

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNAC94-03

執行期限：94年1月1日至94年12月30日

主持人蕭明達

嘉南藥理科技大學醫藥化學系

Abstract

Two polyurethanes, PUMA and PUMB, were synthesized in this study. PUMB containing Polyethylene glycol(PEG, MW=200) polar group in the structure. Using photo-polymerization method, we prepared two series of Polyurethane/liquid crystal composite membranes based on two kinds of polymers (PUMA,PUMB). In order to evaluate the blood compatibility of these membranes, we did a series of test, such as SEM observation of the platelet adhesion to membrane surface, blood clotting and haemolysis ratio. The results showed that the content of liquid crystal or PEG polar group in composite membrane, appear to be beneficial in improving the blood compatibility.

Keyword : liquid crystal, composite membranes, blood compatibility

一、中文摘要

我們自行合成兩種新型聚胺基甲酸酯材料(PUMA,PUMB)。兩者差異在於導入親水性結構(PEG)的有無。實驗中使用光聚合合成法製備此兩種型式的液晶/PU複合膜(PUMA型,PUMB型)。為了評估複合膜與血液相容性質之關係，我們以SEM觀察血小板在複合膜表面吸附情況、血液凝塊的變化量及溶血率性質，此三種測試來做為評估實驗。實驗結果發現PU材料結構，導入液晶或是親水性基團會有利於改善材料本身之血液相容性質。

關鍵詞：液晶、複合膜、血液相容性質

二、簡介

隨著時代的進步，醫療科技的發展也是日新月異。現今的民眾除了在生活品質的提高之外，對於醫療服務的品質也愈趨重視。近年來因生醫材料的使用在醫療中佔有重要的角色，使得生物性的材料在這幾年開始嶄露頭角，科學界也相繼投入生醫材料這方面的相關研究。材料之表面性質將會是影響生醫材料生物相容性之重要因素⁽¹⁾，其中最主要的因素就是生醫材料和生物體之間的血液相容性好壞有關。近幾年來，研究抗血栓⁽²⁾生醫材料的國內外學者利用物理加工、生物處理及化學改質等方法來改善高分子的血液相容性，以避免因血液相容性差而導致的血栓產生⁽³⁾、破壞血球、酵素或過敏的現象。由於液晶具有流體性質，能表現生命體系的形狀、多樣性和運動性⁽⁴⁾，使得液晶現今常被用來作為醫療上的應用。我們利用膽固醇液晶(COC)的相轉移溫度低於人體內溫度這項特點，將液晶鑲埋入高分子中，藉由液晶/高分子複合膜中，液晶可流動的特性模仿天然生物膜表面流動的型態，提升材料的血液相容性質。

三、實驗材料合成⁽⁵⁾：

取HDI放入單頸圓底反應瓶，另取HEA放入進料管中，緩慢加入反應瓶中，HDI與HEA之莫耳比為1:2，在50°C之溫度下反應5小時。利用無水乙醚萃取再將其真空抽氣，可獲得白色粉狀PUMA單體。

取HDI放入單頸圓底反應瓶，另取PEG放入進料管中，以緩慢加入反應瓶中，HDI與PEG之莫耳比為4:1，在60°C之溫度下反應5小時，利用無水乙醚萃取及真空抽氣設備除去未反應之藥品，將產物析出，隨後加入1.682g之HEA在50°C反應5小時。以無水乙醚萃取再將其真空抽氣可得透明粘稠狀之PUMB產物。

液晶/PU複合膜之製備⁽⁶⁾：

實驗中採用光聚合方法，將高分子(PUMA;PUMB)材料

中加入3%的自由基起始劑(HCPK)混合均勻後，在60°C~70°C與液晶(Cholesteryl oleyl carbonate)相混合並攪拌成透明的均質溶液，其中液晶佔總重量0~10%。將間隙膜置於玻璃片上，再放上一層控制厚度的中空間隙膜，取適量的混合液於間隙膜中空處，並覆蓋上另一層間隙膜及玻璃片，兩端以長尾夾夾緊。置於紫外光燈源器中，照光60秒行光聚合反應，使之硬化成膜，脫去間隙膜後即得液晶/高分子複合膜。

血液凝塊測試(Blood clotting test)⁽⁷⁾：

將待測的液晶/PU複合膜與血液混合置入樣品瓶中於37°C恆溫循環水槽中培養(10、20、30分鐘)。培養後加入去離子水10ml，取出以100g離心30秒，再加入40ml的去離子水，放入37°C恆溫循環水槽中60分鐘之後，以紫外光/可見光度計測量其在542nm下之相對吸收度。0.25ml加了ACD的全血以50ml去離子水稀釋後在542nm下之吸收度，假設為100用以作為參考值，並計算BCI值，計算公式如下。

$$BCI值 = \frac{\text{接觸過複合膜的血液 Abs值}}{\text{用水稀釋過的全血 Abs值}} \times 100$$

溶血率測量(Haemolysis ratio measurement)⁽⁷⁾：

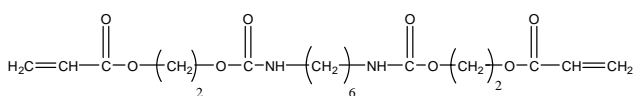
將待測的液晶/PU複合膜分別以去離子水及食鹽水沖洗三次，平放於樣品瓶中，加入10ml的食鹽水。置入恆溫循環水槽中搖動培養60分鐘(100次/hr)，溫度調整為37°C。之後，加入0.2ml稀釋後的全血(8ml加了ACD的全血以10ml食鹽水稀釋)繼續搖動培養60分鐘。培養完畢後，將溶液取出以100g離心五分鐘。取上層液以紫外光/可見光度計測量其在542nm下之相對吸收度，並計算HR值，計算公式如下。

$$HR = \frac{AS - AN}{AP - AN} \times 100$$

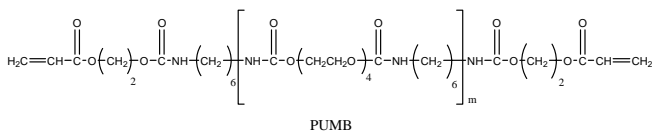
[AS為與複合膜培養後血液之吸收值，AP為10mL去離子水加0.2mL稀釋後血液之吸收值(positive control)，AN為10ml食鹽水加0.2mL稀釋後血液之吸收值(negative control)。]

血小板的吸附測試⁽⁷⁾：

將待測的液晶/PU複合膜以去離子水沖洗三次，平放於樣品瓶中。吸取3ml之血小板濃厚液(PRP，由加了ACD的全血以100g離心10分鐘取得)完全覆蓋液晶/PU複合膜表面，並置入恆溫循環水槽中調整溫度為37°C。靜置60分鐘後，以PBS緩衝溶液將反應後未吸附及物理吸附的血小板濃厚液洗去，之後使用含有2.0% (w/v)的戊二醛PBS溶液覆蓋複合膜，放入冰箱，時間為五分鐘。經過戊二醛的固定後，以去離子水清洗複合膜。而後，將複合膜放置在烘箱內抽真空乾燥。將完全乾燥後的複合膜用金鈹以15mA進行濺鍍(sputter-coating)100秒，以備接下來的SEM檢測。處理後的複合膜，必須放置在防潮箱內，避免因吸收大氣中的水氣而使表面的血小板產生形變。完成了上述所有的步驟後，使用SEM觀察複合膜表面所吸附的血小板及其形態。



PUMA



四、結果與討論

血液凝塊測試(Blood clotting test)⁽⁷⁾

BCI(Blood clotting index)值表達血液與複合膜接觸所產生血液凝塊的變化量，BCI 值大時，複合膜不易與血液產生凝塊，其血液相容性質變好。由圖一、圖二所示，在相同的培養時間及液晶含量條件下，PUMB 的 BCI 值皆高於 PUMA，即顯示出液晶/PUMB 複合膜之血液相容性優於液晶/PUMA 複合膜。且當複合膜中液晶含量增加時，BCI 值也隨之增加。故由圖示可知當材料導入 PEG 親水性結構或添加液晶，皆可提升材料的血液相容性質。

溶血率測量(Haemolysis ratio measurement)⁽⁷⁾：

HR(Haemolysis ratio) 值表達複合膜與血液接觸時對血球細胞的破壞程度，HR 值愈小，表示複合膜對血球細胞的破壞程度就愈小，血液相容性質愈好。由圖三可明顯辨別出 PUMB 的血液相容性質優於 PUMA，且液晶的添加確實可以降低 HR 值來提昇材料的血液相容性質。

血小板的吸附測試⁽⁷⁾：

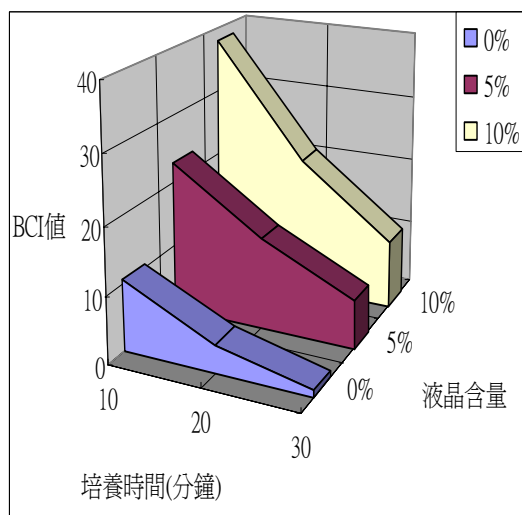
圖四~圖九為液晶/PU複合膜(0~10%)與血小板濃液(PRP)接觸60分鐘後，以SEM觀察血小板在複合膜表面吸附的數量、形態。血小板黏著量與血液相容性值成正向關係。由圖四~圖六及圖七~圖九可明顯看出，高分子材料添加液晶含量愈高，其血小板黏著量愈少。證明了在高分子材料中添加液晶改質的確可以降低對血小板的吸附，也就是可以達到抗血栓的功效。

五、結論

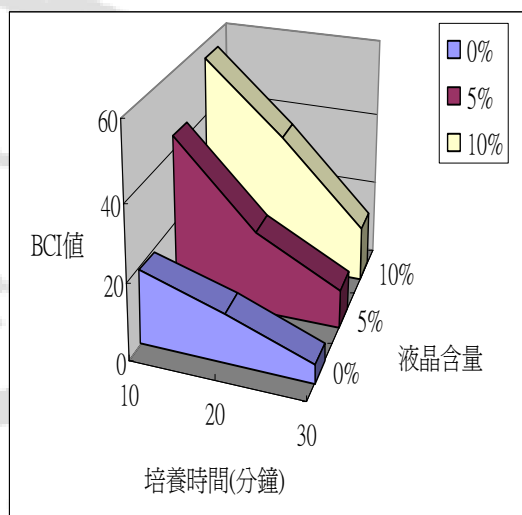
由於生物膜內存在液晶而具有可移動的狀態，實驗針對此一特點，利用膽固醇液晶的相轉移溫度低於人體內溫度這項特點，將液晶鑲埋入高分子中，藉由液晶高分子複合物中，液晶可流動的特性來模仿天然生物膜表面流動的型態，提升液晶/高分子複合物的生物相容性。綜合實驗結果，佐證高分子結構中含有親水性 PEG 結構材料(PUMB)，由實驗結果看來其血液相容性質確實比未含有親水性結構材料(PUMA)來的優異。且在高分子導入液晶這方面來看，液晶的添加對於提升材料的血液相容性是有正面的影響。

六、參考文獻

1. Kim YH, Han DK, Park KD, Kim SH. t. Biomaterials 2003;24:2213-2223.
2. 邱思凱, 張孟榮"嘉南藥理科技大學專題研究"(2001)。
3. Li L, Tu M, Mou S, Zhou C. Biomaterials 2001; 22:2595-2599
4. Nakabayashi N, Williams DF. Biomaterials 2003;24:2431-2435.
5. Gnter Oertel, "Polyurethane Handbook", Hanser Publisher, Munich Vienna New York,(1985)
6. 王宗新"嘉南藥理科技大學專題研究"(200)。
7. Changen Zhou, Zhengji Yi " Biomaterials 20(1999)2093-2099.

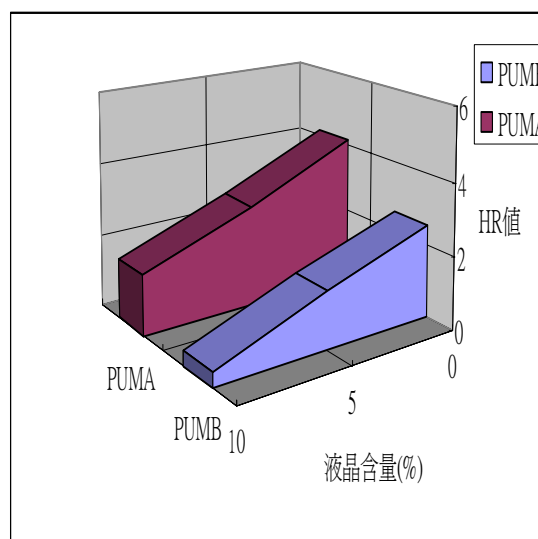


圖一 不同時間及不同比例液晶/PUMA 複合膜對 BCI 值的影響。

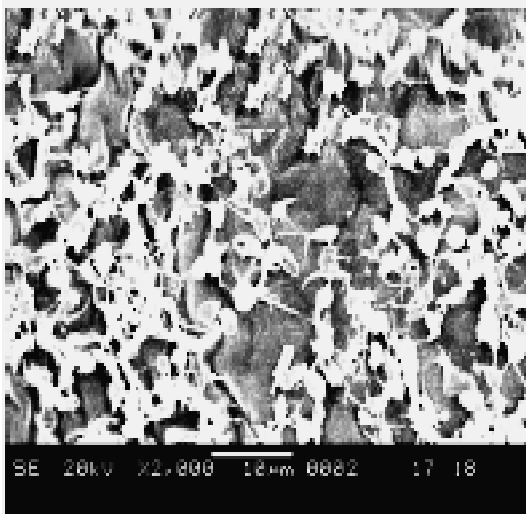


圖二 不同培養時間及不同比例液晶/PUMB 複合膜對

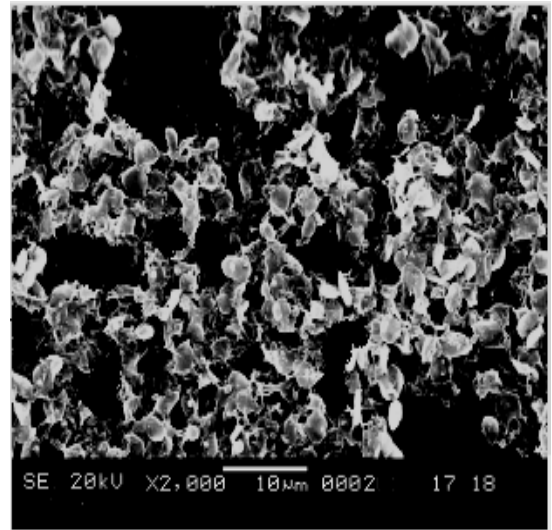
BCI



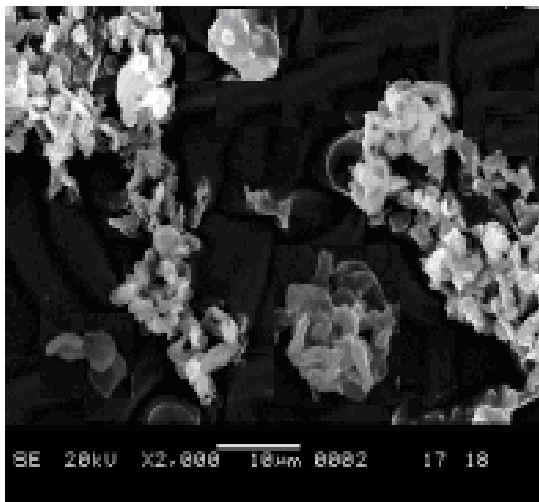
圖三 液晶/高分子複合膜對 HR 值之影響



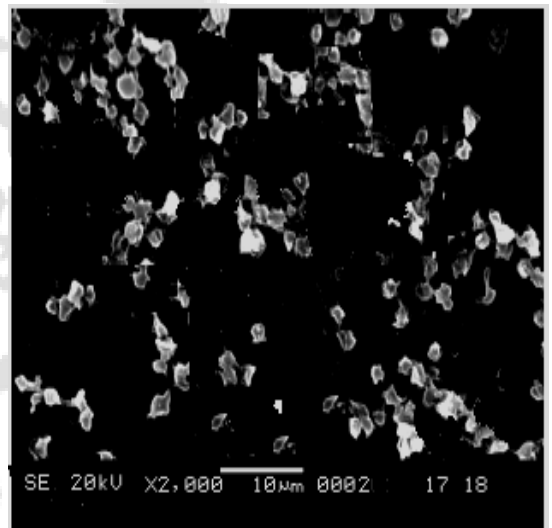
圖四 液晶/PUMA (0%)之血小板 SEM 吸附圖



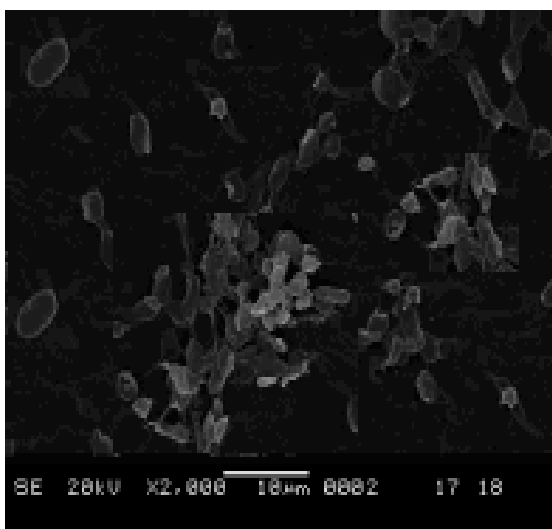
圖七 液晶/PUMB (0%)之血小板 SEM 吸附圖



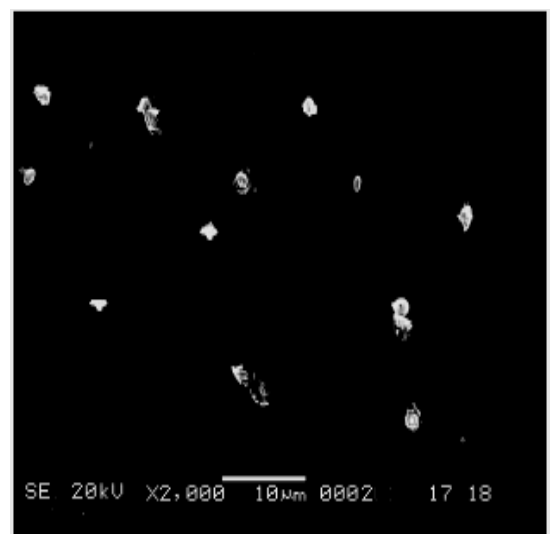
圖五 液晶/PUMA (5%)之血小板 SEM 吸附圖



圖八 液晶/PUMB (5%)之血小板 SEM 吸附圖



圖六 液晶/PUMA (10%)之血小板 SEM 吸附圖



圖九 液晶/PUMB (10%)之血小板 SEM 吸附圖