

新型聚胺基甲酸酯(PU)合成及其液晶複合膜之結構與血液相容性研究

林紹倫¹ 蕭明達² 陳素容³ 蔡百豐^{4*}

¹嘉南藥理科技大學醫藥化學系

²嘉南藥理科技大學生物科技系

³嘉南藥理科技大學藥學系

⁴嘉南藥理科技大學職業安全衛生系

摘 要

本研究合成兩種新型聚胺基甲酸酯材料(PUMA、PUMB)，兩者差異在於PUMB材料在合成時導入親水性結構(PEG)。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，研究以SEM觀察血小板在複合膜表面吸附情況、血液凝塊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，導入液晶或親水性基團均能改善材料本身之血液相容性質。並且發現，(1)含有親水性結構(PEG)的PUMB，其血液相容性優於未含有親水性結構(PEG)的PUMA。(2)當高分子複合物導入液晶，則有減少血栓、增進血液相容性的趨勢，其趨勢隨添加液晶含量增高而上升。

關鍵詞：聚胺基甲酸酯、液晶、複合膜、聚乙二醇、血液相容性

*通訊作者：嘉南藥理科技大學職業安全衛生系

Tel: +886-6-2664911 Ext6231

Fax: +886-2667320

E-mail: paifeng@mail.chna.edu.tw

壹、前言

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(Ravi *et al.*, 2009; Sahithi *et al.*, 2010; Rosellini *et al.*, 2010)。一般而言，生醫材料的材質可分為人工合成的高分子材料、金屬、陶瓷及存在自然界中的生物高分子材料。針對不同的用途，結合不同材質特性的複合材料可應用在疾病治療上。在生醫材料中，人工合成高分子材料的應用最為廣泛，其佔有率也超過其它材質。

人工合成的高分子生醫材料通常經由特殊加工處理，再運用於生物體上。使用這些生醫材料到生物體中，必須先克服材料與生物體的排斥問題；

傳統的高分子生醫材料研究多偏重於對物質的整體性質(例如化學結構、機械物理性質)與生物相容性之間做評估及預測。但研究發現生醫材料應用在治療時，只有材質的表面與生物體內環境相接觸，因此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，其中最主要的因素是生醫材料和生物體之間的血液相容性(Guo *et al.*, 2011)。近幾年來，研究抗血栓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、破壞血球、酵素或產生過敏的現象(Wang *et al.*, 2010; Shih *et al.*, 2006)。

1966年Boretos發現PU具有良好的血液相容性以來(Rangwala *et al.*, 2009)，PU在血液相容性上的相關研究開始衍生(McBane *et al.*, 2011; Blit *et al.*,

2011)。由於文獻上指出帶有親、疏水性不同結構的高分子，對於降低血栓產生及對細胞的破壞與提高材料的血液相容性有關，本論文將探討 PU 材料導入親水性結構(PEG)的影響。

液晶常被用來作為醫療上的運用，主要的特性是因為液晶它不同於一般固態晶體的分子排列，固態晶體分子運動受限制，而液晶分子的排列除有規則度之外，分子也有一定的運動自由度，因此當液晶受到外力(如電場、磁場、溫度)作用時，會順應外力改變分子的排列狀態，簡單的說，液晶的結構介於晶體與液體之間，有別於傳統的三態，所以被視為物質的第四態，具有一度或二度的排列規則性，稱之為液晶態或中間態。我們知道生物膜是一種脂質及蛋白質所組成有組織的、片狀的組合物，其構造類似馬賽克，並且磷脂雙層可以移動，又稱為「流動鑲嵌膜」，主要強調的是流動的脂質雙層構成膜的連續元體。由於疏水作用形成的雙層分子之分子膜，使得膜上的蛋白質分子就像冰山一樣，在脂質的海洋中飄流。因此分子雙層的行爲既像液體又具有晶體的有序結構(Morimoto *et al.*, 2002; Nakabayashi and Williams, 2003; Yang *et al.*, 2003)。

本論文主要針對高分子結構中親水性官能基的有無添加液晶含量的多寡，探討高分子血液相容性之好壞趨勢。研究合成出兩種新型聚胺基甲酸酯-PU 材料(PUMA、PUMB)，兩者差異在於導入親水性結構(PEG)的有無。並以光聚合法製成高分子複合膜，以探討親水性結構的有無對 PU 材料血液相容性之影響。由於生物膜內存在液晶而具有可移動的狀態，文中也針對此一特點利用某些液晶的相轉移溫度低於人體內溫度這項特點(Lin *et al.*, 2001)，將液晶鑲入高分子中，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(Li *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002)。本論文在血液相容性評估實驗上，利用血液凝塊測試和溶血率測量來評估複合膜與血液接觸相容性好壞，以及使用 SEM 觀察複合膜表面黏著的血小板形態。建立高分子因部分結構不同及添加液晶含量的差異，對於 PU 材料之血

液相容性的影響趨勢。

貳、材料及方法

一、試藥及材料

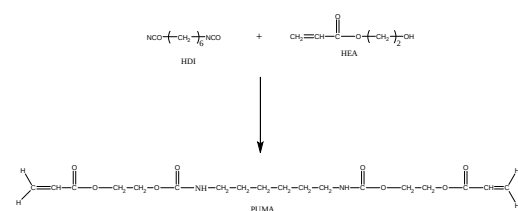
膽固醇液晶(cholesteryl oleyl carbonate ; COC) 由 Aldrich 公司購得；自由基起始劑(1-hydroxy-cyclohexylphenylketone ; HCPK) 由 Ciba-Geigy 公司購得；抗凝劑(citrate-dextrose solution)、食鹽水(normal saline)由 Sigma 公司購得，並於 2~8℃ 下儲存；氯化鈣(calcium chloride 2-hydrate)由 Riedel-deHaën 購得；A commercial PU (Tecoflex; CAS registry number 76600-67-4)、2-hydroxyethyl acrylate (HEA)、1,6-diisocyanatohexane (HDI) 及 polyethylene glycol (PEG) (HO[CH₂CH₂O]₄H, Mw = 200)、2% 戊二醛溶液(2% glutaraldehyde solution)由 Fluka 公司購得。

二、新型聚胺基甲酸酯 PUMA、PUMB 的和成

(一)、PUMA 單體和成

取 HDI 放入單頸圓底反應瓶，另取 HEA 以 NCO/OH 莫耳數比 2:1 的比例緩慢加入反應瓶中，在 50℃ 下反應 5 小時，以無水乙醚萃取後，經真空乾燥得白色粉狀 PUMA 單體(反應式 1)。

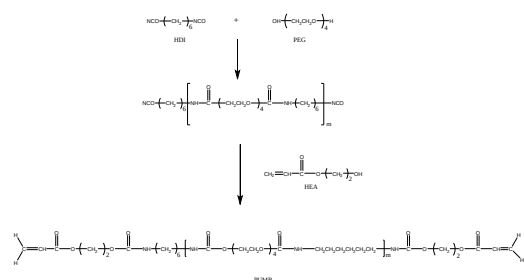
反應式 1



(二)、PUMB 單體和成

取 HDI(hexanediisocyanate)放入單頸圓底反應瓶，另取 PEG 以 NCO/OH 莫耳數比 4:1 的比例緩慢加入反應瓶中，在 60℃ 下反應 5 小時，以無水乙醚萃取後，經真空乾燥後將產物析出，隨後加入 2 個當量比的 HEA，在 50℃ 下反應 5 小時，以無水乙醚萃取後，經真空乾燥得透明黏稠狀 PUMB 單體(反應式 2)。

反應式 2



三、製備液晶/高分子複合膜

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 60-90°C 與液晶(Cholesteryl oleyl carbonate)相混合並攪拌成透明均質溶液，其中液晶占總重量 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，存放於乾燥箱中。

四、血小板的吸附測試(Zhou and Yi, 1999)

將待測的液晶/高分子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 100 × g 離心 10 分鐘取得) 完全覆蓋液晶高分子複合膜表面，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先去，之後使用含有 2.0% (w/v) 的戊二醛 (glutaldehyde) 的 PBS 溶液覆蓋複合膜，放入冰箱，時間為五分鐘。經過 glutaldehyde 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。

五、血液凝塊測試 (Blood clotting test)

(Zhou and Yi, 1999)

將待測的液晶/高分子複合膜，平放於樣品瓶中，並置入恆溫循環水槽中溫度調整為 37°C，五分鐘後將 0.3mL 加了 ACD 的全血與 0.024mL CaCl₂ (0.2mol/L) 混合均勻，取其中 0.27mL 滴在複合膜表面，進行恆溫培養，培養時間分別為 10 分鐘、20 分鐘及 30 分鐘。培養後沿壁緣緩慢加入去離子水 10mL，取出以 100 × g 離心 30 秒，再加入 40mL 的去離子水，放入恆溫循環水槽中 60 分鐘，溫度同樣設定為 37°C。之後，以紫外光/可見光度計測量其在 542nm 下之相對吸收度。0.2mL 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。

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

六、溶血率測量 (Haemolysis ratio

measurement) (Zhou and Yi, 1999)

將待測的液晶/高分子複合膜分別以去離子水及食鹽水 (normal saline) 沖洗三次，平放於樣品瓶中，加入 10mL 的食鹽水 (normal saline)。置入恆溫循環水槽中緩慢培養 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) 繼續緩慢培養 60 分鐘。培養完畢後，將溶液取出以 100 × g 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)。

參、結果與討論

一、PU 單體(PUMA；PUMB)之結構分析

按照反應式 1 和反應式 2 成功合成出 PUMA 和 PUMB 材料，其結構由 FT-IR 和 $^1\text{H-NMR}$ 鑑定之。並以 GPC 數據判讀顯示出 PUMA 和 PUMB 之分子量，對應於聚苯乙烯標準聚合物的重量平均分子量。

(一)、PUMA 和 PUMB 之 FT-IR 結構鑑定

由圖 1 明顯看出 2269cm^{-1} 異氰酸酯之特性吸收峰的消失，伴隨形成胺基甲酸酯之特性吸收峰，分別在 1717cm^{-1} (伸縮振動, C=O 胺基甲酸酯)、 1683cm^{-1} (伸縮振動, C=O 醯胺)、 1542cm^{-1} (彎曲振動, N-H 醯胺)、 3320cm^{-1} (伸縮振動, N-H 胺基甲酸酯) 和 1637cm^{-1} (伸縮振動 C=C)。以及圖 2 中的 $^1\text{H-NMR}$ 相關 ^1H 的訊號可印證合成之 PUMA 單體結構是正確的。

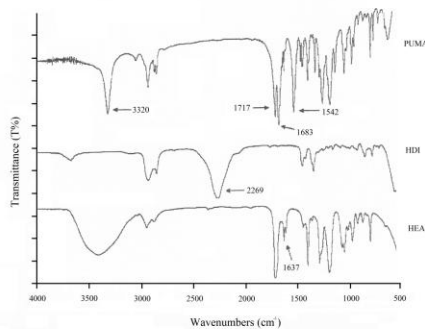


圖 1、PUMA、HDI、HEA FT-IR 比較圖

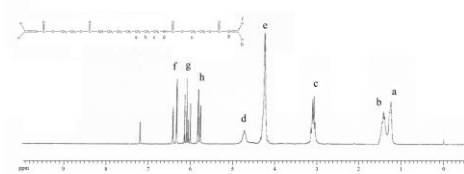


圖 2、PUMA $^1\text{H-NMR}$ 圖

由圖 3 明顯看出 2269cm^{-1} 異氰酸酯之特性吸收峰的消失，伴隨形成胺基甲酸酯之特性吸收峰，分別在 1719cm^{-1} (伸縮振動, C=O 胺基甲酸酯)、 1686cm^{-1} (伸縮振動, C=O 醯胺)、 1540cm^{-1} (彎曲振動, N-H 醯胺)、 3346cm^{-1} (伸縮振動, N-H 胺基甲

酸酯) 和 1637cm^{-1} (伸縮振動, C=C)。以及圖 4 中的 $^1\text{H-NMR}$ 相關 ^1H 的訊號可印證合成之 PUMB 單體結構是正確的。

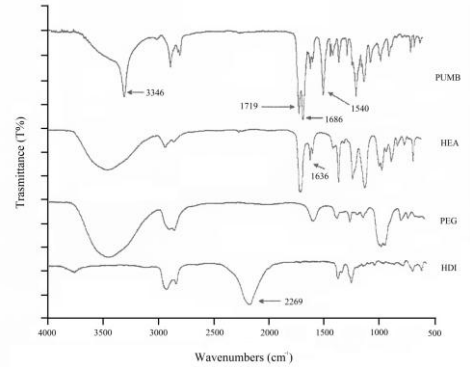


圖 3、PUMB、HEA、PEG、HDI FT-IR 比較圖

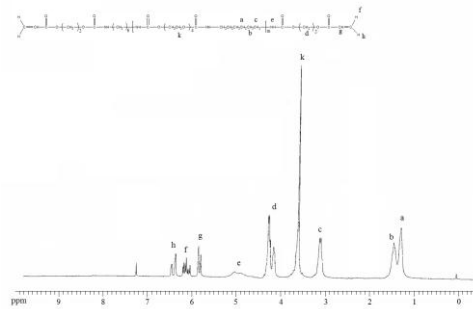


圖 4、PUMB $^1\text{H-NMR}$ 圖

(二)、GPC 分析

由 GPC 數據判讀顯示出 PUMA 和 PUMB 之分子量，對應於聚苯乙烯標準聚合物的重量平均分子量分別為 490 和 2440，多分散指數分別為 1.04 和 1.7。

二、血液凝塊特性(blood clotting properties)

血液凝塊測試表現的是當添加不同比例液晶的複合膜與血液接觸時間增加時，抗血小板因子活動(抗血栓活動；antithrombogenic activity)的變化。在本論文中，抗血栓活動是以 BCI(blood clotting index)值來表達。其原理為假設當血液與複合膜接觸時產生大量的血液凝塊，這就代表此複合膜的血液相容性差，則紫外光/可見光度計可以偵測到的吸收度當然是小的，所以 BCI 值也就跟著變小。反之，當複合膜的血液相容性愈好，BCI 值就愈大。圖 5、

6 顯示出兩種類的複合膜中液晶含量及複合膜與血液接觸的時間對 BCI 值的影響。由實驗數據清楚的指出在相同的接觸時間下，當複合膜中液晶含量增加時，BCI 值也就隨之增加。我們可以說，在分子內添加液晶是有助於改進高分子的血液相容性，這是因為複合膜內包含著液晶的形態，由於液晶相的流動性，可以防止血小板黏著在複合膜的表面。

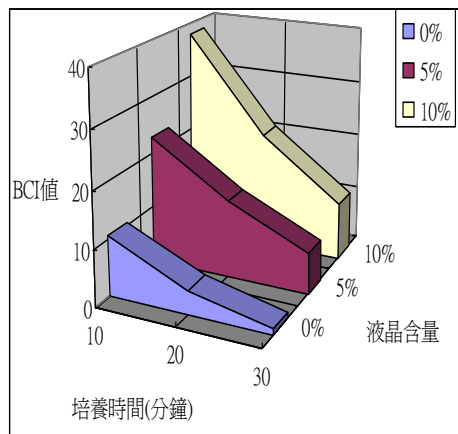


圖 5、不同時間及不同比例液晶/PUMA 複合膜對 BCI 值的影響

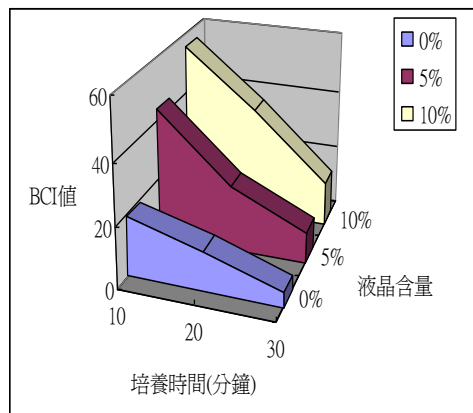


圖 6、不同培養時間及不同比例液晶/PUMB 複合膜對 BCI 值的影響

由圖 5、6 的比較下也清楚顯示出在相同的培養時間及液晶含量條件下，PUMB 的 BCI 值皆高於 PUMA，顯示液晶/PUMB 複合膜之血液相容性優於液晶/PUMA 複合膜。

三、溶血率測量(Haemolysis ratio)

溶血率代表的是複合膜與血液接觸時，對血球細胞的破壞程度。也就是被破壞的紅血球細胞數目愈多，所測得的吸光值愈高，則 HR 值也就愈大。

我們可以說當 HR 值愈小，此生醫材料與血液相容性愈好。由圖 7 可以發現當液晶含量越高時 HR 值有下降的趨勢。這表示在分子材料中添加液晶，可以降低複合膜對紅血球細胞的破壞，增加其血液相容性。並且由圖 7 中可明顯辨別出 PUMB 的血液相容性質優於 PUMA。

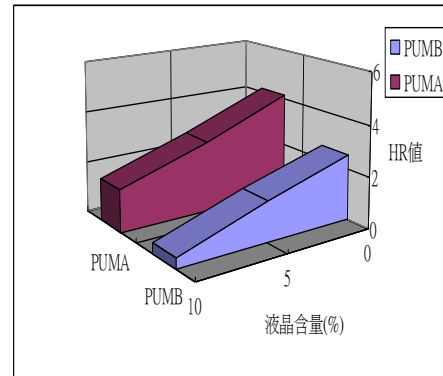
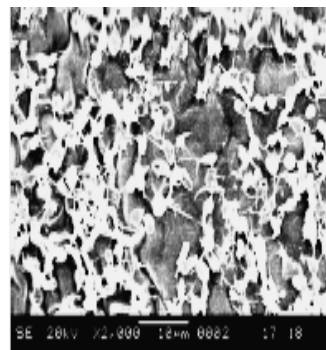


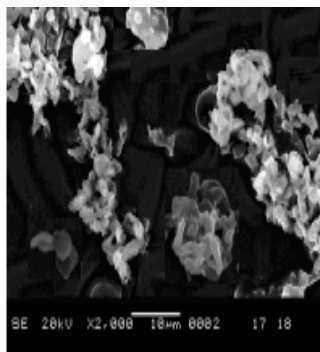
圖 7、液晶/高分子複合膜對 HR 值之影響

四、血小板的吸附 SEM 圖

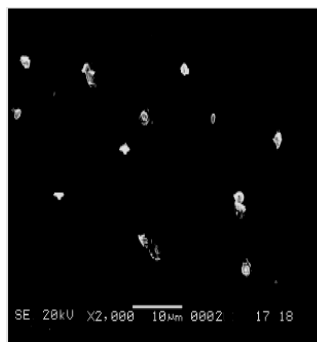
圖 8 為液晶/高分子複合膜(0~10%)與血小板濃厚液(PRP)接觸 60 分鐘後，以 SEM 觀察血小板在複合膜表面吸附的數量、形態，可以觀察複合膜血液相容性的好壞，也可比較在分子材料中添加液晶對血小板黏著的影響。由圖中可明顯看出，高分子材料不論是 PUMA 或 PUMB，由圖 8(a)~(c)及 (d)~(f)可看出，所添加液晶含量由 0%、5%而提高至 10%，其血小板黏著量愈少。證明了在分子材料中添加液晶改質，的確可以降低對血小板的吸附，也就是可以達到抗血栓的功效。



(a) 液晶/PUMA(0%)

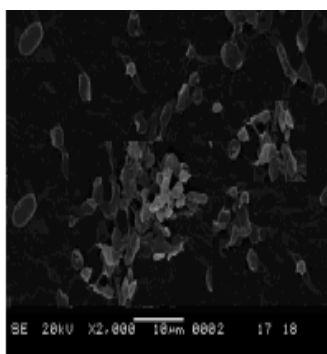


(b) 液晶/PUMA (5%)



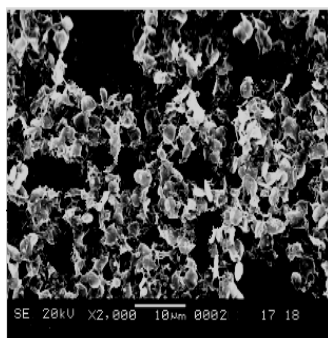
(f) 液晶/PUMB (10%)

圖 8、(a~c):液晶/PUMA (0%、5%、10%)之血小板
SEM 吸附圖

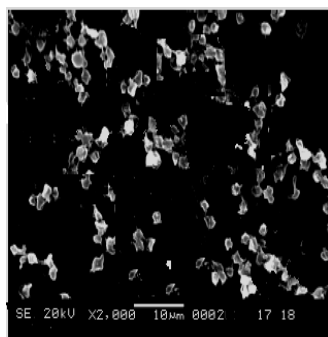


(c) 液晶/PUMA (10%)

(d~f):液晶/PUMB (0%、5%、10%)之血小板
SEM 吸附圖



(d) 液晶/PUMB (0%)



(e) 液晶/PUMB (5%)

肆、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，從血液凝塊測試、溶血率測量及 SEM 的觀察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。

伍、文獻

- Blit, P.H.; McClung, W.G.; Brash, J.L.; Woodhouse, K.A.; Santerre, J.P. (2011). Platelet inhibition and endothelial cell adhesion on elastin-like polypeptide surface modified materials. *Biomaterials*, 32, 5790-5800.
- Guo, J.; Feng, Y.; Ye, Y.; Zhao, H. (2011). Construction of hemocompatible polycarbonate urethane with sulfoammonium zwitterionic polyethylene glycol. *J. Appl. Polym. Sci.*, 122, 1084-1091.
- Li, L.; Tu, M.; Mou, S.; Zhou, C. (2001). Preparation and blood compatibility of polysiloxane/liquid-crystal composite membranes. *Biomaterials*, 22, 2595-2599.
- Lin, S.Y.; Ho, C.J.; Li, M.J. (2001). Precision and reproducibility of temperature response of a temperature response of a thermo-responsive membrane embedded by binary liquid crystals for drug delivery. *J. Control. Release*, 73, 293-301.
- Lin, S.Y.; Lin, H. L.; Li, M.J. (2002). Manufacture factors affecting the drug delivery function of thermo-responsive membrane prepared by adsorption of binary liquid crystals. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 17, 153-160.
- McBane, J.E.; Sharifpoor, S.; Cai, K.; Labow, R.S.; Santerre, J.P. (2011). Biodegradation and *in vivo* biocompatibility of a degradable, polar/hydrophobic/ionic polyurethane for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 32, 6034-6044.
- Morimoto, N.; Iwasaki, Y.; Nakabayashi, N.; Ishihara, K. (2002). Physical properties and blood compatibility of surface-modified segmented polyurethane by semi-interpenetrating polymer network with a phospholipids polymer. *Biomaterials*, 23, 4881-4887.
- Nakabayashi, N.; Williams, D.F. (2003). Preparation of non-thrombogenic materials using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *Biomaterials*, 24, 2431-2435.
- Rangwala, H.S.; Ionita, C.N.; Rudin, S.; Baier, R.E. (2009). Partially polyurethane-covered stent for cerebral aneurysm treatment. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 89, 415-429.
- Ravi, S.; Qu, Z.; Chaikof, E.L. (2009). Polymeric materials for tissue engineering of arterial substitutes. *Vascular*, 17, S45-S54.
- Rosellini, E.; Cristallini, C.; Barbani, N.; Vozzi, G.; D'Acunto, M.; Ciardelli, G.; Giusti, P. (2010). New bioartificial systems and biodegradable synthetic polymers for cardiac tissue engineering: A preliminary screening. *Biomed. Eng.-Appl. Basis Commun.*, 22, 497-507.
- Sahithi, K.; Swetha, M.; Ramasamy, K.; Srinivasan, N.; Selvamurugan, N. (2010). Polymeric composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, 46, 281-283.
- Shih, M.F.; Shau, M.D.; Chang, M.Y.; Chiou, S.K.; Chang, J.K.; Cheng, J.Y. (2006). Platelet adsorption and hemolytic properties of liquid

crystal/composite polymers. *Int. J. Pharm.*, 327, 117-125.

Wang, Y.; Xu, W.; Chen, Y. (2010). Surface modification on polyurethanes by using bioactive carboxymethylated fungal glucan from *Poria cocos*. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, 81, 629-633.

Yang, Z.M.; Wang, L.; Yuan, J.; Shen, J.; Lin, S.C. (2003). Synthetic studies on nonthrombogenic biomaterials14: synthesis and characterization of poly(ether-urethane) bearing a zwitterionic structure of phosphorylcholine on the surface. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 14, 707-718.

Zhou, C.; Yi, Z. (1999). Blood-compatibility of polyurethane/liquid crystal composite membranes. *Biomaterials*, 20, 2093-2099.

Synthesis and Evaluation of New Poly(urethane) and PEG-Poly(urethane) and Their Cholesteryl Oleyl Carbonate Composites for Human Blood Biocompatibility

Siu Yu Lin¹ Min Da Shau² Su Jong Chen³ Pai Feng Tsai^{4*}

¹Department of Applied Chemistry,

²Department of Biotechnology,

³Department of Pharmacy,

⁴Department of Occupational Safety and Health,

Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R. O. C.

Abstract

Polyurethane/liquid crystal composite membranes were first suggested to be used as biomaterials. In our work, we synthesized the PUMA and PUMB. The 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's adhesion to membrane's 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.

Key words : Polyurethane, Liquid crystal, Polyethylene glycol, Composite membranes, Blood compatibility

*Correspondence: Department of Occupational Safety and Health, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R. O. C.

Tel: +886-6-2664911 Ext. 6231

Fax: +886-2667320

E-mail: paifeng@mail.chna.edu.tw