

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 : 脂肪酸對於氫氧基磷灰石/高分子複合材料粒子分散性 *
* 名 稱 : 與生物活性之影響 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 陳欣儀
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-030-E
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授： 湯正明

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 100年04月06日

一、研究動機與目的

牙周病之治療與顎骨重建為臨床上口腔治療的常見病例，民國 95 年全民健康保險醫療統計資料中牙醫門診人數統計指出，齒齦與牙周疾病約占年度總門診件數之 28.7%，與民國 91 年相比(26.4%)，比例有緩慢上升的趨勢，顯示牙周病已嚴重影響國人健康，並增加政府全民健康保險的負擔。為促進了牙周韌帶細胞與骨細胞的順利再生，臨床上廣泛使用具拉伸性之聚四氟乙烯(e-PTFE)進行膜導引組織再生術，e-PTFE 具有細胞隔絕性及空間創造性、組織整合性、生物相容性及良好的穩定性及可靠性等眾多優點，但因 e-PTFE 在於生物體內不能被降解吸收，植入後四至八週後必須經二次手術取出，會破壞新形成的牙周附著，另外，膜片如有暴露易造成細菌感染而影響骨生長。因此，膜導引再生目前發展的重點轉為可降解高分子結合具生物活性的陶瓷粉體所製成的高分子複合材料，然而陶瓷粉體與高分子基質間易產生微相分離，而降低材料之機械性質及加快複合材料的降解速率，影響膜材的應用性。本研究藉由控制脂肪酸種類及添加濃度，將脂肪酸做為界面活性劑加入陶瓷懸浮液中，提高陶瓷粉體於複合材料中的分散性，並評估對複合材料之生物活性的影響。

二、文獻回顧與探討

2-1 氫氧磷灰石(Hydroxyapatite, HA)：化學式為 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ，鈣磷比值為 1.67。在正常體溫的體液中酸鹼值大於 4.2 下可穩定存在，若升高溫度或是酸鹼值小於 4.2 時，會轉變成其他的磷酸鈣化合物，如 TCP 或 C_4P [1]。HA 與構成動物骨骼的主要礦物組成相似，可直接和骨骼產生鍵結。HA 在生物體中的分解有下列三種因素：(1)生物體內環境的 pH 值會影響 HA 的溶解度。氫氧基磷灰石只溶於酸性環境中；(2)生理性的分解。如骨頭即為動態的平衡，而非固定不會改變；(3)巨噬作用(phagocytosis)。加速氫氧基磷灰石在生物體中分解的因素有：材料表面積的增加、結晶度降低、結晶的區域大小降低、以及碳酸根(CO_3^{2-})、鎂離子(Mg^{2+})及鋇離子(Sr^{2+})的存在。而降低其分解的因素有：氟離子(F^-)以及 β -TCP 的存在[1]。Damien 於 1991 年指出，HA 有良好之生物相容性及骨引導性[2]，但臨床上其較差的機械性質及需要較長的分解時間為其缺點(Cooke, 1992；Verheyen, 1992)。Gorbunoff 等人於 1984 年對 HA 和蛋白質間的作用力做一系列的研究，發現 HA 表面和蛋白質可進行吸附的官能基主要有：(1)氫氧基(hydroxy radical)，利用氫鍵和蛋白質鍵結；(2)磷酸(phosphates)，和蛋白質中帶正電之胺基產生鍵結；(3)鈣原子，和蛋白質之羰基(carbonyl group)產生鍵結，故 HA 的改質上可藉由與蛋白質和胜肽混合來達成。2004 年 Kumar 指出臨床上 HA 的粉末可利用於治療牙周骨質缺損，或是用於拔牙之後保留齒槽骨以及擴大齒槽脊時使用，在植體牙醫學中，因其高度的生物相容性及骨傳導性廣泛的應用於植體表面的處理上以縮短骨整合的時間。

2-2 複合材料(composite)：傳統之複合材料一般由兩種以上的材質所組合而成，依照比例可分成基材及補強材，其中基材是材料組成中連續的材質，而補強材則為其中不連續的材質。通常補強材的機械強度要比基材高，才能夠補強基材，使合成的複合材料得到較佳的機械強度。然而，複合材料的性質並不同於其構成的任一材料，而是呈現另一種新的材料性質。近幾年來以高分子為基材，加入球狀、棒狀或盤狀等不同形狀的奈米等級粒子所形成高分子奈米複合材料之研究已廣泛的探討。相對於單一相的高分子，高分子奈米複合材料由於奈米分子的加入，往往能改善材料之物理性質（如抗腐蝕性或易燃性）與熱機械性質等（如熱膨脹係數或剛性）。硬骨是種有機(膠原蛋白)/無機(氫氧磷灰石)組成的天然複合材，兼有強度與韌性。而結合具有生物活性的陶瓷與可降解高分子所形成之高分子/陶瓷奈米複合材料應用於硬骨組織修復，主要將具有骨誘導性之無機鹽類與生物可降解性高分子進行結合，除提高材料之骨誘導性，並增強材料的機械強度與生物活性，1995 年 Jansen 等人[3]首先將 poly(ethyleneglycol terephthalate)/poly(butylenes terephthalate)(PEG/PBT) 混入不同比例之氫氧基磷灰石

(Hydroxyapatite, HA)顆粒並以溶劑鑄造法(solvent casting)製備成膜材，並分別植入於山羊背部之皮下及牙周下，經過 12 週後，組織學分析結果指出複合材料對周遭組織具有良好的生物相容性，沒有明顯的外來物反應，其中又以 PEG/PBT 共聚合比例為 60/40，植入 12 週時沒有降解的產生，研究者評估可作為膜導引組織再生應用。1999 年 Shikinami 等人[4]將氫氧基磷灰石微米級粒子與聚乳酸(poly-L-lactide, PLLA)製成複合材料作為骨板與骨釘之用，研究中指出此複合材料具有高的斷裂強度及生物相容性。

2-3 複合材料的改質

由於奈米粒子的表面積/體積比極大，造成其能量較高，使得奈米粒子傾向藉由凡德瓦爾力及氫鍵產生聚集的行為降低表面積/體積比例，而此自發性現象將造成奈米粒子的持續成長與穩定性下降，即奈米粒子的分散性降低，複合材料產生相分離現象，為改善相分離現象的發生以及提高無機粒子在聚合物中的分散性，增加奈米粒子穩定性有以下兩種方式，如使用界面活性劑、聚合物或其他有機物鍵結或包覆於奈米粒子表面，以立體排斥效應的方式幫助個別奈米粒子產生較佳的分散效果。或者利用表面鍵結的帶電官能基，利用凡德瓦力產生靜電排斥。

2-3-1 接枝共聚法(*graft copolymerization*)：可分成兩種，一種為先將預聚合的某一高分子經化學或物理化學方法活化，使主鏈上產生活性中心(自由基，或是正、負離子)。經由活性中心引發單體聚合生成接枝共聚物。另外一種則是通過單體的聚合，在它還帶有反應活性時(如負離子聚合的高分子)與預先聚合的某一高分子的官能團發生反應生成接枝共聚物。2006 年 Lee 等人[5]將氫氧基磷灰石奈米粒子直接以開環聚合的方式接上聚己內酯，並且比較不同長度之氫氧基對接枝率的影響，其發現聚己內酯之接枝數量與接枝率受到氫氧基磷灰石表面之氫氧基立體環境與性質影響，以穿透式電子顯微鏡分析指出表面改質過之氫氧基磷灰石在二氯甲烷中分散較未改質之氫氧基磷灰石均勻並有效提升膠體穩定性。分別以接枝與未接枝之氫氧基磷灰石粒子製成複合材料，結果顯示有接枝之氫氧基磷灰石可增加複合材料之抗拉強度與硬度。2007 年 Lee 等人[6]證實先行接枝之氫氧基磷灰石製備之複合材料表面，與未接枝之氫氧基磷灰石所製備之複合材料相比，蛋白質吸附與纖維母細胞(NIH3T3)的貼附與增生有正面的效果。以上結果並未針對接枝之氫氧基磷灰石於體內降解速率進行探討，接枝之氫氧基磷灰石需要破壞高分子與氫氧基磷灰石之間的鍵結再進行水解，當氫氧基磷灰石降解速率變慢，導致材料周遭鈣磷離子釋放量降低，對於骨母細胞之增生與貼附會造成影響。

2-3-2 有機分散劑：常用的有檸檬酸鹽、腐殖酸鈉和單寧酸鹽。檸檬酸鈉在 pH 值為 9-10 範圍內具有較大的 Zeta 電位。 α - Al_2O_3 懸浮液(70%)在 pH=8.8 時，隨檸檬酸鈉用量的增加，顆粒表面吸附檸檬酸根離子，使表面電荷發生改變，懸浮液的 Zeta 電位由正變成負，產生靜電穩定作用。2009 年 Leeuwenburgh 等人[7]使用不同種類的分散劑(檸檬酸鈉、檸檬酸等)製備含有奈米分散礦物相之明膠/磷灰石複合材料作為骨修復的材料，由沈降實驗中發現檸檬酸鈉可有效穩定磷酸鈣 (calcium phosphate, CaP) 的懸浮液，主要由於檸檬酸根可吸附於 CaP 奈米晶體上而使晶體外側表面負電荷強力增加，因而增加粒子間的排斥力並抵銷粒子間的 van der Waals forces。其研究發現奈米複合材料中 CaP 與檸檬酸根比例為 4.0 時顯示形成之奈米結構礦物相而沒有 CaP 微米級粒子產生。

2-3-3 微胞(*micelle*)：1936 年 Hartley 等人[8]提由於一種具有非極性疏水基(親油基)與極性親水端之兩性分子(界面活性劑)，少量表面活性劑分散於水中時，表面活性劑以單體的形式存在；當水中界面活性劑濃度很低時，表面活性劑分子會吸附在空氣和水的界面，藉著親水性的頭部

和水水合，疏水基朝向空氣，親水基朝向液面，使表面張力下降。然而當表面活性劑濃度提高至界面吸附量到達飽和時，未能吸附在界面的界面活性劑分子，會聚集成微胞使親水端朝外與水分子接觸，並將疏水部分包圍減少水分子和碳氫鏈的接觸面積，以降低系統的自由能。微胞的生成主要靠在界面活性劑中之非極性基與極性溶劑間的斥力、非極性基與非極性間的凡德瓦力、和離子基之間的庫倫靜電力三者達平衡所致。一般來說，微胞的形狀趨向球形，但其大小形狀仍會隨界面活性劑濃度、系統溫度等因素不同而改變。微胞的大小受以下兩個因素互相平衡而決定：(1) 疏水效應，使疏水基聚集而使微胞變大。(2) 表面靜電效應：抑制微胞的成長，使微胞不會形成無限大。2007年 Kim[9]以油酸混入三氯化碳中形成混合溶液，再依序混入氫氧基磷灰石與聚己內酯 (poly(epsilon-caprolactone), PCL) 製備成奈米複合材料，藉由脂肪族界面活性劑-油酸的調節，其研究發現氫氧基磷灰石粒子 (<1 microm) 可均勻分布於高分子基質中但不產生凝集，與傳統聚己內酯/氫氧基磷灰石複合材料及純聚己內酯相比機械強度顯著增加，骨母細胞增生行為亦有顯著改善。

2-4 脂肪酸

脂肪酸依照分子鏈長度可分為短鏈脂肪酸、中鏈脂肪酸及長鏈脂肪酸 (鏈長大於十二個碳)。依照脂肪酸分子鏈上的雙鍵數目又可分成飽和脂肪酸 (Saturated fatty acid)、單元不飽和脂肪酸 (Monounsaturated fatty acid) (含一個雙鍵) 及多元不飽和脂肪酸 (Poly-Unsaturated Fatty Acid, PUFA) (含二個或二個以上雙鍵)。植物中富含亞麻油酸 (linolenic acid, LA) 及 γ -次亞麻油酸 (gamma-linolenic acid, GLA)，花生四烯酸 (Arachidonic acid, AA) 多存在動物脂肪中，二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 與二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 則多存在魚油。生物體內可利用亞麻油酸及次亞麻油酸為原料轉化成細胞之重要成份，如細胞膜成分中的脂質含有亞麻油酸，如缺乏亞麻油酸則無法維持正常的細胞膜。另外，如膽固醇之代謝，也必須有不飽和脂肪酸配合才得以順利進行。由於純粹的膽固醇不溶於水 (血)，在血液中不易移動，如果有不飽和脂肪酸存在，則可與其生成酯化態，使得水溶性增加，在身體內之移動較快，比較容易回肝臟被分解，而由亞麻油酸 (ω 6 脂肪酸) 轉變而來之花生四烯酸，經由特殊酵素作用，可轉變成多種組織荷爾蒙，以及有特殊生理作用的化學物質，如前列腺素 (prostaglandin) 和前列凝素 (thromboxane) 等。可維持身體生理功能。但如果產生過多，會促使血小板凝集引起血管梗塞、免疫能力下降，使發炎情況惡化。而次亞麻油酸 (ω 3 脂肪酸) 可以抑制它們的產生[10]。但以上兩種多元不飽和脂肪酸不能由身體自行合成，因此需要透過食物攝取供給，又稱為必須脂肪酸 (Essential Fatty Acid, EFA)。

2-4-1 正己酸 (Hexanoic acid)：由己烷衍生出的六個碳的直鏈狀羧酸，又名羊油酸 (caproic acid)，自然存在於動物脂肪及油中。為無色油狀液體，帶有類似羊的氣味。氨基己酸可抑制纖維蛋白溶酶原的啟動因子，使纖維蛋白溶酶原不能啟動為纖維蛋白溶酶，從而抑制纖維蛋白的溶解，產生止血作用。

2-4-2 十二酸：俗稱月桂酸 (Dodecanoic acid)，月桂油中含量僅佔 1-3%。目前發現月桂酸含量高的植物油有椰子油 (45-52%)、油棕籽 (palm kernel) 油 (44-52%)、巴巴蘇籽油 (babassu kernel) (43-44%) 等。存在於乳汁中的月桂酸，嬰兒攝取後會將月桂酸轉化成單元月桂酸甘油酯 (monolaurin)，可以對抗病毒及細菌的上層脂質包圍病毒，不會引起抗體組織的出現，降低細菌對抗生素的抗拒。成為保護嬰兒抵抗病毒、細菌及原蟲的最重要物質[11]。月桂酸抗病毒能力是所有中鏈脂肪中最強的，對新型冠狀病毒 (SARS 病毒) 有明顯的殺滅作用，還可殺滅蟲消瘡，殺滅腸道寄生蟲，並能促進新陳代謝，調節生理機能。1966年醫學界就已經開始有關於單元月桂酸甘油酯具有抗菌效果的研究報告。Jon Kabara 最早研究食品保存時抗病毒的相關

效果，就已經注意到月桂酸的作用，Kabara (1978)的研究指出某些特定脂肪酸（尤其是中鏈飽和脂肪酸）及其衍生的單酸甘油酯，可以讓諸如細菌、酵母，黴菌及包膜病毒等失去活性。而 Hierholzer 和 Kabara(1982)的研究，顯示單元月桂酸甘油酯可穿透 RNA 和 DNA 病毒的脂質膜（lipid membrane），因此具有抗菌性效果[12, 13]。

2-4-3 十八酸：一種單元不飽和脂肪酸，又稱為油酸(Oleic Acid)，存在於動植物體內，其中在橄欖油、菜種籽油及酪梨等中含量豐富。將油酸加氫加成得到硬脂酸[14]。油酸的雙鍵反式異構體稱為反油酸。油酸具有羧酸和烯烴的性質。對碳碳雙鍵氧化可以使油酸分子斷裂，生成醛、酮或羧酸。油酸還可以發生還原反應生成醇。暴露於空氣中的油酸就會緩慢發生上述氧化反應，此過程稱為酸敗反應。有研究指出油酸可降低血壓，預防動脈硬化[15]。降低膽固醇量及保持高密度脂蛋白(High Density Lipoprotein)的含量。高密度脂蛋白與膽固醇結合後，能清除血管內的膽固醇；與此同時能減少低密度脂蛋白(Low Density Lipoprotein)的產生。低密度脂蛋白與膽固醇結合後，會造成血管閉塞。高純油酸可以用作藥物吸收促進劑，對難吸收的抗菌物質、抗癌劑等藥品有顯著的促進吸收效果，可以用作穩定性和安全性高的醫藥基劑或輔助劑。

2-4-4 魚油(Fish oil)：動物性油脂多由飽和脂肪酸構成，而深海魚類身上的油脂含有二十碳五烯酸 (Elcosapentaenoic acid, EPA) 和二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA)等 Ω -3 不飽和脂肪酸。DHA 可通過腦血管障壁(B.B.B)使神經傳導物質-乙醯膽鹼的傳導性增加，增加腦液的流動性並活化腦細胞。避免血球凝集改善血液的流動性，減少心臟負荷，使血壓不易上升。對腦神經傳導和突觸的生長發育極為有利。在網膜細胞中 DHA 的含量高達 50-60%其作用為柔軟視網膜細胞膜使感光細胞活性增加因而可改善視力[11]。EPA 可降低血脂。日本東京醫院與其他研究者認為：EPA 是一種抗血管硬化的重要元素，降低凝血及發炎反應，減少血中三酸甘油酯濃度，增加好的膽固醇(HDL)，降低不好的膽固醇 (LDL)。

三、研究方法及步驟

3-1 陶瓷粉體的製備：氫氧基磷灰石與硫酸鈣(Calcium sulfate, CS)以不同重量比進行混合，經除泡處理後，秤取固定重量置入模具中，以油壓機壓製成圓形試片，本研究分別以不同之升溫速率[10°C/min (S10)與 20°C/min (S20)]進行燒結，爐溫升至 1000°C 後，自然冷卻至室溫。

3-2 陶瓷粉體的性質分析：以桌上型試驗機進行試片對徑拉伸強度(DTS)評估，施力速率為 1mm/min，施力方向為對徑壓縮。 $DTS = (2N/\Phi) \times 3.14 \times h$ ，其中 N 為最大斷裂力量 (牛頓)， Φ 為樣品直徑(mm)，h 為樣品厚度(mm)。試片以 χ 光繞射分析其晶體結構。每分鐘 4°的掃描速率，掃描範圍為 10°至 70°之，探討燒結前後之陶瓷粉體之晶相變化[17,18]。結晶度(X_c)= $1 - (V_{211/300}/I_{300})$ ，其中 $V_{211/300}$ 為 HA 在 (211) 與 (300) 間峰谷的強度， I_{300} 則為 (300) 的強度。以 FTIR 分析粉體的化學組成，掃描波數為 400-4000 cm^{-1} ，掃描次數為 8 次。解析度為 2 cm^{-1}

3-3 陶瓷複合物懸浮液之製備及穩定性評估：氫氧基磷灰石與硫酸鈣屬於離子晶體的一種，不溶於非極性溶劑，導致其在有機溶劑中穩定性差，容易產生凝集與沉降行為，影響粒子在分子基質中之均勻性。本研究先將上述步驟燒結之陶瓷粒子添加至 1,4-二氧陸園(1,4-dioxane)中並攪拌一小時，做為控制組；另外，由於脂肪酸溶解後分散在有機溶劑時，因分子間作用力會形成類似微胞(micelle)之結構，本研究選擇具有不同碳數之脂肪酸如正己酸(C6)、月桂酸(C12)、油酸(C18)、魚油(FA)等，加入有機溶劑中形成溶液，導引陶瓷奈米晶體聚集在微胞內，增加粒子在有機溶劑中的穩定性。首先將 1%脂肪酸分別加入 1,4-二氧陸園，攪拌一小時形成均勻

溶液。再將陶瓷粒子加入脂肪酸/1,4-二氧陸園溶液中以高速均質機進行攪拌，如同控制組做法進行觀測，實驗依不同時間點觀察其沉降的情形，沉降率計算公式為 $[1 - (H_t/H_0)] \times 100\%$ ，其中 H_t 為時間點 t 的陶瓷粉體沉降液面高度， H_0 為陶瓷粉體最初的液面高度。

3-4 陶瓷/聚己內酯複合材料的製備與性質評估

3-4-1 複合材料的製備：控制組方面，取 1.5 克聚己內酯(PCL)完全溶於 10ml 的 1,4-dioxane 中，配製成 15%(w/v)的高分子溶液，將溶液倒入圓盤狀模具(鐵氟龍材質，直徑=100mm)，置於排煙櫃中使溶劑揮發。另一組則是取相同量之聚己內酯加入上述陶瓷粒子懸浮液(見 3-3 節)中，經均質機均勻混合後，將混合溶液倒入圓盤狀模具形成均勻的液膜，置於排煙櫃中使溶劑揮發取得膜材。實驗組方面，將油酸先溶於 1,4-dioxane 後，再加入陶瓷粉體形成懸浮液，最後再加入聚己內酯，將混和溶液倒入圓盤狀模具，形成均勻的液膜，置於排煙櫃中使溶劑揮發。

3-4-2 複合材料的性質分析：以 ATR-FTIR 分析膜材表面官能基團之種類與強度變化。掃描波數為 $560-4000\text{cm}^{-1}$ ，掃描次數：32 次，解析度： 2cm^{-1} 。以 XRD 分析複合材料之相與結晶度的改變。掃描速度為每分鐘 4 度，掃描範圍為 10 度至 70 度。並以 FESEM 觀察膜材表面型態。

3-5 複合材料之生物活性：硬骨於體內的生成屬於生物礦化的現象，Kokubo 等人[19]以將膜材浸泡在與人體血漿具有相似的酸鹼值，無機成分也極為相似之模擬體液(SBF)中，材料表面產生與生物體內的生物礦化極為相似。可作為評估材料在生物體內是否具有生物活性及其活性強弱。本研究將試片切割成固定尺寸大小(1cm^2)後，將試片滅菌後，再以無菌水清洗，將試片浸泡於 SBF 中，放置於 37°C 恆溫水槽中，經過 1,3,7 天時將試片取出，觀察高分子奈米複合材料表面之形態與化學組成隨時間之變化，以 FESEM 觀察試片表面形成之磷灰石之型態，另外以 ATR-FTIR 測量表面官能基團之種類與強度變化。而以 XRD 分析複合材料之相與結晶度。

3-6 細胞活性分析：人類骨肉瘤細胞 MG-63 (Human osteosarcoma, cell line)以含有 10%FBS、1% 抗生素(10000 U/ml penicillin、10 mg/ml streptomycin、0.025mg/ml amphotericin B)之 low-glucose DMEM 作為培養液，將培養皿於 37°C 、5% CO_2 的培養箱中，每 2 天置換一次培養液。膜材剪成約 well 大小，並貼附在 well 底層，將固定密度之細胞懸浮液

3-6-1 細胞吸附能力測試-Alamar Blue：活細胞內部之粒線體的可將原本深藍色無螢光性的 Alamar Blue 還原成為粉紅色高螢光性的產物，將培養液稀釋成 10%(v/v) Alamar Blue solution，取 200 μl 加入培養盤中， 37°C 下反應 4 小時。吸取反應後 100 μl 的溶液於 96-well 細胞培養盤，以波長 570nm(氧化態)和 600nm(還原態)讀取吸光值，計算出細胞還原態之比值。

3-6-2 細胞增生能力測試-Alkaline phosphatase(ALP)：硬骨分化的過程中鹼性磷酸酶(ALP)的表現量以及活性都會上升，因此 ALP 的活性可做為硬骨分化的一個指標。移除培養盤之細胞培養液後，用 Triton-100 將細胞膜打破，使其釋放出鹼性磷酸酶酵素。加入 200 μl p-nitrophenyl phosphate solution，於 37°C 培養箱下反應 1 小時，再加入 200 μl 1N 之 NaOH 溶液中止反應，並在搖盪器(shaker)上搖晃均勻，吸取 100 μl 的反應溶液於 96-well 細胞培養盤，以 ELISA reader 在 405nm 波長下讀取吸光值。p-Nitrophenol 在 405nm 有很強的吸光度。在 405nm 下，ALP 之活性與 p-Nitrophenol 形成之速率成正比。

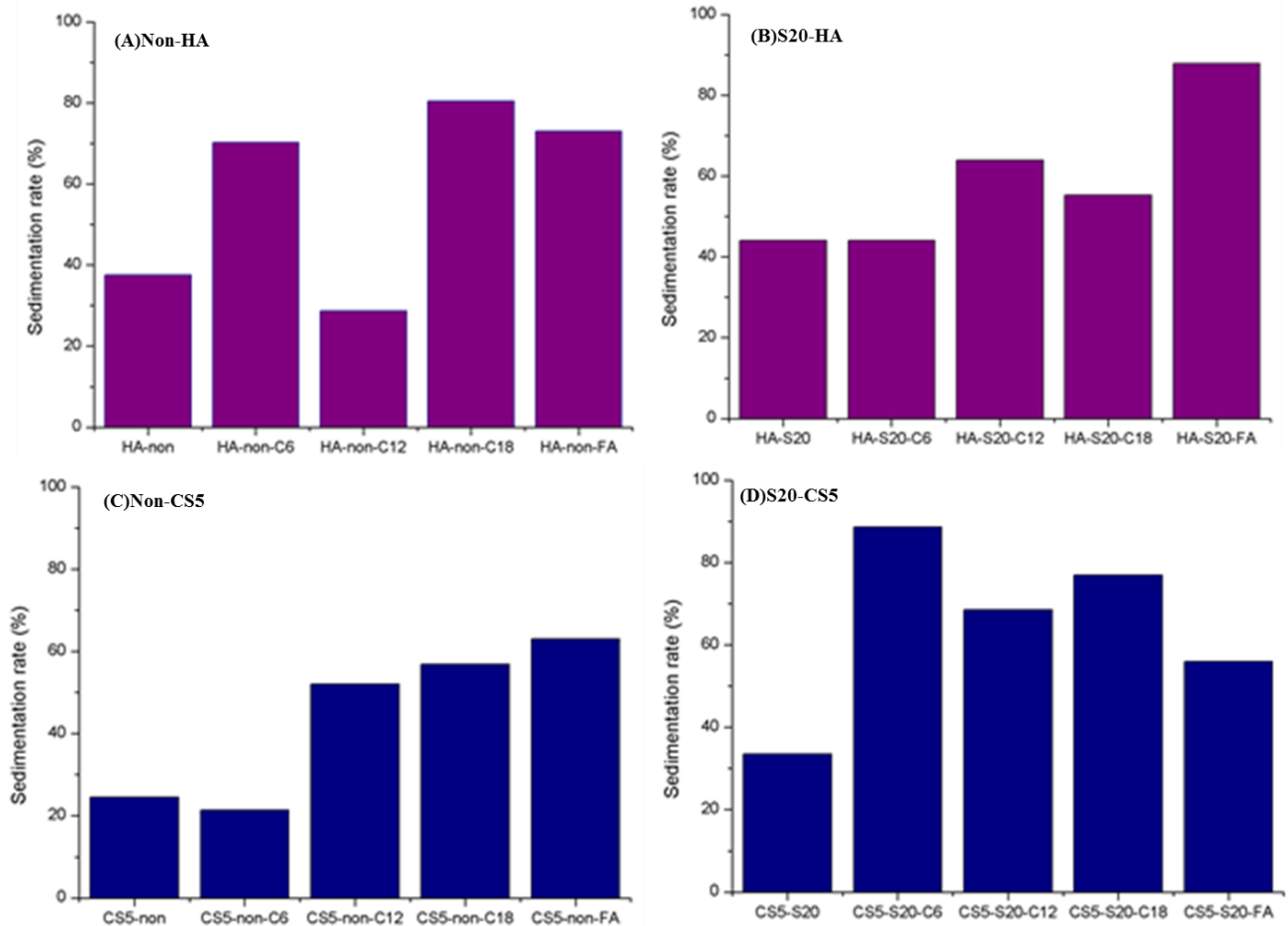
五、結果與討論

5-1 陶瓷粉體的製備與其物化性質測定：測量燒結後試片之直徑、厚度與重量並換算成密度，發現燒結後的密度變化明顯提升(見表一)。其中以 S20 試片的密度提升較多，約是 S10 的兩倍。而以 FTIR 分析粉體的化學組成，其中 $3200-3600\text{cm}^{-1}$ 代表 OH 官能基，經高溫燒結的粉體明顯減小，代表粉體之 OH 基團因燒結而損失，而 $1034, 604, 564, 476\text{cm}^{-1}$ 代表為 PO_4^{3-} 官能基，燒結前後沒有明顯的變化。以桌上型試驗機測量試片的徑向拉伸強度(見表一)，燒結前(Non)與以燒結速率 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ (S10)的組別，發現 HA 在有添加 CS 之組別的徑向拉伸強度有明顯提升，而純 CS 經燒結程序後強度則明顯減弱。比較兩種不同燒結速率，S20 組別的徑向拉伸強度則大於 S10。經由比較燒結速率及徑向拉伸強度的關係，可推斷出燒結速率對機械強度影響不大，除了純 CS 組別外，燒結速率愈快則徑向拉伸強度愈高。在 HA 中添加 CS 則有助於提高陶瓷粉體的機械強度。以 XRD 觀察試片之晶體結構發現，HA 及 CS5 在未燒結及經不同升溫速率燒結後，燒結後的試片沒有新的繞射峰產生，燒結後試片之繞射峰較未燒結的試片有明顯的提升。從表一可得知較慢的燒結速率(S10)促進 HA 的結晶度提升。而添加微量 CS 混合的粉體(CS5)以不同升溫速率進行燒結，其中的 HA 的結晶度也有顯著提升，但是在 S10 及 S20 結晶度的差異不大，而結晶度提升，其強度也會提升。以上研究結果可發現，燒結有助於提升試片之機械強度及結晶度，在 S20 的燒結程序下，試片機械強度較強。而加入微量 CS 也會提高陶瓷粉體的機械性質。

表一、不同燒結速率下陶瓷試片的物理性質

試片編號	燒結條件	編號	密度變化 (%)	徑向拉伸強度(MPa)	結晶度 (Xc)	粒徑 (nm)
Hydroxyapatite (HA)	燒結前	Non-HA	-	0.94 ± 0.12	69.4 ± 8	38.4 ± 0.1
	S10	S10-HA	17	1.31 ± 0.18	91.5 ± 8	50.5 ± 0.1
	S20	S20-HA	32	2.46 ± 0.76	83.3 ± 6	69.5
5% Calcium sulfate in Hydroxyapatite (CS5)	燒結前	Non-CS5	-	0.81 ± 0.35	68.0 ± 12	55.0 ± 0.1
	S10	S10-CS5	16	2.27 ± 0.55	93.6 ± 4	69.7
	S20	S20-CS5	13	2.46 ± 0.34	90.0 ± 6	61.1 ± 0.1
Calcium sulfate (CS)	燒結前	Non-CS	-	1.88 ± 0.30	-	-
	S10	S10-CS	7	1.12 ± 0.15	-	-
	S20	S20-CS	14	0.61 ± 0.06	-	-

5-2 陶瓷粉體懸浮液之製備及穩定性評估：觀察粉體隨時間之沉降行為以評估其穩定性，其結果見圖一。可發現在 HA 未燒結(HA-non)的組別中，除了十二酸(C12)外，加入脂肪酸的確有助於陶瓷粉體分散於高分子溶液中，其中以油酸(C18)的分散性最好。而在 HA-S20 的組別中，正己酸(C6)對於改變陶瓷粉體的分散性質不明顯外，也因為燒結後粉體的親水性下降，和高分子的親和力上升，再加上脂肪酸的加入，更有助於降低相分離的情形。而從整體組別來看，魚油(FA)在 HA 燒結前後的組別中，改變 HA 在高分子基質溶液的分散情況是最明顯的，而 C18 次之。在 CS5 的組別中，油酸(C6)的加入對於改變 CS5 未燒結(CS5-non)的相分離情形較差，而其他脂肪酸則較可以改變其分散性；加入脂肪酸則明顯的改變 CS5-S20 組別之分散性。從整體可判斷出 C18 對於改變 CS5 組別的相分離情形較佳。因此粉體在懸浮液中的穩定性受粉體種類以及脂肪酸種類而有所改變。



圖一、脂肪酸添加對燒結前(A)與燒結後(B)氫氧基磷灰石(HA)及燒結前(C)與燒結後(D)氫氧基磷灰石/硫酸鈣(CS5)沉降行為的影響

5-3 複合膜材的性質分析：

分析高分子複合膜材之結晶結構，發現加入脂肪酸的膜材沒有新的繞射峰產生，而加入燒結後粉體的膜材其繞射峰較未燒結有明顯的提升。氫氧基磷灰石(HA)之高分子複合膜材中，可觀察 HA 之結晶度及粒徑的下降，但組別間的影響不大。添加油酸(C18)的組別，結晶度相較於其他組別則較為下降，粒徑也較小。添加氫氧基磷灰石/硫酸鈣混合粉體(CS5)之高分子複合膜材，可觀察到脂肪酸的添加，使其結晶度與粒徑皆下降；在未燒結 CS5 的組別中，添加 C6 的膜材其結晶度相較於其他脂肪酸較低，但組間差異不大；而添加 C12 的膜材其粒徑較其他組別大。加入燒結後 CS5 的組別則是添加 C18 後相較於其他組別的結晶度較低。

表二(A)、脂肪酸種類對於複合材料中氫氧基磷灰石結晶度(X_c)的分析

試片種類	脂肪酸種類				
	未添加	C6	C12	C18	FA
PCL-Non-HA	35.1±2	30.8±0.1	29.7±2.2	23.7±4	29.1±0.5
PCL-S20-HA	83.8	78.8±0.6	83.6±0.2	69.5	72.4±0.3
PCL-Non-CS5	68.01±12	21.2±0.8	23.8±1	23.84%±0.3	23.3±1.4
PCL-S20-CS5	90±6	78.4±0.5	70.1±0.5	68.1±0.5	79.6±0.2

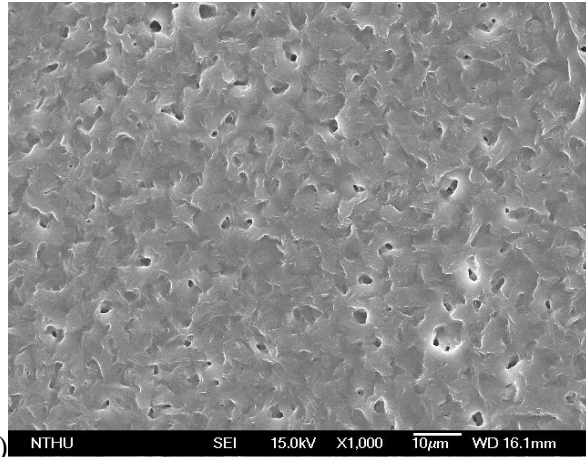
表二(B)、脂肪酸種類對於複合材料中氫氧基磷灰石粒徑的分析

試片種類	脂肪酸種類				
	未添加	C6	C12	C18	FA
PCL-Non-HA	54.7±0.1	32.7±0.1	31.1±0.1	27.8±0.24	28.70±0.1
PCL-S20-HA	68.8±0.02	47.8±0.1	49.2±0.1	56.1±0.4	40.1±0.1
PCL-Non-CS5	54.9±0.1	28.1±0.2	41.6±0.1	32.1±0.2	25.9±0.1
PCL-S20-CS5	61.1±0.1	53.3±0.1	48.4±0.2	46.2±0.1	44.0±0.1

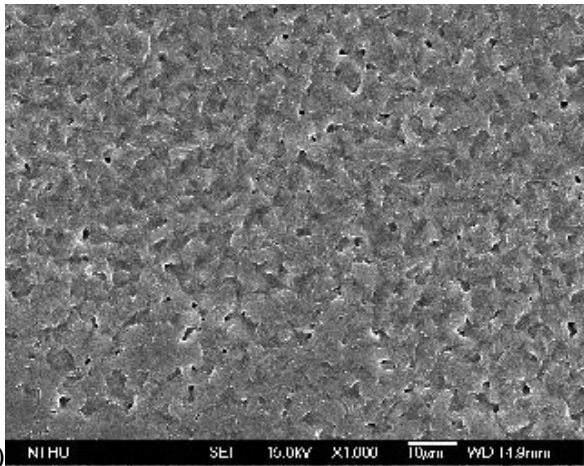
2004 年 Elzein 等人所提出的 PCL 膜材之標準紅外線吸收光譜特徵峰，在 1727 cm^{-1} 處有 C=O 明顯的吸收光譜，在 2949 cm^{-1} 處則有非對稱之 $-\text{CH}_2$ stretching 之吸收峰，在 2865 cm^{-1} 處有對稱之 $-\text{CH}_2$ stretching 之吸收峰，1923- CH_2 cm^{-1} 處有 C-O 與 C-C stretching 之吸收峰，1240 cm^{-1} 處有非對稱之 C-O-C stretching 之吸收峰、1190 cm^{-1} 處有非對稱之 OC-O stretching 之吸收峰，1170 cm^{-1} 處有對稱性之 C-O-C stretching 之吸收峰，1157 cm^{-1} 處有 C-C 和 C-O stretching 之吸收峰。由 ATR-FTIR 分析複合膜材表面組成，PCL 之紅外線吸收光譜在 1157 cm^{-1} 、1170 cm^{-1} 、1240 cm^{-1} 、1727 cm^{-1} 、2865 cm^{-1} 和 2949 cm^{-1} 仍有 PCL 表面官能基之特性峰出現。而加入脂肪酸的複合膜材表面之 PCL 官能基在 ATR-FTIR 之比較上，大致上無明顯差異，無其他新的官能基產生，可見在製作複合膜材的過程中，PCL 之結構沒有特別的改變。而在 1000-1050 cm^{-1} 處，則發現含有陶瓷粉體之膜材其吸收峰強度上升，有可能是 PO_4^{3-} 官能基表現於膜材之上。

添加 C6 的膜材其表面 PCL 之吸收峰有降低之現象，可見膜材表面並非被 HA 顆粒所覆蓋，而添加陶瓷粉體與 C6 之膜材，其吸收峰特性相近，且並非析出在膜材表面之上，可推測出，添加 C6 對於改善陶瓷粉體的分散性並不明顯。添加 C12 的複合膜材表面 PCL 之吸收峰和 PCL 相似，純粹添加陶瓷粉體之膜材其 PCL 吸收峰則下降許多，推斷陶瓷粉體會沉降在膜材內部。加入 C12 及燒結後陶瓷粉體複合膜材之吸收峰則與 PCL 相似，推測，有 C12 調節的燒結後陶瓷粉體會析出在膜材上，而未燒結的陶瓷粉體的分散則較佳。添加 C18 和 FA 的複合膜材表面吸收峰和 PCL 相似，而相較之下，純粹添加陶瓷粉體之膜材其 PCL 吸收峰則下降許多，推斷陶瓷粉體會沉降在膜材內部。加入 C18 或 FA 及燒結陶瓷粉體複合膜材之吸收峰則與 PCL 相似，可見，添加此兩種脂肪酸的確有助於燒結之陶瓷粉體分散於膜材中，而燒結厚陶瓷粉體的分散則優於未燒結之粉體。添加脂肪酸調節之氫氧基磷灰石/硫酸鈣混合粉體之膜材，其 ATR-FTIR 圖譜與添加 C6/氫氧基磷灰石相似，經脂肪酸調節的膜材其 PCL 吸收峰明顯下降，推斷出脂肪酸對於陶瓷粉體之分散性的改善不大，但 PCL-C12-NonCS5 及 PCL-FA-CS5-S20 此兩組別的陶瓷粉體分散性較其他組別佳。

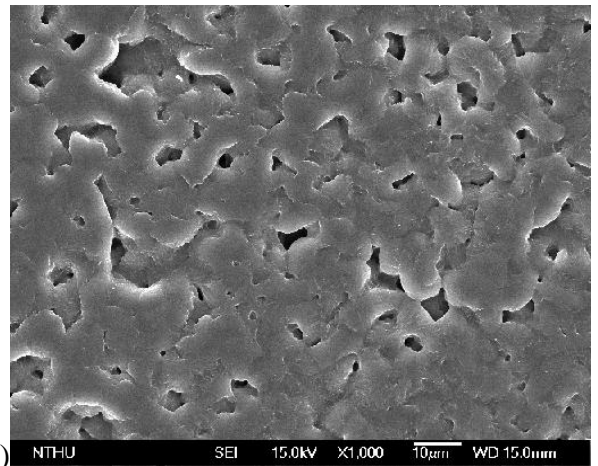
以 FESEM 觀察膜材表面，脂肪酸種類會影響膜材的表面形態(見圖二)，PCL 的表面會形成片狀起伏，而加入 C6 時表面起伏型態開始加劇，而加入 C12 時表面起伏程度開始加速，但更換成 C18 與 FA，則表面型態趨於緩和，當製成複合材料時，未添加脂肪酸的組別，改變 PCL 結晶層狀的排列，變成具孔洞且較平滑的表面。但觀察到表面有陶瓷顆粒的聚集(見圖三至圖六)。有加入脂肪酸的組別，膜材表面較緻密平滑，只有少許陶瓷顆粒的發現，顯示粉體聚集的現象，因為脂肪酸的調節而明顯下降，降低複合材料相分離的情形。而燒結後陶瓷粉體的加入，因高溫使粉體表面羥基喪失，相較於未燒結的陶瓷粉體，燒結後粉體疏水性較高，和 PCL 的親和力高，使膜材表面的孔洞形成較大。



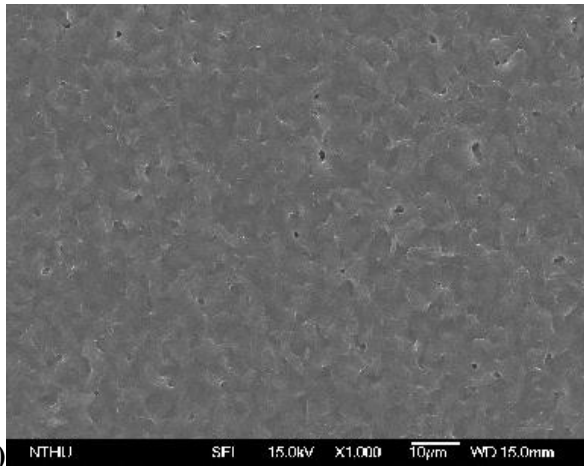
(A)



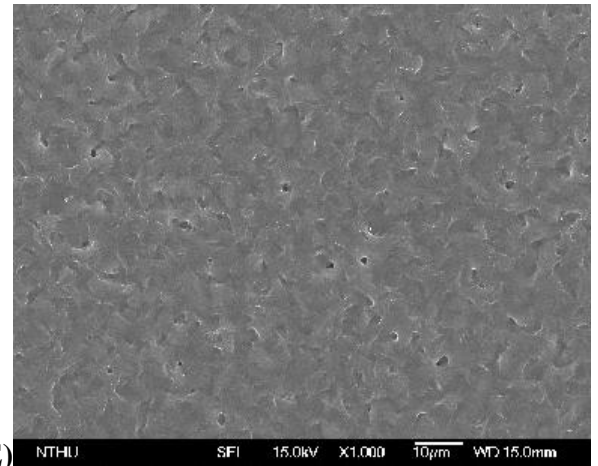
(B)



(C)

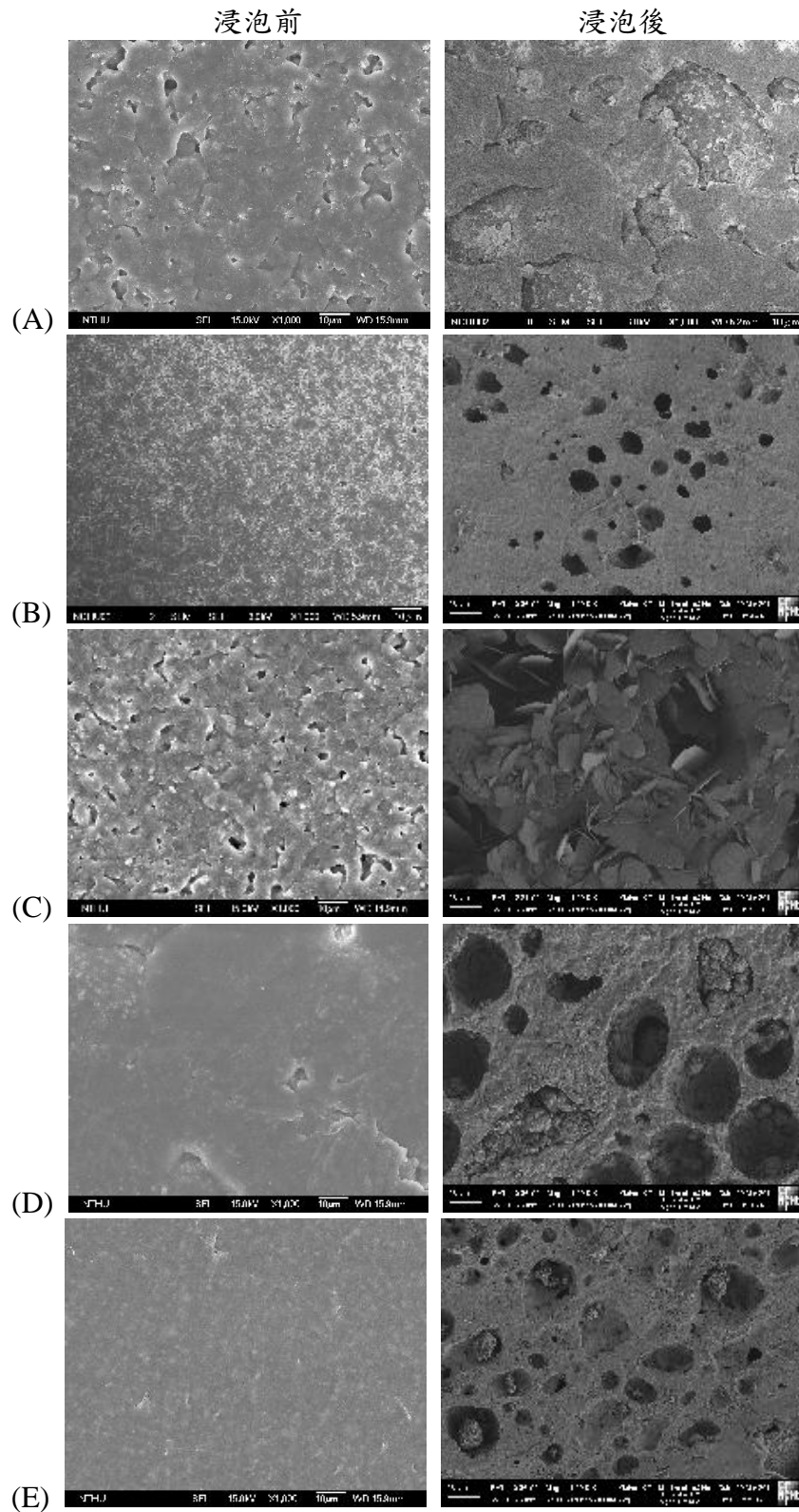


(D)

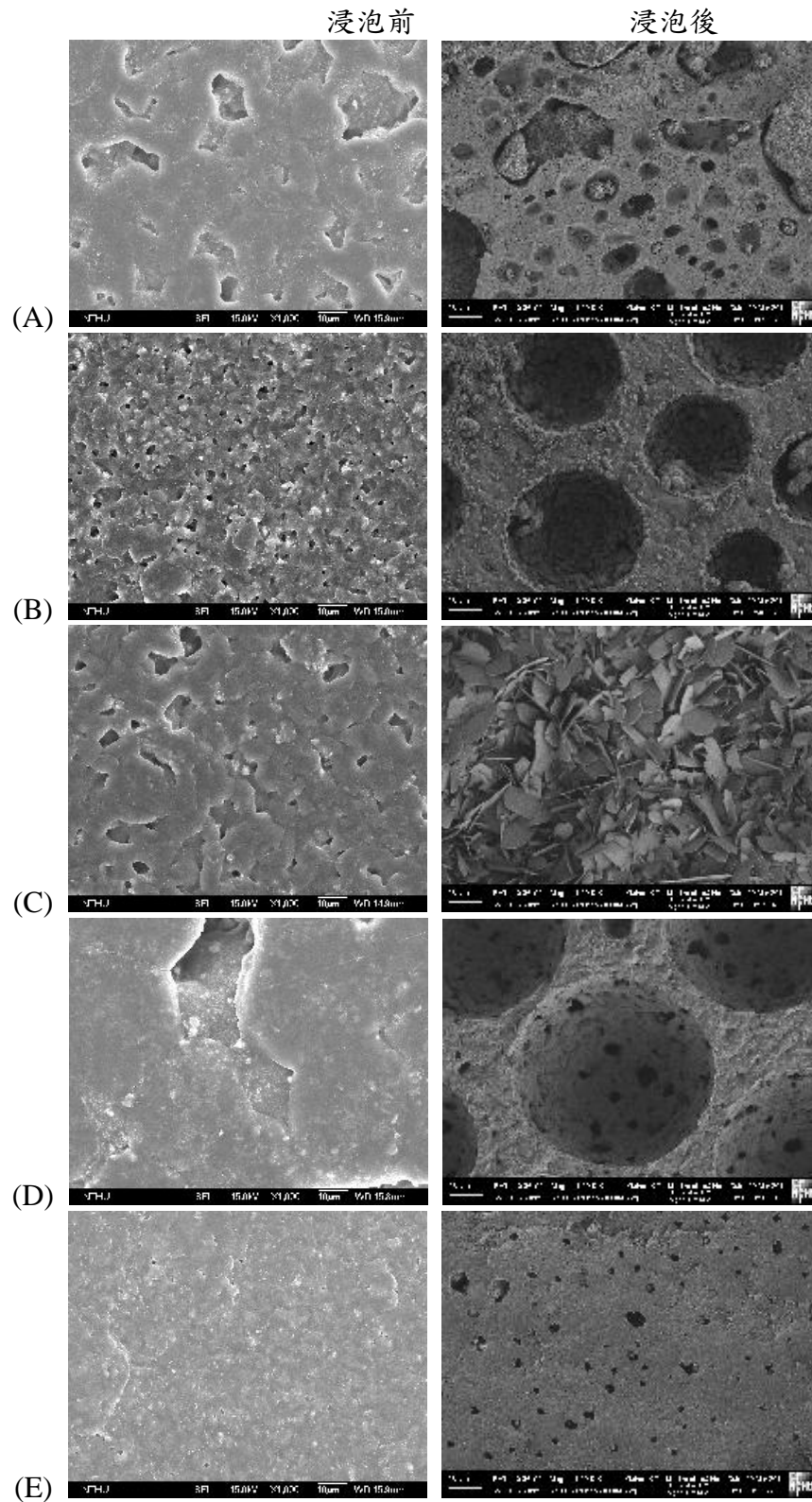


(E)

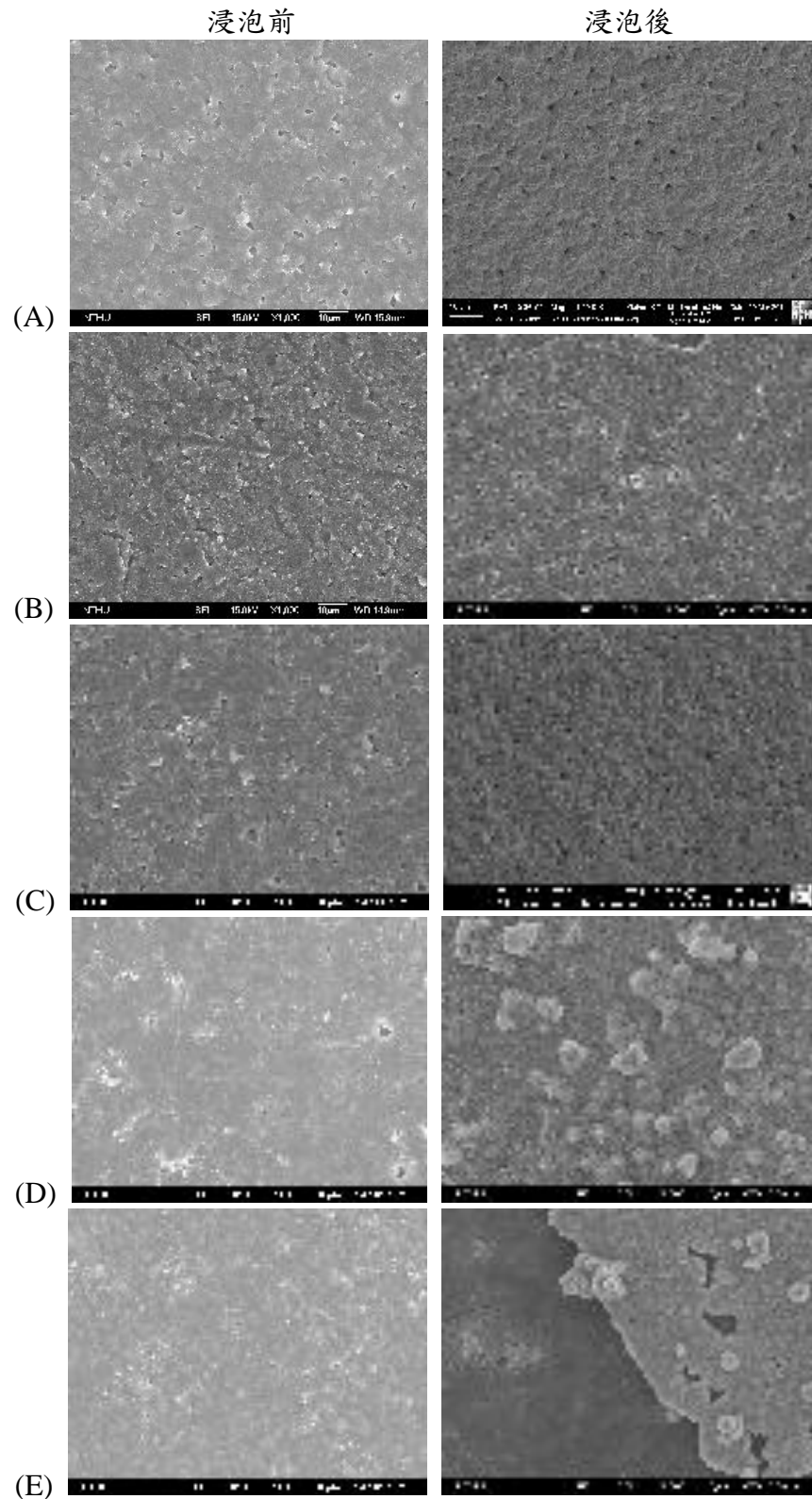
圖二、以 FESEM 觀察 (A) PCL、(B) PCL/C6、(C) PCL/C12、(D) PCL/C18、(E) PCL/FA 之表面型態



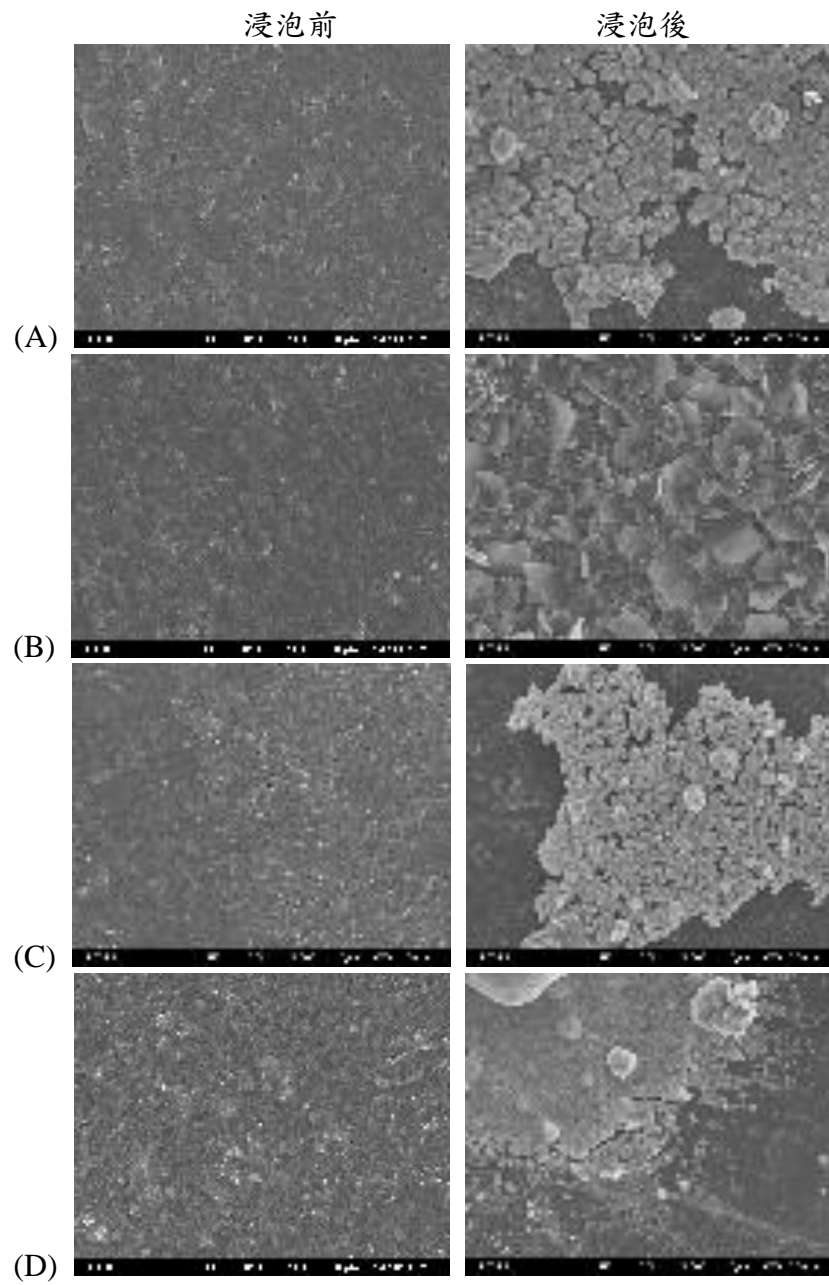
圖三、以 FESEM 觀察 (A) PCL/Non-HA、(B) PCL/C6/Non-HA、(C) PCL/C12/Non-HA、(D) PCL/C18/Non-HA、(E) PCL/FA/Non-HA 之表面型態與浸泡三天 SBF 後之表面型態。



圖四、以 FESEM 觀察 (A) PCL/S20-HA、(B) PCL/C6/ S20-HA、(C) PCL/C12/ S20-HA、(D) PCL/C18/ S20-HA、(E) PCL/FA/ S20-HA 之表面型態與浸泡三天 SBF 後之表面型態。



圖五、以 FESEM 觀察 (A) PCL/Non-CS5、(B) PCL/C6/ Non-CS5、(C) PCL/C12/ Non-CS5、(D) PCL/C18/ Non-CS5、(E) PCL/FA/ Non-CS5 之表面型態與浸泡三天 SBF 後之表面型態。



圖六、以 FESEM 觀察 (A) PCL/C6/ S20- CS5、(B) PCL/C12/ S20- CS5、(C) PCL/C18/ S20- CS5、(D) PCL/FA/ S20- CS5 之表面型態與浸泡三天 SBF 後之表面型態。

5-4 陶瓷/聚己內酯複合材料的生物活性

加入脂肪酸與未燒結 HA 粉體的組別中發現，添加 C6 的組別在浸泡三天後的表面較平滑緻密，且有磷灰石開始形成於直徑約 $2\mu\text{m}$ 的孔洞中，浸泡七天後形成的圓形孔洞直徑較大，約 $16\mu\text{m}$ ，且孔洞及膜材表面皆有蜂巢狀磷灰石的出現。添加 C12 的膜材經浸泡後在形成的圓型孔洞中有平板狀磷灰石結晶出現。經 C18、FA 調節的膜材，再經 SBF 浸泡三天後，在表面及形成的圓型孔洞中皆有磷灰石的出現；浸泡七天則發現有許多堆積成球狀的磷灰石充滿於膜材表面。

加入脂肪酸與燒結後 HA 粉體的組別在則發現，添加 C6 的膜材在浸泡三天後，其表面有孔洞的形成，且在孔洞內有明顯的蜂巢狀磷灰石呈球狀堆積；浸泡七天則是連膜材表面都佈滿磷灰石。由 C12 調節的膜材在浸泡三天後，其表面同樣有平板狀磷灰石結晶的析出，但在浸泡七天後，膜材表面雖然仍有圓形孔洞的形成，但表面並無結晶析出。添加 C18 的膜材在浸泡三天後，有約 $38\mu\text{m}$ 的圓形孔洞形成，而膜材表面有少許磷灰石結晶的形成；浸泡七天的膜材則有約 $4\mu\text{m}$ 的圓形孔洞出現，而磷灰石是出現在膜材表面較內部的地方。經 FA 調節的膜材在浸泡三天後，有少許磷灰石在孔洞中及表面開始形成；而浸泡七天後的膜材其表面則均勻的遍佈蜂巢狀的磷灰石結晶。

未燒結之 CS5 在未加入脂肪酸的組別在浸泡三天後，膜材表面均勻緻密，且有小孔洞的出現；浸泡七天後的膜材表面則是層狀結構，有磷灰石在膜材表面的孔洞中析出。添加 C6 的膜材浸泡後會出現緻密有磷灰石融溶的表面。由 C12 調節的膜材，其經浸泡三天後的表面有均於緻密的磷灰石出現；浸泡七天則出現扁塌的片狀磷灰石。添加 C18 的膜材在浸泡三天後表面有磷灰石呈球狀表現；浸泡七天的表面則有成桿狀的磷灰石形成。添加 FA 的膜材經浸泡後有蜂巢狀的磷灰石均勻緻密的出現於膜材表面。

燒結之 CS5 的組別經由 C6、C18 及 FA 調節，在浸泡三天後有許多叢集的蜂巢狀磷灰石呈球型堆積於膜材表面，FA 膜材的表面較為緻密。添加 C6、C18 調節之膜材經浸泡七天後，表面佈滿顆粒狀的磷灰石結晶，而 C18 的膜材磷灰石出現在較內部的地方。FA 調節的膜材在浸泡七天後，表面有片狀的磷灰石出現。添加 C12 的膜材在浸泡三天後，有平板狀的磷灰石析出在表面；浸泡七天的膜材其平板狀結晶的邊緣則較圓滑。

由 SEM 圖的觀察可發現，不同脂肪酸的調節會有不同形狀的磷灰石析出於膜材表面，且氫氧基磷灰石的組別其膜材表面會有圓型孔洞的形成，而有添加硫酸鈣的組別，則是呈現較均勻緻密的表面。經浸泡時間的長短，對於膜材表面孔洞的大小及型態也有差別，如浸泡三天的 PCL-C12-HA 組別表面有磷灰石的析出；但浸泡七天後的膜材表面，則沒有磷灰石的形成。和 ATR-FTIR 的推斷結果相比，原來預測分散性較差的 C6，在經浸泡 SBF 後的觀察，則發現其表面的磷灰石生長情形良好，而預測分散性良好的 C18 與 FA，其添加 C18 與未燒結的 HA 膜材表面的磷灰石生長較經燒結的 HA 密佈。PCL-FA-HAS20 的組別其表面磷灰石的生長就很均勻緻密。添加 C12 的組別，其表面形成的平板狀磷灰石結晶很特別。

表三(A)、浸泡於模擬體液三天與七天後複合材料中氫氧基磷灰石的結晶度

粉體種類	脂肪酸 種類	浸泡時間(日)		
		0	3	7
HA before sinter (Non-HA)	-	35.1	35.5±6	61.1±1
	C6	69.4±8	45.7±1.5	41.7±1.8
	C12	29.7±2.2	54.3±1.6	81.5±0.3
	C18	23.7	36.8±4	37.4±3
	FA	29.1±0.5	32.4±8	36.7±0.8
HA after sinter (S20-HA)	-	83.8	63.4±1	72.7
	C6	47.8±10	74.8±3	71.4
	C12	49.2±9	72.7±0.2	48.5±17.5
	C18	69.5	70.5±1	73.5±1
	FA	40.1±13	-	72.4
5% CS in HA before sinter (Non-CS5)	-	68±12	42.3	63.7±11
	C6	21.2±0.8	40.4±12.4	41.7±1.8
	C12	23.8±0.9	29.7±1.7	69.5±0.3
	C18	23.8±0.3	43.1±0.8	29.7±3.5
	FA	23.3±1.4	35.8±0.6	40±4.1
5% CS in HA before sinter (S20-CS5)	-	90±6	79.3	75.6±1
	C6	78.4±0.5	77.8±0.2	72.6±0.2
	C12	70.1±0.5	74.2±0.7	29.7±3.5
	C18	68.1±0.5	63.8±0.3	72.6
	FA	79.6±0.2	54.3±0.6	75.6±1

表三(B)、浸泡於模擬體液三天與七天後複合材料中氫氧基磷灰石的粒徑

粉體種類	脂肪酸 種類	浸泡時間(日)		
		0	3	7
HA before sinter (Non-HA)	-	51.8	36.8±0.1	26.9±0.3
	C6	32.70±0.1	41.4±0.1	39.4±0.1
	C12	31.10±0.1	30.4±0.2	34.0
	C18	20.1	30.2±0.1	38.3±0.1
	FA	28.70±0.1	39.4±0.6	49.3±0.2
HA after sinter (S20-HA)	-	67.8	44.1±0.2	52.8±0.2
	C6	47.80±0.1	76.7	55.7
	C12	49.20±0.1	53.9±0.3	50.2±0.1
	C18	32.9	41.2±0.3	26.9±0.3
	FA	40.1±0.1	-	53.2±0.2

5% CS in HA before sinter (Non-CS5)	-	55±0.1	38.9±0.2	24.9±0.3
	C6	28.1±0.2	50.9±0.2	67.5±0.1
	C12	41.6±0.1	33.5±0.1	28.9±0.2
	C18	32.1±0.2	43.1±0.8	44±0.1
	FA	25.9±0.1	53.6	34±0.1
5% CS in HA before sinter (S20-CS5)	-	61.1±0.1	57.6±0.1	68±0.2
	C6	53.3	67.4±0.1	56.1
	C12	48.4±0.2	52.5±0.1	67.1±0.1
	C18	46.2±7.0	63.8±0.3	72.6
	FA	44.0±8.0	52.5±0.2	69.0

HA-non 結晶度=69.41%±8% ， HA-S20 結晶度=83.31%±6%

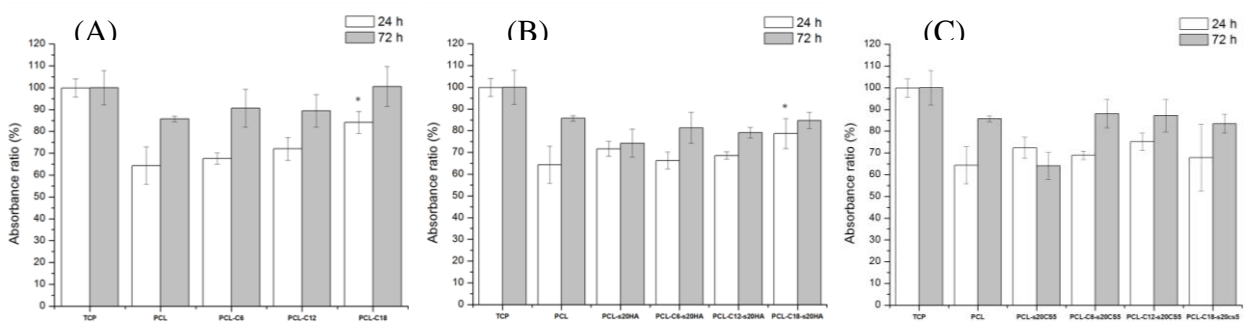
CS5-non 粒徑=38.37±11% ， CS5-S20 粒徑=69.45 ±3%

5-5 陶瓷/聚己內酯複合材料的細胞活性分析

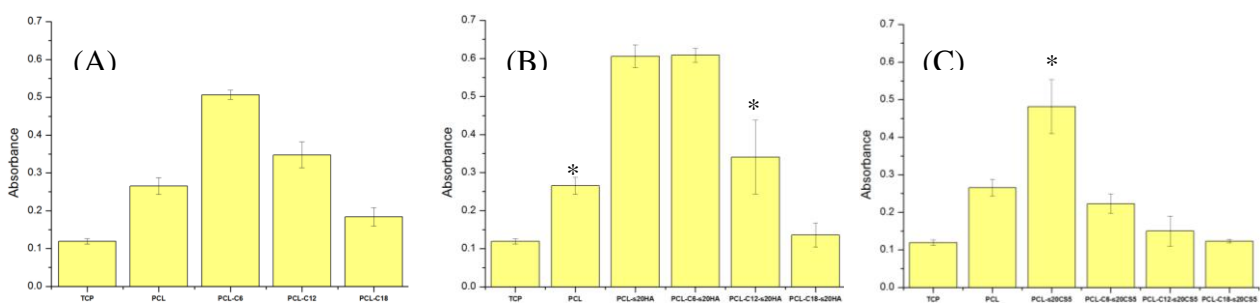
以 MTT 比色法分析膜材表面對人類骨肉瘤(MG-63)細胞的貼附與增生行為產生的影響，圖七(A)顯示單純脂肪酸加入 PCL 時，僅添加油酸(C18)的組別對於細胞貼附明顯多於 PCL，但在細胞生長方面則沒有明顯增加。

而圖七(B)與 5(C)是膜材混合脂肪酸及粉體(分別為氫氧基磷灰石燒結粉體與氫氧基磷灰石/硫酸鈣混合燒結粉體)，可發現膜材對於細胞貼附與增生沒有產生明顯差異。但在細胞分化方面，膜材中分別添加正己酸(C6)與月桂酸(C12)細胞分泌鹼性磷酸酶的量遠大於 PCL，但加入 C18 的組別反而低於 PCL[圖七(A)]。但當膜材加入燒結之氫氧基磷灰石時，細胞分泌鹼性磷酸酶的量與添加 C6 的組別明顯高於 PCL[圖七(B)]，但更換粉體為氫氧基磷灰石/硫酸鈣混合燒結粉體時，單純添加粉體的膜材細胞鹼性磷酸酶的分泌遠高於其他組別，而脂肪酸的添加反而降低細胞鹼性磷酸酶的分泌。

以上結果顯示材料表面組成與細胞分化有密切相關，本研究添加脂肪酸之目的在於改善膜材內部高分子鏈與粉體間的界面，然而由膜材表面型態可知粉體種類對於脂肪酸調節能力產生影響，以 EDX 分析結果證實添加燒結之氫氧基磷灰石之膜材遠比添加氫氧基磷灰石/硫酸鈣混合燒結粉體之膜材表面有較多粉體裸露，對於細胞分化有明顯誘導的能力。



圖七(A)人類骨肉瘤細胞分別培養於膜材上 1 天及 3 天後的細胞活性



圖七(B)人類骨肉瘤細胞培養於膜材上 7 天後鹼性磷酸酶分泌量

(六)結論

本研究使用硫酸鈣與氫氧基磷灰石共同燒結，可增加氫氧基磷灰石之生物降解性，並改變粉體脂化學組成。而添加不同碳數之脂肪酸，可使 HA 結晶度降低，減少其在體內的分解時間，且加入脂肪酸的膜材沒有新的繞射峰產生。脂肪酸會影響分子間作用力，形成微胞結構，改變陶瓷粉體與高分子鏈間相分離情形，對陶瓷粉體在複合材料中的分散性會產生明顯的影響，可預期對高分子鏈亦會產生交互作用。進而改變複合材料表面形態與陶瓷粉體在表面的分布，再藉由生物活性的評估，發現油酸可誘導骨母細胞貼附，但在只有添加陶瓷粉體的膜材其細胞所釋放的鹼性磷酸酶的活性遠高於其他組別，脂肪酸的添加反而降低細胞 ALP 的分泌，推論出細胞分化增生與材料表面組成有密切相關，其中因為添加氫氧基磷灰石之膜材表面有較多粉體裸露，對於細胞分化有明顯誘導的能力。本研究之目的在於藉添加脂肪酸改善膜材內部高分子與粉體間的界面，由膜材表面型態可知粉體對於脂肪酸調節所產生的影響，但複合膜材對於骨母細胞的貼附增生的效果不如預期。所以接下來應該要設計一組針對已預先進行仿生礦化的複合材料進行分析，進一步加以比對並判讀生物活性的結果，並找出適合的脂肪酸種類與濃度比例，增加複合材料於硬骨再生方面的應用。

(六)參考文獻

- [1] Buddy D. Ratner, Allen S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons, *Biomaterials Science*, Academic Press, 1996.
- [2] Ruiyun Zhang, Peter X. Ma, Poly (α -hydroxyl acids) /hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999; 33:446-455.
- [3] Jansen JA, de Ruijter JE, Janssen PT, Paquay YG. Histological evaluation of a biodegradable Polyactive/hydroxyapatite membrane. *Biomaterials*. 1995; 16:819-827.
- [4] Shikunami Y, Okuno M. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. *Biomaterials*. 1999; 20:859-77.
- [5] HJ Lee, HW Choi, KJ Kim, SC Lee. Modification of Hydroxyapatite Nanosurfaces for Enhanced Colloidal Stability and Improved Interfacial Adhesion in Nanocomposites. *Chem Mater*. 2006; 18:5111-5118.
- [6] Lee HJ, Kim SE, Choi HW, Kim CW, Kim KJ and Lee SC. The effect of surface-modified nano-hydroxyapatite on biocompatibility of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite nanocomposites. *European Polymer Journal* 2007; 43:1602-1608
- [7] S.C.G. Leeuwenburgh, I.D. Ana, J.A. Jansen Sodium citrate as an effective dispersant for the synthesis of inorganic-organic composites with a nanodispersed mineral phase. *Acta Biomaterialia* 2009; 6:836-844.
- [8] Entazul M. Huque , The Hydrophobic Effect", *Journal of Chemical Education*, 1989; 66:581-585.
- [9] Kim HW. Biomedical nanocomposites of hydroxyapatite/polycaprolactone obtained by surfactant mediation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2007; 83:169-177
- [10] 陳淑娟編譯，最新圖解生物化學，初版，合記圖書出版社，2001
- [11] Jon Kabara 1966， Hierholzer and Kabara 1982， Isaacs and Thormar 1991， Isaacs et al. 1992
- [12] Kabara JJ.(1978) "Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents -- A review, in The Pharmacological Effect of Lipids," in JJ Kabara(ed) American Oil Chemists' Society, Champaign IL
- [13] Hierholzer, J.C. and Kabara, J.J. (1982) "In vitro effects of monolaurin compounds on enveloped RNA and DNA viruses." *Journal of Food Safety* 4:1-12; Kabara JJ.(1985) "Inhibition of staphylococcus aureus in The Pharmacological Effect of Lipids II," pp.71-75.in JJ Kabara(ed) American Oil Chemists' Society, Champaign IL, 1985
- [14] Bishop, Paul L. (2000). Pollution Prevention: Chapter 2 - Properties and Fates of Environmental Contaminants, instructional slides to accompany Pollution Prevention: Fundamentals and Practice, by Paul L. Bishop
- [15] Terés, S; Barceló-Coblijn, G; Benet, M; Alvarez, R; Bressani, R; Halver, Je; Escribá, Pv (2008, September) · Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil · Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
- [16] Wallin R. Saldeen T, Effect of low-dose aspirin in combination with stable fish oil on whole blood production of eicosanoids. Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids. 2001; 64(6):291-7.

- [17] Y.X. Pang, X. Bao, Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. *Journal of the European Ceramic Society*. 2003; 10:1697-1704.
- [18] E. LANDI, A. TAMPIERI, G. CELOTTI, S. SPRIO Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites *Journal of the European Ceramic Society*. 2000; 20:2377-2387.
- [19] Inanc B, Elcin AE, Elcin YM. Osteogenic induction of human periodontal ligament fibroblasts under two- and three-dimensional culture conditions. *Tissue Eng*. 2006;12:257-66.