

仿生兩性離子高分子修飾丁腈橡膠之抗生物沾黏應用

*周盈年、龔威豪、吳玉嬋

南臺科技大學化學工程與材料工程系

*ynzhou@stust.edu.tw

摘要

本研究使用具有廣用性改質功能的環氧型兩性離子共聚高分子 PGMA-co-PSBMA (poly(glycidyl methacrylate-co-sulfobetaine methacrylate)) 對丁腈橡膠 (nitrile-butadiene rubber, NBR) 進行生物相容性改質。藉由化學改質法中最具經濟效益的表面接枝法 (grafting to) 以浸泡塗佈 (dip-coating) 的方式讓功能端接枝上所需的改質的丁腈橡膠表面形成“改質 NBR” (m-NBR)。透過最佳化製程: 塗佈溶液為 3 mg/ml (PGMA-co-PSBMA/H₂O)、溶液溫度為 80°C、反應時間控制為 3 hr, 可得到最佳之表面接枝密度。經過油與水接觸角實驗得知, 疏水親油的丁腈橡膠經由處理後能變成親水疏油的改質丁腈橡膠。經過 ATR-FTIR 和 XPS 的表面官能基檢測確定 m-NBR 表面擁有 C=O (1660-1770 cm⁻¹) 及更強烈的 O-H (3300-3800 cm⁻¹) 訊號, 證明高分子確實有接枝上 NBR。接著針對 m-NBR 進行生物性質檢測, 結果發現, 塗佈上 PGMA-co-PSBMA 的 m-NBR 可以抵抗廣泛的蛋白質吸附, 最佳能夠降低 87% 的吸附量。在抵抗血球的貼附 (紅血球 RBC (red blood cells)、血小板 PRP (platelet-rich plasma) 及貧血小板的血漿 PPP (platelet-poor plasma)) 最佳能夠降低 90% 的貼附量。最後在抵抗細菌的貼附 (大腸桿菌 E.coli) 上, 最佳能夠降低 70% 的細菌貼附量。以上的結果證實, PGMA-co-PSBMA 塗佈過後的 m-NBR 可達到理想的抗生物沾黏效果。

關鍵詞: 丁腈橡膠、兩性離子、抗生物沾黏、表面改質

Modification of Biomimic Zwitterionic Polymer on NBR for Anti-biofouling Application

*Ying-Nien Chou, Wei-Hao Gong, Yu-Chan Wu

Department of Chemical and Materials Engineering, Southern Taiwan University of Science and Technology

Abstract

In this study, nitrile-butadiene rubber (NBR) was modified by epoxyated zwitterionic copolymer polymer PGMA-co-PSBMA (poly(Glycidyl methacrylate-co-sulfobetaine methacrylate)) to improve its biocompatibility. By means of the most economical surface grafting method in the chemical modification method (grafting to), the functional end was grafted on the surface of the NBR through the dip-coating method and forming a PGMA-co-PSBMA modified surface (m-NBR). Through the optimization process to achieve the best graft density, the concentration of coating solution was 3 mg/ml (PGMA-co-PSBMA/H₂O), the controlled coating temperature is 80°C, and the reaction time was controlled for 3 hours. The oil-water contact angle experiment showed that the hydrophobic and oleophilic nitrile rubber can be transformed into a hydrophilic and oleophobic modified nitrile rubber after treatment. The surface functional group detection of ATR-FTIR confirmed that the surface of m-NBR has C=O (1660-1770 cm⁻¹) and more intense O-H (3300-3800 cm⁻¹), which proves that the polymer is indeed grafted with NBR. The biological properties of m-NBR were tested, and it was found that m-NBR can resist the adsorption of a wide range of proteins and can reduce the adsorption capacity by 87%. The reduction of blood cell attachments (erythrocyte RBC (red blood cells), platelet PRP (platelet-rich plasma) and platelet-poor

Received: Feb. 22, 2022; first revised: Mar. 29, 2022, accepted: Apr. 2022.

Corresponding author: Y.N. Chou, Department of Chemical and Materials Engineering, Southern Taiwan University of Science and Technology, Tainan 710031, Taiwan.

plasma PPP (platelet-poor plasma) is about 90 %. Finally, the adhesion against bacteria (*Escherichia coli* E.coli) can reduce the amount of adhesion by 70 %. The above data proved that the m-NBR coated with PGMA-co-PSBMA can achieve the ideal anti-biofouling effect.

Keywords: Nitrile-butadiene Rubber, Zwitterion, Anti-biofouling, Surface Modification

壹、前言

一、生醫材料發展

生老病死是人類生命中必經的過程，年輕時生的病都有可能造成器官受到損害，功能也可能喪失，上了年紀之後這些都必定會反應在生理上。每個國家為醫療成本的支出越來越高，臺灣亦是，而這現象也帶起了生醫材料的發展熱潮。生醫材料這個領域至今發展了 60-70 年左右，對於人類健康不僅有了更大的保障，也帶動了經濟以及科學相關領域的發展。

生醫材料基本的定義，為用於製造體內或是體外使用的醫學器材材料，稱為生醫材料 (biomaterials) 又稱生物材料、醫療材料。這些醫學器材基本上直接或間接的會與人體的組織、體液或是血液等接觸。因此，在製造這些醫學器材時除了一般的物理、化學性質外，還需要考量跟人體組織、體液或血液等接觸時的生物相容性 (biocompatibility) 及生物機能性 (biofunctionality)。在任何情況下，材料不能對所處的生物環境造成負面影響[1]。生醫材料須具備 1.良好的生物相容性、生物機能性及穩定性 2.具有暫時輔助醫學治療或具有長期可取代生物組織或器官的功能 3.能承受滅菌劑量而做成規範的生醫及產品，才能稱作是生醫材料。材料亦不能對人體有產生毒性反應，如：發炎、溶血作用、細胞溶解、過敏、致癌物質、組織突變、血管病變等負面影響，人體天生的免疫系統是會排斥外來不屬於自身的異物，當有異物進入人體時，免疫功能就會被啟動而發生嚴重的發炎反應或是血液異常凝固的現象，甚至可能分解掉外來異物。其實所有的材料若是使用於人體，多少都會發生上述的排斥反應，良好生物相容性的生醫材料代表著身體的排斥反應較低，使用後材料周圍的組織還能正常生長，被植入的人體也能正常生活[2-4]。為提升生醫材料之生物相容性，常透過各類的表面改質方式提升表面與生物環境接觸之相容性。要能有效的提升生物相容性可分為數個方面，包含抵抗蛋白吸附、抵抗血球貼附、抵抗細菌貼附與生物膜形成、抵抗組織細胞增生等幾個層面[5]。

二、提升生物相容性之表面改質技術

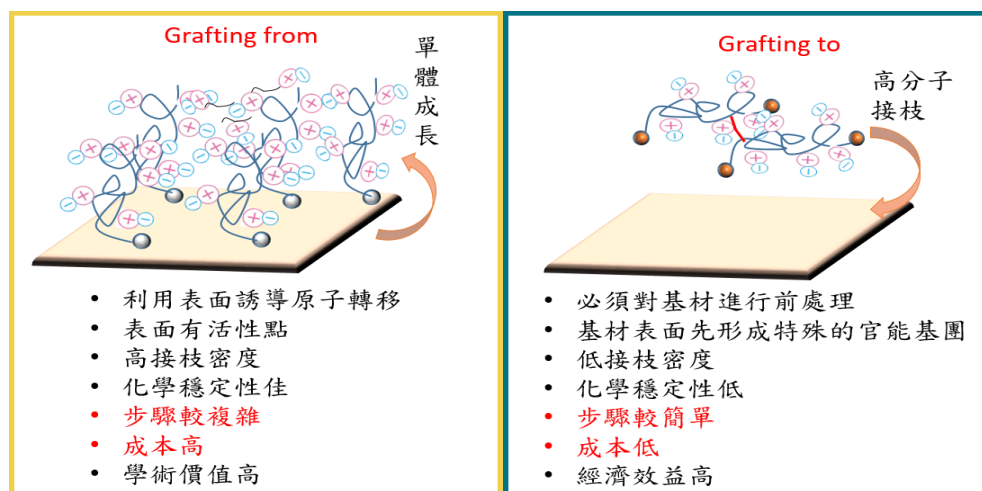
表面接枝聚合物，已成為表面改性或功能化的重要工具。隨著大分子表面科學的發展，表面接枝聚合物已成為修飾或功能化材料表面以提高性能的重要方法，通過控制接枝反應條件和接枝過程，可以將許多種類的功能高分子接枝到材料表面。為了形成穩定的表面接枝聚合物，聚合物與表面之間需要形成強鍵結力，可通過反應過程參數精確調控接枝性能以得到更好的穩定性。針對表面接枝聚合物的形成過程而言，有多種改質方法，大致上可歸類為兩種，分別是表面起始法和表面接枝法，這兩類方法之常見優缺點條列如圖1所示。

(一) 表面起始法 (Grafting from)

表面起始法是讓基材表面產生自由基團形成活性點並開始自由基聚合，形成表面高分子鏈。常使用的自由基聚合的方式有兩種，1.原子轉移自由基聚合 (ATRP) 2.表面誘導的可逆加成-斷裂鏈轉移聚合 (RAFT)。原子轉移自由基聚合 (ATRP)，常使用銅離子搭配螯合配體進行穩定，藉由銅離子的氧化力誘導表面原子轉移，形成自由基活性點後便可與單體進行單一位向之鏈鎖聚合成表面高分子刷。表面誘導的可逆加成-斷裂鏈轉移聚合 (RAFT) 是當觸發分子鏈斷裂時，會因為單體的存在讓鍛鍊繼續增長直到單體被消耗完，同時，分子鏈會保持活性。如果添加了新的單體進入系統，高分子鏈將會持續的增長。鏈轉反應為RAFT的主要反應，必須再繼續添加RAFT試劑才能使整個系統開始作用，且原子上會釋放出具有活性的自由基，會跟結合單體形成增長鏈。RAFT 有著高鏈轉移常數的轉移試劑去進行聚合，就可以使自由基能更快速的交換然後成長[6-7]。

圖 1

兩種類型的高分子表面改質技術: 表面起始法和表面接枝法



(二) 表面接枝法 (Grafting to)

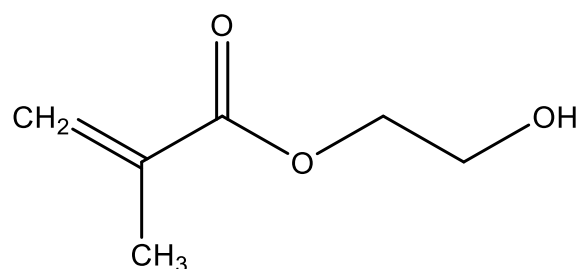
此種方法是較有經濟效益的接枝方式，先合成製作出具有嵌合端的共聚物，再藉由凡德瓦力或形成化學鍵使共聚物與基材嵌合。由於共聚物是預先製作，只要能穩定在表面嵌合即可便於進行量產。為增加介面嵌合的穩定性，常會搭配數種前處理方式，例如紫外線臭氧活化 (ultra-violet ozone)、等離子體聚合 (plasma polymerization) 或是高能輻射 (high level of radiation) 等方法。這些方法是要讓基材表面先形成特殊的官能基團，才能開始接枝上高分子的聚合物。接枝的物質必須具有能跟材料表面上特殊基團進行反應的鏈段才能讓聚合物順利嵌合。為了讓化學鍵結合以實現改性材料表面的效果，最後就必須將含有高分子共聚物的溶液塗佈在基材上，讓兩者的官能基互相反應。而表面接枝法在表面覆蓋率上跟表面起始法相比，較不易覆蓋均勻緻密，需要較多的參數調控[8]。

(三) 抗生物沾黏材料 (Antifouling materials)

當材料在生醫環境中使用時必須具備良好的生物相容性，否則會引起生物免疫反應或者會產生雜質聚集而降低使用性。例如若有一不具生物相容性之材料進入到人體中，此時人體環境中的蛋白質會先析附到材料表面進行覆蓋，接著會引起血球細胞如血小板或紅血球的表面貼附；當材料在生活環境中使用，如廢水在，目前的研究已針對抗沾黏高分子根據作用力與其發展歷史可依序區分為第一代甲基丙烯酸2-羥乙酯 (HEMA-based systems) 第二代聚乙醇 (PEGlyated systems)、第三代兩性離子性材料 (Zwitterionic systems) [9-10]。被劃分為第一代材料的 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA) 自1950年開始被廣泛的使用、之現今仍被廣泛的使用在隱形眼鏡的製造上，因為HEMA具有羥基所以其本身具有極性的性質，使高分子本身擁有較高的親水性。且羥基和水分子之間形成的氫鍵作用更提供了材料表面的水合層，同時也抵禦了一些生物分子的沾黏，此外材料本身擁有的電中性性質也使其增加了生物相容性。但是HEMA類型的高分子與血液相容性欠佳，容易引起血球凝集和蛋白質貼附，如圖2。

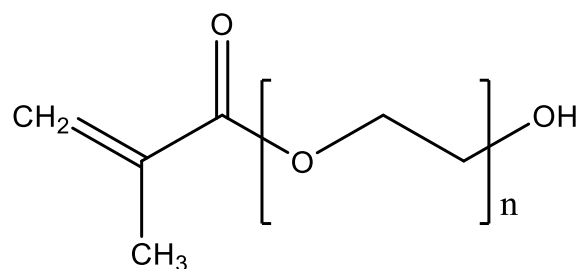
圖 2

2-Hydroxyethyl methacrylate之結構



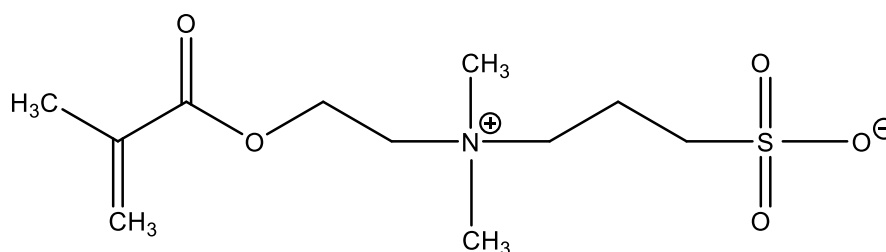
自從1970年開始聚乙醇 PEGlyated systems也開始問世，並且開始有一些研究指出 PEG 和 HEMA 的性質極其相同，同時擁有相當高的親水性，電中性性質，也有著羥基和水分子之間形成的氫鍵作用，因此也能夠在基材表面形成一層水合層，同樣能抵抗生物分子的沾黏。但是此醚類高分子並沒有好的耐高溫性及化學穩定性，隨著在高溫下裂解，抗生物沾黏效果則會降低。圖3為一種第二代高分子Poly (ethylene glycol)。

圖3
Poly (ethylene glycol) methacrylate之結構



如圖4所示，SBMA (Sulfobetaine methacrylate) 為甲基壓克力基和磺基甜菜鹼 (Sulfobetaine) 之單體結構，此類具備正負電荷的結構至1990年開始被廣泛使用並被稱為第三代的抗生物沾黏材料。經過許多科學家之研究指出，兩性離子高分子能抵禦生物分子 (包括細菌、血球、蛋白質)、具有血液相容性、抗生物沾黏等特性，當中兩性離子的設計理念是來自於細胞膜所啟發的自然生物惰性理論[11]，因此這種材料又可稱為仿生材料。第三代兩性離子性材料不僅同時擁有前兩代材料 (PEG和HEMA) 的優點 (電中性、親水性等) 同時也透過此高分子的中心代電基團吸引水分子能在表面排列緻密，因此能形成一層堅固的水合層，且與第二代 (PEG) 不一樣的是兩性離子性材料不含醚基或一些熱敏感性的官能基，因此兩性離子性材料能夠忍受相對高的溫度而導致不裂解或是承受嚴苛的金屬氧化環境。因為此類材料擁有高度的生物惰性及生物相容性而醫學材料界被高度關注，並在相關領域中被廣泛利用。其中常用的兩性離子材料主要以Phosphobetaine (PC)、Carboxybetaine (CB) 之結構之結構之結構之結構之結構之結構、Sulfobetaine (SB) 為主流。本研究中以SBMA作為抗沾黏材料進行改質[12]。

圖4
Sulfobetaine methacrylate之結構



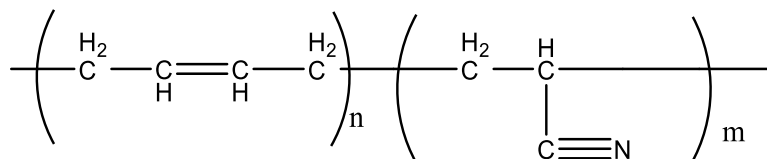
三、生物相容彈性材料-矽膠與橡膠

矽膠亦稱為矽氧樹脂，是一個介於有機與無機的聚合物，主要成分是二氧化矽，化學性質穩定，不燃燒，耐溫性從-40°C到230°C、耐熱度可達260°C。矽膠是一種高活性吸附材料，屬非晶態物質，可以是液體、膠體、油脂或彈性體，不溶於水和任何溶劑，無毒無味，化學性質穩定。矽膠除強鹼、氫氟酸外不與任何物質發生反應，因此也決定了它具有許多其他同類材料難以取代得特點：吸附性能高、熱穩定性好、化學性質穩定、有較高的機械強度等。橡膠，彈性體 (Elastomer) 是一種天然或合成的高分子物質，具有很高的延伸性、柔軟性，可以呈現多種不同的密度，而經延伸為原來長度兩倍以上時，當外力去除後，仍可以迅速恢復原狀，其中多種高分子材料只有天然橡膠及各種合成橡膠才能被認為是彈性

體，而利用這些彈性體製成的物品，必須經過費時的熱壓、硫化（Vulcanization）程序才能完成。這種硫化程序能使最終產品形成交聯的熱固性物質，雖然一般的常用塑膠也能形成交聯的熱固性物質，但卻有著和橡膠彈性體完全不同的物理及熱性質。

丙烯腈-丁二烯橡膠（丁腈橡膠, Nitrile-butadiene rubber, NBR）（圖5）是在1930年德國的 Konrad 利用丁二烯與丙烯腈乳化合而成，為一種耐油性極佳的橡膠。NBR的性質隨著丙烯腈含量有很大的變化，丙烯腈含量愈大，橡膠的容積化愈小抗油性愈好，橡膠的黏度越高，但是其耐低溫撓曲性較差。NBR 的主要用途燃料輸管，油井零件等耐油性的用途上。

圖 5
丙烯腈-丁二烯橡膠結構式



從上述介紹中，可知矽膠與 NBR 橡膠都同時具有極佳的化學穩定性及熱性質（矽膠250°C、NBR橡膠400°C）其中又以 NBR 橡膠更勝一籌，雖然矽膠比起 NBR 橡膠更為昂貴且不符合經濟效益，但矽膠因其生物相容性佳，較常被使用在生醫材料之應用，而 NBR 橡膠則不具有生物相容性。因此，若可有效的提升 NBR 橡膠之生物相容性，將可大幅增加其應用性與附加價值。在本研究中，使用先前研究所開發之廣用型環氧基兩性離子共聚高分子 PGMA-co-PSBMA 進行 NBR 橡膠之改質以增強其生物相容性 [13]，並透過簡單的浸泡塗布法達成步驟簡單、價錢便宜、富有經濟價值及效益之表面修飾方式 [14]。

貳、實驗步驟

一、共聚高分子合成、基材表面處理與鑑定分析

開啟設有油浴的電磁加熱板並設定溫度 60°C，再依照所需比例參數，秤量適量比例之偶氮二異丁腈、磺基甜菜鹼甲基壓克力 SBMA、甲醇、蒸餾水及甲基丙烯酸縮水甘油酯 GMA 於圓底燒瓶中，放入磁石，將混合液置於電磁攪拌器上，充分混合，最後放置在油浴中，調整適當轉速，放置 3-6 hr。等待合成時間結束，取出並放置在冰浴內 10 min 左右，讓高分子終止反應，裝取 800 mL 的甲醇放入磁石，並放置在電磁攪拌器上調整轉速約 6-7，將圓底燒瓶內未反應完全的液體倒掉，用藥匙取出黏稠的高分子於甲醇中，高分子於甲醇中，析出時間越久，高分子純度越高。將析出的高分子裝入塑膠試管，蓋上錫箔紙並戳洞，再放進真空烘箱1天，確保裡面已無液體，再放入冷凍乾燥機1天，最後會得到已經完全乾燥之高分子，並進行磨粉。

剪取直徑 0.65 cm 的橡膠試片於燒杯，並加入清潔液及水，震洗約 20 min，利用蒸餾水反覆沖洗直到沒有泡沫產生，再加入蒸餾水震洗 20 min。秤取適量的高分子粉末於閃爍瓶中，加入蒸餾水，並放進搖擺烘箱內以 110 rpm 的速度進行反應 3 hr，時間到後取出試片，並裝入新的閃爍瓶內，裝蒸餾水震洗 20 min，再用試鏡紙擦乾試片，放進 24孔well plate 中放入冰箱保存。運用之原理是利用加熱至一定溫度後，作為被攻擊端的 GMA 有開環反應，與NBR材料表面形成共價鍵，因為 GMA 的環氧基會使橡膠的 C=C 斷鍵，讓作為功能端的 SBMA 可以藉由反應接枝在 NBR 表面上。鑑定分析部分，本實驗使用共振頻率為 400 MHz 的 NMR Spectrometer 檢測單體及雙離子共聚物之化學結構。半衰減全反射式傅立葉轉換紅外線光譜儀（Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR）用來進行材料表面官能基鑑定，並使用 X-ray 光電子光譜（X-ray photoelectron spectroscopy, XPS）進行表面元素分析。原子力顯微鏡（Atomic force microscopy, AFM）與螢光光學顯微鏡（Optic microscopy, OM）被用來觀測表面形貌變化以及表面生物沾黏情形。

表1
雙離子共聚物樣品命名表

共聚物 樣品名稱	共聚反應單體莫耳比例	
	GMA	SBMA
G0	0	100
G10	10	90
G20	20	80
G30	30	70
G40	40	60
G50	50	50
G60	60	40
G70	70	30
G80	80	20
G90	90	10
G100	100	0

右欄代表單體GMA與SBMA之合成莫耳比例

二、血球貼附實驗

利用含有檸檬酸鈉 (Sodium citrate) 抗凝劑的血袋，安排健康的自願捐血者至醫院，由專業醫護人員進行抽血液作業，並獲得血液之後分裝至 50 mL 的離心管中，利用離心機分離出不同血液的血品。將NBR橡膠片材成直徑為 0.65 cm 的圓片，經塗布後，並放到 24 well plate。在每格加入 1 mL 的磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS) 並放入 37°C 熱風循環箱並浸泡一晚，使膜能夠完全膨潤 (swelling)，之後將 24 well plate 中的 PBS 運用真空幫浦吸除，並再用 PBS 潤洗三次，最後一次須將 PBS 吸除。將血液對每格的膜表面加入 1 mL，之後放入 37°C 熱風循環烘箱 1 hr。等待血液貼附 1 hr 後，並將 well plate 內的血液移除，並用 PBS 將試片潤洗三次，切記不能直接沖洗表面，怕會影響貼附的情況。配置 2.5% 的戊二醛，在每一格加入 1 mL 於每片膜上，以 DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride, 螢光染劑) 和固定細胞膜結構進行染色，並浸泡 2 hr。染色完後，將試片拿去在相位差螢光光學顯微鏡下拍攝，藉此觀察試片貼附血球的貼附情形，最後使用 Image J 軟體去計算細菌的貼附量，去比對試片參數不同之貼附量。本研究操作之採血過程與相關血液研究皆在具有人體試驗倫理委員會 (Institutional Review Board, IRB) 許可之環境下進行實驗。

三、蛋白質吸附實驗

使用的蛋白質顯色法為 BCA (Bicinchoninic acid) 顯色法，是一種穩定的水溶性複合物，在鹼性條件下，二價銅離子可被蛋白質還原成一價銅離子，一價銅離子可以和 BCA 相互作用，兩分子的 BCA 整合一個銅離子，形成紫色的絡合物，該複合物為水溶性，在 562 nm 處顯示強吸光性，在一定濃度範圍內，吸光度與蛋白質含量呈良好的線性關係，製作標準曲線，因此可根據待測蛋白在 562nm 處的吸光度計算待測蛋白濃度。BCA 顯色液含A液和B液，A液：BCA 鹼性溶液 (配方：1% BCA 二鈉鹽，0.4% 氫氧化鈉，0.16% 酒石酸鈉，2% 無水碳酸鈉，0.95% 碳酸氫鈉，這些液體混合後再調 PH 至 11.25) B液：4% 硫酸銅。

將橡膠片裁切成直徑為 0.65cm 的圓片，經塗布後，並放到 24孔 well plate 中。先將試片備好，放置在 24孔 well plate，加入適量 PBS 並在 37°C 熱風循環烘箱內浸泡一晚，確保膜能夠完全膨潤，之後將 24 well plate 中的 PBS 運用真空幫浦吸除，並再用 PBS 潤洗三次，再放進熱風循環烘箱內放置 30 min。配置濃度 1 mg/mL 的蛋白質溶液及適量的顯色液，跟試片的 24孔well plate 一起放置在熱風循環烘箱中，欲溶 30 min。等待蛋白質溶液溶解完後，將試片中的 PBS 移出，並用 PBS 再次潤洗3次，並用微量

取液器將 1 mL 的蛋白質溶液加入 well plate 中，再回熱風循環烘箱計時 30 min。再將 PBS 取出，用 PBS 潤洗三次，再將試片移至新的空格並加入 1 mL 的顯色液，放置熱風循環烘箱顯色 30 min。顯色完後，每格吸取 200 uL 到 96孔well plate，以 562 nm 的波長去測吸光值，再以軟體作圖，比對參數不同之蛋白質吸附量。

四、細菌貼附實驗

將橡膠切為直徑 0.65 cm 的圓片，在每格 24 well TCPS 中，在每格中加入 1 ml 的 PBS 溶液，放入 37°C 培養箱中，靜置一晚後移除 PBS，並潤洗三次後每格加入 1 ml 培養的菌液 OD600=1 (約 8×10^8 - 1.2×10^9 cells/ml)，並放入 37°C 之培養箱中進行貼附 3 hr。之後將 24 well TCPS 中的菌液移除，並用 PBS 潤洗五次後加入 2.5% 戊二醛浸泡 3 hr，以倒立式螢光顯微鏡系統模組200倍鏡頭進行拍攝，最後使用 Image J 計算細菌貼附量。

參、結果與討論

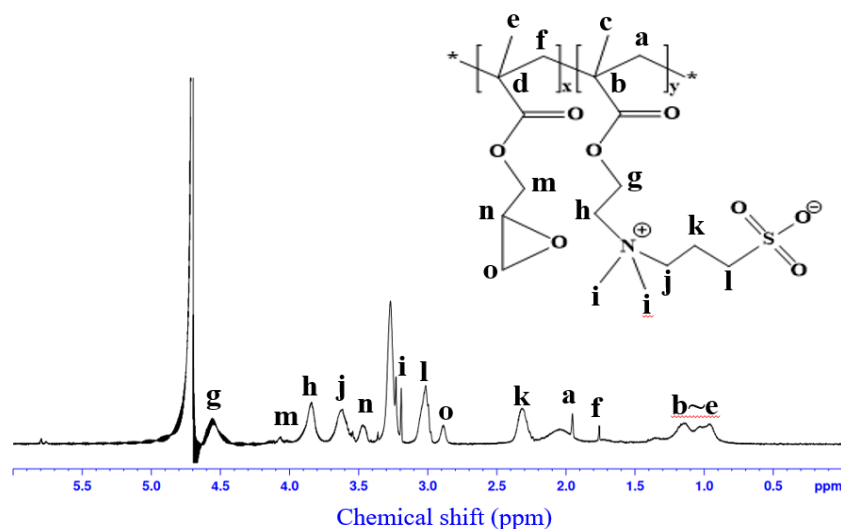
一、共聚高分子PGMA-co-PSBMA合成與基材表面改質

(一) 共聚高分子材料分析

本實驗使用 GMA 和 SBMA 單體摩爾數 40 : 60 合成出 PGMA-co-PSBMA 共聚高分子，再利用氫譜核磁共振 ($^1\text{H-NMR}$) 鑑定雙離子共聚物 PGMA-co-PSBMA 是否成功合成，圖6中 $\delta = 3.2\text{ppm}$ 則來自於 SBMA 上的 $(\text{CH}_3)_2\text{N}^+$ 上的質子共振結構特徵峰，而 $\delta = 3.45\text{ppm}$ 為 GMA 的環氧基特徵峰，以此證明雙離子共聚物為目標物。

圖 6

核磁共振光譜化學結構分析圖

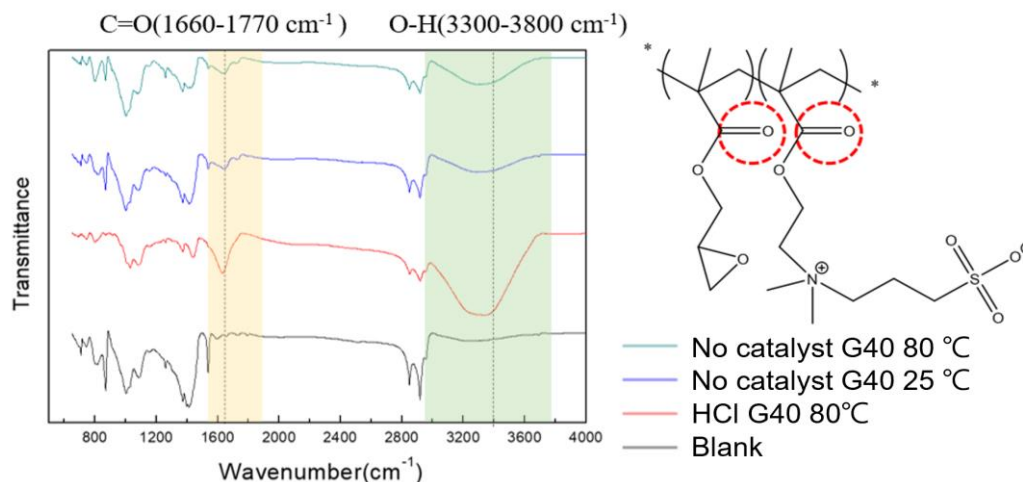


(二) 表面化學結構特徵分析

利用全反射式傅立葉紅外線光譜儀 (ATR-FTIR) 鑑定所合成之兩性離子高分子共聚物 (PGMA-co-PSBMA) 是否有成功接枝在橡膠基材上，圖7中的訊號中，跟未改質橡膠相比，加入 HCl 催化劑在 80°C 下反應、未加催化劑在 25°C 下反應和未加催化劑在 80°C 下反應之三種條件，皆多了兩個官能基，分別為 C=O ($1660-1770\text{ cm}^{-1}$) 及 O-H ($3300-3800\text{ cm}^{-1}$)。其中 C=O 為兩性離子高分子之訊號，而 O-H 判定為塗布過後基材上水合層之訊號，由此將其視為所合成的高分子，可成功接枝在基材表面，使原本疏水的橡膠片，改質成親水材料。

圖 7

ATR-FTIR紅外光光譜表面官能基分析

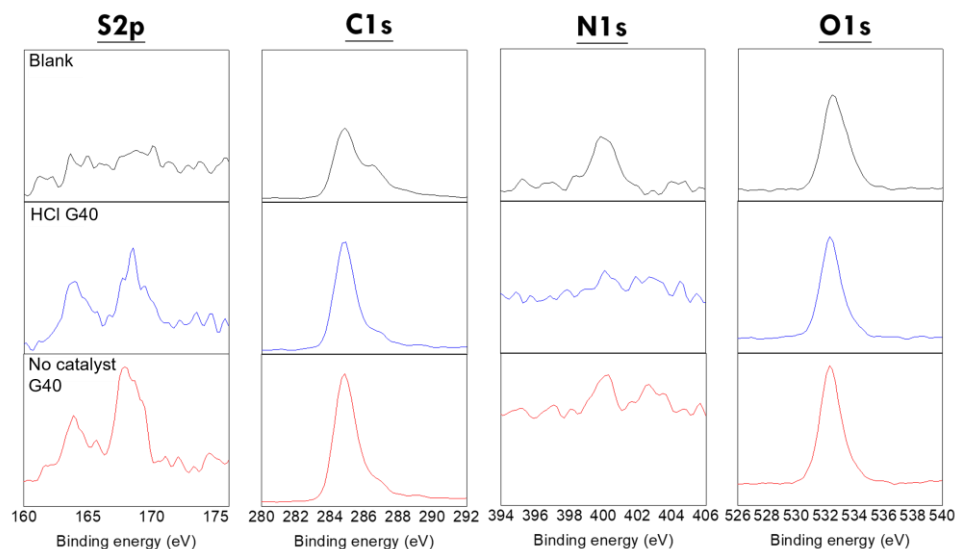


Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

X光光電子能譜儀，XPS 主要用於表面、成份、金屬表面氯化等分析，材料會經由帶有能量的X光照射後形成光電效應，內層軌域的電子會激發產生光電子，只有在樣品表面所產生之光電子才可以被測到，而被激發之光電子經過偵檢器後，可以測得光電子束縛能的能譜；元素不同、軌域不同所產生出的光電子束縛也會不同，所以可以由束縛能可以得知光電子來自於哪種元素的哪個軌域。圖8為未改質橡膠、添加 HCl 催化劑和未加催化劑之三種條件做對比，未改質橡膠上並沒有硫的訊號，由前述的 NMR 橡膠結構可得知只有碳、氮及氧之訊號，而經過塗布 之後的 m-NBR 出現了硫的訊號，這可能是來自於雙離子高分子具有有 S=O 官能基，藉此推測高分子是有成功接枝在基材上。

圖 8

X-ray光電子光譜元素分析



Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

(三) 表面親疏水性質之分析

透過水接觸角的測試方法，預配置不同濃度高分子進行表面修飾，由圖9中得知，在溶液配置 3mg/ml時，能夠使材料表面形成最低的水接觸角，因此判斷 3 mg/ml 為最佳改質濃度。圖10為添加總體積1%的催化劑，在酸催化中使用 H₃PO₄、CH₃COOH 及 HCl，去跟未改質橡膠及不加催化劑去做比較，

雖然酸催化之效果都不錯卻沒有比不加催化劑的接觸角還低，且塗布完之後，m-NBR 都會被酸催化劑侵蝕，導致材料表面有產生顆粒狀及凹凸不平，我們認為 m-NBR 表面的不平整會讓高分子堆積在洞裡，造成接觸角實驗誤差，所以將不再繼續考慮使用酸催化劑。

圖11是添加同樣是總體積 1% 之鹼催化劑，使用的鹼催化劑有 NH_3 及 TEA，一樣是跟未改質橡膠及沒有加催化劑的試片做比較，可以發現加了鹼催化劑後，有些水接觸角跟未改質橡膠差不多，甚至比未改質橡膠還差，而不加催化劑的試片之水接觸角可以降得很低，所以最後選擇之後不再添加催化劑。

圖 9
濃度不同之水接觸角

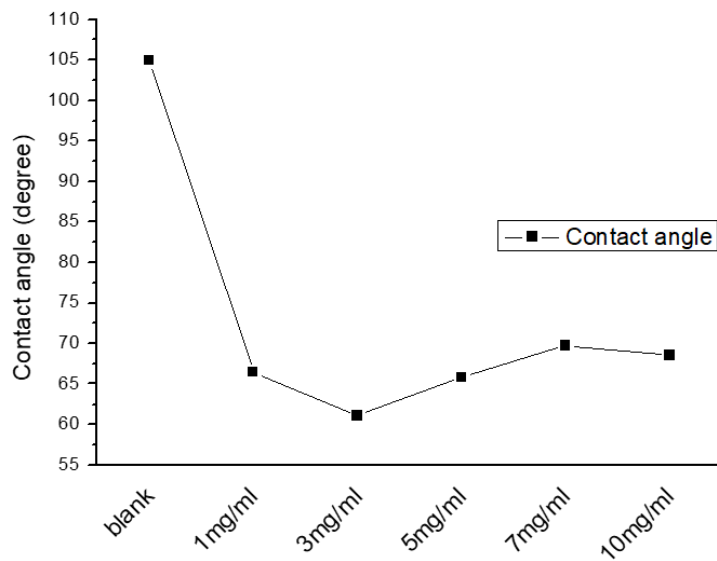
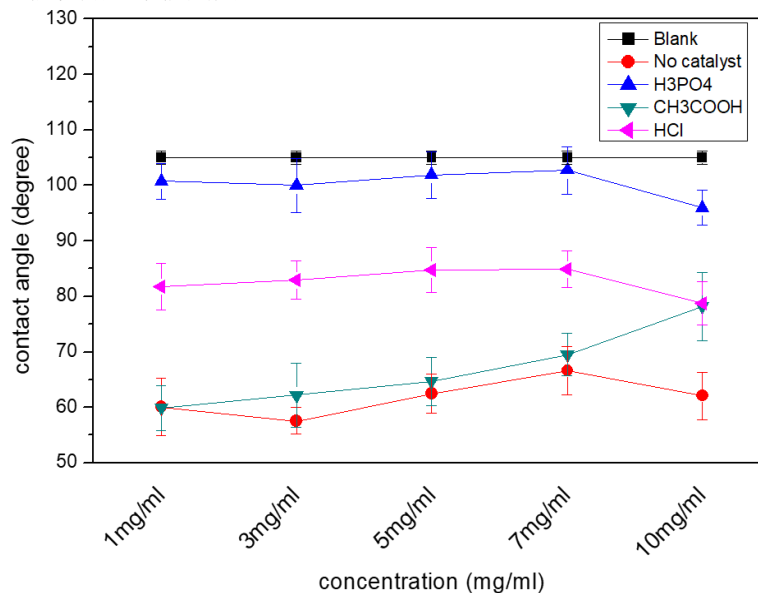
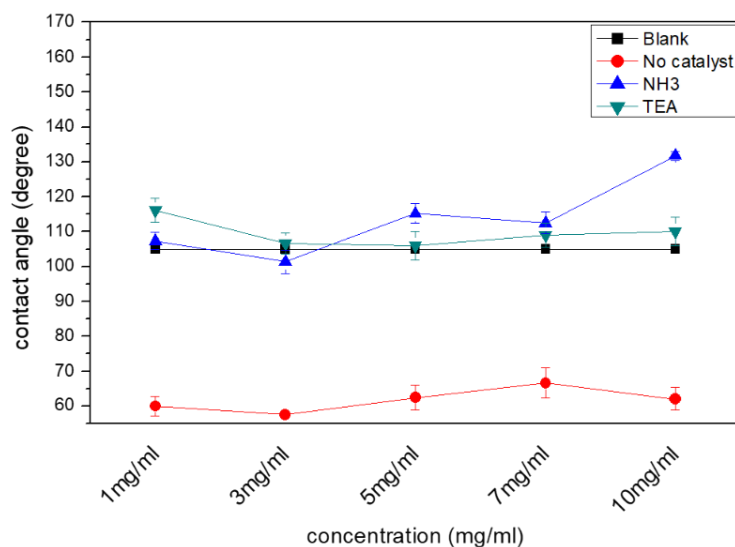


圖 10
酸催化劑之水接觸角



Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

圖 11
鹼催化劑之水接觸角

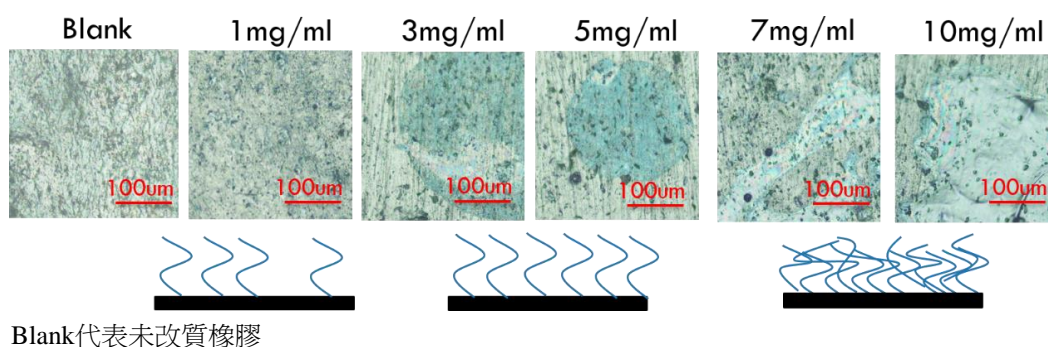


Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

(四) 表面形貌觀測分析

圖12為未改質的橡膠與不同高分子濃度在光學顯微鏡下之拍攝，可以發現到未改質橡膠和 1 mg/mL 的 m-NBR 上沒有明顯差異，由圖8也能發現到說濃度 1 mg/mL 之水接觸角並沒有下降到最低點，推測高分子濃度越低會導致高分子在材料表面上會分布不均；而濃度 3 mg/mL及 5 mg/mL 在顯微鏡拍攝下有出現藍色圓形狀的物體，比對水接觸角也能發現到這兩個條件中，3 mg/mL 之水接觸角為最低點，可以推測是適中的高分子濃度可以在材料表面排列緻密，將會有很好的效果；接著可以看到濃度 7 mg/mL 及 10 mg/mL 在顯微鏡的拍攝下，表面會有結晶產生，比對水接觸角圖可以發現到兩者之水接觸角都偏高，由此可以推測是高分子濃度過高，會造成高分子在 m-NBR 表面產生堆積嚴重，使水接觸角上升，最後將判定 3 mg/mL 為最佳參數。

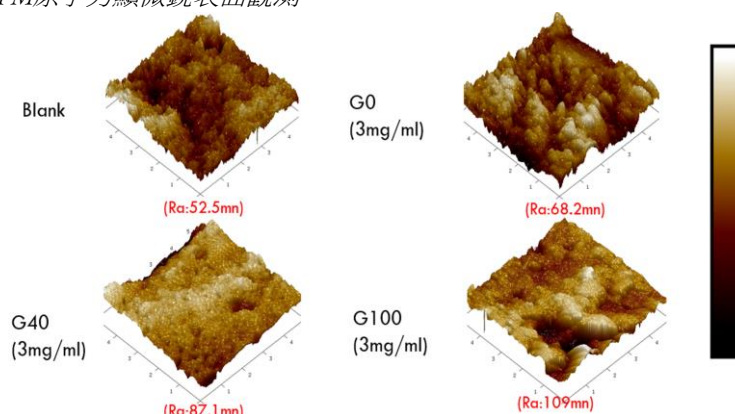
圖 12
光學顯微鏡下的橡膠表面



Blank代表未改質橡膠

圖13為未改質的橡膠與不同高分子之組成比在原子力顯微鏡下拍攝，發現未改質橡膠之粗糙度為 52.5 nm，經過 G0 (polySBMA) 改質發現表面具有突起物，但是 G0 (polySBMA) 本身不具有接枝端，推測突起物為依靠物理吸附高分子所造成之且粗糙度為 68.2 nm，接著以接枝效果最好的 G40 (polyGMA40-SBMA60) 進行改質發現表面較為平坦，代表其接枝效果良好且粗糙度為 87.1 nm，最後經過 G100 (polyGMA) 改質發現表面有較明顯的凹洞，推測 polyGMA在橡膠表面具有交聯反應，雖然接枝效果良好但是缺乏功能端且粗糙度為 109 nm。

圖 13
AFM原子力顯微鏡表面觀測



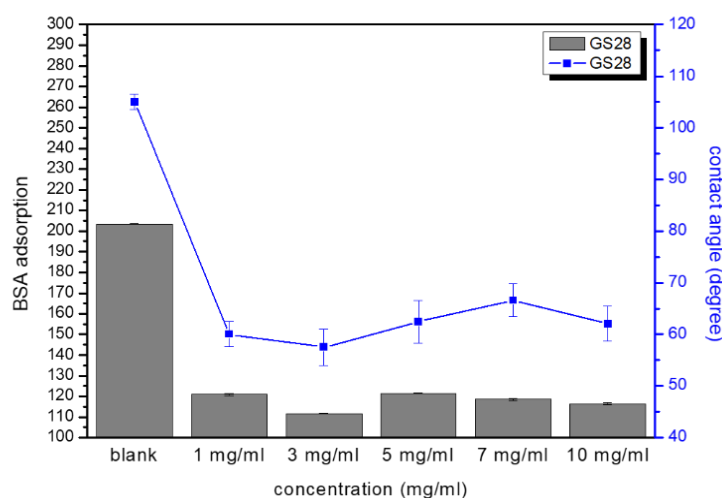
Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

(五) 材料表面抵抗生物沾黏性質之探討

1. 蛋白質吸附分析

針對濃度不同相關實驗，除了拍攝光學顯微鏡外也對相同條件以 BCA 顯色法做 BSA 吸附實驗，且做了雙Y軸的對照圖，黑色Y軸是蛋白質吸附量，藍色Y軸是水接觸角之角度，由圖14蛋白質吸附量來看，可以發現到說濃度 3 mg/mL 之吸附量是所有條件中最低的；油接觸角來看的話，同樣也是濃度 3 mg/mL 最低，可以證實水接觸角越低，蛋白質吸附量也越低之理論。

圖 14
濃度不同之蛋白質吸附

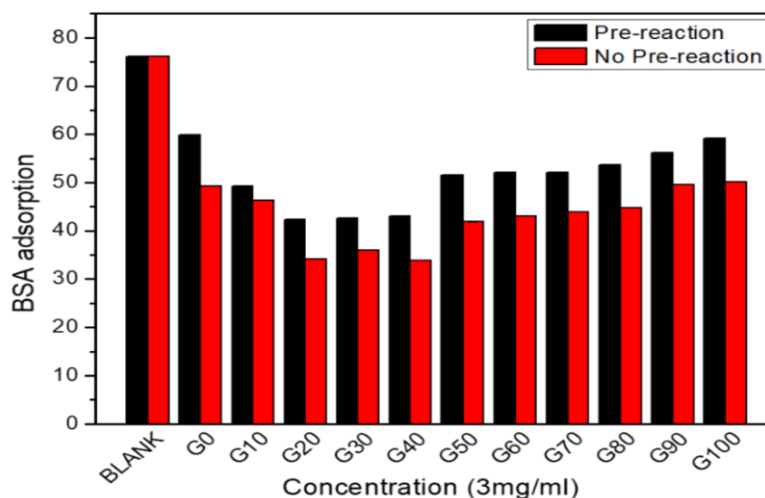


Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

得知 3 mg/mL 為最佳濃度後，又在做了高分子比例之不同，去找出最佳比例之高分子及有預先溶解和沒有預先溶解之差別，由圖15所示，黑色條狀圖為有預先溶解之蛋白質吸附量；紅條狀圖為沒有預先溶解之吸附量，預先溶解之做法是將裝有高分子溶液放入 60°C 之搖擺烘箱中，反應 1 hr再丟入試片，在放進搖擺內繼續反應，讓 NBR 在均勻混合之液體內進行塗布，而沒有預先溶解之作法是直接在高分子溶液中丟入 NBR 再放進搖擺烘箱內進行塗布，而由結果來看的話可以發現沒有預先溶解之蛋白質吸附量比有預先溶解之蛋白質吸附量低，而最好比例的高分子區間落在 G20 (polyGMA20-SBMA80) -G40 (polyGMA40-SBMA60) 間。經過實驗結果得知以上抵抗蛋白質吸附數據與水接觸角之數據吻 G20 (polyGMA20-SBMA80) -G40 (polyGMA40-SBMA60) 間擁有最低的水接觸角也同時擁有最低的蛋白質吸附數據。

圖 15

高分子比例不同之蛋白質吸附

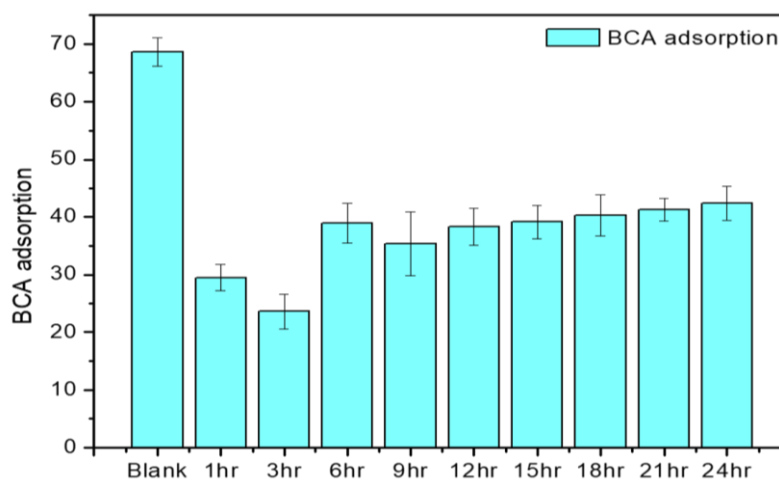


Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

之後圖16針對塗布時間之不同去做比較，同樣也是為了找出最佳之參數，反應時間 1 hr -3 hr 之蛋白質吸附量，比反應超過 6 hr 之蛋白質吸附量還低，塗布時間越久，蛋白質吸附量越高，所以判定塗布時間設定在 3 hr 是最好之參數。

圖 16

反應時間不同之蛋白質吸附

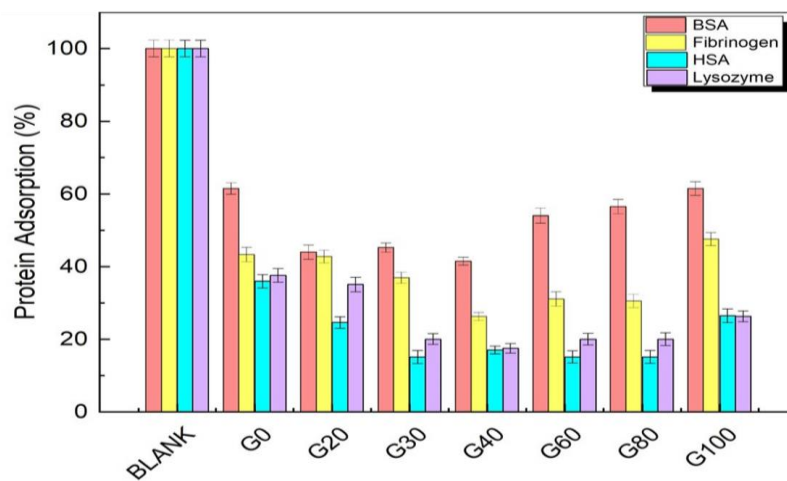


Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

本實驗利用牛血清蛋白、溶菌酶、人體纖維素蛋白和人血清蛋白作為改質前後的橡膠進行蛋白質吸附測試。實驗證明 m-NBR 比起未改質橡膠都能夠抵抗蛋白質吸附，其中以牛血清蛋白實驗中，圖17，以 G40 (polyGMA40-SBMA60) 改質的 m-NBR 能抵抗蛋白質吸附能力最佳，能夠抵抗 60% 牛血清蛋白吸附。在溶菌酶實驗中，圖17，以 G40 (polyGMA40-SBMA60) 改質的 m-NBR 能抵抗蛋白質吸附能力最佳，能夠抵抗 80% 以上溶菌酶吸附。人體纖維素蛋白實驗中，圖，以 G40 (polyGMA40-SBMA60) 改質的 m-NBR 能抵抗蛋白質吸附能力最佳，能夠抵抗 75% 以上人體纖維素蛋白吸附。在人血清蛋白實驗中，圖17以 G30 (polyGMA30-SBMA70) 改質的 m-NBR 能抵抗蛋白質吸附能力最佳，能夠抵抗 85% 以上人血清蛋白吸附。經過實驗結果得知以上抵抗蛋白質吸附數據與水接觸角之數據相互吻合在 G20 (polyGMA20-SBMA80) -G40 (polyGMA40-SBMA60) 間擁有最低的水接觸角 也同時擁有最低的蛋白質吸附數據。

圖 17

不同單體比之蛋白質吸附



Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

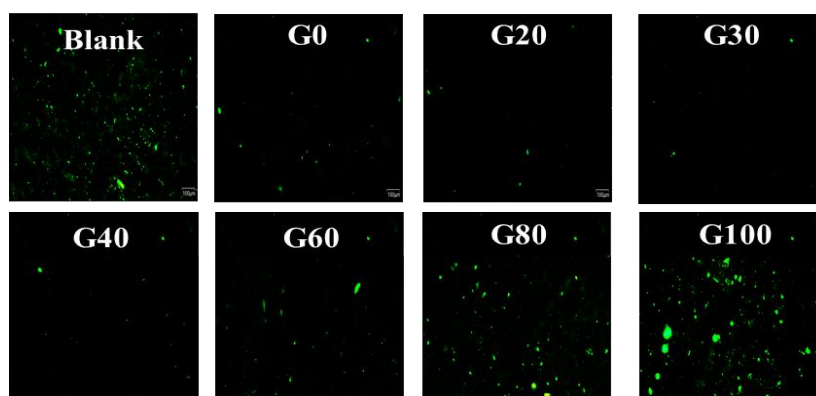
2. 大腸桿菌E. coli表面貼附觀測分析

圖18、19為E.coli在不同高分子單體比的條件中，於樣品上的貼附程度。細菌若容易貼附在醫療材料上就會使產品之品質降低，因此醫療材料就必須有相對的抵抗細菌貼附能力，否則使用的病患接觸容易造成感染。圖中綠色的點為經過染色的大腸桿菌貼附量。

從圖中可以得知，透過雙離子共聚物改質的橡膠表面，比起未改質的橡膠表面能夠更有效的降低大腸桿菌的貼附，其中以 G20 (polyGMA20-SBMA80) 之高分子的效果最為顯著，經過計算後比起未改質之橡膠能夠降低 80% 的大腸桿菌貼附，其中主要原因為單體 SBMA 中心擁有帶電基團，能夠使水分子在橡膠表面擁有一個堅固的水和成，導致細菌不易貼附在材料表面。經過實驗結果得知以上抵抗細菌貼附數據與蛋白質吸附之數據相互吻合在 G20 (polyGMA20-SBMA80) -G40 (polyGMA40-SBMA60) 間擁有最低的蛋白質吸附也同時擁有最低的細菌貼附量。

圖 18

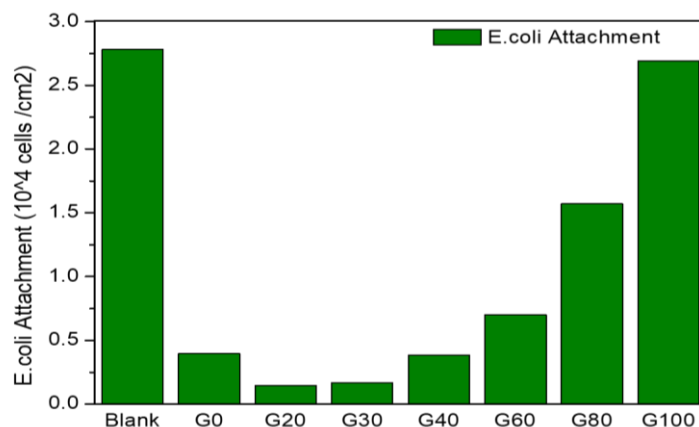
E.coli細菌貼附情況



Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

圖 19

E.coli.細菌貼附定量分析圖



Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

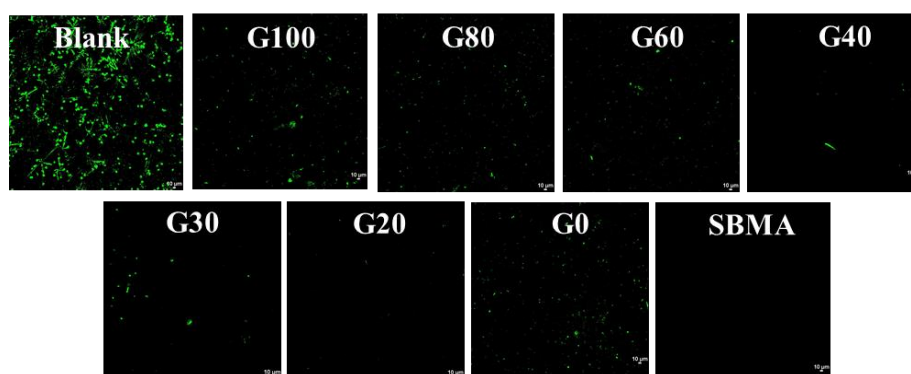
3. 人體血液細胞貼附觀測分析

侵入人體之醫療材料其最重要的關鍵是不能夠引起身體的排斥反應，否則將會導致發炎、休克甚至死亡，而是否為良好的醫療材料其中以血球貼附情況可作為參考數據。而人體血液中主要有三種血球，分別為進行免疫反應的白血球、運送氧氣的紅血球和使血液凝結的血小板，其中紅血球所佔的比例為 55%、血小板為 44%，而進行免疫反應的白血球為 1%。本實驗利用紅血球、血小板和缺乏血小板的血漿進行血液貼附之實驗。

在圖20、21之中，以未改質橡膠的紅血球貼附量為 100%，SBMA 水膠為實驗的負對照組，TCPS 為實驗的正對照組，利用 polyGMA-co-SBMA 改質的橡膠表面，已改質橡膠比起未改質的橡膠表面都能夠降低紅血球的貼附其中以 G20 (polyGMA20-SBMA80) 至 G40 (polyGMA40-SBMA60) 之高分子的效果最為顯著，經過計算後比起未改質之橡膠能夠降低 90% 紅血球貼附。經過實驗結果得知以上抵抗紅血球吸附量與人體纖維素蛋白吸附之數據相互吻合在 G20 (polyGMA20-SBMA80) -G40 (polyGMA40-SBMA60) 間，擁有最低的人體纖維素蛋白吸附量也同時擁有最低的紅血球吸附量。

圖 20

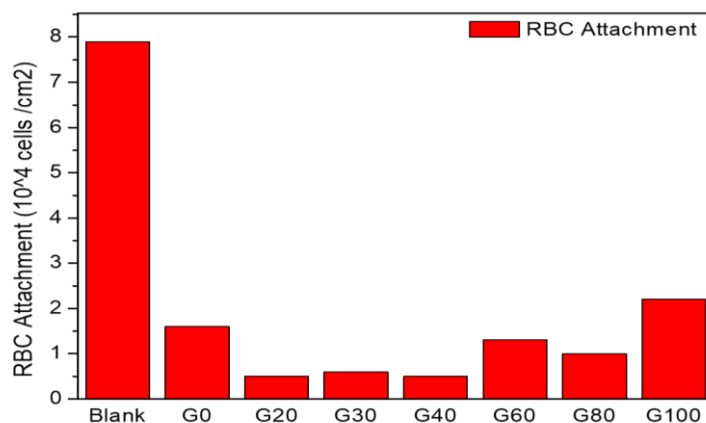
紅血球進行血液貼附實驗



Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

圖 21

紅血球貼附定量分析圖



Blank代表未改質橡膠，其他條件為改質橡膠。

肆、結論

本研究以新一代兩性離子共聚高分子 PGMA-co-PSBMA，運用表面接枝法於NBR橡膠表面上，利用浸泡塗佈的方式將 NBR 橡膠表面改質成親水材料，表面會有一層很強的水合層，可製備出同時具有親水性質及生物相容性極佳的材料。經由光學顯微鏡、全反射式傅立葉紅外線光譜儀（ATR-FTIR）、X光光電子學能譜儀等精密儀器分析與蛋白質吸附、細菌貼附及血液貼附等生物試驗後，結果可歸納結論如下數點：

- 一、未塗佈的 NBR 沒有 C=O 及 O-H 的官能基，與 m-NBR 相比出現了明顯的 C=O 及 O-H 官能基，判定為兩性離子高分子之 C=O，且因已改質成親水材料，出現了 O-H 之官能基，判定兩性離子高分子已成功接枝在 m-NBR 上。
- 二、經過水相及油相接觸角測試後發現，加了酸催化劑的試片，不僅接觸角效果不佳，甚至會侵蝕 NBR 本身，造成凹洞、不平均，可能影響正確實驗結果；加了鹼催化劑溶液，雖然不會侵蝕 NBR，但接觸角卻沒有明顯下降甚至上升；最後發現是不使用催化劑效果最佳，水接觸角最低。
- 三、嘗試不同比例之高分子去做水接觸角之測試，調整兩性離子高分子 PGMA-co-PSBMA 的單體比及起始劑比，可以得知 G40（polyGMA40-SBMA60）之比例為接觸角最低，視為最佳參數。
- 四、運用光學顯微鏡之拍攝塗佈過後之 m-NBR 表面，在利用蛋白質吸附實驗測試，可以得知 3 mg/mL 的濃度為最佳濃度，也能得知濃度太低會導致高分子分布的不均勻；濃度太高會導致高分子堆積在 m-NBR 上，再去比對水接觸角，可以證實 3 mg/mL 為最佳濃度條件。
- 五、改變溫度、有無欲先溶解及塗佈時間，再利用蛋白質吸附做檢測，得知塗佈時間 3 hr 且沒有欲溶，蛋白質吸附最低，下降了約 70% 左右。
- 六、透過血液及細菌的貼附實驗，血球、血小板及 E.coli 經倒立式螢光顯微鏡之拍攝後發現，貼附量已下降約 90% 以上。
- 七、將抗沾黏技術實際用於產業上常用之 ABS 產品（丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物）及 NBR 手套（丙烯腈-丁二烯共聚物），使水接觸角分別降低的 30° 及 70°，蛋白質抵抗降低吸附 50% 及 70%。經過改質之產品在產業方面將有更好的應用及突破。

參考文獻

- [1] T.J. Blokhuis, M.F. Termaat, F.C. den Boer, P. Patka, F.C. Bakker, & H.J. Haarman. (2000). Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behavior. *J Trauma*, 48(1), 179–186.
- [2] A. Bruce. (1999). Closer to nature: New biomaterials and tissue engineering in ophthalmology. *Br J Ophthalmol*, 83, 1235–1240.
- [3] S. Pina, & J. Ferreira. (2012). Bioresorbable plates and screws for clinical applications: a review. *J. Healthc. Eng.*, 3, 243–260.
- [4] Y.C. Chiag, Y. Chang, W.Y. Chen, R.C. Ruaan, & A. Higuchi. (2012). Biofouling resistance of ultrafiltration membranes controlled by surface self-assembled coating with PEGylated copolymers. *Langmuir*, 28(2), 1399–1407.
- [5] C.J. Brinker, & G.W. Scherer. (1990). Film formation, Sol-Gel science: The physics and chemistry of sol-gel processing. *AP*, 787–790
- [6] G. Moad, E. Rizzardo, & S.H. Thang. (2012). Living radical polymerization by the RAFT process a third update. *Aust. J. Chem.*, 65, 985–1076.
- [7] C.J. Huang, N.D. Brault, Y. Li, Q. Yu, & S. Jiang. (2012). Controlled hierarchical architecture in surface-initiated zwitterionic polymer brushes with structurally regulated functionalities. *Adv. Mater.*, 24(14), 1834–1837
- [8] L.E. Scriven. (1988). Physics and applications of DIP coating and spin coating. *MRS Proceedings*, 121, 717–729.
- [9] M. Tanaka, A. Mochizuki, N. Ishii, T. Motomura, & T. Hatakeyama. (2002). Study of blood compatibility with poly (2-methoxyethyl acrylate). Relationship between water structure and platelet compatibility in poly (2-methoxyethylacrylate-co-2-hydroxyethylmethacrylate). *Biomacromolecules*, 3(1), 36–41.
- [10] W. Feng, S.P. Zhu, K. Ishihara, & J.L. Brash. (2006). Protein resistant surfaces: Comparison of acrylate graft polymers bearing oligo-ethylene oxide and phosphorylcholine side chains. *Biointerphases*, 1, 50–60.
- [11] D.G. Castner, & B.D. Ratner. (2002). Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surf. Sci.*, 500, 28–60.
- [12] Y. Chang, S.C. Liao, A. Higuchi, R.C. Ruaan, C.W. Chu, & W.Y. Chen. (2008). A highly stable nonbiofouling surface with well-packed grafted zwitterionic polysulfobetaine for plasma protein repulsion. *Langmuir*, 24(10), 5453–5458.
- [13] Y.N. Chou, T.C. Wen, & Y. Chang. (2016). Zwitterionic surface grafting of epoxytated sulfobetaine copolymers for the development of stealth biomaterial interfaces. *Acta Biomater.*, 40, 78–91
- [14] Y.H. Zhao, K.H. Wee, & R Bai. (2010) Highly hydrophilic and low-protein-fouling polypropylene membrane prepared surface modification with sulfobetaine-based zwitterionic polymer through a combined surface polymerization method. *J. Membr. Sci.*, 362(1), 326–333.