NOHC 的熱裂解溫度約在 230  $^{\circ}\text{C}$ ，在 30  $^{\circ}\text{C}$  ~120  $^{\circ}\text{C}$  之間也無水份重量散失情況，即 full NOHC 是高度疏水材料同時也不吸水。

partial NOHC 的己醯接枝率(DH)為 1.699，所以仍有親水的-OH 和-NH 存在，導致 partial NOHC 在第一階段 30 ~120 有約 3%的水份重量散失，而 partial NOHC 的熱裂解溫度約在 207 。

Fig.4-18 是 OHC 及 NHC 的 TGA 重量損失圖。OHC 的熱裂解溫度約在 187 ，在第一階段 30 ~120 有約 1.5%的水份重量散失。NHC 在第一階段 30 ~120 有約 1.5%的水份重量散失，其熱裂解溫度約在 268 ，比 OHC 的熱裂解溫度高出約 81 ，己醯基接枝在氮上的熱穩定性明顯較佳。

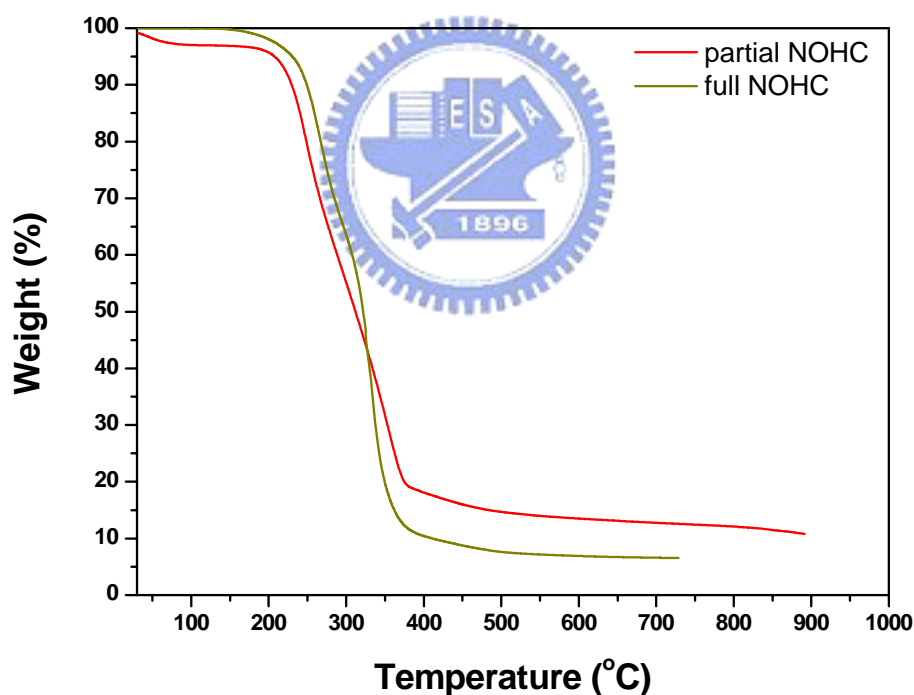


Fig.4-17 Thermogravimetric analysis of partial NOHC and full NOHC.

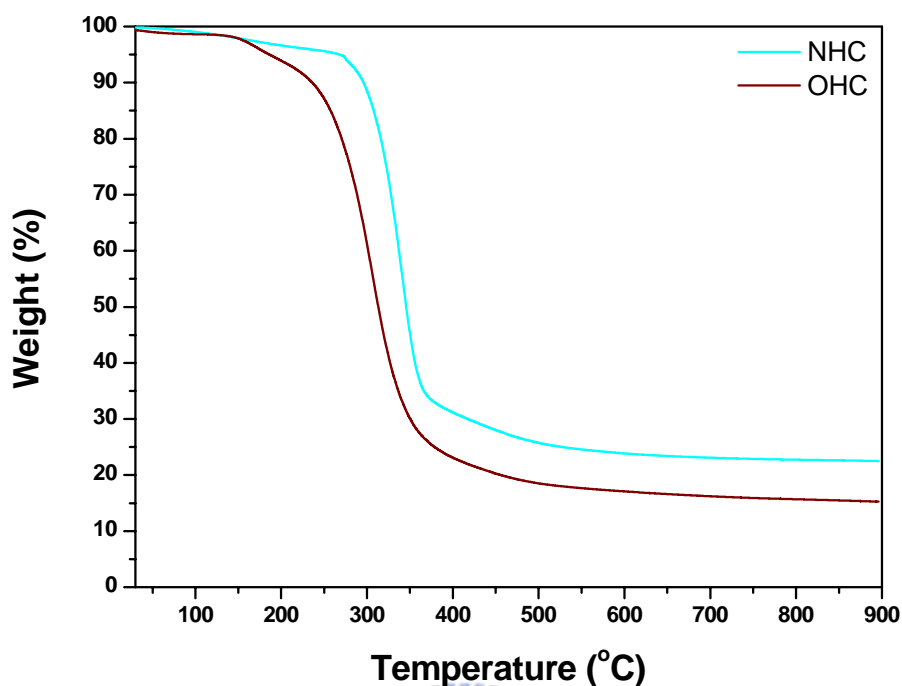


Fig.4-18 Thermogravimetric analysis of OHC and NHC.

#### 4-2-4 改變己醯基接枝率對溶解度影響

這部份將把 full NOHC、partial NOHC 與 NHC 一起討論溶解度。Full NOHC 可完全溶於  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、 $\text{CHCl}_3$ 、THF，在 DMF 中不可溶解。對於 partial NOHC 找不到合適溶劑可溶解，但在 DMF、DMSO、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、 $\text{CHCl}_3$  中稍有膨潤現象，在 pyridine 中有顯著膨潤，應用上會有限制 N-hexanoyl chitosan 更只有在純水才稍微有膨潤，和在強酸破壞下才完全溶解。

#### 4-2-5 己醯基在不同取代位置對溶解度影響

相較無適當溶劑可溶 N-hexanoyl chitosan 來說，O-hexanoyl chitosan 因破

壞了比-NH 能產生更強氫鍵的-OH，只在氧上接枝己醯基的 OHC 反而可完全  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、 $\text{CHCl}_3$ 、DMF 與 DMSO。

### 4-3 兩性幾丁聚醣

親水性幾丁聚醣(NOCC)化學結構和透明質酸相似，同樣具有羧酸及醯基官能基，其溶液黏度高有很好保溼效果，可溶解於中性水中又具 pH 敏感性。但實驗發現 NOCC 水膠膨潤度低，水溶液被調至  $\text{pH}=5.3$  時因 NOCC 分子內部靜電引力結果開始沉澱析出，造成往後應用上的困擾。

油性幾丁聚醣 full NOHC 材料延展性佳但機械強度低，生物降解能力差。儘管 OHC 降解能力比幾丁聚醣快，膜材機械性質脆弱。甚至 NHC 無溶劑可被溶解，無法作為應用，這都是材料選擇上需要考量的因素。

無論親水性及油性幾丁聚醣都有不被期望的缺點，因此這篇研究融合親水及油性化學改質的兩種方法，各取其材料優點合成出兩性幾丁聚醣，希望新發展出溶解度不受 pH 值影響的兩性衍生物，又保留原 NOCC 材料的 pH 敏感性，還能包覆雙性藥物。將兩種不同羧酸甲基接枝率( $\text{DS}=0.316$ ,  $\text{DS}=0.497$ )的水溶性幾丁聚醣再接枝疏水性官能基-己醯基，也變化己醯基接枝量，成為同時具有親水基/疏水基的兩性材料。

#### 4-3-1 化學結構鑑定與分析

##### 高磁場核磁共振光譜 $\text{H}^1$ -NMR

接枝在水溶性幾丁聚醣一級羥基上的己醯基可以  $H^1$ -NMR 光譜鑑定其己醯碳鏈 ( $-CH_3$ )部分，確定 hexanoylated NOCC (HNOCC)化學結構。Fig.4-19(a) 是兩性幾丁聚醣 HNOCC-2A 的  $H^1$ -NMR 光譜，圖中清楚分別標出每一個官能基的化學位移，所使用的溶劑  $D_2O$  的參考化學位移在 4.67 ppm；0.75 ppm ( $-CH_3$ )；1.28 ppm ( $-C_8H_2-$ )；1.76 ppm ( $-C_7H_2-C_8H_2-$ )；1.48 ppm ( $-COCH_3$ )；1.94 ppm ( $-CH_\beta-$ )；2.18 ppm ( $-CO-C_\alpha H_2-$ )，以上都是己醯基碳鏈上的氫； $H_2$  是在 3 ppm，在這根 peak 左邊約 ppm 還有一枝細峰是醯胺鍵結的  $-NH-$ ；醣的六元環上之  $H_3 \sim H_6$  重疊夾雜出現在 3.25~4 ppm；在 4.5 ppm 的  $H_1'$  訊號增強，表示有己醯胺鍵結形成，且 N 上己醯基接枝量越高  $H_1'$  的積分面積會隨之增加；在 4.2 ppm、4.4 ppm 是原 N、O 上羧甲基酸的 methylene 訊號。

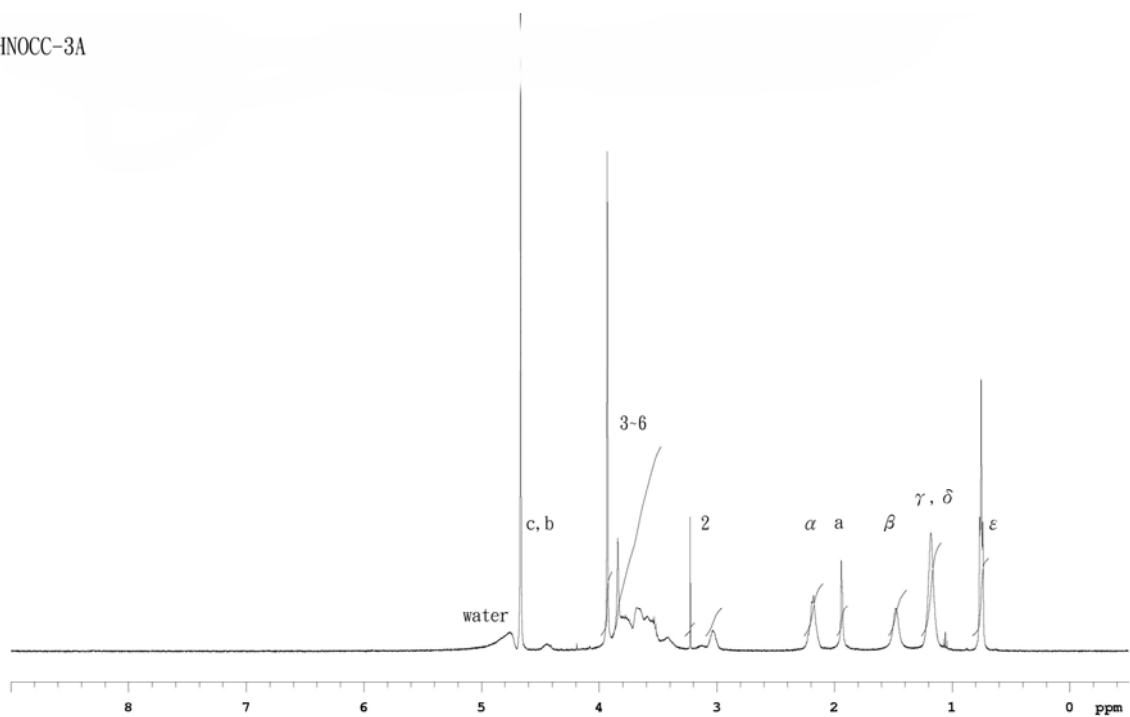
Fig.4-19(b)是兩性幾丁聚醣 HNOCC-2B 的  $H^1$ -NMR 光譜，圖中清楚分別標出每一個官能基的化學位移，使用溶劑為  $D_2O$ ，HNOCC-2B 所有化學位移是相似於 HNOCC-2A，相異在己醯基接枝量，而在 4.2 ppm、4.4 ppm 原 N、O 上羧甲基酸的 methylene 訊號相對不明顯。

在羧甲基酸接枝量為 0.441 的 NOCC-3 導入不同接枝率的己醯基，以 NMR 鑑定其化學結構，得到  $H^1$ -NMR 光譜 Fig.4-20(a)是 HNOCC-3A，Fig.4-20(b) 是 HNOCC-3A，其中光譜結果同樣相似於 Fig.4-19。





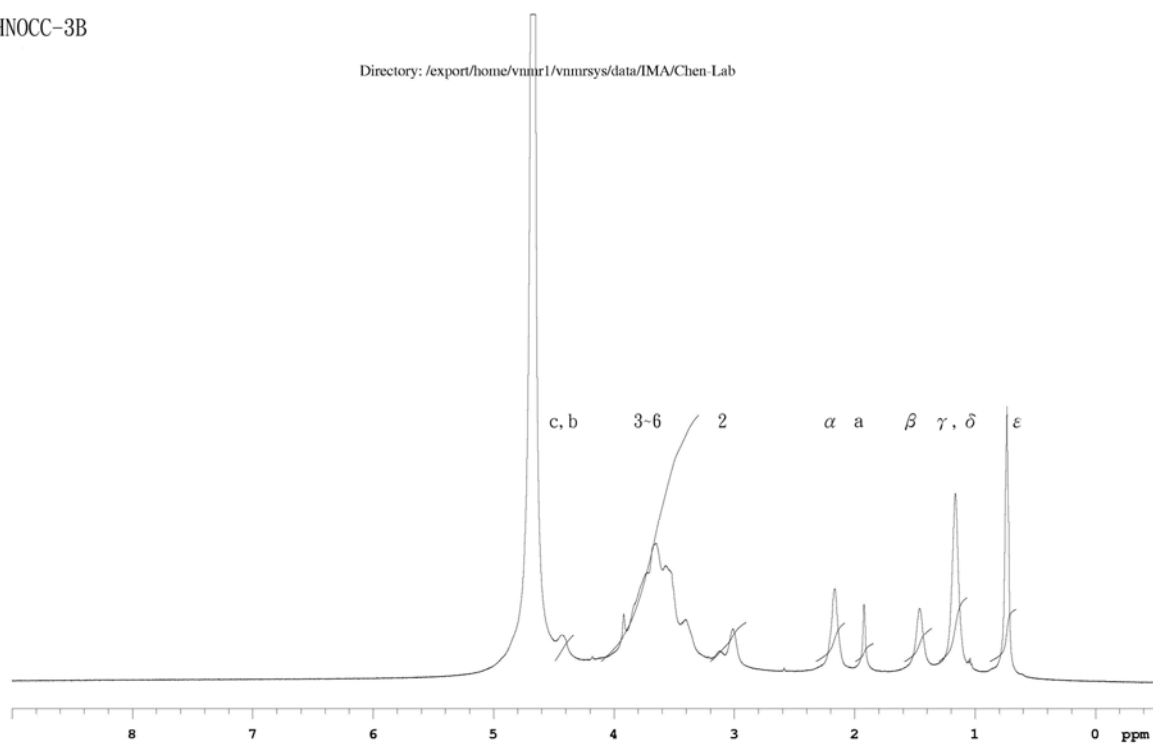
HNOCC-3A



(a)



HNOCC-3B



(b)

Fig. 4-20.  $^1\text{H}$ -NMR spectra of HNOCC-3A and HNOCC-3B in  $\text{D}_2\text{O}$ .

## 傅立葉紅外光譜FTIR

Fig.4-21 是 HNOCC-2A 和 HNOCC-2B 之 FTIR 光譜分析。還有殘留  $1029\text{ cm}^{-1}$  (一級醇 C-O, stretching), 在  $1200\text{ cm}^{-1}$  也沒有很強又寬的訊號, 所以在  $1738\text{ cm}^{-1}$  是羧酸-COOH, 表示己酸酐在這樣的反應條件下不易和一級醇反應形成酯類;  $1080\text{ cm}^{-1}$  (C-O stretching, 出現  $\text{C}_3$  上二級醇的-C-OH 吸收峰);  $1149\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C asymmetry);  $1320\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}_2$  連接胺基的 C-NH 吸收);  $1546\text{ cm}^{-1}$  (己醯的 amide II (-NH-C=O)吸收峰);  $1638\text{ cm}^{-1}$  (己醯的 amide I (C=O) 吸收峰)。

Fig.4-22 是 HNOCC-3A 和 HNOCC-3B 之 FTIR 光譜分析。還有殘留  $1029\text{ cm}^{-1}$  (一級醇 C-O, stretching), 在  $1200\text{ cm}^{-1}$  也沒有很強又寬的訊號, 所以在  $1738\text{ cm}^{-1}$  是羧酸-COOH, 表示己酸酐在這樣的反應條件下不易和一級醇反應形成酯類;  $1080\text{ cm}^{-1}$  (C-O stretching, 出現  $\text{C}_3$  上二級醇的-C-OH 吸收峰);  $1149\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C asymmetry);  $1320\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}_2$  連接胺基的 C-NH 吸收);  $1551\sim1557\text{ cm}^{-1}$  (己醯的 amide II (-NH-C=O)吸收峰);  $1637\text{ cm}^{-1}$  (己醯的 amide I (C=O)吸收峰); 還有明顯的-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>3</sub> stretching 吸收峰在  $2840\sim2950\text{ cm}^{-1}$ ;  $3430\sim3445\text{ cm}^{-1}$  出現 O-H 吸收峰。

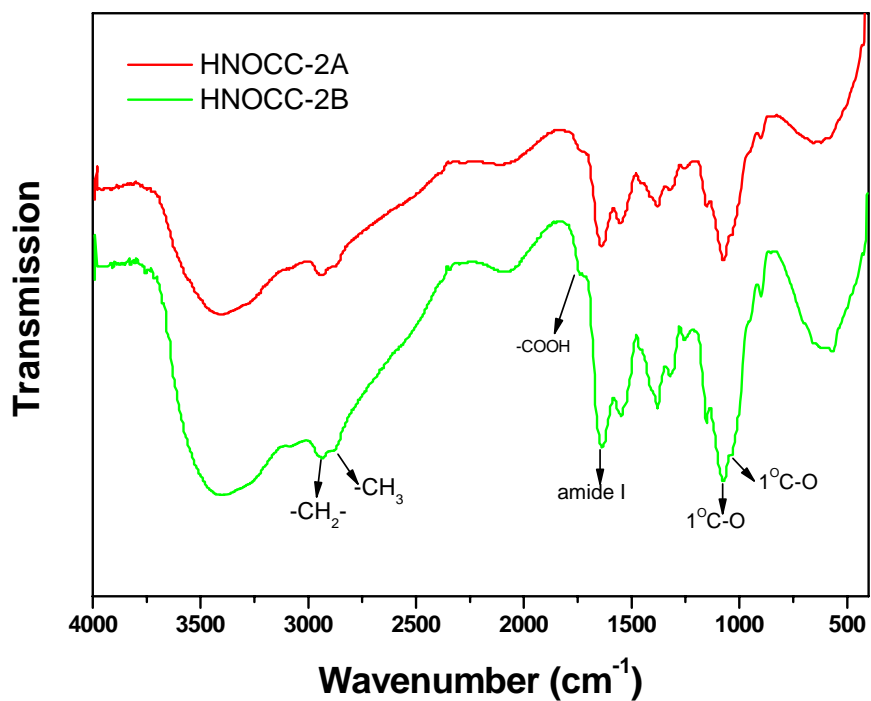


Fig.4-21 FTIR spectra of HNOCC-2A and HNOCC-2B.

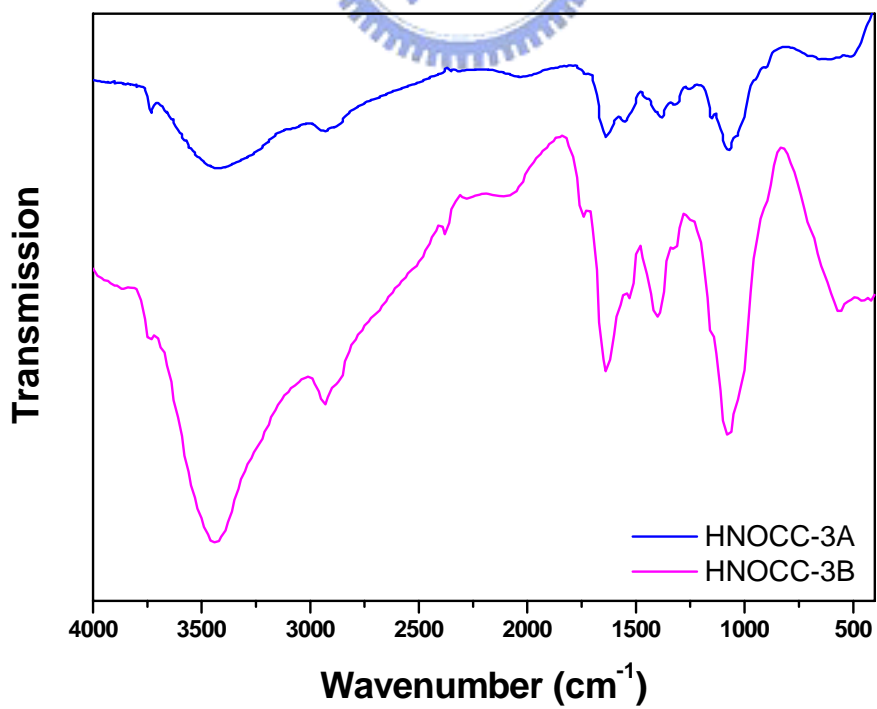


Fig.4-22 FTIR spectra of HNOCC-3A and HNOCC-3B.

#### 4-3-2 不同添加己酸酐反應濃度對接枝率影響

對親水性幾丁聚醣(NOCC-2、NOCC-3)中導入疏水基使成為雙性幾丁聚醣衍生物，分別固定反應時間為 12 小時下添加兩種不同的己酸酐反應當量濃度，這裡選擇 0.3 及 0.5 兩種反應當量濃度，改變反應物添加量探討對己醯基接枝量影響。

以  $^1\text{H}$ -NMR 光譜鑑定雙性幾丁聚醣化學結構，及計算光譜中己醯基的  $-\text{CH}_3$  之 peak 積分面積後，代入公式(3)可分別算出在幾丁聚醣的己醯基接枝(DH)。

所以

HNOCC-2A 己醯基接枝率  $\text{DS} = 0.259$

HNOCC-2B 己醯基接枝率  $\text{DS} = 0.441$

HNOCC-3A 己醯基接枝率  $\text{DS} = 0.23$

HNOCC-3B 己醯基接枝率  $\text{DS} = 0.44$

#### 4-3-3 反應時間對己醯基接枝量影響

對親水性幾丁聚醣(NOCC-2、NOCC-3)中導入疏水基使成為雙性幾丁聚醣衍生物，分別在固定添加兩種不同的己酸酐反應當量濃度(0.3 equiv.、0.5 equiv.)下，這裡選擇 6 小時及 12 小時兩種反應時間，改變反應時間探討對己醯基接枝量影響，同樣利用  $^1\text{H}$ -NMR 光譜計算出己醯接枝率。

所以

對於 NOCC-2 添加 0.3 當量濃度己酸酐時:

反應時間 6 小時得到產物的己醯基接枝量=0.190

反應時間 12 小時得到產物的己醯基接枝量=0.259

對於 NOCC-2 添加 0.5 當量濃度己酸酐時:

反應時間 6 小時得到產物的己醯基接枝量=0.253

反應時間 12 小時得到產物的己醯基接枝量=0.441

對於 NOCC-3 添加 0.3 當量濃度己酸酐時:

反應時間 6 小時得到產物的己醯基接枝量=0.194

反應時間 12 小時得到產物的己醯基接枝量=0.232

對於 NOCC-3 添加 0.5 當量濃度己酸酐時:

反應時間 6 小時得到產物的己醯基接枝量=0.265

反應時間 12 小時得到產物的己醯基接枝量=0.445

#### 4-3-4 固定羧酸甲基比例下不同己醯基接枝量的熱重分析

Fig.4-23 是 NOCC-2 serie 的 TGA 重量損失圖。HNOCC-2A 的熱裂解溫度約在 208 °C，在第一階段 30 ~120 °C 有約 11%的水份重量散失；HNOCC-2B 的熱裂解溫度約在 202 °C，在第一階段 30 ~120 °C 有約 9.5%的水份重量散失，因此我們可知道 HNOCC-2A 的保水能力比 HNOCC-2B 好，且在氮上

接枝己醯基後的熱裂解溫度都比原來 NOCC-2 高，這符合在 4-2-3 小節中所提到 N-hexanoyl chitosan 因氮上接枝己醯基而熱裂解溫度比原 chitosan 提高許多。Fig.4-24 是 NOCC-3 series 的 TGA 重量損失圖。同樣地 HNOCC-3A 的熱裂解溫度約在 204 °C，在第一階段 30 ~ 120 °C 有約 13.5%的水份重量散失；HNOCC-3B 的熱裂解溫度約在 196.5 °C，在第一階段 30 ~120 °C 有約 11.5%的水份重量散失，因此我們可知道 HNOCC-3A 的保水能力比 HNOCC-3B 好，且在氮上接枝己醯基後的熱裂解溫度都比原來 NOCC-2 高，這符合在 4-2-3 小節中所提到 N-hexanoyl chitosan 因氮上接枝己醯基而熱裂解溫度比原 chitosan 提高許多。

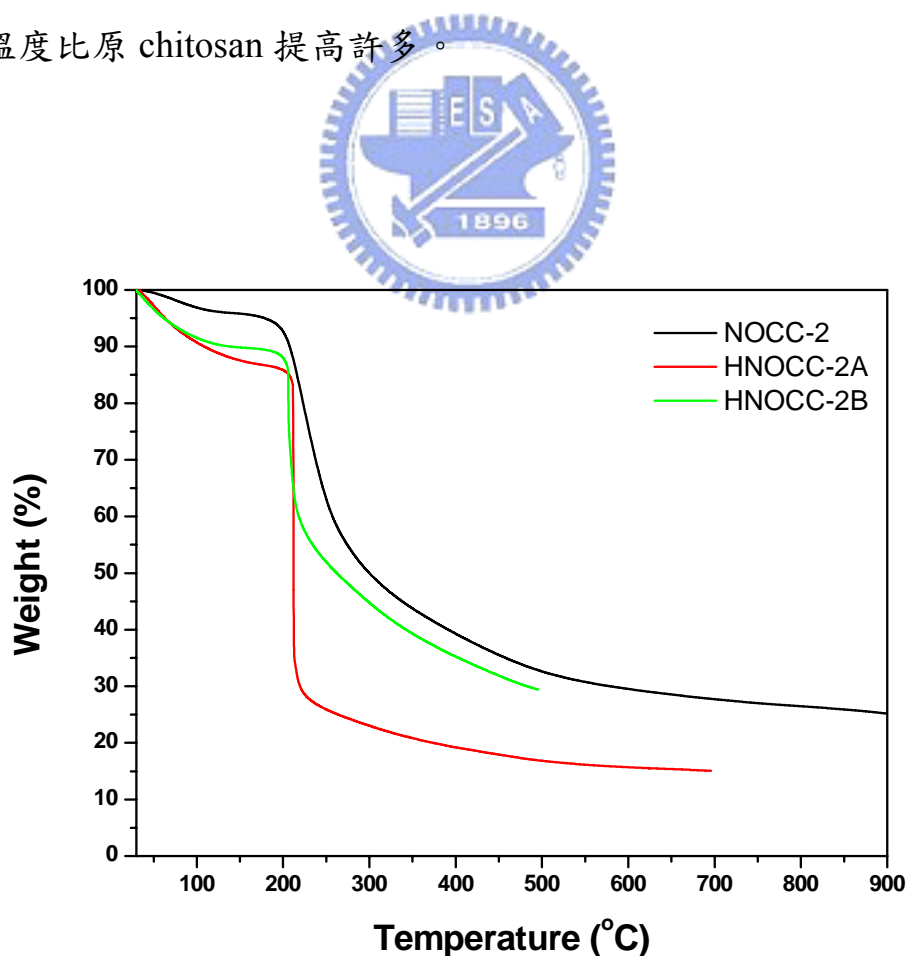


Fig.4-23 Thermogravimetric analysis of NOCC-2 series.



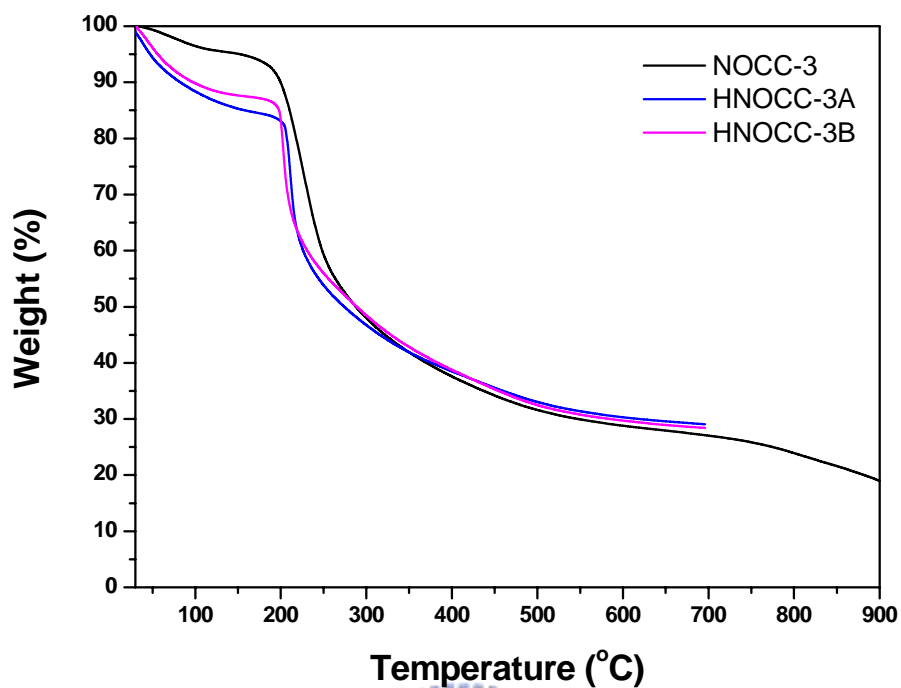


Fig.4-24 Thermogravimetric analysis of NOCC-3 series.

#### 4-4 拉伸試驗

以微拉力做試樣薄膜拉伸試驗，代入公式(6)~(7)可計算出應力即應變。

$$\text{Stress} = \frac{\text{拉力}}{\text{膜的截面積}} \quad (6)$$

$$\text{Strain} = \frac{\text{位移量}}{\text{膜拉伸前長度}} \quad (7)$$

Fig.4-25是full NOHC和未改質前幾丁聚醣的應力對應變圖。油性幾丁聚醣full NOHC在高己醯基接枝率下強度變差許多，但延展性變得特佳，應變量高達160%時還能繼續拉伸不斷。

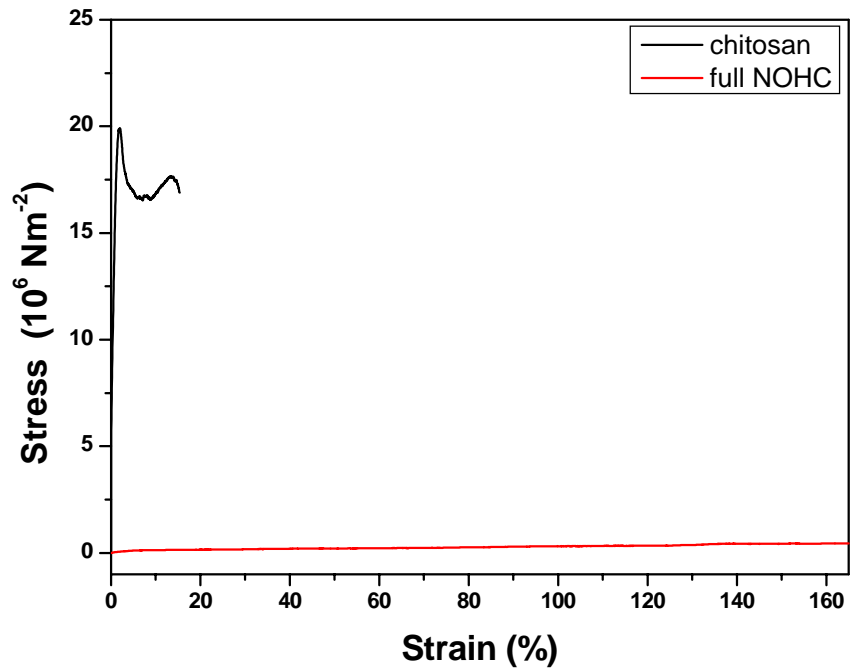


Fig.4-25 Stress/strain relation for chitosan and full NOHC.

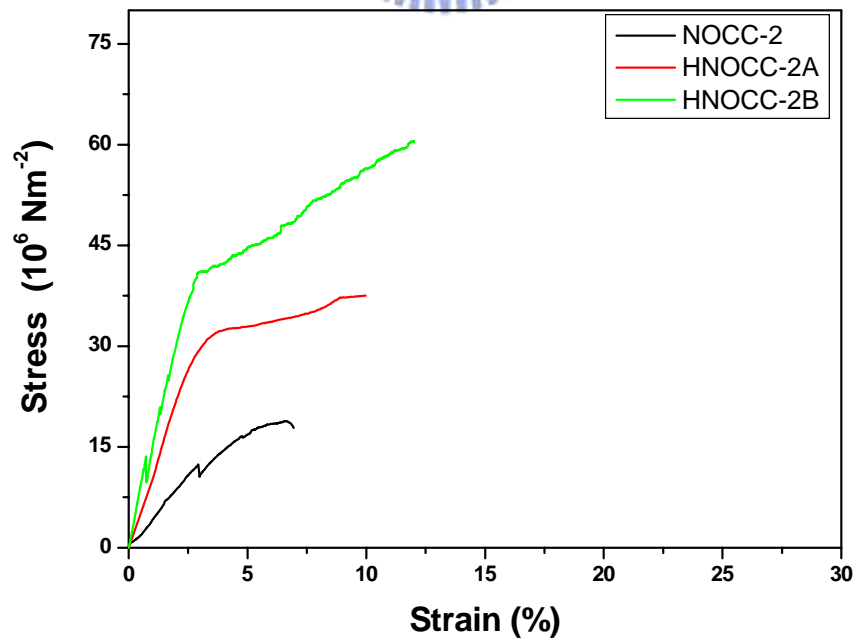


Fig.4-26 Stress/strain relation for NOCC-2 series.

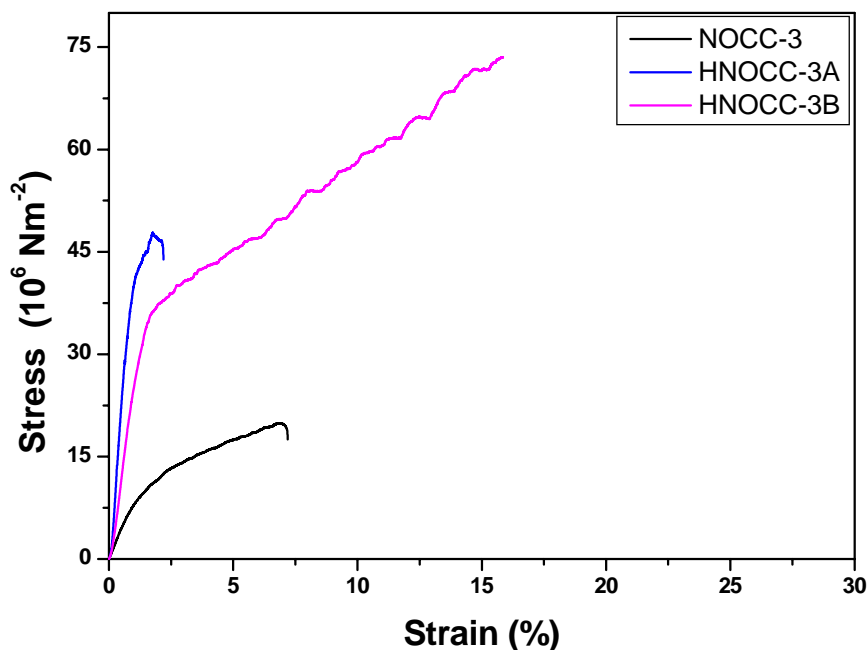


Fig.4-27 Stress/strain relation for NOCC-3 series.

Fig.4-26 是 NOCC-2 和兩性幾丁聚醣的應力對應變量圖。NOCC-2 系列隨己醯基接枝量應力提高，假設 hydrophobic interaction 佔有很重要影響，且軟鏈間的作用力造成韌性大幅增加。

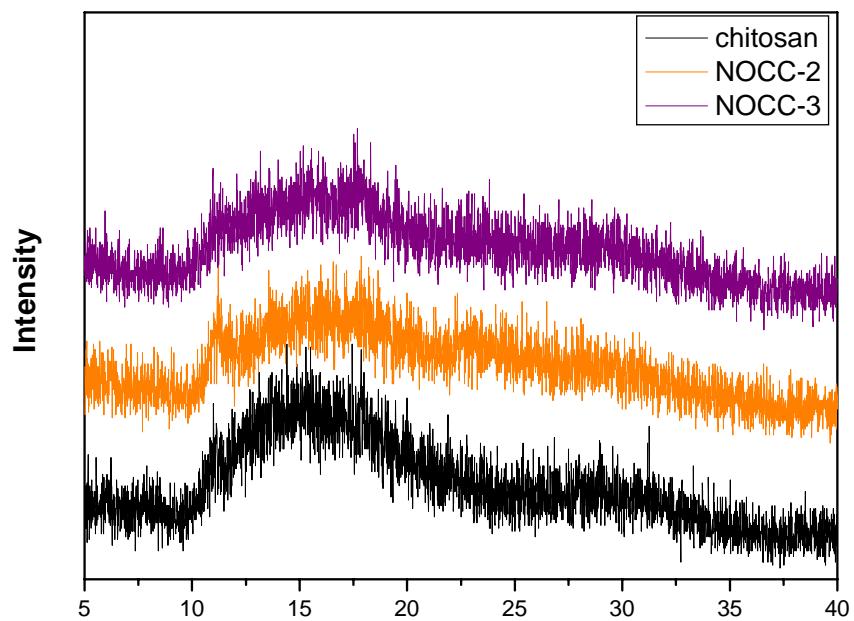
Fig.4-27 是 NOCC-3 和兩性幾丁聚醣的應力對應變量圖。HNOCC-3A 有加入 23.5% 己醯基，應力提高至  $47.5 (10^6 \text{ Nm}^{-2})$ ，似乎氫鍵扮演較大因素而不好拉動分子鏈，在應力上表現比 HNOCC-3B 強，韌性較差。HNOCC-3B 有 50.1% 己醯基，hydrophobic interaction 變成重要角色，韌性提高，但因結構較鬆而應力比 HNOCC-3A 低。

兩性幾丁聚醣衍生物皆比原來的 NOCC 強度提高，且高己醯基接枝下延展性也變好。

## 4-5 XRD

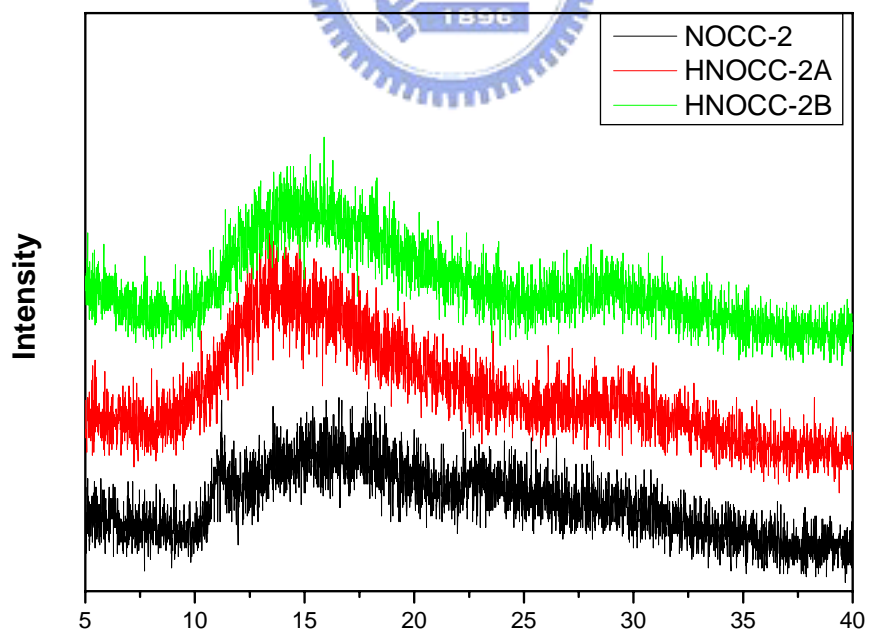
幾丁聚醣本身具細微結晶區域，由 Fig.4-28 XRD 圖中知道 NOCC 因 NaOH 及接枝羧甲基酸，會破壞其結晶性；當 HNOCC 因導入己醯基後又稍增加結晶度；若是己醯基接枝率高達 4 時，就可得到結晶度高的油溶性衍生物，這可在 Fig.4-29 full NOHC 的偏光顯微鏡看到有似層狀的結晶情況。Fig.4-30 是幾丁聚醣衍生物薄膜的 SEM 照片，形成的薄膜結構緊密。





20

(a)



20

(b)

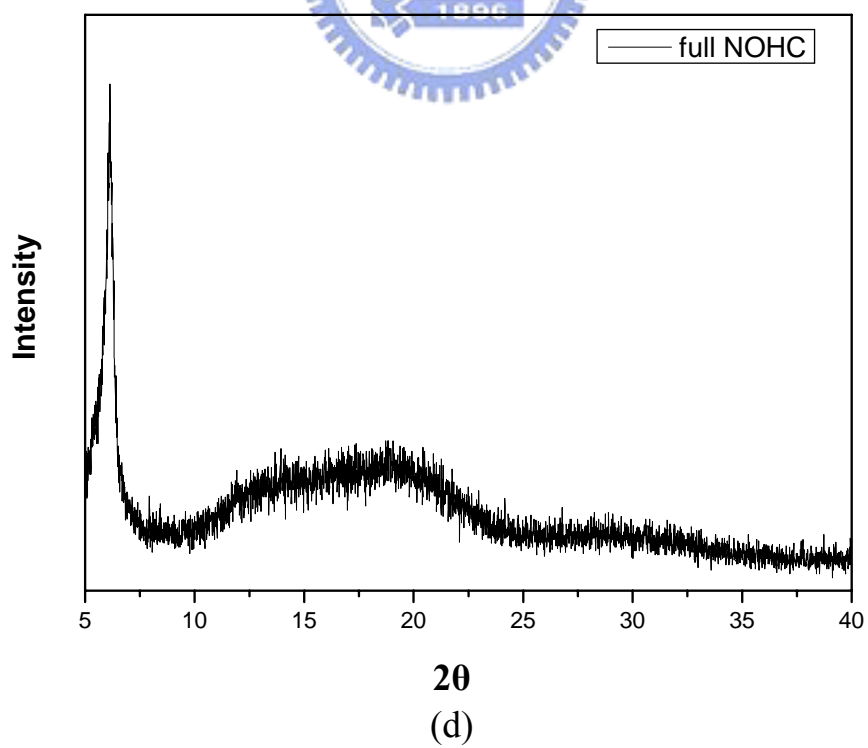
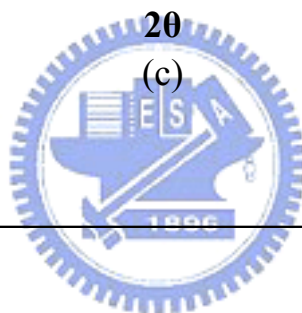
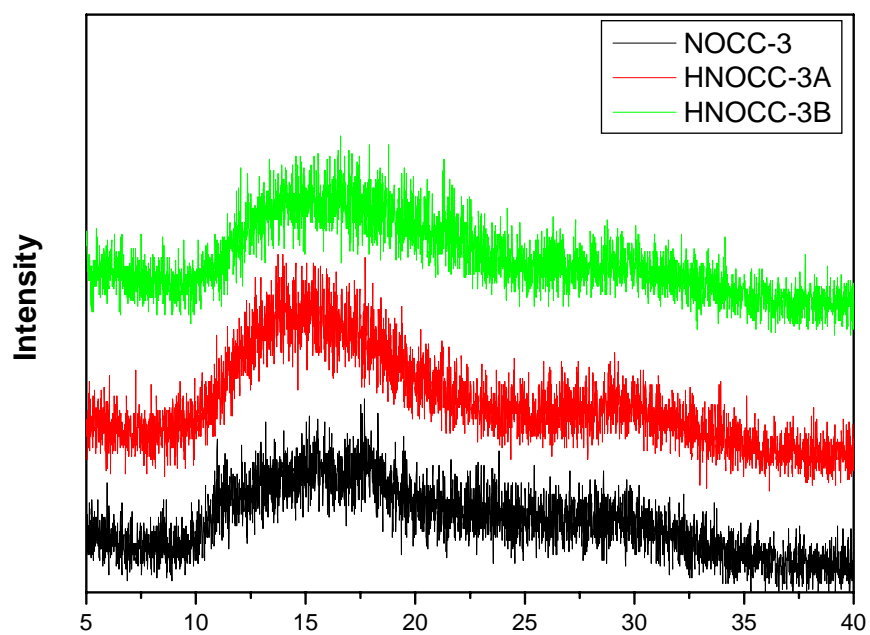


Fig.4-28 XRD of chitosan derivatives.

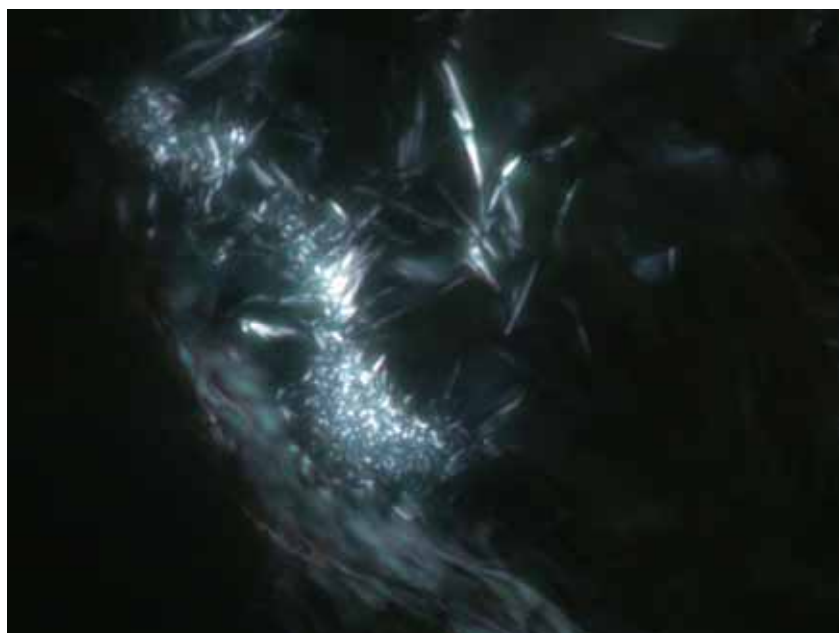
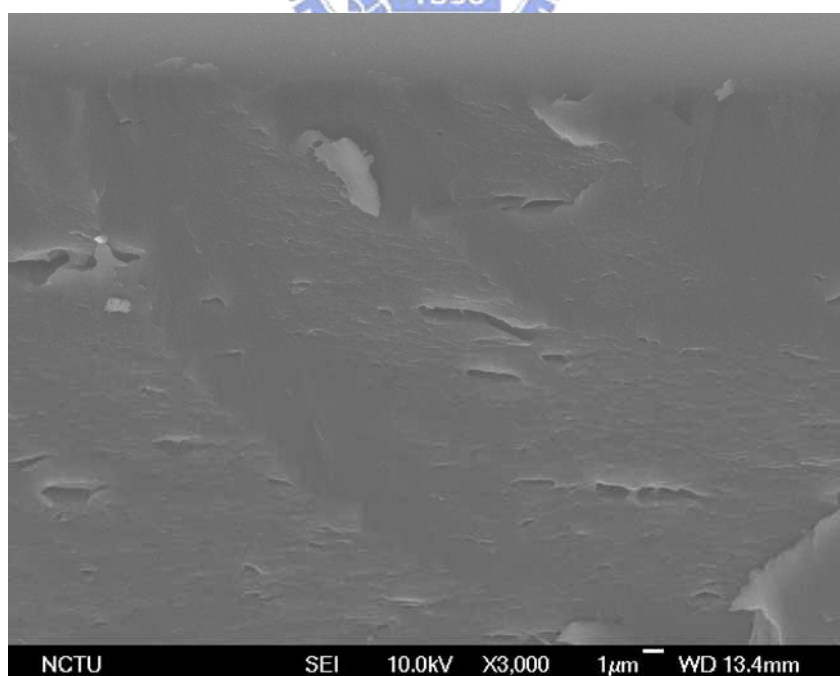
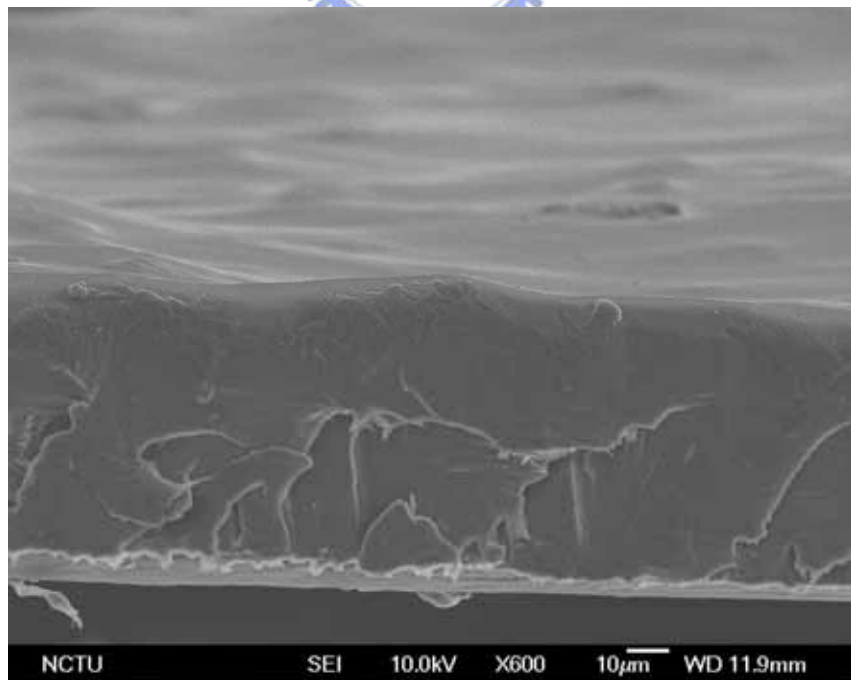
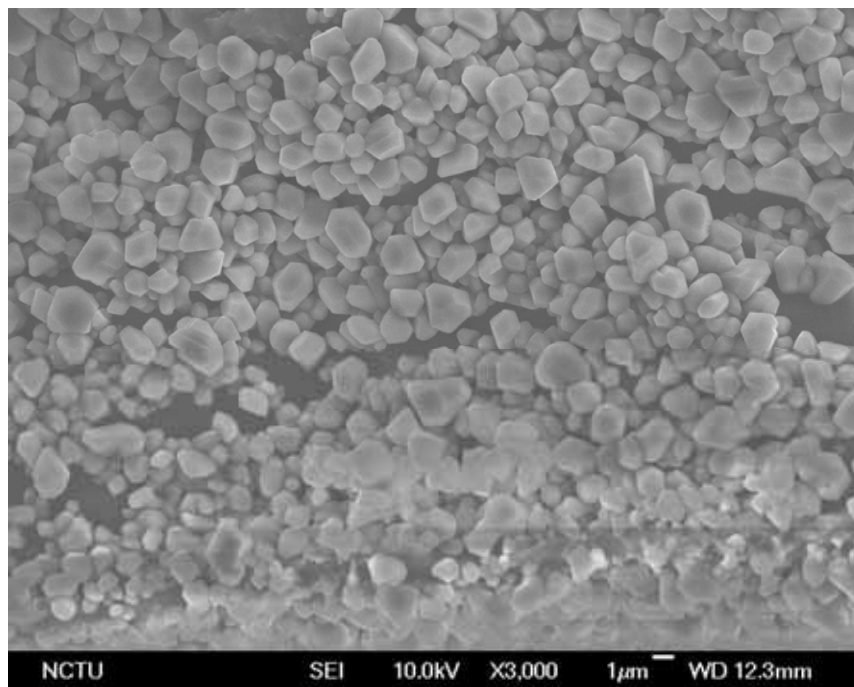


Fig.4-29 Polarizing microscope image of full NOHC.

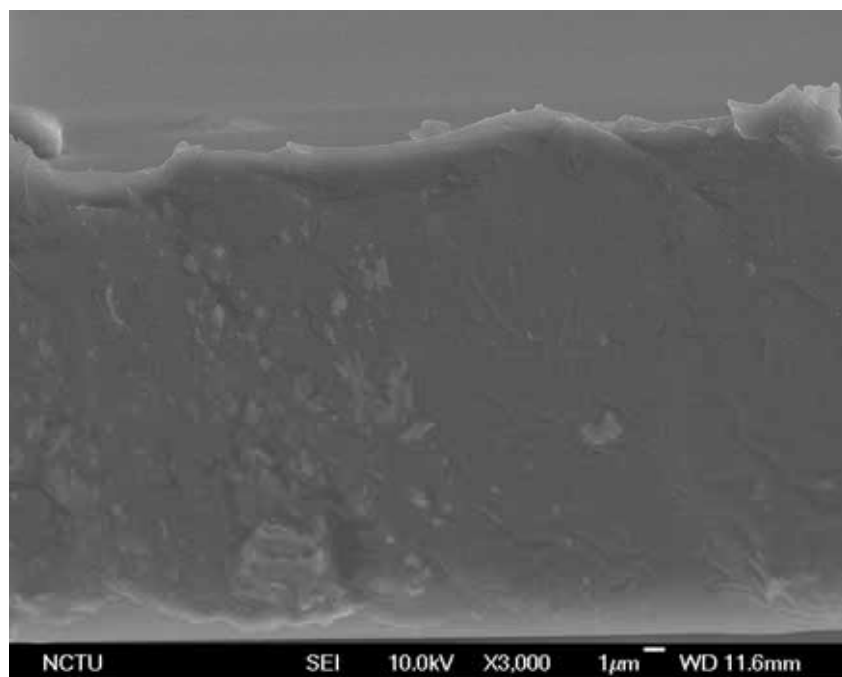


Chitosan

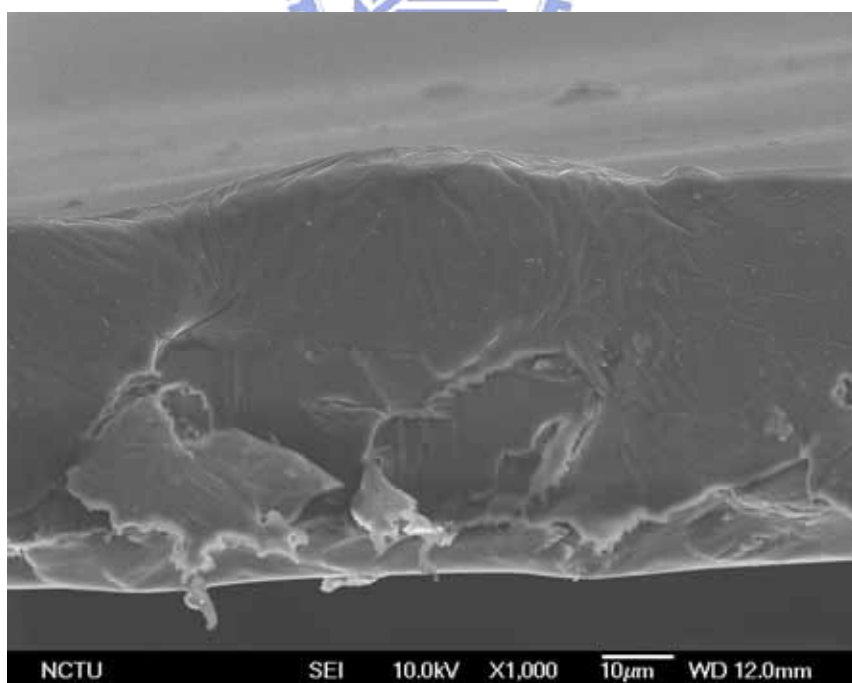




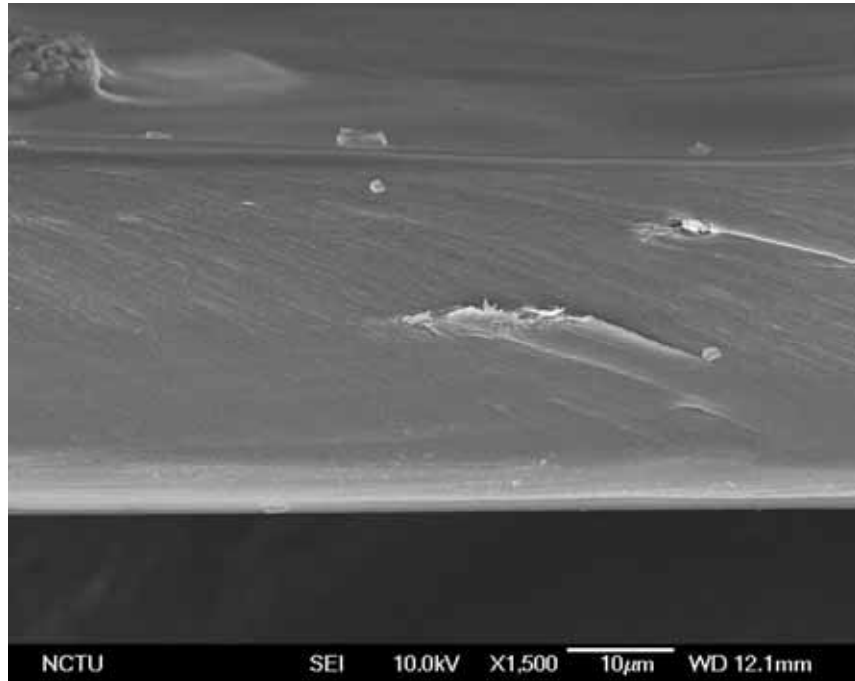
NOCC-2



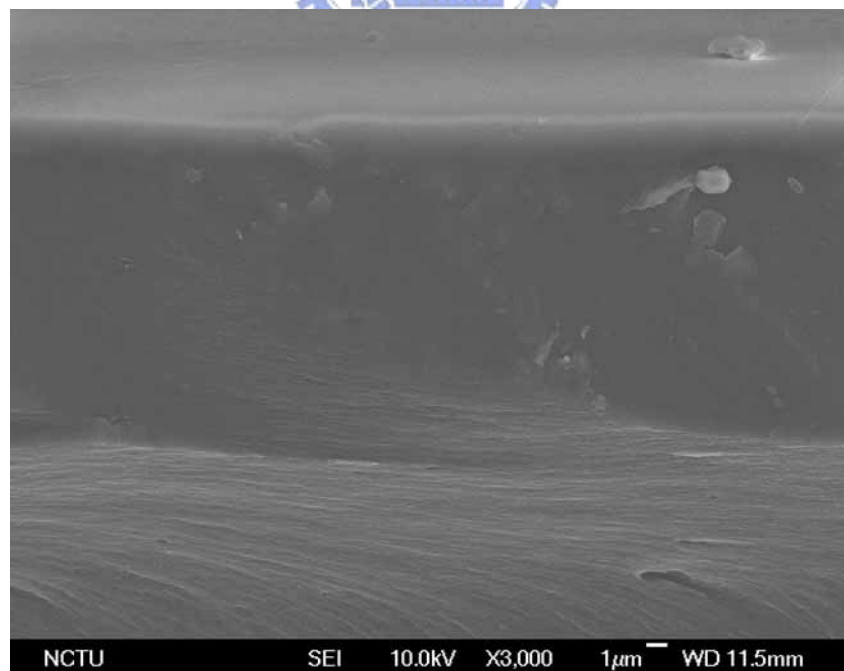
NOCC-3



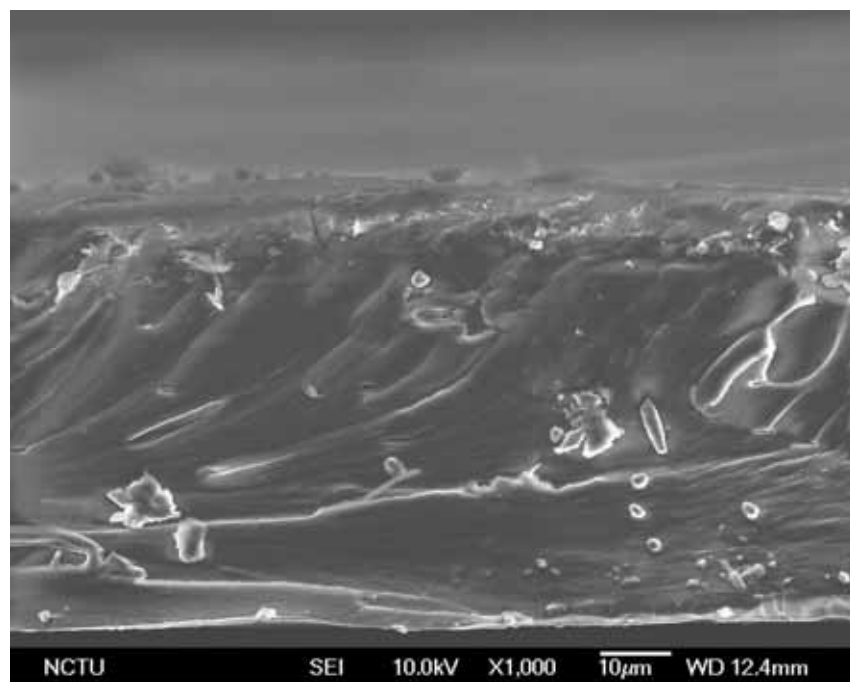
HNOCC-2A



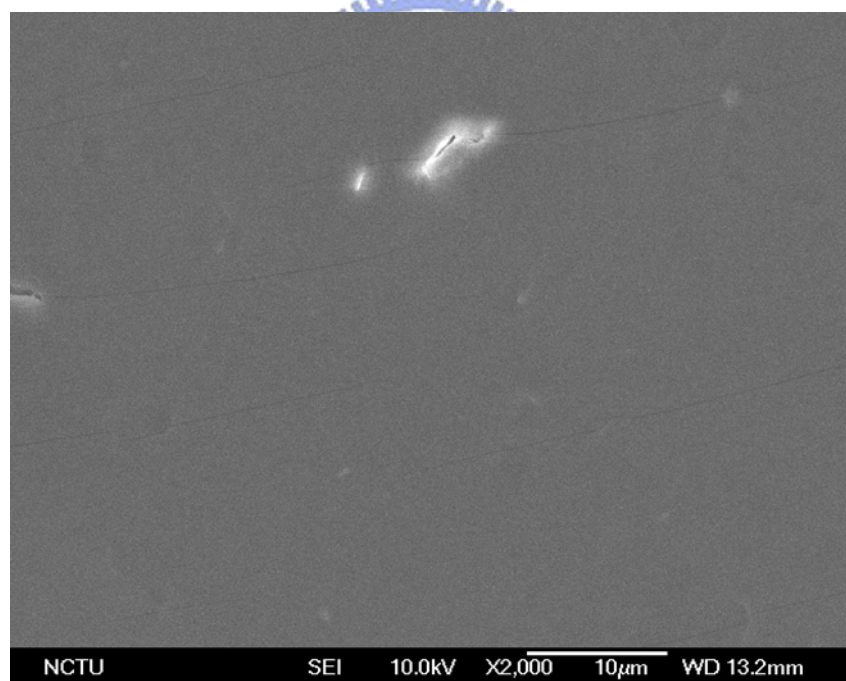
HNOCC-2B



HNOCC-3A



HNOCC-3B



Full NOHC

Fig. 4-30 SEM graphs of chitosan derivative films.

## 第五章 改質過幾丁聚醣衍生物材料吸水與持水性質

### 5-1 對於改質過後幾丁聚醣衍生物之氫鍵探討

幾丁聚醣分子鏈因帶有 hydroxyl group, amino group, carbonyl group,而富具有氫鍵作用力使得影響溶解度性質，為改善幾丁聚醣的對水溶解度問題，會以接枝水溶性官能基來增加親水性和破壞原有堅硬氫鍵鍵結，提高在水中溶解性。

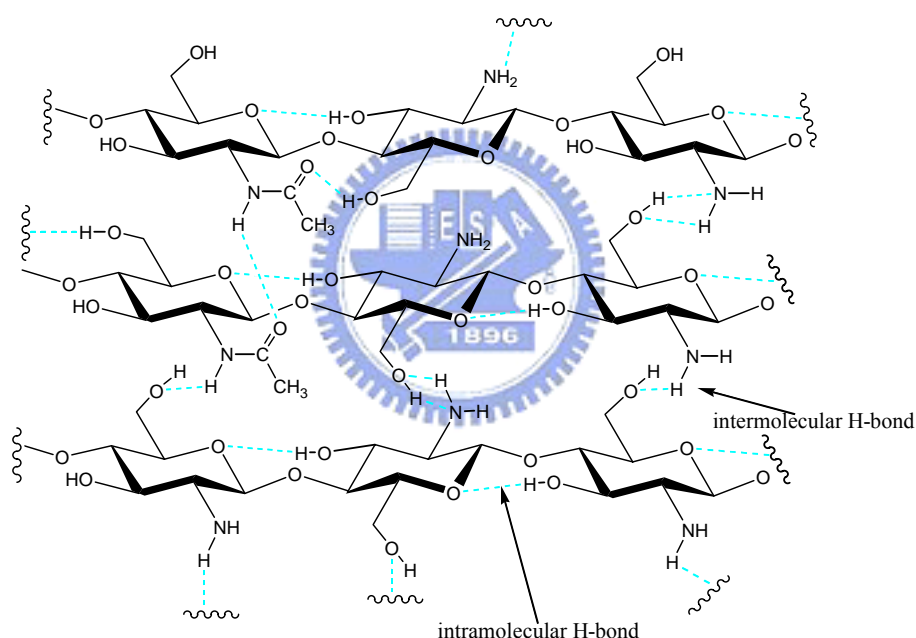


Fig.5-1 Diagram of the hydrogen bonding structure for chitosan.

Fig.5-1 是幾丁聚醣分子間及內部氫鍵鍵結圖，胺基是氫提供者，而二級醇是氫的接受者，兩者一起形成氫鍵，一級醇還會跟 C=O 氫鍵，O<sub>5</sub> 跟二級醇形成氫鍵鍵結[84]。

欲利用 FTIR 分析觀察化學改質幾丁聚醣衍生物的氫鍵變化，因需提供部

分電子去形成氫鍵，若有氫鍵影響會使原本鍵結的電子密度降低，IR 吸收能量會降低。

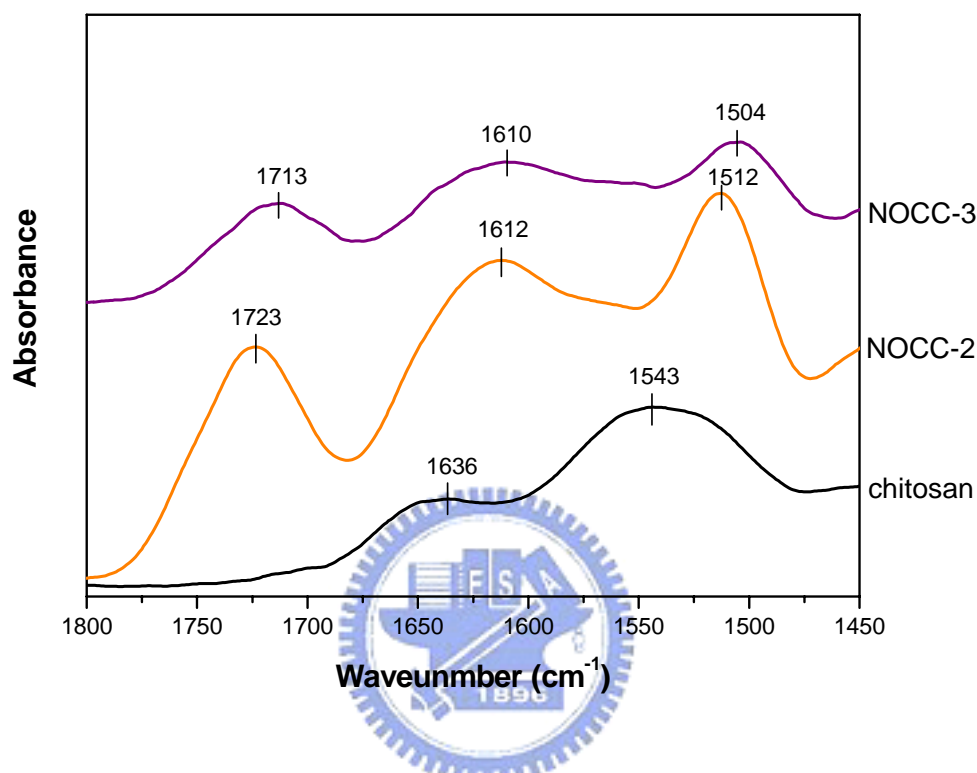


Fig.5-2 FTIR-ATR spectra chitosan, NOCC-2 and NOCC-3.

幾丁聚醣中的胺基及羥基是在 FTIR-ATR 光譜之  $2800\text{ cm}^{-1}\sim 4000\text{ cm}^{-1}$  吸收峰位置，及在  $1450\text{ cm}^{-1}\sim 1800\text{ cm}^{-1}$  範圍內有醯基的 amide I, amide II 吸收，但因胺基及羥基訊號會有重疊而不易辨別，所以這裡將著重在  $1450\text{ cm}^{-1}\sim 1800\text{ cm}^{-1}$  範圍內醯基的吸收位置變化。

Fig.5-2 是未改質幾丁聚醣和羧甲基酸幾丁聚醣衍生物的 FTIR 光譜圖。一般來說幾丁聚醣的乙醯基的 amide I ( $\text{C}=\text{O}$ )約在  $1650\text{ cm}^{-1}$ ，amide II ( $-\text{NH}$ )約為  $1550\text{ cm}^{-1}$ ，而實驗數據所得幾丁聚醣的乙醯基的 amide I ( $\text{C}=\text{O}$ )約在  $1636$

$\text{cm}^{-1}$ ，amide II (-NH)約為  $1544 \text{ cm}^{-1}$ ，這可能是膜材試樣內有水分子產生氫鍵作用關係[85]，以下的討論皆以幾丁聚醣在 FTIR-ATR 光譜的特徵吸收位置( $1636 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1544 \text{ cm}^{-1}$ )為基準參點。可看到 NOCC-2 的 FTIR-ATR 光譜中醯基的 amide I= $1612 \text{ cm}^{-1}$ ( $\Delta\nu=24 \text{ cm}^{-1}$ )，amide II= $1513 \text{ cm}^{-1}$ ( $\Delta\nu=21 \text{ cm}^{-1}$ )；NOCC-3 的 FTIR 光譜中 amide I= $1610 \text{ cm}^{-1}$ ( $\Delta\nu=26 \text{ cm}^{-1}$ )，amide II= $1504 \text{ cm}^{-1}$ ( $\Delta\nu=40 \text{ cm}^{-1}$ )。

所以觀察到幾丁聚醣接枝羧甲基酸根後，NOCC-2 的乙醯 amide I( $\Delta\nu=24 \text{ cm}^{-1}$ ), amide II( $\Delta\nu=21 \text{ cm}^{-1}$ )的 IR 吸收能量些微降低，是因-COOH 所形成氫鍵影響結果，而  $\Delta\nu$  差異值愈大表示氫鍵強度愈大；羧甲基酸根對 NOCC-3 有同樣的影響，amide I( $\Delta\nu=26 \text{ cm}^{-1}$ ), amide II( $\Delta\nu=40 \text{ cm}^{-1}$ )的 IR 吸收能量也些微降低，因此接枝羧甲基酸根後分子間氫鍵強度  $\text{NOCC-3} > \text{NOCC-2} > \text{chitosan}$ 。



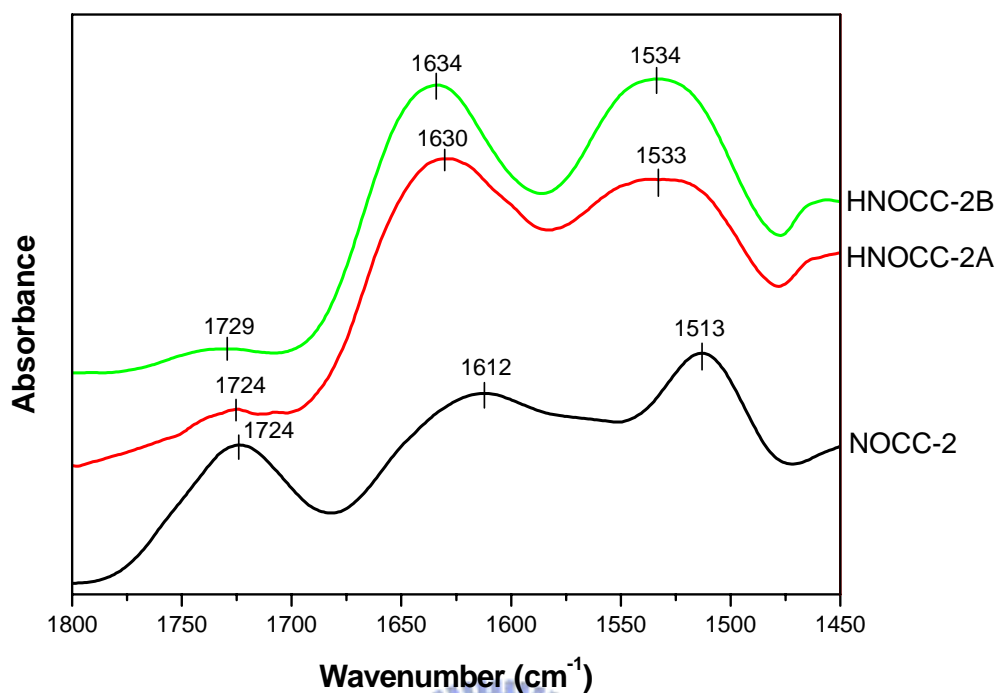


Fig.5-3 FTIR spectra of NOCC-2 series.

Fig.5-3 是兩性幾丁聚醣衍生物 NOCC-2 series 的 FTIR 光譜圖。可看到隨己醯基接枝量由 0 (NOCC-2)、0.26 (HNOCC-2A)至 0.44 (HNOCC-2B)，FTIR-ATR 光譜中 amide I 分別是  $1612\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\nu=24\text{ cm}^{-1}$ )、 $1630\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\nu=4\text{ cm}^{-1}$ )、 $1632\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\nu=2\text{ cm}^{-1}$ )，表示導入己醯基對 amide group 會減少氫鍵作用，但在 NOCC-2 series 中提高己醯基接枝量對 amide II 卻無影響。因此接枝己醯基後 NOCC-2 series 分子間氫鍵強度比  $\text{NOCC-2} > \text{HNOCC-2A} \cong \text{HNOCC-2B}$ 。

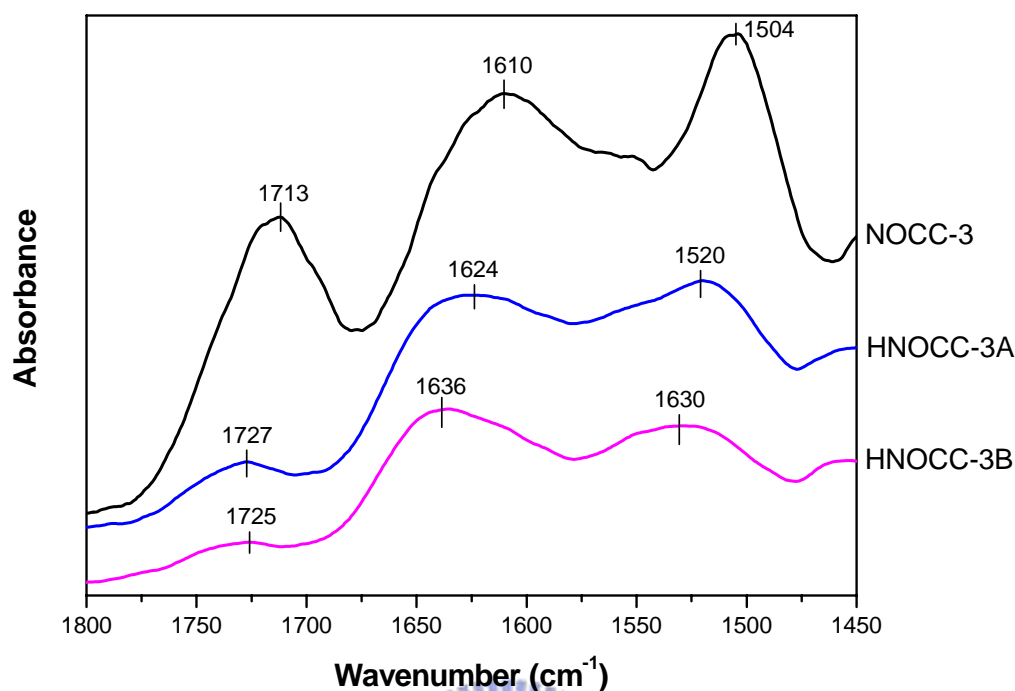
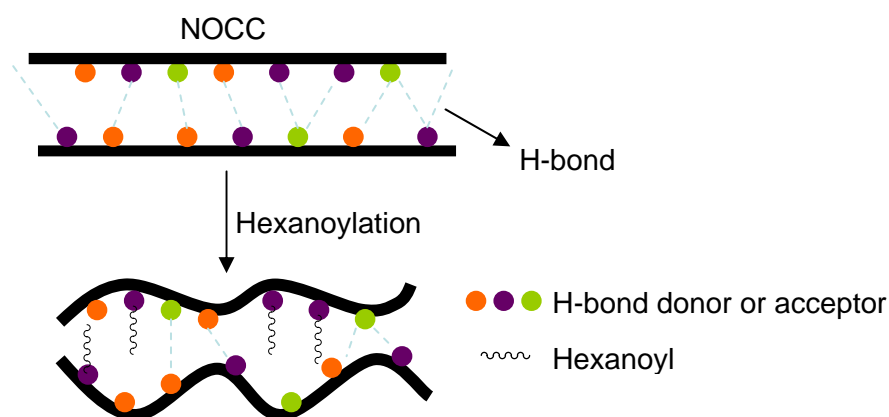


Fig.5-4 FTIR spectra of NOCC-3 series.

Fig.5-4 是兩性幾丁聚醣衍生物 NOCC-3 series 的 FTIR-ATR 光譜圖。可看到隨己醯基接枝量由 0 (NOCC-3)、0.23 (HNOCC-3A) 至 0.44 (HNOCC-3B)，FTIR-ATR 光譜中 amide I 的吸收能量分別是  $1610\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\nu=26\text{ cm}^{-1}$ )、 $1624\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\nu=12\text{ cm}^{-1}$ )、 $1636\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\nu=0\text{ cm}^{-1}$ )；amide II 的吸收能量分別是  $1504\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\nu=40\text{ cm}^{-1}$ )、 $1520\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\nu=24\text{ cm}^{-1}$ )、 $1530\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\nu=14\text{ cm}^{-1}$ )，表示對於 NOCC-3 series 導入己醯基使 amide group 減少氫鍵作用，因此接枝己醯基後 NOCC-3 series 分子間氫鍵強度  $\text{NOCC-3} > \text{HNOCC-3A} > \text{HNOCC-3B}$ 。



上圖是假設對水溶性幾丁聚醣導入己醯基後，長鏈碳使分子間間距撐開的圖示。當幾丁聚醣接枝羧甲基酸基後分子間氫鍵作用變強，且隨羧甲基酸基接枝率提高分子間氫鍵越強，在文獻[85, 86]中甚至提到羧甲基酸會與胺基在分子鏈間形成很強的 conjugative H-bond ( $\text{C}=\text{O} \cdots \text{NH}$ )，這會造成分子鏈聚集現象；接枝上長鏈碳己醯基後的兩性幾丁聚醣其內部氫鍵鍵結會因此減弱，分子結構也會較為鬆散，分子間間距變大。

## 5-2 鍵結水能力

目前有許多高分子材料被應用於生物醫學方面，因人體佔有 75%的水，所以引發許多學者研究材料和水之間的作用。Nakamura K, Hatakeyama H, McCrystal CB, Joshi NH 等人定義在聚合物內部的水分為三種型態[87~91]:

Table 2  
Classification of the state of water in water-swollen polymer systems.

Bound water		Free water, Freezing (I)
Non-freezing(III)	Freezing(II)	
Freezing at/or Below 180 K	Freezing between 180 and 273 K	Freezing at 273 K
Bound	Interfacial	Bulk
Primary bound	Secondary bound	Free bulk
Tightly bound	Loosely bound	

這裡我們使用 DSC 儀器來探討水分子與高分子材料的作用[92]，以加入不同水量於膜中，使膜達不同含水量，在經歷平衡 24 小時後精確稱重。

$$W_c \% = 100 \times (W_s - W_d) / W_d \quad (8)$$

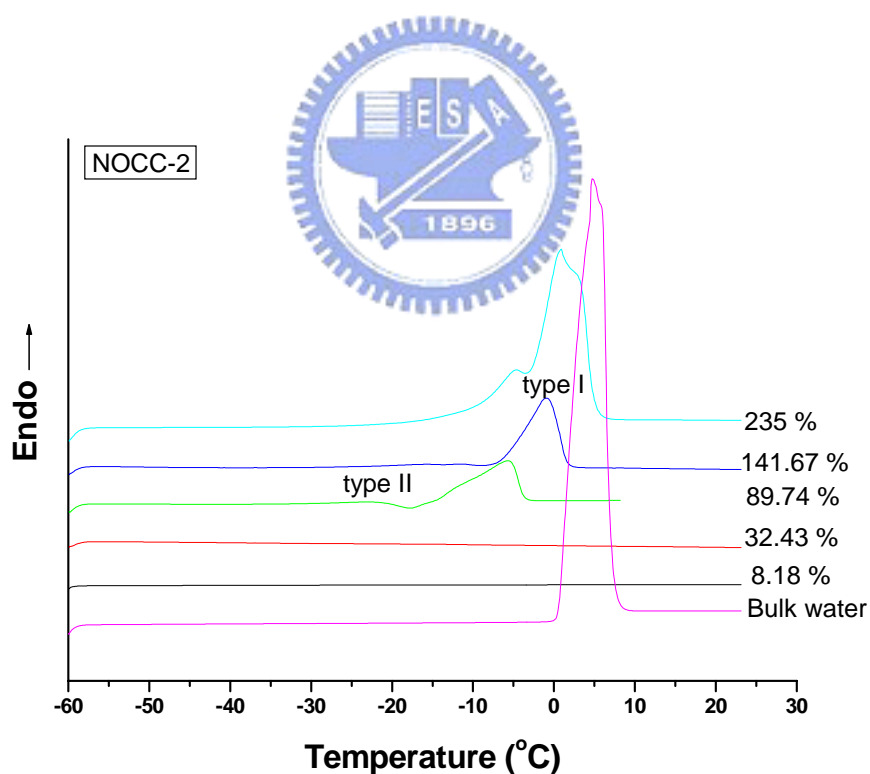
$W_c$  = 含水量

$W_d$  = 乾膜重量

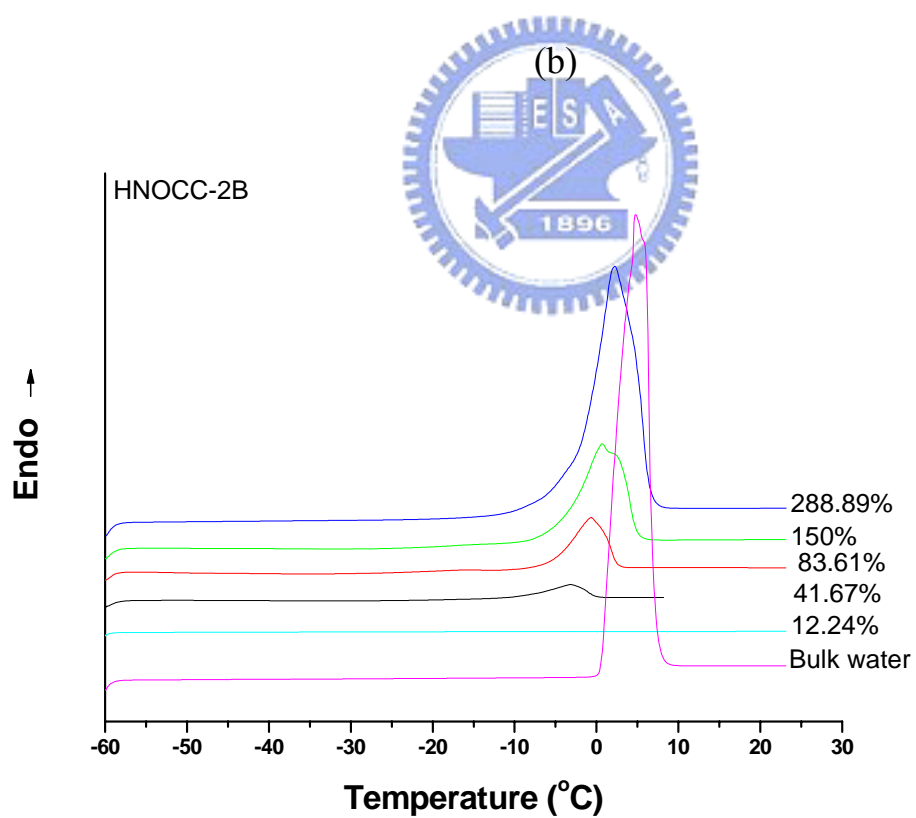
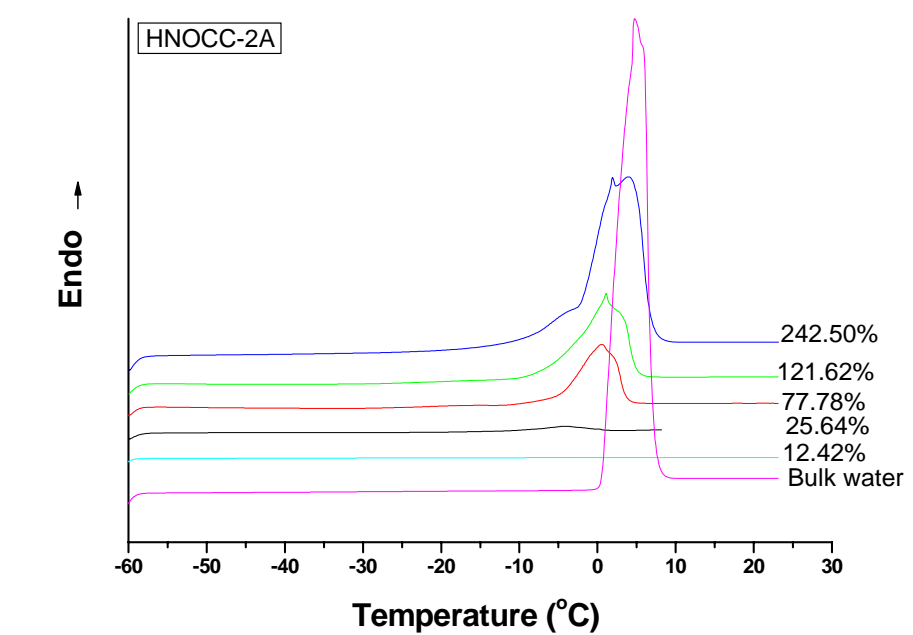
$W_s$  = 濕膜重量

以 DSC 量測不同含水量膜的方法:在-60 恆溫 10 分鐘後，由-60 掃描至 25，速率: 5 /min，就可得到 DSC 結果，圖中是材料內部水在 0 附近相變化吸熱峰。Fig.5-5 和 Fig.5-6 是對膜在不同含水量掃描 DSC 結果。一般而言，高分子內部的自由水隨著整體含水量愈來愈高，水的狀態和性質

會愈接近 bulk water，融化吸收峰愈向 bulk water 融化吸熱峰( $T_{mp}= 4.75$  )靠近。而在自由水的融化吸熱峰左邊約-20 有時會出現微小吸熱是水和高分子有弱鍵結作用的結果。相較 bulk water 融化吸熱，在分子內部的水吸熱峰形狀通常不太對稱，這跟材料本身有關。Fig5-5~6 是分別不同含水量的幾丁聚醣衍生物以 DSC 掃描得到結果。

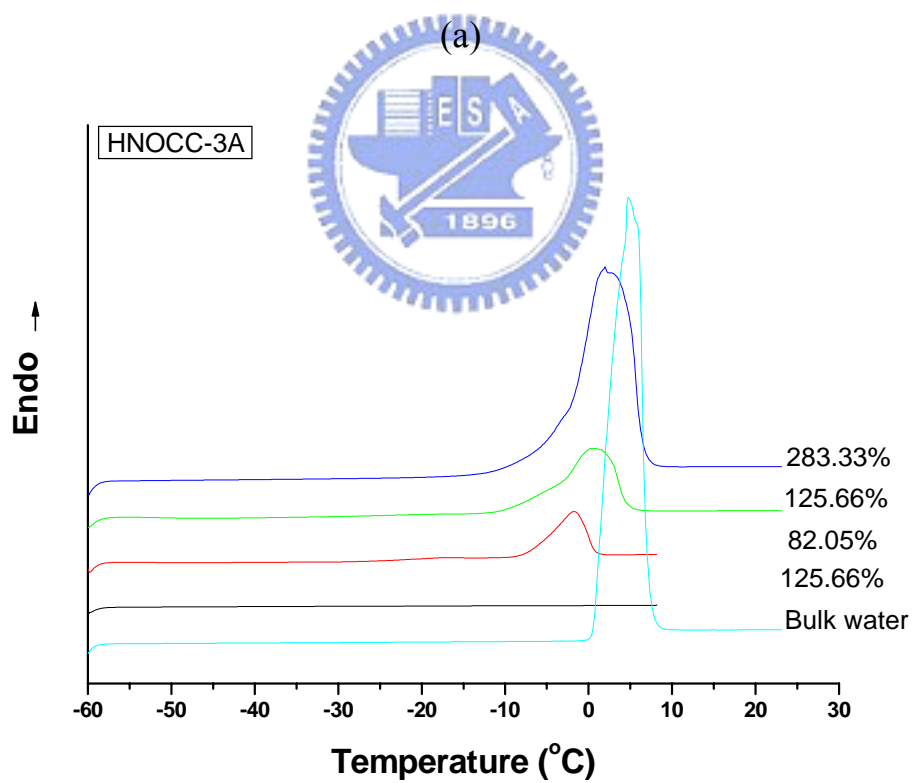
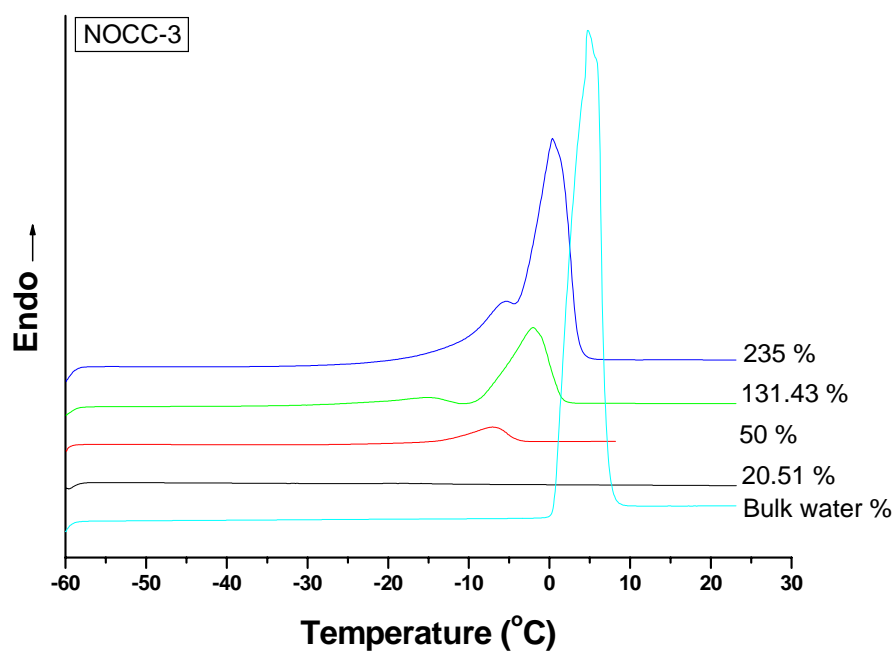


(a)



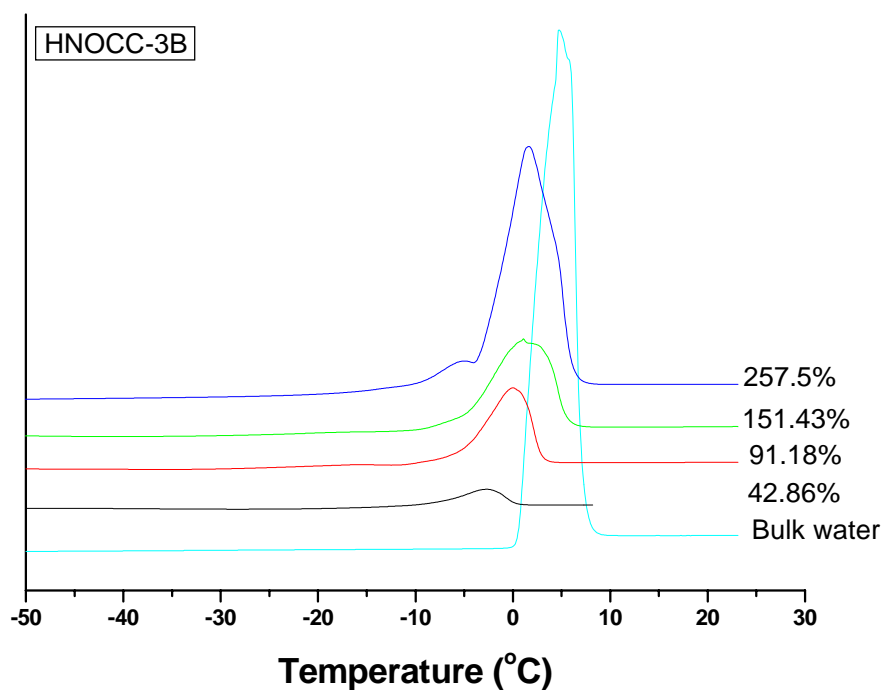
(c)

Fig.5-5 Representative DSC melting endotherms of pure water and of water in hydrate NOCC-2 series at different water content.



(b)





(c)

Fig.5-6 Representative DSC melting endotherms of pure water and of water in hydrate NOCC-3 series at each water content.

由自由水的融化吸熱能量及水的融化焓 348 (J/g)代入公式(9)~ (14)，算出在分子內部自由水含量( $W_f$  %), 進而可得到鍵結在分子上水的含量( $W_b$  %), 得到 Table 3.。

Table 3. Effect of water content on melting onset temperature, melting peak temperature and bound water content for chitosan derivatives.

Temperature and Density Water Content for Unknown Samples							
$W_c$ (%)	Free freezing water			$W_{mo}$ (%)	$W_{nf}$ (%)	$W_b$ (%)	$M_n$
	$T_{mo}$ ( )	$T_{mp}$ ( )	$W_f$				
NOCC-2							
32.43	---	---	0	0	32.43	32.43	3.313
89.74	-15.49	-5.71	39.04	8.23	42.48	50.71	5.181
141.67	-6.03	-0.89	46.95	2.58	92.14	94.14	9.618
235	-3.48	0.88	167.68	---	67.32	67.32	6.878
HNOCC-2A							
12.41	---	---	0	0	12.41	12.41	1.444
25.64	-9.84	-4.12	20.81	0	4.83	20.83	2.423
80.56	-5.03	0.95	47.44	0.45	29.89	33.12	3.852
121.62	-2.71	1.10	73.24	0.001	48.38	48.38	5.628
242.50	-1.38	3.98	181.62	---	60.82	60.82	7.074
HNOCC-2B							
12.24	---	---	0	0	12.24	12.24	1.544
41.67	-9.14	-3.14	11.43	0	30.23	30.23	3.813
83.61	-5.39	-0.65	36.43	0.91	46.27	47.18	5.950
150	-4.17	0.67	82.73	0.003	67.26	67.27	8.484
288.89	-2.32	2.20	217.31	0	71.56	71.56	9.025
Bulk water	2.57	4.75					

在其他樣品中 $W_b$ 隨 $W_c$ 上升，但NOCC-2在 $W_c = 141.67\%$ 達到最大值之後隨之下降，NOCC-3也存有同樣趨勢

$W_c$  = water content

$T_{mo}$  = melting onset temperature

$T_{mp}$  = melting peak temperature

$W_f$  = free freezing water content

$W_{bf}$  = loosely bound water content

$W_{nf}$  = non-free freezing water content(tightly bound water)

$W_b$  = total of bound water

$M_n$  = the number of molecules of nonfreezing bond water attached per polymer repeating unit.

Table 4. Effect of water content on melting onset temperature, melting peak temperature and bound water content for chitosan derivatives.

Free freezing water							
$W_c$ (%)	$T_{mo}$ ( )	$T_{mp}$ ( )	$W_f$	$W_{bf}$ (%)	$W_{nf}$ (%)	$W_b$ (%)	$M_n$
NOCC-3							
20.51	---	---	0	0	20.51	20.51	2.212
50	-13.24	-7.10	12.01	0	37.99	37.99	4.098
131.43	-7.97	-2.03	58.27	7.96	65.20	73.16	7.891
235	-4.73	0.38	176.34	---	57.66	57.66	6.219
HNOCC-3A							
30.77	---	---	0	0	30.77	30.77	3.704
82.05	-6.87	-1.8	23.74	1.19	57.59	58.78	7.075
125.66	-5.10	0.28	65.78	0.27	59.61	59.88	7.207
283.33	-3.06	1.95	221.59	0	61.74	61.74	7.431
HNOCC-3B							
42.86	-8.26	-2.72	13.03	0	29.83	29.83	3.933
91.18	-5.41	0.009	55.52	1.23	34.43	35.66	4.702
151.43	-5.22	1.08	84.12	0.251	67.06	67.31	8.874
257.5	-2.84	1.69	173.83	---	---	83.67	11.031
Bulk water	2.57	4.75					

$$W_c (\%) = 100 \times (W_i - W_d) / W_d \quad (9)$$

$W_i$  : 實驗初始含水膜重       $W_d$  : 未含水的乾膜重

$$W_f (\%) = 100 \times (\Delta H_f / 348) / W_d \quad (10)$$

$\Delta H_f$  : 由 DSC 量測得 free freezing 水的焓

$$W_{bf} (\%) = 100 \times (\Delta H_{bf} / 348) / W_d \quad (11)$$

$\Delta H_{bf}$  : 由 DSC 量測得 loosely bound freezing 水的焓

$$W_{nf} (\%) = W_c - W_f \quad (12)$$

$$W_b = W_{bf} + W_{nf} \quad (13)$$

$$M_n = (M_{w,a} \times W_b) / (18 \times 100) \quad (14)$$

$M_{w,a}$  : 試樣單體分子量

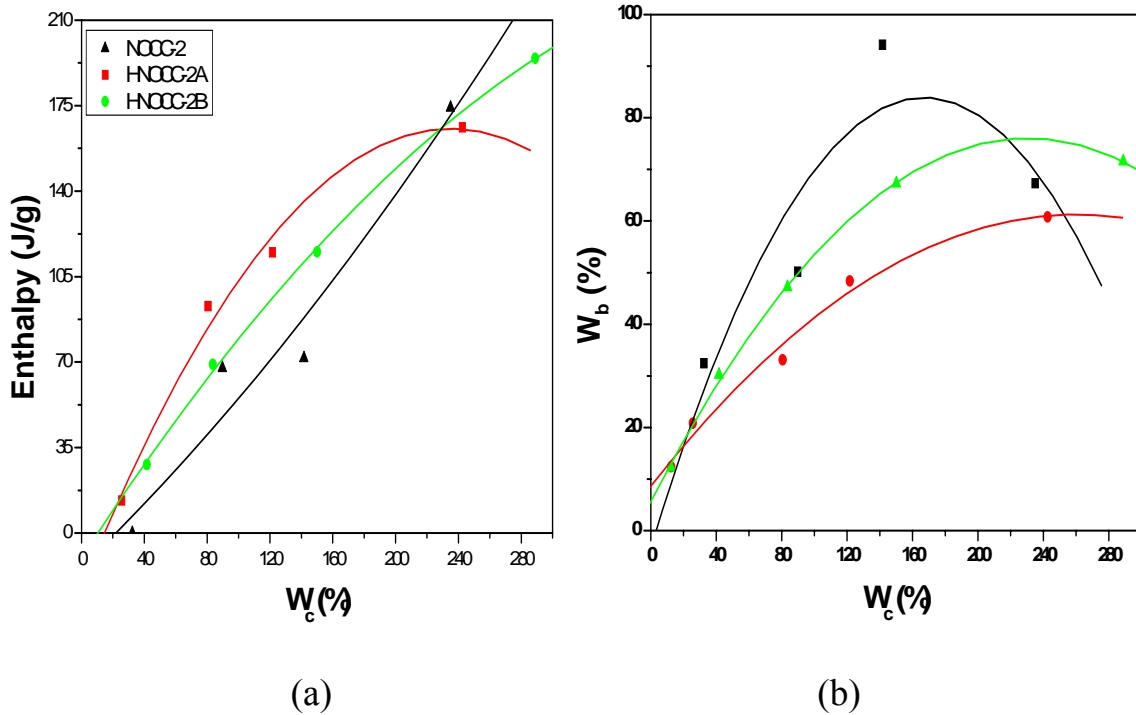


Fig.5-7 (a) enthalpies (J/g) (b)  $W_b$  % associated with melting endotherms as function of the water content .

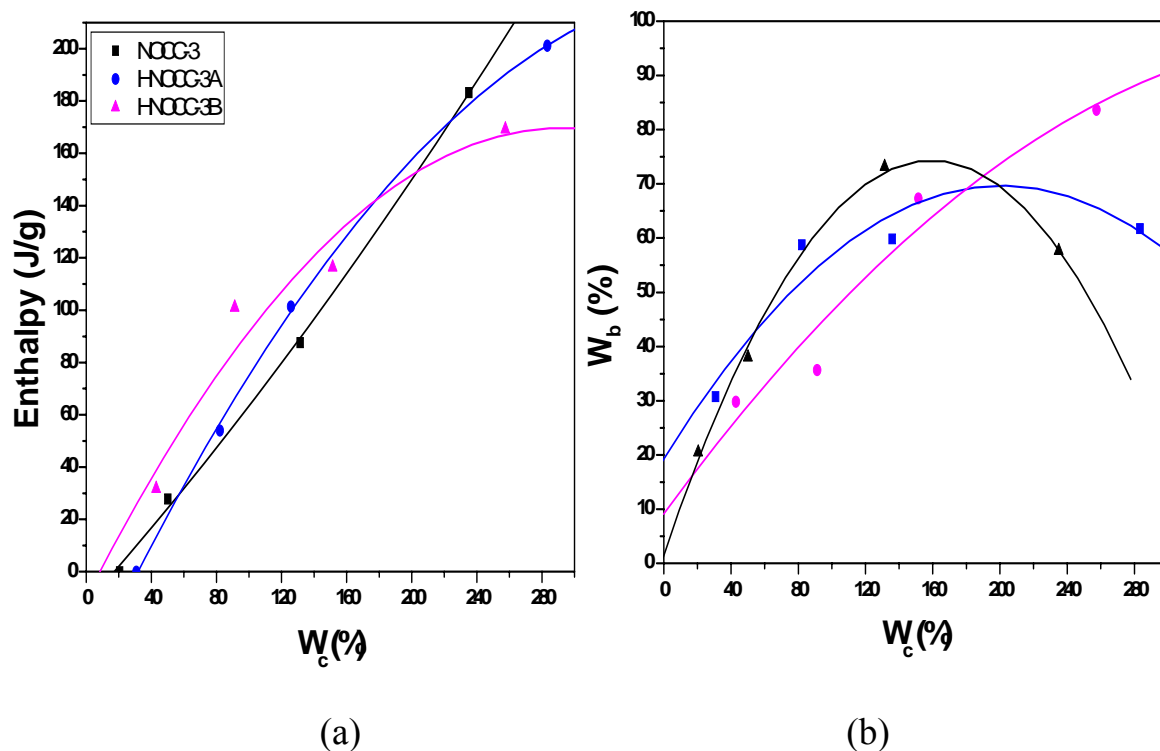


Fig.5-8 (a) enthalpies (J/g) (b)  $W_b$  % associated with melting endotherms as function of the water content .

將每種試樣在不同含水量下的 $\Delta H_f$ 對 $W_c$ (%)作圖，及不同含水量下的 $W_b$ (%)對 $W_c$ (%)作圖，分別得到Fig.5-7(a)。Fig.5-7中 $\Delta H_f$ 愈高表示非鍵結水(未能與高分子形成氫鍵)含量愈大，若轉換為Fig.5-7(b)來看，可清楚知道當 $W_c$  (%)小於15%時材料中內含鍵結水的比較  $\text{HNOCC-2A} > \text{HNOCC-2B} > \text{NOCC-2}$ ；但當 $W_c$  (%)約為30%~220%時內含鍵結水的比較為  $\text{NOCC-2} > \text{HNOCC-2B} > \text{HNOCC-2A}$ 。

同樣地以這樣方法研究 NOCC-3 series 水型態得到 Table 4.與 Fig. 5-8。當 $W_c$ (%)小於 15%時材料中內含鍵結水的比較為  $\text{HNOCC-3A} > \text{HNOCC-3B} > \text{NOCC-3}$ ；但當  $W_c$  (%)約為 60%~ 180%時內含鍵結水的比較為  $\text{NOCC-3} >$

HNOCC-3A > HNOCC-3B。這可以轉化成 Fig.5-9 可以較清楚明白，分別在  $W_c=10\%$ 、 $W_c=160\%$ 時 DH 對  $W_b$  的影響。

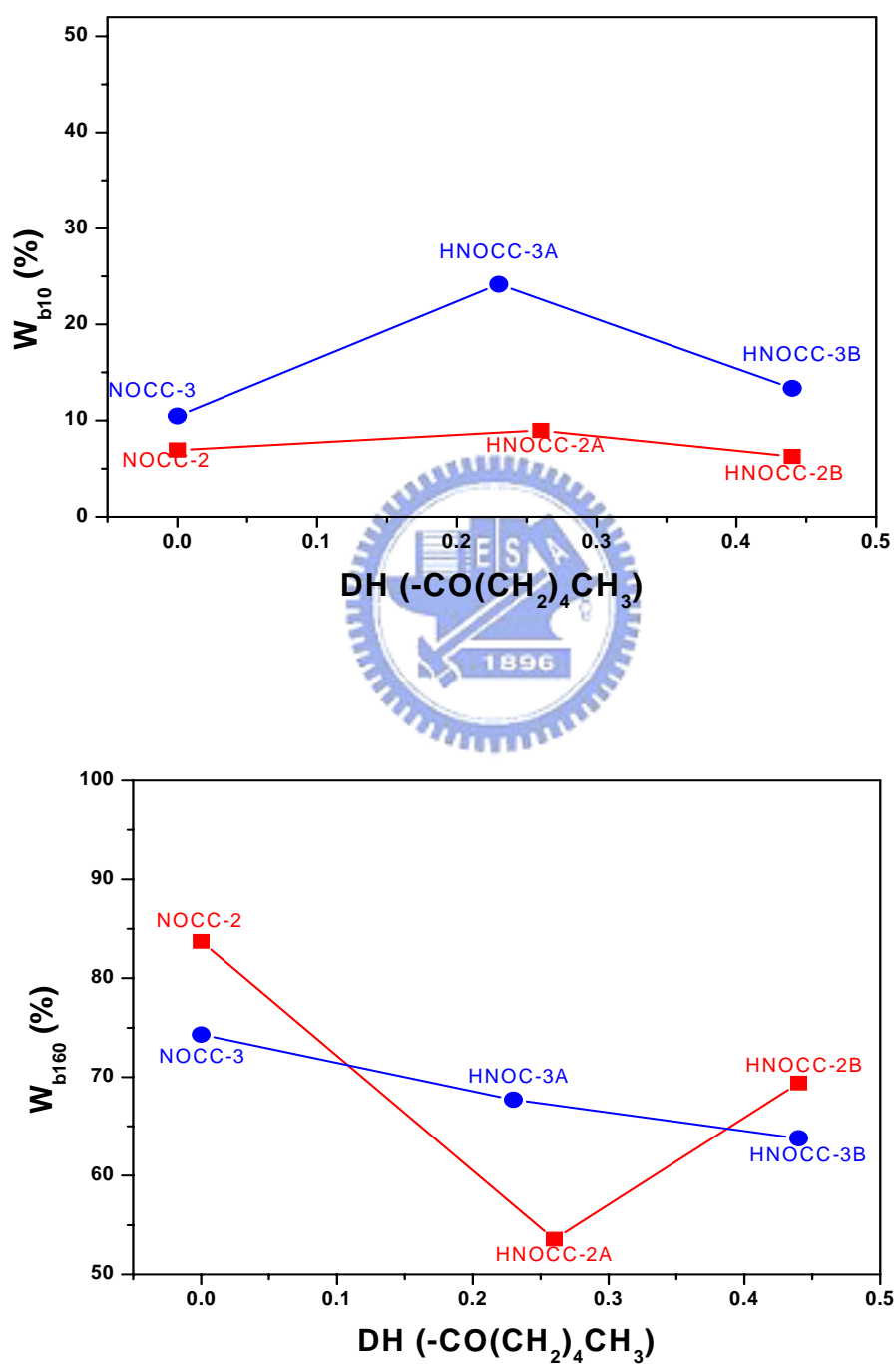
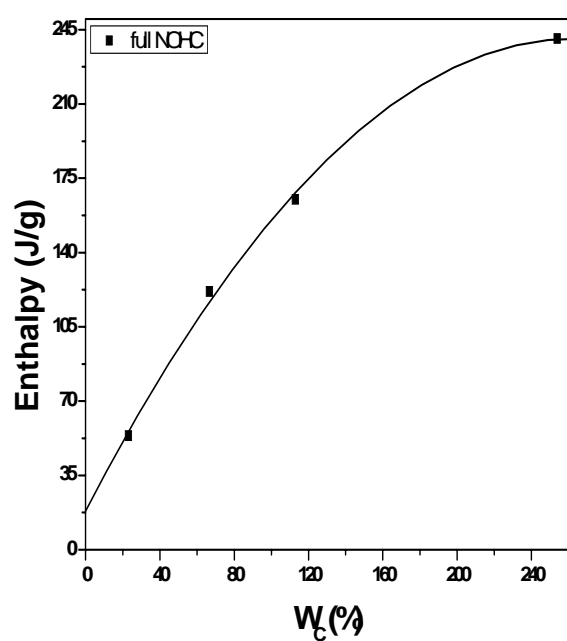


Fig.5-9 Degree of hexanoyl groups substitution affect on  $W_b$ %  
(at  $W_c=10\%$  &  $160\%$ ).

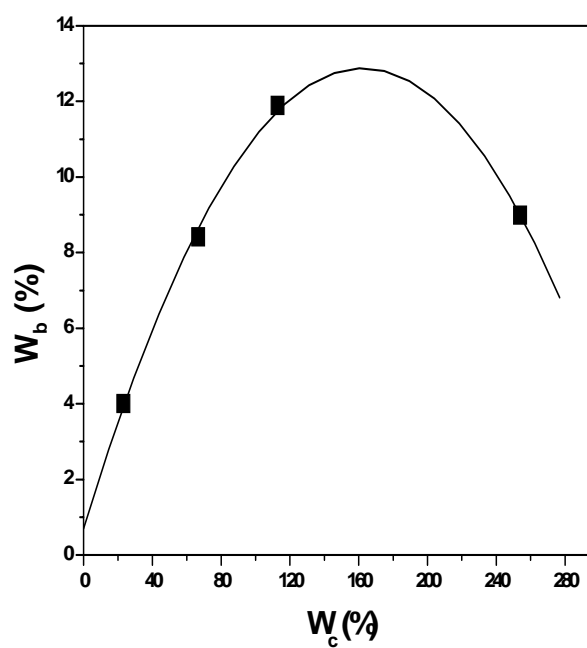
利用對 full NOHC 水型態研究得到 Table 5.、Fig.5-10。

Table 5. Effect of water content on melting onset temperature, melting peak temperature and bound water content for chitosan derivatives.

Free freezing water							
$W_c$ (%)	$T_{mo}$ ( )	$T_{mp}$ ( )	$W_f$	$W_b$ (%)	$W_n$ (%)	$W_b$ (%)	$M_n$
full NOHC							
23.08	-0.13	0.86	19.00	---	4.01	4.01	1.207
66.67	0.18	1.00	58.25	---	8.42	8.42	2.535
112.82	0.34	2.68	100.93	---	11.89	11.89	3.578
253.85	0.42	3.81	244.85	---	8.99	8.99	2.706
Bulk water	2.57	4.75					



(a)



(b)

Fig.5-10 (a) enthalpies (J/g) (b)  $W_b$  % associated with melting endotherms as function of the water content .

### 5-3 材料吸水與持水性質

#### Moisture absorption

將改質過 chitosan film 在 65 °C 烘箱以  $P_2O_5$  乾燥後，放入含有不同鹽類飽和溶液的乾燥器，使膜暴露在不同相對濕度下 48 小時 20 min，再拿出秤重計算水吸附量(Ra%)

$$Ra (\%)=100 \times (W_n - W_0) / W_0 \quad (15)$$

$W_0$ ：完全乾燥後膜重.

$W_n$ ：吸附水後的膜重

水吸附能力和材料本身性質、分子結構緊密有關。

#### Moisture retention

分別在乾燥過的膜中加入相對膜重 10%的純水，精確秤重紀錄乾膜重和濕膜重，放入含有 silica gel 的乾燥器 36 小時 20 min，再拿出秤重計算水吸附量(Rh%)。

$$Rh (\%) = 100 \times (H_n / H_0) \quad (16)$$

$H_0$ ：放入含有 silica gel 的乾燥器前含水材料的水重

$H_n$ ：拿出含有 silica gel 的乾燥器後含水材料的水重

持水能力會受水是否和高分子之間有作用力影響。

如此可得到 Table 6.



Table 6.

Moisture-absorption and –retention ability of modified chitosan with different DS and DH values

Sample	DS	DH	Ra%			Rh%
			RH 81%	RH 68%	RH 43%	
Chitosan	0	0	27.25	14.81	8.60	77.27
NOCC-1	0.07	0	79.84	47.41	13.08	62.22
NOCC-2	0.32	0	22.03	11.51	8.19	57.14
HNOCC-2A	0.32	0.26	23.41	17.42	12.41	77.78
HNOCC-2B	0.32	0.44	19.10	10.08	12.24	61.53
NOCC-3	0.50	0	29.40	13.65	1.29	58.33
HNOCC-3A	0.50	0.23	23.97	16.45	12.62	100
HNOCC-3B	0.50	0.44	24.06	17.69	14.49	88.24
Full NOHC	0	4	0.51	0	0	0

DS= degree of substitution of carboxymethyl group

DH= degree of hexanoylation

RH= relative humidity

Ra= Moisture-absorption ability

Rh= Moisture -retention abilities



### 5-3-1 改質接枝對吸水能力影響

我們可將 Table 6.轉化為圖線做解讀比較。

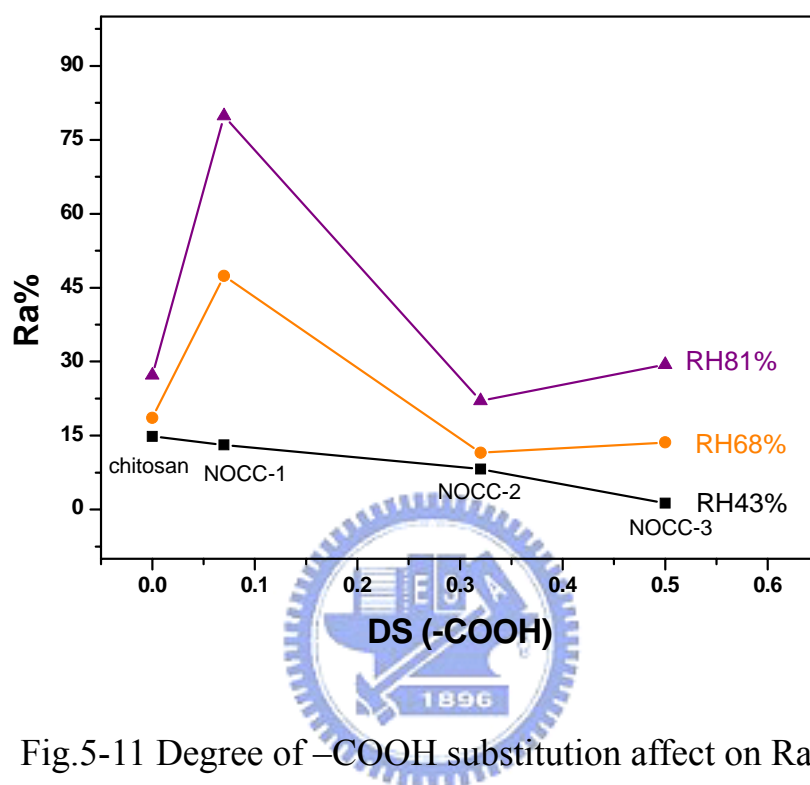


Fig.5-11 Degree of -COOH substitution affect on Ra%.

在幾丁聚醣衍生物上-COOH 接枝率對 Ra%的影響如 Fig.5-11 所示，在低濕度時(RH43%)，很明顯地可看出 Ra% 隨著-COOH 接枝率的增加而降低，其可能的原因解釋如下：因 NOCC-1 是鹼性且分子鏈呈高負電離子狀態 (-COO-)又帶少量親水基，所以 NOCC-1 的 Ra%最高；因 NOCC 的 COO<sup>-</sup>和-NH 間有很強分子間的 conjugative hydrogen bond，形成 single chain 的 twofold helix，隨著羧酸甲基接枝率的增加而氫鍵強度增加，此分子間氫鍵的增加進而造成 NOCC-3 結構的緊密程度高於 NOCC-1 及 NOCC-2，所以

在低濕度時水不易進入分子鏈之中，導致 NOCC-3 具最低的  $Ra_{43}\%$  值；另一方面，在高濕度時(RH81%)時， $Ra_{81}\%$  先隨著-COOH 接枝率的增加大幅降低，然後再些微提升，可能是因為 NOCC-3 較 NOCC-2 多親水基，所以 RH81%時 NOCC-3 的  $Ra_{81}\%$  較 NOCC-2 高。

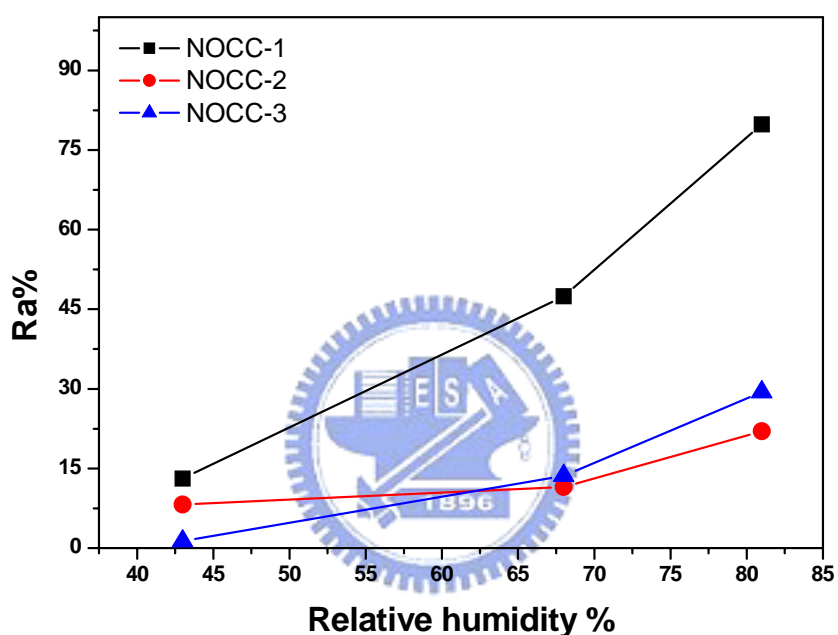
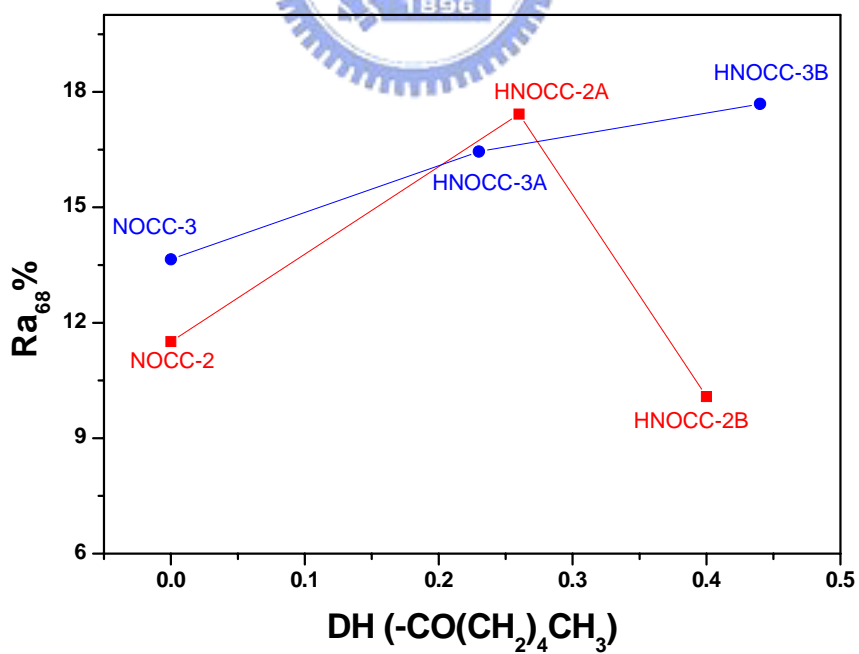
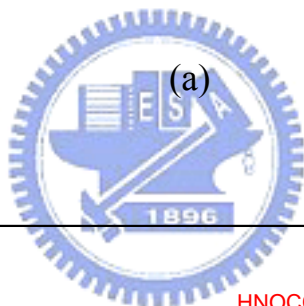
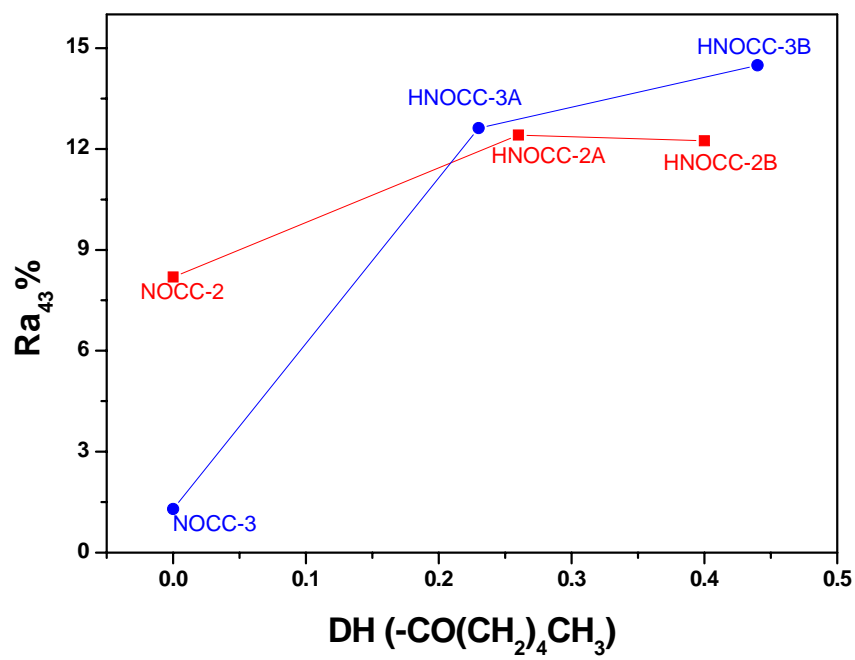


Fig.5-12  $Ra\%$ . of NOCC as various relative humidity.

Fig.5-12 是在不同相對濕度下 NOCC-1, NOCC-2, NOCC-3 的對水吸附能力結果。NOCC-1 的水吸附能力對不同相對濕度有顯著敏感反應，在低濕度 (RH=43%)、高濕度 (RH=81%) 時分別  $Ra_{43}\%=13.08\%$ 、 $Ra_{81}\%=79.84\%$ ，相差近 6 倍；相對之下，NOCC-2 及 NOCC-3 儘管在不同溼度環境下都能維持較穩定的吸水力。



(b)

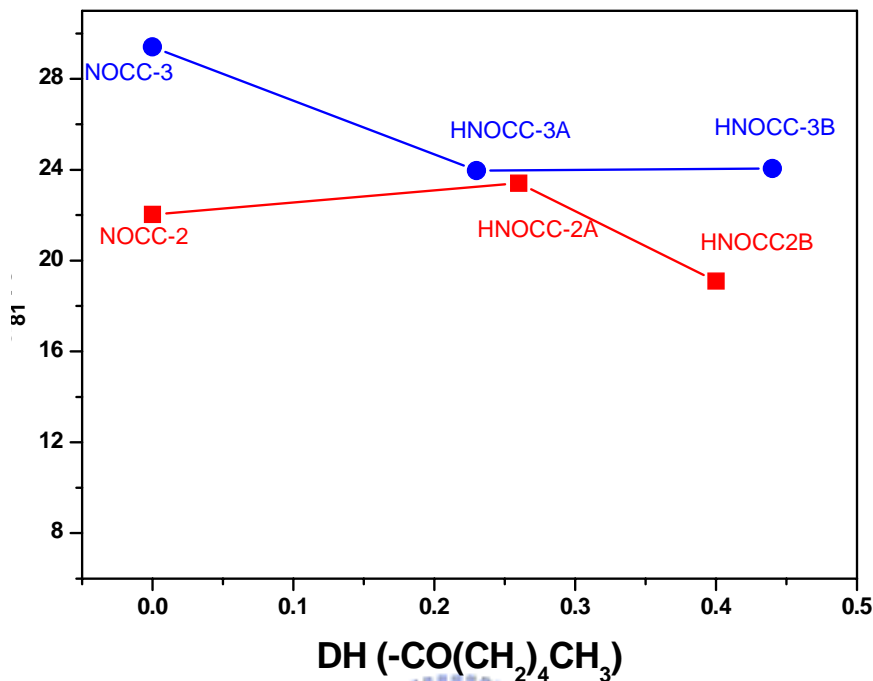


Fig.5-13 Degree of hexanoyl groups substitution affect on Ra%.

至於長鏈己醯基對吸水率Ra%的影響則如Fig.5-13~15所示，由此圖可觀察到無論在中或高-COOH接枝率時(NOCC-2, NOCC-3)，在低濕度狀態下，吸水率Ra<sub>43</sub>%都因己醯基的導入而增加，可能原因為長鏈己醯基使分子間距變大，水進入兩性幾丁聚醣材料分子中機會變多，在低濕度時造成Ra<sub>43</sub>%的增加。比較原NOCC-3導入己醯基後可使Ra<sub>43</sub>%明顯增加且隨己醯接枝率提高Ra<sub>43</sub>%也有提高現象；HNOCC-2A之Ra<sub>43</sub>%雖比NOCC-2提高許多，但隨己醯接枝率提高至於長鏈己醯基接枝率對Ra<sub>43</sub>% 的影響則不顯著。

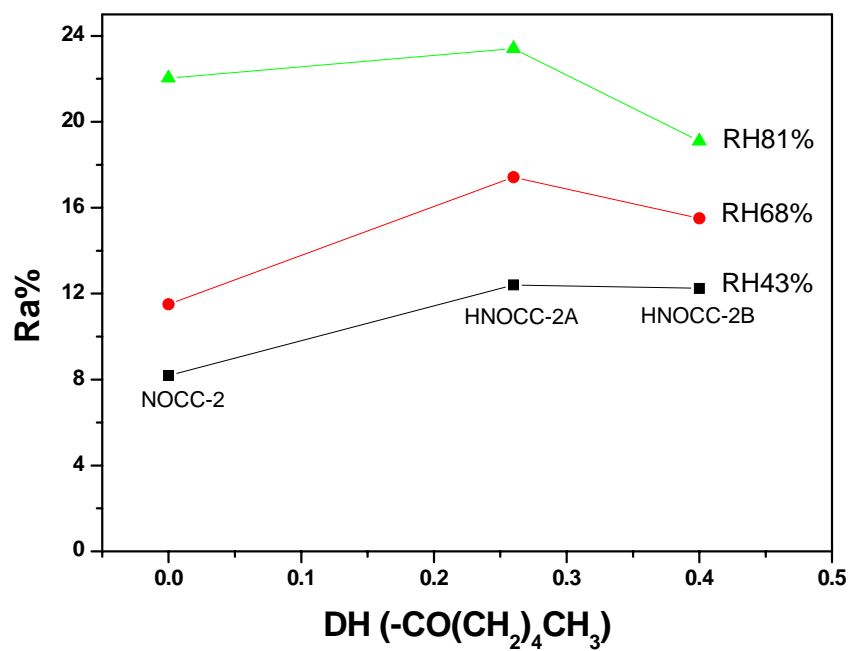
中濕度(68%)時和低濕度現象相似，NOCC-3 series隨己醯接枝率提高吸水

率 $Ra_{68}\%$ 也隨之提高；雖己醯基的導入使HNOCC-2A的 $Ra_{68}\%$ 比NOCC-2高，但HNOCC-2B卻比HNOCC-2A降低許多。

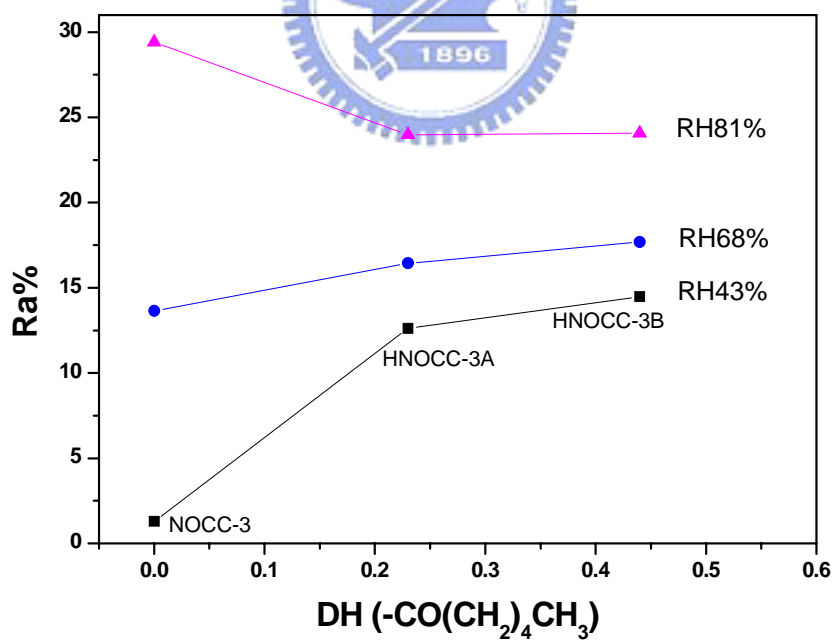
另一方面，對於高濕度(81%) 狀態下，吸水率 $Ra_{81}\%$ 因己醯基的導入而對NOCC-2系列和NOCC-3系列有相反趨勢影響。己醯基的導入反而讓HNOCC-3B的 $Ra_{81}\%$ 大幅降低；HNOCC-2A的 $Ra_{81}\%$ 比NOCC-2高。

Fig.5-15 是說明對 NOCC 導入不同己醯基接枝量，在不同相對溼度下對水吸附能力影響。可發現接枝己醯基後的兩性幾丁聚醣衍生物在變化不同溼度環境下都能維持較穩定良好的吸水力。



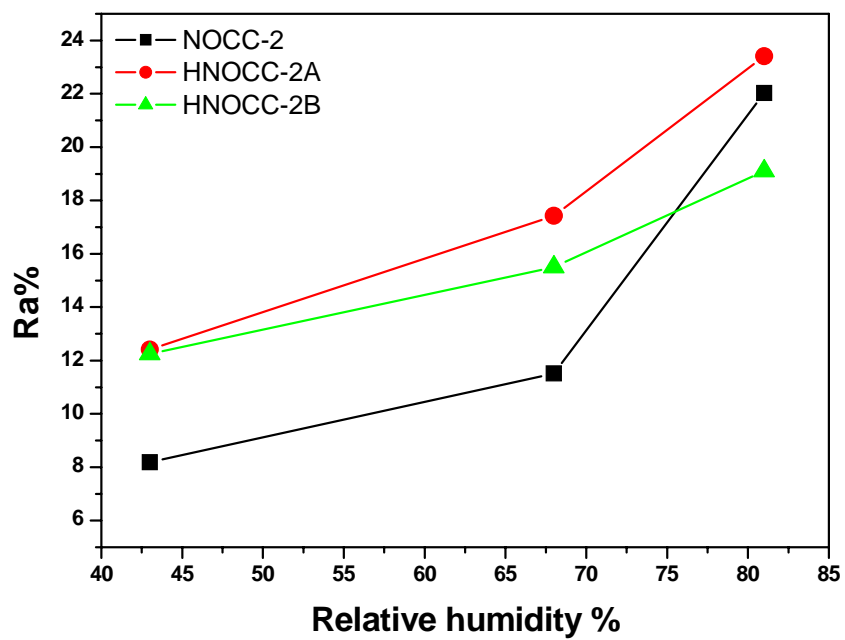


(a)

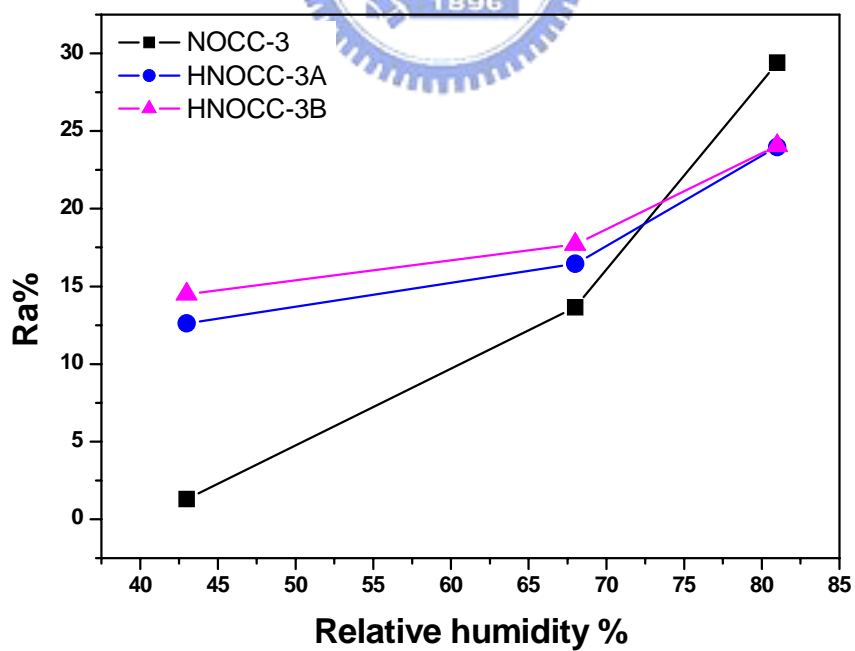


(b)

Fig.5-14 The effect on Ra% at different relative humidity for (a) NOCC-2 series  
(b) NOCC-3 series.



(a)



(b)

Fig.5-15 Ra%. of NOCC series as various relative humidity.



### 5-3-2 改質接枝對持水能力影響

-COOH 接枝率對持水力 Rh% 的影響如圖 Fig.5-16 所示，此圖顯示在沒有長鏈己醯基的狀況下，Rh% 隨 -COOH 接枝率增加而些微降低，由 5-1 小節所探討材料分子間氫鍵結果知道，因接枝羧基後儘管親水性改善，也使分子間氫鍵更強，反而能和水分子形成氫鍵的部份變少，所以 Rh% 隨 COOH 接枝率增加而些微降低。

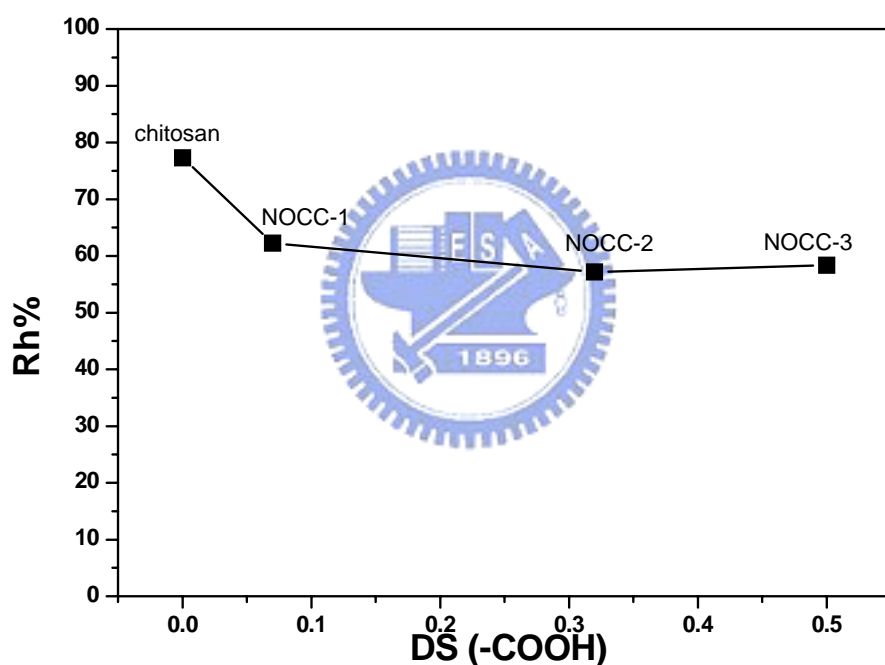


Fig.5-16 Degree of -COOH substitution affect on Rh% ( $W_c=10\%$ ).

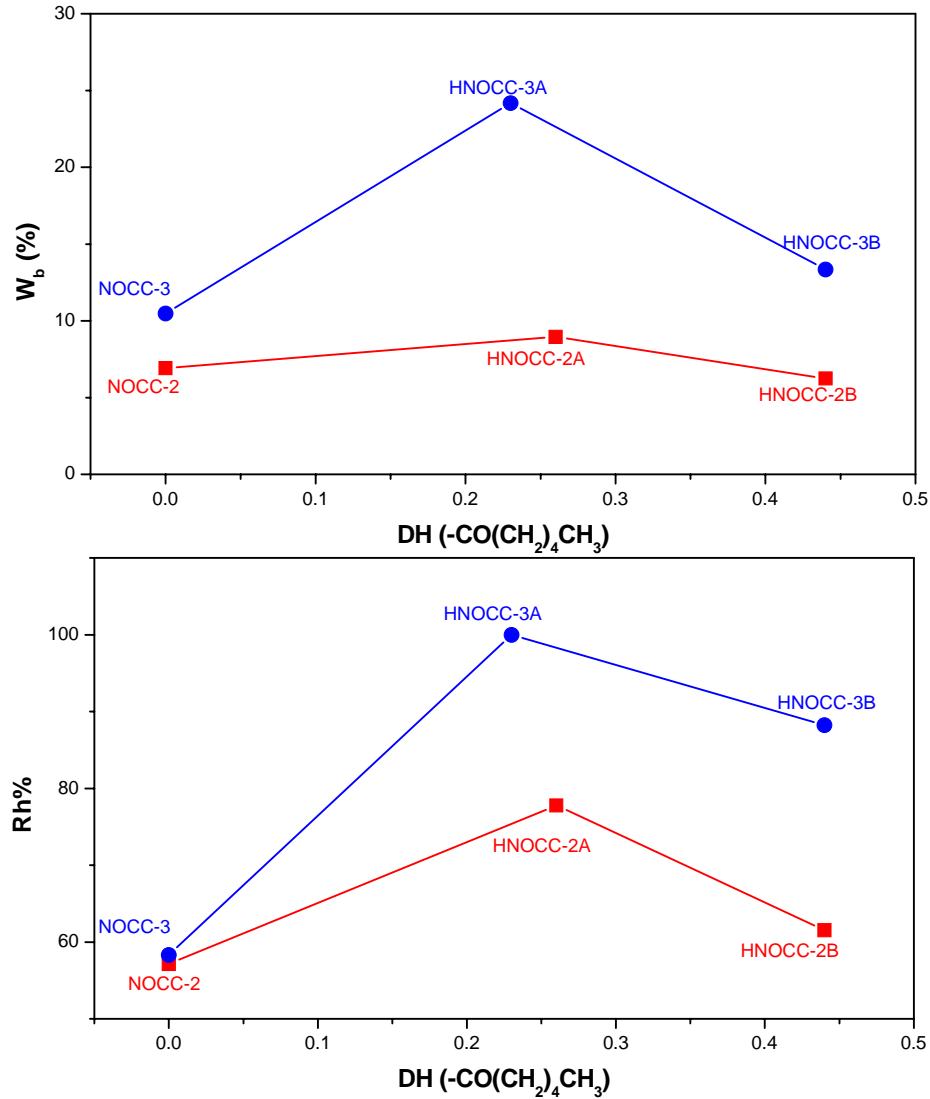


Fig.5-17 Degree of hexanoyl groups substitution affect on  $Rh\%$  ( $W_c=10\%$ ).

長鏈己醯基對持水能力  $Rh\%$  的影響則如圖 Fig.5-17 所示，此圖顯示長鏈己醯基對保水能力的顯著影響，由 5-1 小節所探討材料分子間氫鍵結果知道，因長鏈己醯基的導入，使分子間距變大造成分子間氫鍵變少，使得有較多  $-COOH$  和水作用形成鍵結，所以 HNOCC-2A 及 HNOCC-3A 之  $Rh\%$  分別高於 NOCC-2 與 NOCC-3；另外，隨長鏈己醯基接枝率進一步提高，開始有 hydrophobic interaction 扮演重要因素，分子間作用力又增加，高分子和

水的作用力減少，Rh%則會降低。

在相同的長鏈己醯基接枝率狀況下，保水能力似乎也受-COOH 接枝率的影響，如圖 Fig.5-17 所示：HNOCC-2A 與 HNOCC-2B 的 Rh%分別低於 HNOCC-3A 與 HNOCC-3B，其原因可能是在羧酸甲基化程度上的差異，因羧酸甲基化時會破壞幾丁聚醣結晶性，當羧酸甲基化程度愈高時結晶性會愈低，又水分子易存在於非結晶相區域[93]，親水基-COOH 也較多所以 NOCC-3 series 的 Rh%都是較偏高的。由於持水能力(在  $W_c=10\%$ 時)受水和高分子之間作用力影響，可以比照 DSC 結果中不同  $W_c$ 下  $W_b$  含量，結果如 Fig.5-12 同樣在  $W_c=10\%$ 時以 DSC 掃描結果得到鍵結水含量，趨勢與 Retention ability 相似。



## 第六章 Ibuprofen 在水膠材料中的釋放

### 6-1 膨潤度比較


#### Swelling

以 genipin 交聯衍生物(polysaccharide/GP 莫耳數比=300)，成膜後的水膠進行平衡膨潤度試驗，在液體中平衡 24 小時。

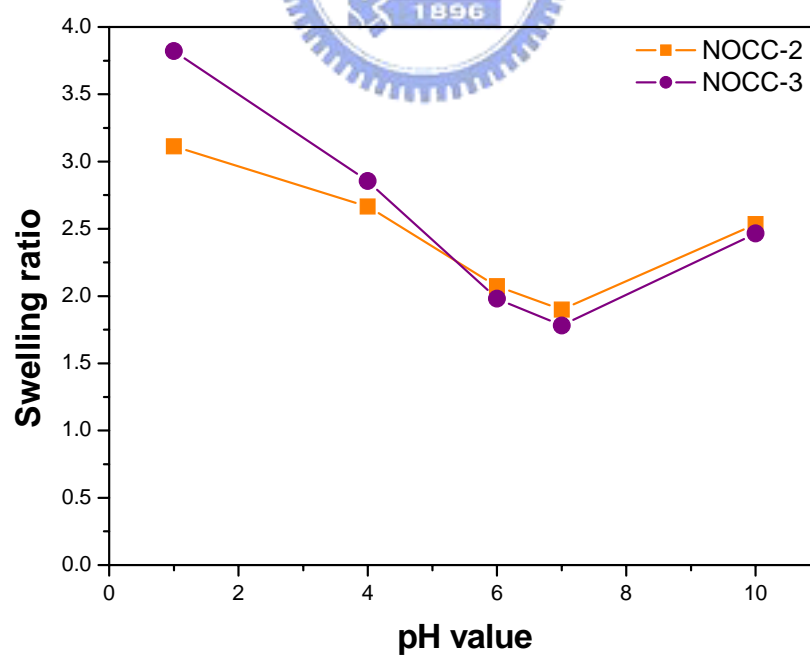
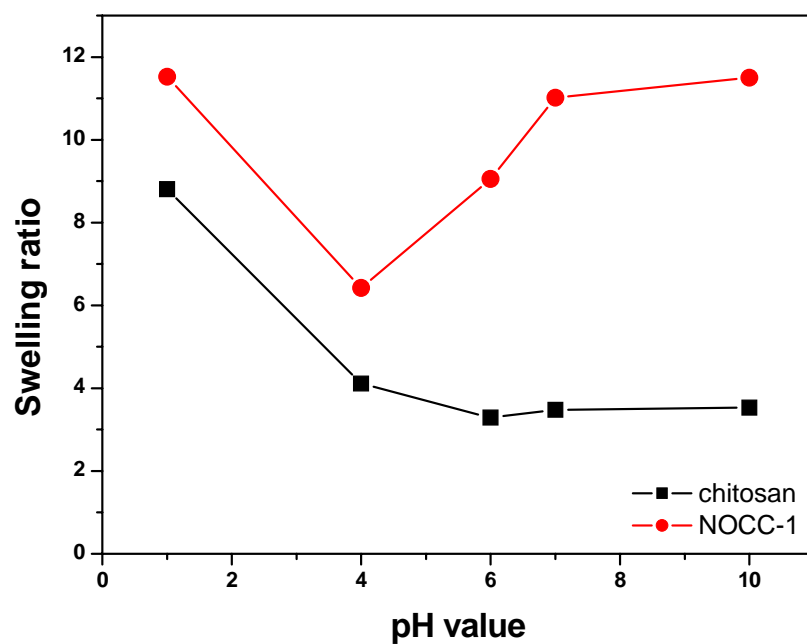
$$\text{平衡膨潤度} = \frac{W_h - W_d}{W_d} \quad (17)$$

$W_h$ : 水膠溼重

$W_d$ : 水膠乾重

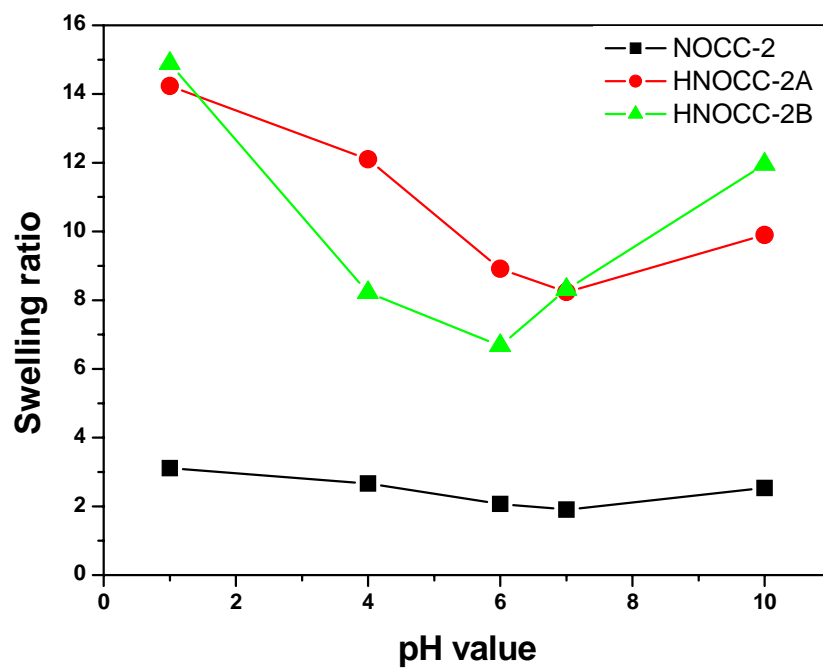


pH 值對膨潤度的影響如 Fig.6-1(a)所示，由於這些材料皆是高分子電解質，膨潤度的趨勢受 pH 值影響很大。首先，NOCC-1 因分子呈高負電離子狀態( $-\text{COO}^-$ )，在鹼性緩衝液下分子鏈因靜電斥力已展開，膨潤度變大。在酸性下會有中和電性結果，所以 NOCC-1 水膠收縮，等電位點在  $\text{pH}=4$ 。由 Fig.6-1(b)可以觀察到在 NOCC-2、NOCC-3 中， $-\text{COOH}$  接枝率對於 pH 值敏感特性的影響，隨著  $-\text{COOH}$  接枝率提高 pH 敏感性愈高，離子性質愈明顯，而 NOCC 在鹼性環境下的膨潤是因為羧酸呈陰離子  $-\text{COO}^-$  的緣故。

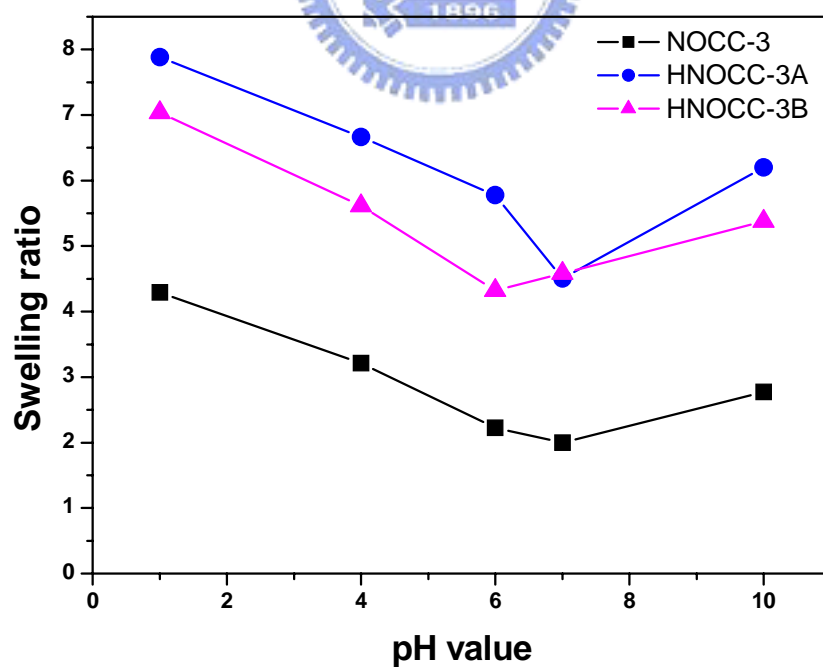


(b)

Fig. 6-1 swelling ratio for the chitosan derivatives at different pH.



(a)



(b)

Fig. 6-2 swelling ratio for the chitosan derivatives at different pH.

並由 Fig.6-2 可發現己醯基的導入並不會降低 NOCC 的 pH 敏感特性，高己醯基接枝率只是會使等電位點向低 pH 值移動，其原因可能是隨-COOH 增加負離子性增加，電位點向低 pH 值移動。另外還可以發現，己醯基的導入會使 NOCC 的膨潤度提高，這是因為 HNOCC 因有長鏈碳己醯基使分子間間距變大較易膨潤，不似未改質幾丁聚糖 pH= 6 時即開始分子聚集，HNOCC 在中性下仍又膨潤態且比 NOCC 更具 pH 敏感性；導入疏水基後的 HNOCC-3 不論己醯基接枝率高低，因其結構較緊密所以膨潤度皆比 HNOCC-2 系列低因結構較緊密。膜的膨潤即是因為水膠吸收了液體所以造成，所以可以把含水率看做膨潤度的另一種解讀，高膨潤度表示是高含水率的材料。由膨潤度試驗知道，己醯化 NOCC 可得具有高膨潤度又高含水率的 HNOCC。

前面提到 HNOCC 接枝己醯基使分子間間距變大較易膨潤，且會比 NOCC 更具 pH 敏感性。若是改為 palmityl group ( $-\text{C}=\text{O}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ ) 這樣長碳鏈官能基時，Fig.6-4 就是在 NOCC-3 上接枝約 20% palmityl group 後，不同 pH 值緩衝液下的膨潤度。的確 PNOCC-3A 的 pH 敏感性更加顯著，緩衝液 pH=1 環境下時膨潤度為 26.29，pH=7 時膨潤度只有 3.21。palmityl group 是 16 個碳的碳鏈，使 PNOCC-3A 分子間 hydrophobic interaction 佔很重要因素，這可能是接近中性環境下的膨潤度反而比推測小許多原因，且 PNOCC-3A 對中性純水的溶解度也比較差。

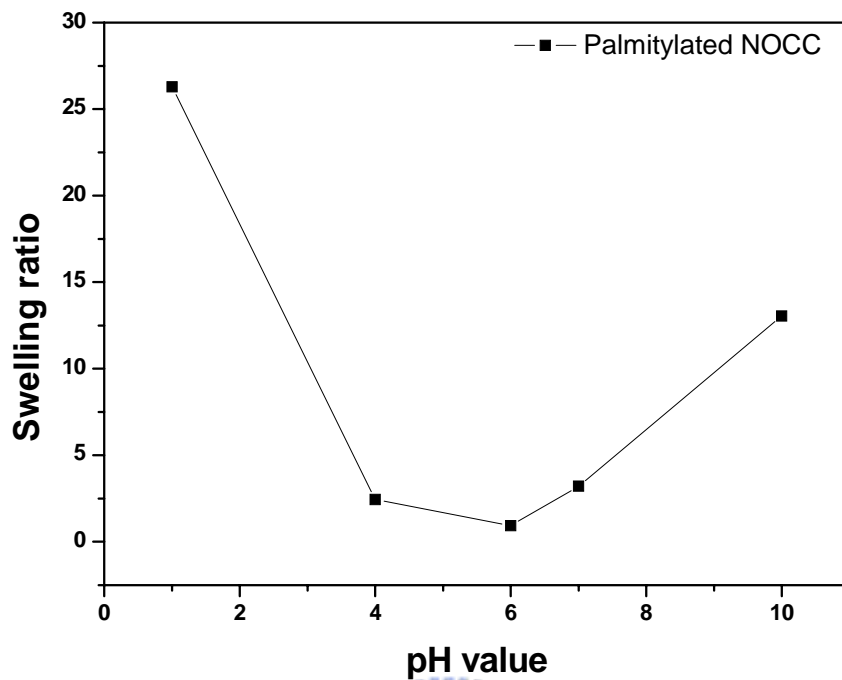


Fig. 6-3 swelling ratio for the PNOCC-3A at different pH.

### Deswelling 水份散失實驗

將在 pH=7 緩衝液平衡膨潤後的水膠置於空氣，不定時量秤水份散失的重量變化，藉此可比較材料保濕能力。Fig. 6-4(a)顯示導入己醯基的 HNOCC-2A 的保濕能力的確比只有接枝羧甲基酸的 NOCC-2 還明顯來得好，延遲水自水膠中散失速率。

$$\text{Water retention} = \frac{M_0 - M_t}{M_0} \quad (18)$$

$$\frac{M_0 - M_t}{M_0} = 4[Dt/\pi r^2]^{1/2}$$

$$\frac{M_t}{M_0} = -4[Dt/\pi r^2]^{1/2} + 1 \quad (19)$$

$M_t$ ：在空氣中不同時間所量測的濕膜重



$M_0$ ：實驗前濕膜重

D：擴散係數

r：膜半徑，約1.75 cm

將水份自水膠擴散出去至外界的水量對(時間)<sup>1/2</sup> 做圖得到 Fig. 6-4(b)，代入公式(19)計算水散失擴散係數 D，在 HNOCC-2A 材料中的水擴散係數比 NOCC-2 低，即表示雙性幾丁聚醣 HNOCC-2A 的保濕能力較好。

NOCC-2的擴散係數= $5.25 \times 10^{-7}$  (cm<sup>2</sup>/s)

HNOCC-2A的擴散係數= $3.69 \times 10^{-7}$  (cm<sup>2</sup>/s)

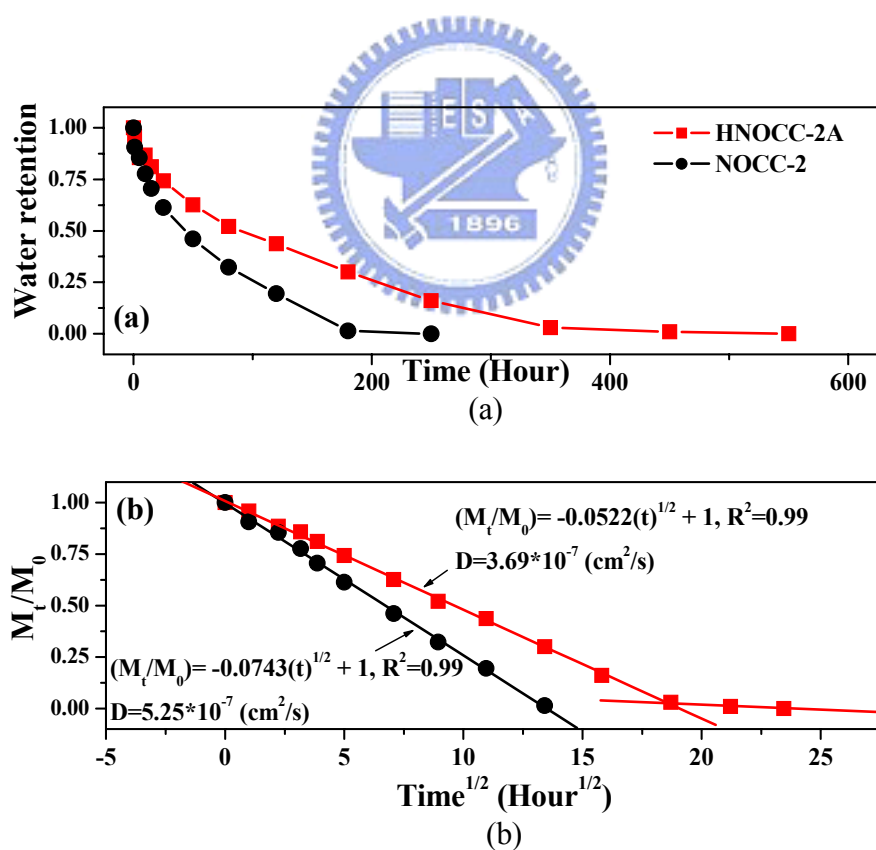


Fig. 6-4 (a)water retention (b)diffusion curve of NOCC-2 and HNOCC-2A

## 6-2 Ibuprofen 釋放實驗

傳統劑型由於藥物代謝半衰期短，為維持療效而採多次投藥，因此在血液中藥物濃度之起伏可能因濃度過低而無法達到療效，抑或因濃度過高而產生不希望之支外反應。微粒包覆後之藥物，可經由高分子薄膜或基質而緩緩釋出，達到持續釋放之目的，填補因代謝等因素而消耗藥劑濃度，維持穩定血漿中藥劑濃度於適當範圍間，即可達到藥劑療效亦避免不必要的支外反應之發生。

### 包覆藥物釋放

以 genipin 交聯衍生物(polysaccharide/GP 莫耳數比=114)，包覆疏水性藥物 ibuprofen 成膜後的水膠進行藥物釋放試驗。

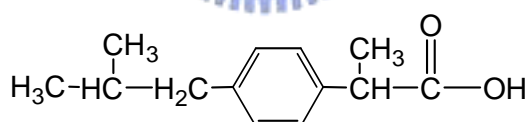


Fig.6-5 Molecular structure of ibuprofen.

Ibuprofen(IBU)雖經加熱溶解於NOCC溶液中(溶液含有乙醇增加對IBU溶解度)，包覆藥物後的成膜過程中，水溶性幾丁聚醣NOCC因太親水，IBU易自動聚集成微胞型態，緩緩形成結晶，以致乾燥薄膜中還可看到IBU細微結晶，文獻[94~98]中提到若是膜中形成IBU結晶，IBU的釋放速率會加快許多，且NOCC是很易溶於水的材料，釋放過程中產生的osmotic force易破壞

膜阻障。可以預期NOCC包覆IBU的釋放是快速的，因此這裡只選擇雙性幾丁聚醣衍生物做試驗。

HNOCC是雙性化學結構，這樣可以平衡IBU產生的hydrophilic/hydrophobic界面，即HNOCC能夠和IBU較為互溶，在包覆藥物成膜後也比較無明顯IBU結晶現象。Fig.6-6是以雙性幾丁聚醣包覆IBU的釋放曲線，可看出無論HNOCC-2A或HNOCC-2B最初Burst release出68~77%的藥量，推測是因HNOCC-2的羧甲基酸接枝率較低，造成疏水/親水的雙性特徵不足，換句話說有可能有很細小結晶在膜的表面；釋放量到了約82%之後的第二階段才以和緩速率釋放，這時釋放的是可與HNOCC有氫鍵及hydrophobic interaction而留在膜內部的IBU分子。另外，HNOCC-3系列因羧甲基酸接枝率高，所以分子結構較緊密又呈現較高雙性特徵，所以釋放速率比HNOCC-2慢，Burst release降至約釋放量45%，真正包覆IBU量提升了。還可以發現無論在HNOCC-2系列或HNOCC-3系列，己醯基接枝率多寡對釋放速率無太大影響，羧甲基酸接枝率是影響IBU釋放較重要因素，但也因接枝己醯基成為雙性結構，使得穩定IBU的疏水/親水性質分子，才可提高對IBU包覆量。

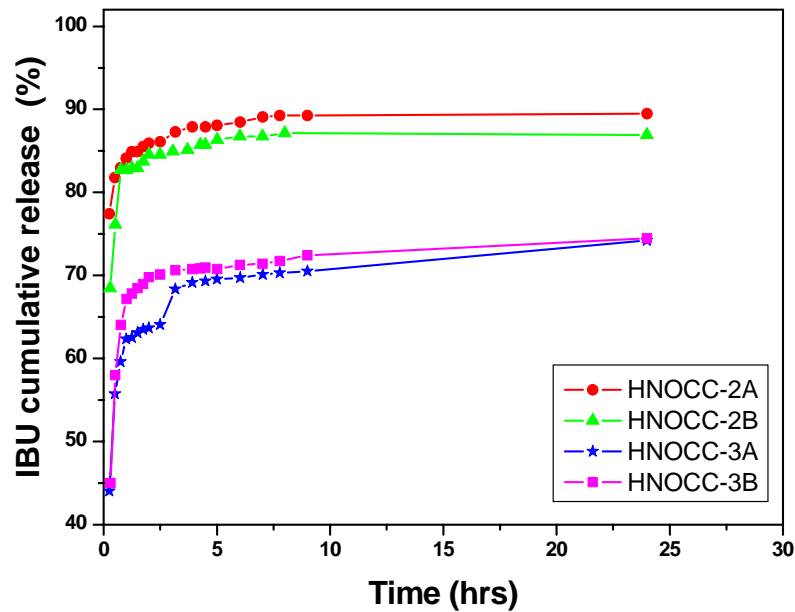


Fig.6-6 Ibuprofen release profile of the genipin-crosslinked chitosan derivative in PBS at 37 °C.

而體外細胞毒性測試(L929纖維母細胞)，在ISO10993-5判定雙性幾丁聚糖的細胞毒性是通過標準。Fig.6-7是說明HNOCC是一個低生物毒性材料。

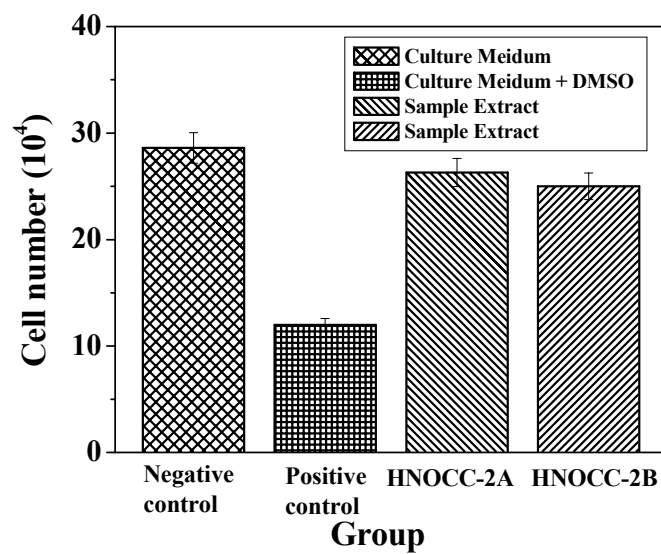


Fig.6-7 Cytotoxicity of extract of HNOCC.

## 第七章 結論

N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC) 早在 1937 年被合成，化學結構與透明質酸相似同樣帶有羧酸根的醣類電解質，且其保濕能力幾乎能夠媲美透明質酸，價格卻低廉許多。雖然 NOCC 能夠完全溶解在中性純水中，但當 NOCC 水溶液被調整至 pH 值 5.3 時因分子內部靜電吸引力結果，分子收縮聚集而開始產生析出物來，這則會限制 NOCC 應用性。另外有人指出太親水的材料不利於血液相容性，若是同時平衡於 hydrophilic/hydrophobic 界面時是比較好的，在醣類官能基中又以己醯基有較好血性相容性，所以我們在 NOCC 上殘留的胺基接枝上疏水性己醯基，合成出水溶性又同時具有 hydrophilic/hydrophobic 的 hexanoylated NOCC (HNOCC)，能夠包覆雙性藥物。幾丁聚醣本身具細微結晶區域，由 XRD 知道 NOCC 因 NaOH 及接枝羧甲基酸，會破壞其結晶性；當 HNOCC 因導入己醯基後又稍增加結晶度；若是己醯基接枝率高達 4 時，就可得到結晶度高的油溶性衍生物。FTIR-ATR 研究發現幾丁聚醣衍生物的分子內部氫鍵強度比較為 chitosan>NOCC-2>NOCC-3，NOCC-2>HNOCC-2A>HNOCC-2B，NOCC-3>HNOCC-3A>HNOCC-3B。推測隨羧甲基酸接枝率提高，分子間氫鍵增加相對結構越緊密；但 HNOCC 接枝己醯基後卻會破壞氫鍵強度，分子間間距變大。這些性質的改變可能會影響材料的吸濕性和保濕能力，其中以 HNOCC-3A 的保濕能力最好，超越原來 NOCC。我們可總和 HNOCC 的優

點為：

1. HNOCC 不但是水溶性，其水溶液還能夠廣泛調整為 pH=1~ pH=13 都不會有任何不溶解現象，只是在偏鹼性環境下溶液黏度會增加。
2. 若是 HNOCC 溶液濃度較高(黏度也高)時，被調至鹼性會變為膠體狀態，這也說明了 HNOCC 是 pH 敏感性材料。
3. 經過細胞毒性試驗後，這是一個不具細胞毒性材料。
4. 相較幾丁聚醣在中性時分子會緊縮，以 genipin 交聯後 HNOCC 膜的在中性環境下仍有膨潤態。
5. HNOCC 水膠在中性環境下的膨潤度可是 NOCC 的四倍，所以 HNOCC 可提高含水率。
6. 具有高度保濕能力。
7. HNOCC 膜材的機械強度高於未改質的幾丁聚醣。



此外還另外合成出可完全溶解於  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、 $\text{CHCl}_3$  等有機溶劑的 O-hexanoyl chitosan 及 N,O-hexanoyl chitosan，可用來包覆高度親油性藥物。以兩性幾丁聚醣衍生物包覆雙性 ibuprofen 後，由藥物釋放實驗可知 HNOCC-3 系列因羧基接枝率高，所以分子結構較緊密又呈現較高雙性特徵，使得穩定 IBU 的疏水/ 親水性質分子，提高對 IBU 包覆量，釋放速率降低。

## 參考文獻

- [1] Muzzarell, R.A.A.; Barontini, G.; Rocchett, R. *Biotech. and Bioeng.* 29 (1987) 87.
- [2] Aiba, S. *Int. J. Biol. Macromol.* 14 (1992) 225-228.
- [3] Rinaudo, M.; Milas, M.; P. Le Dung *Int. J. Biol. Macromol.* 15 (1993) 281-285.
- [4] Roberts, G. A. F. 1992. In: *Chitin Chemistry*. The Macmillan press Lth, Hong Kong.
- [5] Chatelet C.; Damour O.; Domard A. *Biomaterials* 22 (2001) 261.
- [6] Muzzarelli, R. A. A.; Rocchetti, R. *Carbohydr. Polym.* 5 (1985) 461 -472.
- [7] Hackman, R. H. *Aust. J. Biol. Sci.* 18 (1965) 935 - 938.
- [8] Austin-PR, U.S. Patent 4059457, 1977.
- [9] Lang, E. R.; Kienzle -Sterz, C. A.; Rodriquez-Sanchez, D.; Rha, C. K. In: *Chitin and Chitosan*. (1982) pp.34-38.
- [10] Wang, W. S.; Bo, S.; Li, W. Qin. *Int. J. Biol. Macromol.* 13 (1991) 281-286.
- [11] Roberts, G. A. F. 1992. In: *Chitin Chemistry*. The Macmillan press Lth, Hong Kong.
- [12] Sannan, T.; Kurita, K.; Iwakura, Y. *Makromol. Chem.*, 176 (1975) 1191-119.
- [13] Sannan, T.; Kurita, K.; Iwakura, Y. *Makromol. Chem.* 177 (1976) 3589-3600.
- [14] Kurita, K.; Sannan, T.; Iwakura, Y. *Makromol. Chem.* 178 (1977)



3197-3202.

- [15] Shigemasa, Y.; Matsuura, H.; Sashiwa, H.; Saimoto, H. *Int. J. Biol. Macromol.* 18 (1996) 237 - 242.
- [16] Ottøy M. H.; Varum, K. M.; Smidsrod, O. *Carbohydr. Polym.* 29 (1996) 17-24.
- [17] Kurita, K.; Kamiya, M.; Nishimura, S. *Carbohydr. Polym.* 16 (1991) 83-92.
- [18] Kurita, K.; Koyama, Y.; Nishimura, S.; Kamiya, M. *Chem. Lett.* (1989) 1597-1598.
- [19] Kubota, K.; Eguchi, Y. *Polym. J.* 29 (1997) 123-127.
- [20] Hasegawa, M.; Isogai, A.; Onabe, F. *Carbohydr. Polym.* 20 (1993) 279 – 283.
- [21] Rigby, G.W. U.S. Patent 2,072,771, 1937.
- [22] Muzzarelli, R. A. A. *Carbohydr. Polym.* 8 (1988) 1–21.
- [23] Lingyun Chen; Yumin Du; Xiaoqing Zeng, *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 333–340.
- [24] Hayes, E.R. U.S. Patent 4,619,995, 1986.
- [25] Muzzarelli, R.A.A.; Jeuniaux, C.; Gooday, G.W. *Chitin in Nature and Technology*, Plenum Press, New York, 1986.
- [26] Muzzarelli, R.A.A.; Tanfani, F.; Emanuelli, M.; Mariotti, S. *Carbohydr. Res.* 107 (1982) 199.
- [27] Nudga, L.A.; Plisko, E.A.; Danilov, S.N. *Journal of General Chemistry of The USSR*, 2729-2732, 1974.
- [28] Herasa, A.; Rodri'guez, N.M.; Ramosc, V.M.; Agullo' c, E. *Carbohydr. Polym.* 44 (2001) 1–8.
- [29] Chen, C.S.; Su, J.C.; Tsai, G.J. *Adv. Chitin Sci.* 3 (1998) 273-277.
- [30] Chen, C.S.; Liao, W.Y.; Tsai, G.J. *J. Food Prot.* 61(9) (1998) 1124-1128.



- [31] Fang, B.; Jiang T. *Zhongguo Shenghua Yaowu Zazhi*, 19(4) (1998) 163-166.
- [32] Holme, KR; Perlin, AS, *Carbohydr. Res.* 302 (1-2) (1997) 7-12.
- [33] Warner, D.T.; Coleman, L.L. *J.Org.Chem.* 23 (1958) 1133-1135.
- [34] Horton D.; Just E.K. *Carbohydr.Res.* 29 (1973) 173-179.
- [35] Nishimura, S.I.; Nishi, N.; Tokura, S.; Okiei, W.; Somorin ,O. *Carbohydr. Res.* 156 (1986) 286-292.
- [36] Hirano, S.; Tanaka, Y.; Hasegawa, M.; Tobetto K.; Nishioka ,A. *Carbohydr. Res.* 137 (1985) 205-215.
- [37] Muzzarelli, R. A. A.; Tanfani, F. *Carbohydr. Polym.* 5 (1985) 297–302.
- [38] Van der Merwe, S.M.; Verhoef, J.C.; Verheijden, J.H.M.; Kotze', A.F.; Junginger, H. E. *Eur. J. of Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 225–235.
- [39] Zhang, Can; Ping, Qineng; Zhang, Hongjuan; Shen, Jian *Eur. Polym. J.* 39 (2003) 1629–1634.
- [40] Keiichiro, S.; Akihiko, T. *Polym.* 37(23) (2003) 5117-5122.
- [41] Yoshinori, K.; Hiraku, O.; Yoshiharu, M. *Biomaterials* 25 (2004) 907–915.
- [42] Allan, GG.; Peyron, M. *Carbohydr. Res.* 277 (1995) 257.
- [43] Pavia, DL.; Lampman, GM.; Kriz, GS.; “Introduction to spectroscopy”, Brooks/Cole, Thomson Learning, Australia, 13, 2001.
- [44] Hamaguchi, K.; Funatsu, M. *J. Bio. Chem.* 46 (1959) 1659.
- [45] Goosen, MFA. “Applications of chitin and chitosan”, Technomic Pub., Lancaster, p79, 1997.
- [46] Kurita, K.; Ishii, S.; Tomita, K.; Nishimura, S.; Shimoda, K. *J. Polym. Sci.: Part A:Polym. Chem.* 32 (1994) 1027.
- [47] Le Tien, C.; Lacroix, M.; Ispas-Szabo, P.; Mateescu, Mircea-Alexandru *J. Control. Release* 93 (2003) 1– 13.

- [48] Lee, K. Y.; Ha, W. S.; Park, W. H. *Biomaterials* 16 (1995) 1211-1216.
- [49] Fujii, S.; Kumagai, H.; Noda, M. *Carbohydr. Res.* 83 (1980) 389.
- [50] Kurita, K.; Inoue, S.; Nishimura, S. *J. Polym. Sci. : Part A: Polym. Chem.* 29 (1991) 937.
- [51] Kurita, K.; Yoshino, H.; Yokota, K.; Ando, M.; Inoue, S.; Ishii, S.; Nishimura, S. *Macromolecular* 25 (1992) 3786.
- [52] Kurita, K.; Yoshino, H.; Nishimura, S. *Carbohydr. Polym.* 32 (1997) 171.
- [53] Nishimura, S.; Kohgo, O.; Kurita, K.; Vittavatvong, C.; Kuzuhara, H. *Chem. Lett.* (1990) 243.
- [54] Kurita K.; Hirakawa M.; Nishiyama Y. *Chem. Lett.* (1999) 771.
- [55] Lee, M.; Clive, G. W.; Fariba, K.; Laurence, T.; Alexander, I. G. ; Sevda, S.; Ijeoma, F. U. *J. Control. Release.* 80 (2002) 87–100.
- [56] Tokura, S.; Baba, S.; Uraki, Y.; Nishi, N.; Hasegawa, O. *Carbohydr. Polym.* 13 (1990) 273.
- [57] Lee, M.; Clive, G. W.; Fariba, K.; Ijeoma, F. U. *Eur. J. of Pharm. Biopharm.* 55 (2003) 35–45.
- [58] Tokura, S.; Hasegawa, O.; Nishimura, S.-I.; Nishi, N.; Takatori, T. *Anal. Biochem.* 161 (1987) 117.
- [59] Nishimura, S.-I.; Tokura, S. *Int. J. Biol. Macromolecular* 9 (1987) 225.
- [60] Murata, J.; Saiki, I.; Nishimura, S. I.; Nishi, N.; Tokura, S.; Azuma, I. *Jpn. J. Cancer Res.* 80 (1989) 866.
- [61] Feng, F.; Liu, Y.; Hu, K. *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 2321–2324.
- [62] Zhang, Can; Ping, Qineng; Zhang, Hongjuan; Shen, Jian *Carbohydr. Polym.* 54 (2003) 137–141.
- [63] Ramosa, V.M.; Rodri'guez, N.M.; Rodri'guez, M.S.; Herasc, A.; Agullo'a, E. *Carbohydr. Polym.* 51 (2003) 425–429.

- [64] Wichterle, O.; Lim, D. *Nature* 185 (1960) 117.
- [65] Lim, F.; Sun, A.M. *Science* 210 (1980) 908-910.
- [66] Yannas, I.V.; Lee, E.; Orgill, D.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 933-937.
- [67] Hoffman, A. S. *Adv. Drug Delivery Reviews* 43 (2002) 3–12.
- [68] Martens, P.; Anseth, K. S. *Polym.* 41 (2000) 7715-7722.
- [69] Watanabe, T.; Utsunomiya, M.; Kurihara, S.; Nonaka, T. *J. Polym. Sci. A.* 39 (2001) 1505–1514.
- [70] Okano, T.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Takei, Y.; Ogata, N. *J. Control. Release* 36 (1995) 125-133.
- [71] Peppas, N. A.; Klier, J. *J. Control. Release* 16 (1991) 203-214.
- [72] Kim, S. J.; Lee, K. J.; Kim, S. I.; Lee, Y. M.; Chung, T. D.; Lee, S. H. *J Appl. Polym. Sci.* 89 (2003) 2301-2305.
- [73] Irie, M. *Macromolecules* 19 (1986) 2890-2892.
- [74] Matsumoto, A.; Ikeda, S.; Harada, A.; Kataoka, K. *Biomacromolecules* 4 (2003) 1410-1416.
- [75] Griffith, L. G. *Acta mater.* 48 (2000) 263~277.
- [76] Lee, K. Y.; Mooney, D. J. *Chem. Revs.* 101 (2001) 1869-1879.
- [77] Hayes, E.R. U.S. Patent 4,619,995, 1986.
- [78] Qian, G.; Zhou, J.; Ma, J.; Wang, D.; He, B. *Immobil. Biotechnol.* 24 (1996) 567– 577.
- [79] Chen, Xi-Guang; Park, Hyun-Jin *Carbohydr. Polym.* 53 (2003) 355–359.
- [80] Zong, Z.; Kimura, Y.; Takahashi, M.; Yamane, H. *Polym.* 41 (2000) 899–906.
- [81] Mohamed, E. I. B.; Entsar I. R.; Tina M. R.; Christian V. S.; Guy ,S.; Walter, S.; Monica, Ho" fte *Biomacromolecules* 5 (2004) 589-595

- [82] Chen, L.; Du, Y.; Zeng, X. *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 333–340.
- [83] Yoshihiro Shigemasa; Hiroaki Matsuura; Hitoshi Sashiwa; Hiroyuki Saimoto, *Int. J. Biol. Macromole.* 18 (1996) 237~242.
- [84] Kozo Ogawa; Toshifumi Yui; Kenji Okuyama, *Int. J. Biol. Macromole.* 34 (2004) 1–8.
- [85] Chen, L.; Du, Y.; Tian, Z.; Sun, L. *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.* 43 (2005) 296–305.
- [86] Heatley, F.; Scott, J. E.; Jeanloz, R. W. *Carbohydr. Res.* 99 (1982) 1.
- [87] Nakamura, K.; Hatakeyama, T.; Hatakeyama, H. *Text. Res. J.* 51 (1981) 607–613.
- [88] Hatakeyama, H.; Hatakeyama, T. *Thermochim. Acta.* 308 (1998) 3–22.
- [89] Joshi, NH.; Topp, EM. *Int. J. Pharm.* 80 (1992) 213–225.
- [90] McCrystal, CB.; Ford, JL.; Rajabi-Siahboomi, AR. *Thermochim. Acta.* 294 (1997) 91–98.
- [91] Bhaskar, G.; Ford, JL.; Hollingsbee, DA. *Thermochim. Acta.* 322 (1998) 153–165.
- [92] Agrawal, A. M.; Manek, R. V.; Kolling, W. M.; Neau, S. H. *J. of Pharm. Sciences* 93 (2004) 7.
- [93] Kittur, F. S.; Harish P. K. V.; Udaya S. K.; Tharanathan, R. N. *Carbohydr. Res.* 49 (2002) 185-193.
- [94] Vallet-Regí, M.; Granado, S.; Arcos, D.; Gordo, M.; Caban˜as, M. V.; Ragel, C. V.; Salinas, A. J.; Doadrio, A. L.; San Román, J. *Journal of Biomedical Materials Research* 39(3) (1998) 423-428.
- [95] Gul Majid Khan; Jia Bi Zhu, *J. of Control. Release* 56 (1998) 127–134.
- [96] Alderman, D.A. *Int. J. Pharm. Technol.* 5(1) (1984) 1–9.
- [97] Lapidus, H.; Lordi, N.G. *J. Pharm. Sci.* 55(8) (1966) 840–843.

- [98] Ford, J.L.; Rubinstein, M.H.; McCaul, F. *Int. J. Pharm.* 40(1) (1987) 223–234.

