

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

鈷取代氫氧基磷灰石與二氧化鈦奈米管複合物/聚乙烯醇膜材運
用在糖尿病病足的傷口修復

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 104-2633-E-040-002-
執行期間：104年08月01日至105年07月31日
執行單位：中山醫學大學口腔科學研究所

計畫主持人：湯正明

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理人員：林煒竣

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 105 年 10 月 31 日

中文摘要：聚乙醇醇是一種水溶性聚合物，容易通過添加其他物質來提高其性能。鈷離子對脯氨酸羧化酶抑制劑，通常作為缺氧模擬物，短時間可有效提高缺氧誘導因子蛋白質量的性能，在文獻中表示增加組織血管生成。在本研究中，以聚乙醇醇為主要材料和鈷取代的羧基磷灰石 (Co-HA) 共混膜，討論羧基磷灰石鈷比例取代影響膜性能。該研究首先通過電化學沉積鈷取代的羧基磷灰石，鈦金屬作為陰極，在 55°C 下浸泡的電解質 (4.2mM 硝酸鈣，2.5mM 磷酸二氫銨)，固定電壓 20 分鐘。製備膜後，將聚乙醇醇在 80°C 下在去離子水中完全溶解，加入定量的鈷取代的羧基磷灰石粉末混合物，冷卻，倒入鐵氟龍模具中，然後在 45°C 烘箱中放置 48 小時。聚乙醇醇乾燥後/鈷取代羧基磷灰石 (PVA-CoHA) 膜分別進行反射傅立葉變換紅外光譜 (ATR-FTIR) 進行其結晶結構和表面化學成分分析，觀察了場發射掃描電子顯微鏡 (FESEM) 表面形貌。固定區域的樣品使用抗菌膜進行大腸桿菌檢測。發現聚乙醇醇薄膜材料原來無色，加入 Co-HA 呈現紫藍色，膜表面非常光滑，通過 FT-IR 分析可以看出，膜表面無明顯磷酸鹽官能機團，磷灰石可能分佈較寬。另外，抗菌膜的評價，大腸桿菌膜附著的 PVA-CoHA 數遠遠低於 PVA 和 PVA-HA 膜，但 PVA-CoHA 膜之間沒有顯著差異，由於鈷離子的取代比例相近，本研究將探討使用 PVA 後續加入不同鈷取代羧基磷灰石釋放行為的鈷離子及其對細胞的影響，希望未來可用於骨科和牙科的應用。

中文關鍵詞：電化學沉積、鈷取代羧基磷灰石、化學組成、晶體結構、抗菌

英文摘要：Polyvinyl alcohol is a water-soluble polymer, easy to improve their properties by to add other substances. Cobalt ions for proline hydroxylation enzyme inhibitors, often as hypoxia mimetic, a short time can effectively increase the performance of hypoxia inducible factor protein amount, expressed in the literature to increase tissue angiogenesis. In this study, polyvinyl alcohol as the main material and cobalt substituted hydroxyapatite (Co-HA) blended membrane was prepared to discuss hydroxyapatite in ratio of cobalt to replace affect membrane properties. This study firstly prepared by electrochemical deposition of cobalt substituted hydroxyl hydroxyapatite, titanium metal as a cathode, electrolyte soaked in 55 ° C (4.2 mM calcium nitrate, 2.5 mM ammonium dihydrogen phosphate), a fixed voltage 20 minutes. After preparation of membranes is completely dissolved polyvinyl alcohol at 80 ° C in deionized water, adding quantification of cobalt substituted hydroxyl hydroxyapatite powder mix, cool, pour into Teflon mold, and then into 45 ° C oven for 48 hours. Polyvinyl alcohol after drying / cobalt substituted hydroxyl hydroxyapatite (PVA-CoHA) membranes respectively reflective Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) performed its crystalline structure and surface chemical composition analysis, and field emission scanning electron microscope (FESEM) surface morphology was

observed. Fixed area of the specimen using antibacterial membrane of E. coli testing. It was found that the polyvinyl alcohol film material originally colorless, after addition of Co-HA presents lavender, membrane surface is very smooth, the FT-IR analysis can be seen that membrane surface without penetrating peaks phosphate, apatite may be wider distribution resulting in no significant penetration peak performance. In addition, evaluation of antibacterial membranes, membrane of E. coli attached PVA-CoHA number is far lower than PVA and PVA-HA membrane, but no significant differences between the PVA-CoHA membrane, due to the substitution of cobalt ions similar proportions cause, this study will explore the use of PVA subsequent addition of different cobalt substituted hydroxyl apatite release behavior of cobalt ions and their impact on cells can be used in the future hope of orthopedic and dental applications.

英文關鍵詞： Electrochemical deposition, Cobalt substituted hydroxyapatite, Chemical composition, Crystal structure, Antibacterial

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

鈷取代氫氧基磷灰石與二氧化鈦奈米管複合物/聚乙烯醇膜材
運用在糖尿病病足的傷口修復

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2633-E-040 -002 -

執行期間：104 年 8 月 1 日至 105 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學口腔科學研究所

計畫主持人：湯正明

共同主持人：

計畫參與人員：林煒竣

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 一 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

中 華 民 國 一 百 零 五 年 十 月 三 十 一 日

目錄

| | |
|----------|----|
| 摘要 | 1 |
| Abstract | 2 |
| 報告內容 | |
| 一、 前言 | 3 |
| 二、 研究目的 | 4 |
| 三、 文獻探討 | 5 |
| 四、 研究方法 | 6 |
| 五、 結果與討論 | 8 |
| 六、 參考文獻 | 11 |

摘要

聚乙烯醇是一種水溶性聚合物，容易通過添加其他物質來提高其性能。鈷離子對脯氨酸羧化酶抑制劑，通常作為缺氧模擬物，短時間可有效提高缺氧誘導因子蛋白量的性能，在文獻中表示增加組織血管生成。在本研究中，以聚乙烯醇為主要材料和鈷取代的羧基磷灰石（Co-HA）共混膜，討論羧基磷灰石鈷比例取代影響膜性能。該研究首先通過電化學沉積鈷取代的羧基磷灰石，鈦金屬作為陰極，在 55°C 下浸泡的電解質（4.2mM 硝酸鈣，2.5mM 磷酸二氫銨），固定電壓 20 分鐘。製備膜後，將聚乙烯醇在 80°C 下在去離子水中完全溶解，加入定量的鈷取代的羧基磷灰石粉末混合物，冷卻，倒入鐵氟隆模具中，然後在 45°C 烘箱中放置 48 小時。聚乙烯醇乾燥後/鈷取代羧基磷灰石（PVA-CoHA）膜分別進行反射傅立葉變換紅外光譜（ATR-FTIR）進行其結晶結構和表面化學成分分析，觀察了場發射掃描電子顯微鏡（FESEM）表面形貌。固定區域的樣品使用抗菌膜進行大腸桿菌檢測。發現聚乙烯醇薄膜材料原來無色，加入 Co-HA 呈現紫藍色，膜表面非常光滑，通過 FT-IR 分析可以看出，膜表面無明顯磷酸鹽官能機團，磷灰石可能分佈較寬。另外，抗菌膜的評價，大腸桿菌膜附著的 PVA-CoHA 數遠遠低於 PVA 和 PVA-HA 膜，但 PVA-CoHA 膜之間沒有顯著差異，由於鈷離子的取代比例相近，本研究將探討使用 PVA 後續加入不同鈷取代羧基磷灰石釋放行為的鈷離子及其對細胞的影響，希望未來可用於骨科和牙科的應用。

關鍵詞：電化學沉積、鈷取代羧基磷灰石、化學組成、晶體結構、抗菌。

Abstract

Polyvinyl alcohol is a water-soluble polymer, easy to improve their properties by to add other substances. Cobalt ions for proline hydroxylation enzyme inhibitors, often as hypoxia mimetic, a short time can effectively increase the performance of hypoxia inducible factor protein amount, expressed in the literature to increase tissue angiogenesis. In this study, polyvinyl alcohol as the main material and cobalt substituted hydroxyapatite (Co-HA) blended membrane was prepared to discuss hydroxyapatite in ratio of cobalt to replace affect membrane properties. This study firstly prepared by electrochemical deposition of cobalt substituted hydroxyl hydroxyapatite, titanium metal as a cathode, electrolyte soaked in 55 ° C (4.2 mM calcium nitrate, 2.5 mM ammonium dihydrogen phosphate), a fixed voltage 20 minutes. After preparation of membranes is completely dissolved polyvinyl alcohol at 80 ° C in deionized water, adding quantification of cobalt substituted hydroxyl hydroxyapatite powder mix, cool, pour into Teflon mold, and then into 45 ° C oven for 48 hours. Polyvinyl alcohol after drying / cobalt substituted hydroxyl hydroxyapatite (PVA-CoHA) membranes respectively reflective Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) performed its crystalline structure and surface chemical composition analysis, and field emission scanning electron microscope (FESEM) surface morphology was observed. Fixed area of the specimen using antibacterial membrane of *E. coli* testing. It was found that the polyvinyl alcohol film material originally colorless, after addition of Co-HA presents lavender, membrane surface is very smooth, the FT-IR analysis can be seen that membrane surface without penetrating peaks phosphate, apatite may be wider distribution resulting in no significant penetration peak performance. In addition, evaluation of antibacterial membranes, membrane of *E. coli* attached PVA-CoHA number is far lower than PVA and PVA-HA membrane, but no significant differences between the PVA-CoHA membrane, due to the substitution of cobalt ions similar proportions cause, this study will explore the use of PVA subsequent addition of different cobalt substituted hydroxyl apatite release behavior of cobalt ions and their impact on cells can be used in the future hope of orthopedic and dental applications.

Keywords: Electrochemical deposition, Cobalt substituted hydroxyapatite, Chemical composition, Crystal structure, Antibacterial.

報告內容

一、前言

糖尿病患者因長期血糖控制不佳導致糖尿病足潰瘍(Diabetic foot ulcers, DFUs)的產生，患者往往會伴隨著糖尿病神經病變、周邊動脈血管疾病與足部變形。以上病變會造成足部感覺、運動、循環功能與結構上的異常。由於傷口癒合的過程需仰賴細胞產生酪氨酸及賴氨酸的羥化反應，促使初膠原(pro-collagen)形成膠原，而細胞的複製過程需要氧氣，以纖維母細胞及血管內皮細胞為例所需之氧氣分壓為 40mmHg，因此當傷口產生癒合時，動脈血氧的供應會增加，臨床上多應用經皮氧分壓測定儀測試肢體末稍的經皮氧分壓，當經皮氧分壓小於 30mmHg，代表傷口癒合可能會較差，而局部組織氧氣分壓降至 20mmHg 以下，血管新生減少，纖維母細胞亦停止增生，減少細胞外基質的分泌。而缺氧環境同時抑制了白血球殺菌的功能。文獻指出在患者淺層感染、未曾接受治療的糖尿病足潰瘍傷口中，常存在好氧性革蘭氏陽性菌，例如金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)與溶血性鏈球菌(beta-hemolytic streptococci)。曾經接受過抗生素治療、深層與慢性感染的傷口，則常見混合大腸桿菌(*Escherichia coli*)，變型桿菌(*Proteus species*)及克雷伯氏肺炎菌(*Klebsiella species*)與厭氧性細菌如類桿菌屬(*Bacteroides species*)，梭菌屬(*Clostridium species*)，鏈球菌(*Peptococcus species*)及肺鏈球菌(*Peptostreptococcus species*)，對於近期曾住院過或曾接受過生素治療的糖尿病足部潰瘍患者而言，抗藥性金黃色葡萄球菌(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)是相當常見的病原菌。DFUs 的傷口可能會有嚴重和持續性感染，當發生潰瘍若不經適當治療，感染會導致周邊血管發生栓塞造成壞疽，致使造成下肢的截肢，或細菌透過血液循環擴散到全身引起敗血症，奪取患者的生命。

因此，選擇適當的治療方式以加速傷口癒合速度及減低患者受細菌感染的風險，是一個迫切的挑戰。臨床研究顯示適當地讓傷口處於濕潤環境中，有敷料吸收過多的分泌物，而且不會增加傷口感染的機會，相較於讓傷口保持乾燥下，其癒合速度較快。因此理想的傷口敷料需具備以下條件，(1)能提供保溫，氣體交換，並幫助排水和清除雜物，從而促進組織重建進程的能力。(2)具有生物相容性，不引起任何過敏反應或免疫反應的反應。(3)保護創傷面不會引起感染及(4)容易地移去除，並且不會造成二次創傷。現代先進敷料可用在感染期的清創類及抗菌類敷料，1995 年 Oclassen Pharmaceuticals Inc.於發明 Iodosorb Gel 及 Iodoflex Pad，敷料中含有優碘粉(cadexomer iodine)可藉由離子交換緩慢釋出碘離子，可與細胞內各種胞器進行氧化還原反應以殺死微生物，並吸收吸收膿與滲出物，清潔傷口表面並隔絕傷口與外界接觸，為第一個具清創能力並殺菌的敷料，但對碘過敏者或是

進行甲狀腺療程的患者不適用。1967年磺胺銀(Silver sulfadiazine, SSD)開始運用在燒傷傷口的治療。1987年Johnson & Johnson公司的推出在活性炭纖維布中加入了銀離子成為 Actisorb Plus 是第一個成功採用銀離子並取得商業化的醫用敷料。1998年加拿大的 Nucryst 公司於利用 Silcryst™ 奈米銀科技做出 Acticoat™ 抗菌銀敷料，利用真空鍍的方式在聚丙烯膜上鍍上一層奈米級銀顆粒所形成的薄膜(Ag 105mg/100cm²)。2000年，Organogenesis (MA,U.S.A.)所生產的 Apligraf 為目前美國 FDA 唯一核准用來治療糖尿病所引起的潰瘍及靜脈潰瘍的人工皮膚替代品(human skin equivalent, HSE)。二層的人工皮膚，其做法是先將人類真皮纖維母細胞種植在牛第一型膠原蛋白基質中六天後，細胞成長並分泌細胞外基質，形成類似真皮層的組織，再將來自人類新生兒包皮的角質細胞種植上去，讓角質細胞附著在真皮上，讓角質細胞開始分裂分化並形成表皮層，再將此雙層人工皮膚撕下，繼續培養在空氣及培養基的界面(air-liquid interface)，誘導表皮層更加成熟，最後再包裝運送。其優點在於癒合後表皮細胞仍舊由患者本身細胞所取代，但病人不須再承受傷口癒合撕裂的痛苦，可以一次完成表皮和真皮層的重建。但製造程序複雜，很難拿捏並具易碎性，且容易被降解，更由於含有異體細胞，有病毒傳入及產生免疫反應的危險性為其主要缺點。對於糖尿病足潰瘍患者而言，主動型敷料是較佳的選擇，以上大多數敷料不符合健保給付規定，皆需由患者自費，但有久不癒合慢性傷口的患者又大多來自經濟弱勢的族群，因此如何在讓患者省錢並達到治療傷口的目的是一個艱鉅的考驗。另外，主動型敷料也力有未逮無法完全處理深層與慢性感染的傷口。

二、研究目的

糖尿病問題傷口的治療牽涉到細菌感染的抑制及加快組織的增生速度以促使傷口早日修復，本研究將鈷取代氫氧基磷灰石以電沈積方式與具有光觸媒特性的二氧化鈦奈米管做結合，其中釋放之鈷離子可作為缺氧誘導因子的誘導劑，促使傷口組織大量產生血管新生，當微血管增加即可有改善組織的氧氣分壓，促使纖維母細胞合成細胞外基質，增快傷口修復速度。而二氧化鈦奈米管在本研究除作為鈷取代氫氧基磷灰石之載體外，其本身具有的光觸媒特性，可以讓傷口修復期間具有殺菌能力。

本研究分成以陽極氧化法製備二氧化鈦奈米管，透過電沈積方式將鈷取代氫氧基磷灰石與二氧化 碳奈米管結合，所產生的複合物以超音波振盪器與陽極極板分離後，將上述粉體與聚乙烯醇製備成奈米複合材料，再進行體外生物相容性測試及抗菌評估。本研究選擇聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA) 作為敷料基質，有鑒於聚乙烯醇本身的吸水特性，可有效吸收傷口之滲出液，此外，膨潤狀態的水膠膜為透明材質，便於臨床

醫師觀察傷口之癒後狀況，並可以藉由日光的照射可激發二氧化鈦奈米管的 抗菌效果。本研究之應用範圍除糖尿病足潰瘍的治療外，由於糖尿病患者亦是牙周病的高危險群，所製備之敷料亦可用作為組織導引再生膜，除可抑制結締組織的增生，膜材亦可誘導硬骨組織的增生，增加患者植牙之成功率。

三、文獻探討

鈷離子為脯胺酸羥基化酵素抑制劑，常作為缺氧模擬劑，短時間內可有效增加缺氧誘導性因子蛋白表現量，文獻中表示可增加組織血管、內皮細胞新生也是成骨過程中重要的部分[1]。Ying Dai等人發現氯化鈷的施用在新生大鼠中可以激活缺氧誘導因子(HIF-1 α)，並且可改善細胞凋亡和毛細血管損傷,幫助血管生成[2-4]。Nenad Ignjatovic'等人也記載上皮細胞在用鈷取代的羥基磷灰石接觸和對細胞存活率沒有負面影響,並且在增加鈷取代鈣離子，高達整體12%（重量）的量時加速骨形成的速率。[1]同時鈷取代的羥基磷灰石示出了用於醇的氧化脫氫以及為苯乙烯環氧化的方法的催化活性[5]。在其他文獻指出許多含鈷離子的氧化物中具有超順磁性的特性[6-8]，將可運用在細胞分離[9]，磁靶向藥物遞送和熱介體作為熱治療癌症，在生物應用為主要角色。1893年,C. Von Nageli的研究指出,金屬離子對於細菌和其它低等微生物有著致死效應。其殺菌強度大小順序為銀 > 汞 > 銅 > 鎘 > 鉻 > 鎳 > 鉛 > 鈷 > 鋅 > 鐵。而金屬離子可以殺菌種類眾多,且其不是直接將細菌毒化,而是使其細胞的新陳代謝停頓,進而自然的死亡,而屬多細胞生物體的人體,則不會有這些的危險。由於本身與銅.鉛.鋅.鎘金屬離子同屬於帶有二價陽離子的特性，因此可以做為取代氫氧基磷灰石中的鈣離子[10-12]。透過磷灰石結構中的鈣離子經由其他的離子取代交換讓我們能夠改變磷灰石具有的原本性質[8]，如晶格，結晶度，顆粒形態以及用於特定應用的其他所需的性質。然而目前氫氧基磷灰石可以藉由許多方式和成，列如電化學沈積法合成[13-21]，水熱法合成[1, 10, 11]，溶膠-凝膠法合成，濕式沉澱法合成[7, 8, 22, 23]和等離子噴塗法合成[24]。其中經由電化學沈積法合成，氫氧基磷灰石具有多種的形狀且可以容易的控制合成的條件以及在較低的溫度[15]中進行，儘管用作於塗層材料也幾乎不會對植入物的結構產生負面影響[13]。

聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol, PVA)為水凝膠的材料的一種，具有3D網架構的親水性高分子[25]，擁有彈性、含水性佳等特性,因此在生醫材上可作為特殊的用途，在液體中可吸濕膨潤，在膨潤的狀態下可保有巨體積的水份。同時為一種半結晶聚合物具有OH基和氫鍵作用[26, 27]，因為構造上屬於微孔結構親水性材料,形成的水膠具有吸濕性佳及具有高彈性在吸收和滲出的體液學構造與人體皮膚的性質相近，擁有良好的生物相容性、機械性能和足夠的生物相容性[28]與生物可分解廣泛應用在工業、藥物載體、醫療

領域。目前有許多的研究透過添加不同的奈米粒子增強PVA聚合物的機械性能[29]，並且經由不同納米顆粒提熱穩定性[25]、生物相容性[30-32]與抗菌效果[32-34]。

四、研究方法

4.1 鈷取代羧基磷灰石(Co-HA)的製備

用作陽極的鈷的陰極電沉積是 304 不銹鋼片(厚度為 $8 \times 4 \times 0.1 \text{cm}^3$, Extra Pure, Taiwan)。電解質如表 1 所示。42mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Shiada Chemical Works, Japan) 和 25mM Na_2HPO_4 (SHOWA, Japan) [35] 加入到 1L 蒸餾水中(使用 HCL 和 Tris 調節 pH 至 3.52)，另外分別加入 7.98mM 不同的鈷離子，鈷離子源為硫酸鈷、硝酸鈷和氯化鈷。電壓 5.5V (調節直流電源, GR-50H10, GICEK, Taiwan) 在 55°C 下 20 分鐘，最後在室溫下風乾。通過場發射掃描電子顯微鏡 (FESEM) (JSM-6700F, Japan JEOL, Japan) 的形態和表徵。和電感耦合等離子體質譜法 (ICP-OES-O-Optima 8300, PerkinElmer, USA)。

4.2 聚乙烯醇(PVA)和聚乙烯醇/鈷取代氫氧基磷灰石(PVA / Co-HA)奈米複合膜的製備

本研究的 PVA 得自 Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA)。PVA 的分子量為 70,000-110,000g/mol，水解度為 98.5%。通過將 1.4 出 85 克 PVA 和 0.015 克 HA 和不同的 Co-HA 加入 10mL 蒸餾水中並在 85°C 下攪拌 30 分鐘來製備均勻的 PVA 溶液。將 PVA / Co-HA 溶液在室溫下攪拌 24 小時。將 PVA / Co-HA 溶液滴到聚四氟乙烯 (PTFE) 模具 (直徑 90mm) 上並在室溫下乾燥以使溶劑完全蒸發出於評價目的，生物相容性將吸收 100 λ 的 PVA / Co-HA 溶液塗覆在圓形玻璃 ($\Phi 15\text{mm}$) 上。

4.3。形態和結構表徵

4.3.1 場發射掃描電子顯微鏡 (FESEM)

通過 FESEM (JSM-6700F, JEOL, Japan) 檢查 PVA 和 PVA / Co-HA 奈米複合膜的表面形態，使用在 3.2kV 下的 WD 3.2mm 進行觀察和測量。

4.3.2 X 射線衍射 (XRD)

通過 X 射線衍射儀獲得 X 射線衍射 (XRD) 圖，其中在 30kV 和 15mA 下產生 Cu K α 輻射 (Miniflex II, Rigaku, Japan)。在 $10^\circ - 70^\circ$ 的 2θ 範圍內以 0.02° 步長獲得 X 射線衍射圖。

4.3.3 傅立葉變換紅外 (FTIR)

所有樣品用在 650 cm^{-1} 至 4000 cm^{-1} 的光譜範圍內的光譜範圍為 2 cm^{-1} 的 FTIR 系統 (FTIR-8000, Shimadzu, JAPAN) 表徵。使用 ATR 技術的 FTIR 分光光度計。

4.3.4 PVA 和 PVA / Co-Ha 奈米複合膜的膨潤行為

了解 PVA 膜傷口與人體接觸獲得的腫脹行為。因此，我們將 PVA 膜浸沒在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中，並測量在不同時間點取出的腫脹行為。PBS 組合物具有 KCl, KH_2PO_4 , NaCl, Na_2HPO_4 。溶脹比可以作為時間的函數計算。膨脹率 (%) = $[(W_w - W_d) / W_d] \times 100\%$ ，其中 W_d 是樣品在乾燥狀態下的重量， W_w 是樣品在膨脹狀態下的重量。

4.3.5 熱重分析 (TGA)

通過熱重分析(2-HT, Mettler-Toledo, 瑞士)，在 10-600°C 的溫度範圍內以 10°C/ min 的加熱速率評價 Co-HA 和殘留 PVA 之間的含量。

4.4 超導量子干涉器件 (SQUID) 表徵

通過 SQUID (MPMS-5, Quantum Design, USA) 在 310K 下對磁場 ($50\text{kOe} < H < + 50\text{kOe}$) 進行 PVA 和 PVA / Co-HA 奈米複合膜的磁化測量。

4.5 PVA 和 PVA / Co-HA 奈米複合膜的生物礦化

用離子濃度幾乎等於人血漿 ($\text{K}^+ 5.0$, $\text{Na}^+ 142.0$, $\text{Ca}^{2+} 2.5$, $\text{Mg}^{2+} 1.5$, $\text{Cl}^- 3.0$, $\text{HCO}_3^- 4.2$, $\text{HPO}_4^{2-} 0$ 和 $\text{SO}_4^{2-} 0.5\text{mM}$; pH 7.42) 的離子濃度製備模擬體液(SBF)。將尺寸為 10mm × 20mm 的 PVA 和 PVA / Co-Ha 奈米複合膜浸漬在 10mL SBF 溶液中，將其密閉並保持在 37°C。1 和 7 天後取出樣品，用蒸餾水沖洗，並通過冷凍乾燥裝置 (FDU-1200, EYELA, Japan) 凍乾 24 小時。

4.6 PVA 和 PVA / Co-Ha 奈米複合材料膜的生物相容性

通過比色 MTT 測定法評價生物相容性。我們使用 L929 成纖維細胞的小鼠來源的建立的細胞系，在 37°C 下在 5%CO₂ 培養箱中維持在補充有 10%胎牛血清 (FBS) 的 Dulbecco's 改良的 Eagle 培養基 (DMEM) 中。在細胞接種之前，將圓形奈米複合膜 ($\Phi 15\text{mm}$) 用 UV 輻射滅菌 1 小時。然後，將滅菌的奈米複合膜置於 24 孔培養板中，用細胞密度為 5×10^4 個細胞/ mL 的細胞懸浮液接種，然後在 37°C，5%CO₂ 下培養 24, 48 及 72 小時，隨後抽出舊的培養基，然後在含有 1ml MTT 試劑的培養基中溫育 2 小時。除去培養基後，向孔中加入 0.2ml DMSO。將來自每個樣品的 0.15ml 溶液轉移到 96 孔板中，並在 570nm 的吸光度下測量光密度 (O.D.)。

4.7 PVA 和 PVA / Co-HA 奈米複合膜的抗菌效果

已經針對大腸桿菌作為革蘭氏陰性菌，通過菌落平板計數法來研究 PVA 和 PVA / Co-HA

納米複合膜，用於定量細菌效應。使用培養基（BHI，Becton，Dickinson and Company，USA）將大腸桿菌在 37°C 下培養 24 小時。將含有大腸桿菌的 BHI 稀釋至 10-11 倍，提取 1ml 細菌液體，切成圓盤狀（Φ5.5mm）的奈米複合膜，置入離心管中並定時 2 小時。取出樣品，放置新的 BHI 使用衝擊機衝擊 10 分鐘後，提取 100μl，塗佈於含有 BHI 培養皿上，37°C 培養 17 小時。最後，計數菌落，結果表示為降低百分率。

五、結果與討論

5.1 場發射電子顯微鏡

Co-HA 添加在 PVA 膜材中，均勻的包覆在 PVA 3D 的網狀結構(Figure 2,B-E)，其中有細部的結構可看見少數磷灰石的外露，由於 PVA 屬於水膠類的材料可溶於水中，在經過 distilled water at 37 °C for 1 day 後雖然整體結構完整，但表面經由冷凍固定膨潤狀態的 PVA 冷凍乾燥後使膜材收縮造成些微磷灰石外露的現象產生。energy dispersive X-ray (EDS) 分析 (Figure 3.B-E) 確認單純的 PVA 表面並無其他物質的污染，在 PVA-HA 偵測到的 Ca/P 為 1.51 然而 PVA-HAC、PVA-HAN and PVA-HAS 除了都有鈣與磷元素也出現鈷元素的存在(Figure 3.B-E)，Ca+Co/P 則分別為 1.40、1.62 and 1.18 均為缺鈣的氫氧基磷灰石。

5.2 X 光繞射分析

XRD 分析 PVA and PVA/Co-HA nanocomposite membranes 表面晶形分析，由於添加 Co-HA 含量只佔整體 1%，膜材表面並沒有新產生或 cobalt 的繞射峰(Figure 4.)，除了含量的因素以外另一個原因可能是 Co-HA 被 PVA 包覆因此無法觀測到。然而在表面大多為 PVA 的特性峰為 $2\theta = 19.41^\circ$ (101)、 22.74° (200)、 40.87° (110)、 43.06° (111) 各組間並沒有明顯的差異。

5.3 傅立葉變換紅外光譜

PVA and PVA/Co-HA nanocomposites membranes 的 ATR-FTIR 分析(Figure 5.)，PVA 的吸收峰包括 3275 cm^{-1} (stretching of OH)， 2941 、 2906 厘米 cm^{-1} (symmetric stretching of CH_2)， 1569 cm^{-1} (O-H and C-H bending)， 1416 cm^{-1} (bending of OH and wagging of CH_2)， 1658 、 1330 、 cm^{-1} (C=O)， 1142 cm^{-1} (CH wagging)， 1086 cm^{-1} (stretching of CO and bending of OH from amorphous sequence of PVA)， 920 cm^{-1} (CO symmetric stretching)， 837 cm^{-1} (CH_2 rocking) [25, 34, 36-39]。

5.4 膨潤度測試

PVA 膜材的膨潤度將影響藥物的釋放與傷口組織液的吸收，在本實驗中希望開發複合傷

口敷料，為了瞭解敷料與人體接觸時膨潤度的變化，將使用模擬體液(PBS, pH=7.42) 作為測試溶液，結果表明 PVA and PVA/Co-HA nanocomposites membranes 具有快速良好的膨潤性質(Figure 6)，再浸泡 PBS 一分鐘即達到 150%的膨脹率，之後持續的增加放置 24 小時達到 260%並保持平衡狀態，經過統計分析各組間並無顯著性的差異，說明在 PVA 膜材內添加 1%的 HA and Co-HA 對於膨潤度並無明顯的影響。

5.5 熱性質分析

PVA 在 100°C 徹底消除水份達到乾燥的狀態(Figure 8)[36]，加熱至 247~362°C PVA 快速的分解，然而 HA and Co-HA 相較於高分子材料擁有更高的熱穩定性，透過與 PVA 的混和提升膜材的熱性質，PVA-HAC 加熱至 400°C 殘量 20.75%明顯高於純 PVA 的殘餘量 13.32% (Table 2.)，若扣除 PVA-HAC 最終 600°C 的 Ash content 3.08%還是高於純 PVA 在 400°C 的殘餘量，說明除了膜材內本身的 Co-HA 的含量外還增加了 PVA 的熱性質。

5.6 磁性分析

先前的研究指出鈷離子的氧化物具有磁性的特性[6, 8, 40]，可做為特定的抗癌標把藥物載具，然而磁場的強度會因為添加的含量多寡而所影響，當膜材在-10000~10000 Gauss 的磁場範圍中每組樣品皆呈現逆磁性的結果(Figure 8.A)，然而將磁場範圍在-2000~2000 Gauss 卻發現 PVA-HAS、PVA-HAC 兩組具有反轉的現象產生(Figure 8. B)，並且符合先前粉體的磁性的分析果，由大到小依序分別排列為 HAS > HAN = HAC，由於 PVA-HAN 當中 Co-HA 的含量少於相同磁場的 PVA-HAC 所以並沒有發現順磁場現象，Figure 8.得知膜材中 Co-HA 實際含量具有 2~3%以上 PVA/Co-HA nanocomposites membranes 具有順磁場的表現。

5.7 細胞毒性測試

使用 L929 fibroblasts cultured 以 MTT 法瞭解 PVA and PVA/Co-HA nanocomposites membranes 的生物相容性以及測定生物材料的體外評估，Results are shown in Figure 9. PVA-HAC and PVA-HAN 在經過 24、48 and 72 小時雖然低於單純的 PVA 膜材但是隨著時間的增加細胞存活的比列卻沒有因此下降，細胞的存活率都達 70%以上並且有些為上升的趨勢，說明對於細胞並無明顯的傷害，另外在 72 小時 PVA-HA and PVA-HAS 細胞的數量都有表現出高於 PVA 的數量顯示出良好的細胞生存力。

5.8 抗菌試驗

PVA and PVA/Co-HA nanocomposites membranes 的抑制 *E. coli* 效果顯示，所有含 Co-HA 的樣品都有良好的抑制作用(Figure 10)，將培養皿上的菌落數目標記(n = 3)並以 The

single factor analysis of variance (ANOVA) method was used to assess the statistical significance of the results 數據化後為 Figure 11。由於在先前的文獻中指出鈷離子與最常出現使用在抗菌用途的銀離子同為具有抗菌能力的金屬離子，但鈷離子的效果在本研究中只有抑制而無法完全的殺死細菌(Figure 10 C-E)，因為鈷離子在膜材中含量不多加上 PVA 包覆而導致釋放的含量偏低所造成，但是與單純 PVA and PVA-HA 相較之下在統計學上具有顯著性的差異存在確實有提升膜材的抗菌效果，而 PVA-HAC、PVA-HAN and PVA-HAS 雖然來源不同但鈷離子的取代率卻相近介於 25~28%(Table 1.) 所以各組之間並沒有明顯的差異。

5.9 生物模擬礦化

表面的礦化結果為 Figure 12，將 PVA and PVA/Co-HA nanocomposites membranes 放入 37°C 的 SBF 溶液中浸泡 1 and 7 day，純 PVA 膜表面在不個時間點都沒有氫氧基磷灰石的產生，其餘的 PVA-HA and PVA-CoHa 都有發現氫氧基磷灰石的產生，尤其是在浸泡 7 天的 SBF 膜材的表面有大量的結晶存在，經過 EDS 分析表面 Ca/P 比例分別為;PVA-HA(1.29)、PVA-HAC(1.39)、PVA-HAN(1.31)、PVA-HAS(1.39)均為缺鈣的氫氧基磷灰石，同時發現磷灰石結晶的樣貌有所不同，PVA-HA 結晶的形貌為片狀且平整的氫氧基磷灰石，反觀 PVA-HAC、PVA-HAN、PVA-HAS 雖然是片狀結晶但卻分成區域式的聚集而非平整的一片，原因可能是鈷離子在礦化的過程程中造成的現象。

HA and Co-HA in PVA/Co-HA nanocomposites membranes 中實際含量約佔整體的 1-3%，並且在 PBS 溶液中短時間內有快速膨脹的特性。添加 Co-HA 在 -2000~2000 Gauss 膜材中具有些微的順磁性表現，其中以 PVA-HAS 為最高。細胞毒性表明單純的 HA 添加在 72 小時後可提高細胞存活的數量，同時添加 Co-HA 的樣品中也都具有 70% 以上的存活率。另外在抗菌的測試中含有加 Co-HAC 的膜材與其他組別相比擁有明顯抑制大腸桿菌的生長能力。生物礦化的結果，不論添加 HA or Co-HA 都有助於氫氧基磷灰石沉積於膜材的表面，促進 PVA 膜材表面使磷灰石結晶而獲得良好礦化的表面。未來將繼續研究 PVA-CoHA 對於上皮細胞與血管新生的影響，同時希望藉由膜材磁性效果與抑制細菌的特性，運用在治療癌症的特定標靶藥物載具或傷口敷料的運用。

六、參考文獻

1. Ignjatović, N., et al., *Nanoparticles of cobalt-substituted hydroxyapatite in regeneration of mandibular osteoporotic bones*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2013. **24**(2): p. 343-354.
2. Dai, Y., et al., *Preconditioning and post-treatment with cobalt chloride in rat model of perinatal hypoxic–ischemic encephalopathy*. Brain and Development, 2014. **36**(3): p. 228-240.
3. Loboda, A., et al., *Heme oxygenase-1-dependent and-independent regulation of angiogenic genes expression: effect of cobalt protoporphyrin and cobalt chloride on VEGF and IL-8 synthesis in human microvascular endothelial cells*. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France), 2005. **51**(4): p. 347.
4. Tanaka, T., et al., *Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model*. Laboratory investigation, 2005. **85**(10): p. 1292-1307.
5. Opre, Z., T. Mallat, and A. Baiker, *Epoxidation of styrene with cobalt-hydroxyapatite and oxygen in dimethylformamide: A green technology?* Journal of Catalysis, 2007. **245**(2): p. 482-486.
6. Sarath Chandra, V., et al., *Synthesis of magnetic hydroxyapatite by hydrothermal–microwave technique: Dielectric, protein adsorption, blood compatibility and drug release studies*. Ceramics International, 2015. **41**(10): p. 13153-13163.
7. Kramer, E., E. Itzkowitz, and M. Wei, *Synthesis and characterization of cobalt-substituted hydroxyapatite powders*. Ceramics International, 2014. **40**(8): p. 13471-13480.
8. Kramer, E.R., et al., *Synthesis and characterization of iron-substituted hydroxyapatite via a simple ion-exchange procedure*. Journal of Materials Science, 2013. **48**(2): p. 665-673.
9. Wang, D., et al., *Fabrication of superparamagnetic hydroxyapatite with highly ordered three-dimensional pores*. Journal of materials science, 2009. **44**(15): p. 4020-4025.
10. Stojanović, Z., et al., *Hydrothermal synthesis of nanosized pure and cobalt-exchanged hydroxyapatite*. Materials and manufacturing processes, 2009. **24**(10-11): p. 1096-1103.
11. Veselinović, L., et al., *Crystal structure of cobalt-substituted calcium hydroxyapatite nanopowders prepared by hydrothermal processing*. Journal of Applied Crystallography, 2010. **43**(2): p. 320-327.
12. Stanić, V., et al., *Synthesis, structural characterisation and antibacterial activity of Ag⁺-doped fluorapatite nanomaterials prepared by neutralization method*. Applied Surface Science, 2015. **337**: p. 72-80.
13. Isa, N.N.C., Y. Mohd, and N. Yury, *Electrochemical Deposition and Characterization of Hydroxyapatite (HAp) on Titanium Substrate*. APCBEE Procedia, 2012. **3**: p. 46-52.
14. Yousefpour, M., et al., *Nano-crystalline growth of electrochemically deposited apatite coating on pure titanium*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2006. **589**(1): p. 96-105.
15. Parchaon, Y., et al., *Hydroxyapatite electrodeposition on anodized titanium nanotubes for orthopedic*

- applications*. Applied Surface Science, 2014. **311**: p. 54-61.
16. Park, J.-H., et al., *Bioactivity of calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid*. Materials letters, 2006. **60**(21): p. 2573-2577.
 17. Hayakawa, T., M. Kawashita, and G.H. Takaoaka, *Coating of hydroxyapatite films on titanium substrates by electrodeposition under pulse current*. Journal of the Ceramic Society of Japan, 2008. **116**(1349): p. 68-73.
 18. Manso, M., et al., *Electrodeposition of hydroxyapatite coatings in basic conditions*. Biomaterials, 2000. **21**(17): p. 1755-1761.
 19. Park, J.-H., et al., *Bioactive calcium phosphate coating on sodium hydroxide-pretreated titanium substrate by electrodeposition*. Journal of the American Ceramic Society, 2004. **87**(9): p. 1792-1794.
 20. Dumelie, N., et al., *In vitro precipitation of electrodeposited calcium-deficient hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V substrate*. Materials Characterization, 2008. **59**(2): p. 129-133.
 21. Lee, K., et al., *Hydroxyapatite coating on micropore-formed titanium alloy utilizing electrochemical deposition*. Thin Solid Films, 2013. **549**: p. 154-158.
 22. Kothapalli, C., et al., *Influence of temperature and concentration on the sintering behavior and mechanical properties of hydroxyapatite*. Acta Materialia, 2004. **52**(19): p. 5655-5663.
 23. Cox, S.C., et al., *Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation*. Materials Science and Engineering: C, 2014. **35**: p. 106-114.
 24. Kramer, E., J. Podurgiel, and M. Wei, *Control of hydroxyapatite nanoparticle morphology using wet synthesis techniques: Reactant addition rate effects*. Materials Letters, 2014. **131**: p. 145-147.
 25. Tang, C.-M., Y.-H. Tian, and S.-H. Hsu, *Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites Reinforced with Bamboo Charcoal Nanoparticles: Mineralization Behavior and Characterization*. Materials, 2015. **8**(8): p. 4895-4911.
 26. Watanabe, J., et al., *Smectic liquid crystals in main-chain polymers*. Progress in polymer science, 1997. **22**(5): p. 1053-1087.
 27. Chetri, P., N.N. Dass, and N.S. Sarma, *Conductivity studies of poly (vinyl alcohol)-iodine complex membrane*. Polymer Bulletin, 2007. **58**(3): p. 489-494.
 28. Matsumura, K., et al., *Control of proliferation and differentiation of osteoblasts on apatite-coated poly (vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage material*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010. **92**(4): p. 1225-1232.
 29. Ismail, H., P. Freakley, and E. Sheng, *The effect of carbon black particle size on multifunctional additive-carbon black interaction*. European polymer journal, 1995. **31**(11): p. 1049-1056.
 30. Becaro, A.A., et al., *Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans*. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 2015. **3**: p. 22-29.

31. Liu, R., et al., *A facile route of microwave to fabricate PVA-coating Ag nanofilm used as NIR-SERS active substrate*. Applied Surface Science, 2013. **270**: p. 495-502.
32. Bryaskova, R., et al., *Cell adhesive behavior of PVA-based hybrid materials with silver nanoparticles*. Surface and Coatings Technology, 2013. **235**: p. 186-191.
33. Ramdayal and K. Balasubramanian, *Antibacterial application of polyvinylalcohol-nanogold composite membranes*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014. **455**: p. 174-178.
34. Bryaskova, R., et al., *Synthesis, characterisation and antibacterial activity of PVA/TEOS/Ag-Np hybrid thin films*. J Colloid Interface Sci, 2010. **349**(1): p. 77-85.
35. He, C., et al., *Electrodeposition on nanofibrous polymer scaffolds: Rapid mineralization, tunable calcium phosphate composition and topography*. Advanced functional materials, 2010. **20**(20): p. 3568-3576.
36. Vashisth, P., et al., *A novel gellan-PVA nanofibrous scaffold for skin tissue regeneration: Fabrication and characterization*. Carbohydr Polym, 2016. **136**: p. 851-9.
37. Shi, Y., et al., *Swelling, mechanical and friction properties of PVA/PVP hydrogels after swelling in osmotic pressure solution*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016. **65**: p. 172-80.
38. Mishra, S.K., J.M. Ferreira, and S. Kannan, *Mechanically stable antimicrobial chitosan-PVA-silver nanocomposite coatings deposited on titanium implants*. Carbohydr Polym, 2015. **121**: p. 37-48.
39. Abdelrazek, E.M., I.S. Elashmawi, and S. Labeeb, *Chitosan filler effects on the experimental characterization, spectroscopic investigation and thermal studies of PVA/PVP blend films*. Physica B: Condensed Matter, 2010. **405**(8): p. 2021-2027.
40. Mirzaee, S., S. Farjami Shayesteh, and S. MahdaviFar, *Anisotropy investigation of cobalt ferrite nanoparticles embedded in polyvinyl alcohol matrix: A Monte Carlo study*. Polymer, 2014. **55**(16): p. 3713-3719.

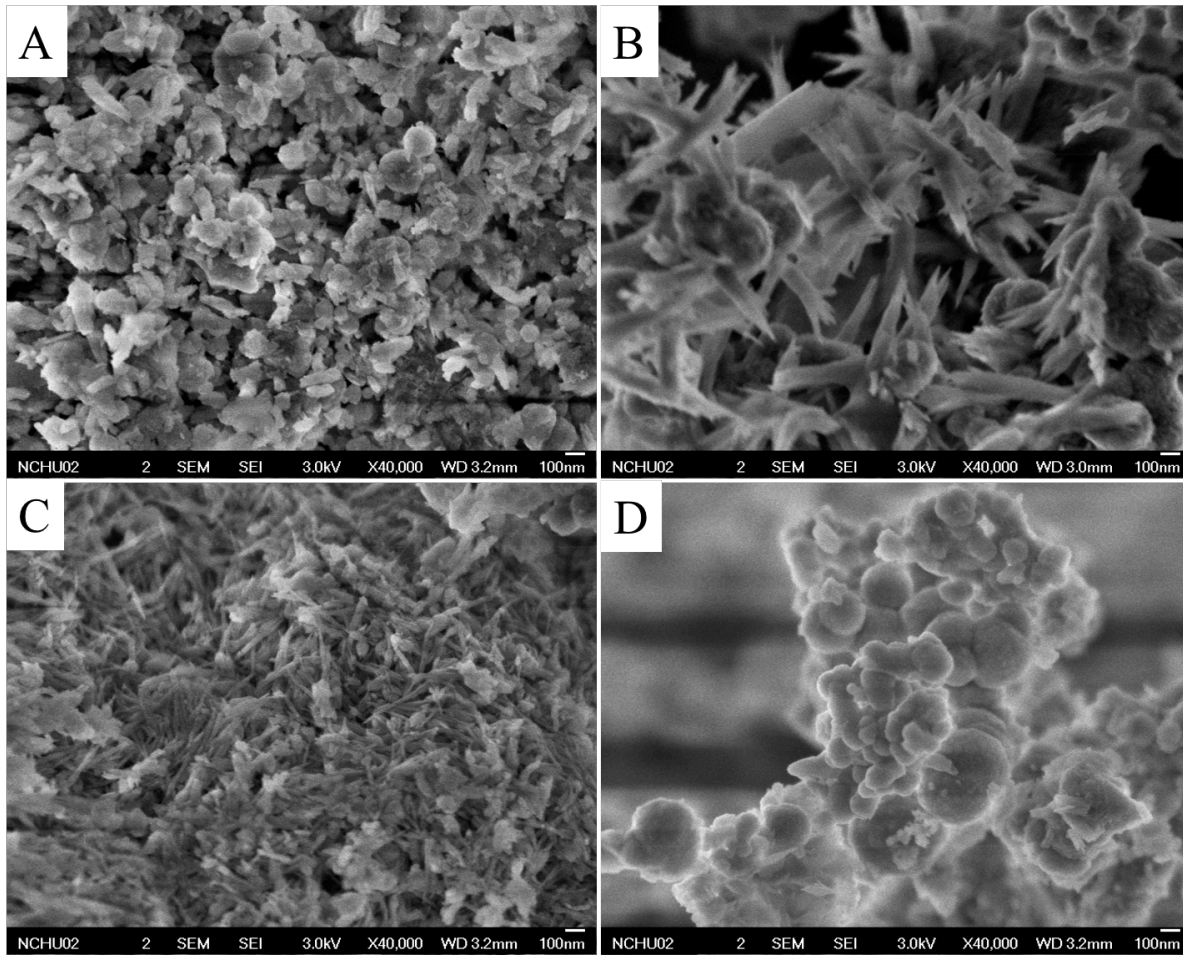


Figure 1. Surface morphology of (A) hydroxyapatite and cobalt substituted hydroxyapatite with (B) Co-HAC, (C) Co-HAN and (D) Co-HAS by FESEM.

Table 1. Element analysis of hydroxyapatite and cobalt substituted hydroxyapatite by ICP-AA

| Specimen | Ca (mole) | P (mole) | Co (mole) | Ca+Co/P | Xco (mole%) | Co Ions source |
|----------|--------------|-------------|--------------|---------|----------------|-------------------|
| HA | 7.650 | 5.194 | - | 1.472 | - | - |
| Co-HAC | 5.500 | 4.452 | 4.000 | 2.133 | 28.7 | CoCL ₂ |
| Co-HAN | 5.650 | 4.290 | 3.470 | 2.125 | 25.9 | CoNO ₃ |
| Co-HAS | 5.650 | 4.258 | 3.426 | 2.131 | 25.7 | CoSO ₄ |

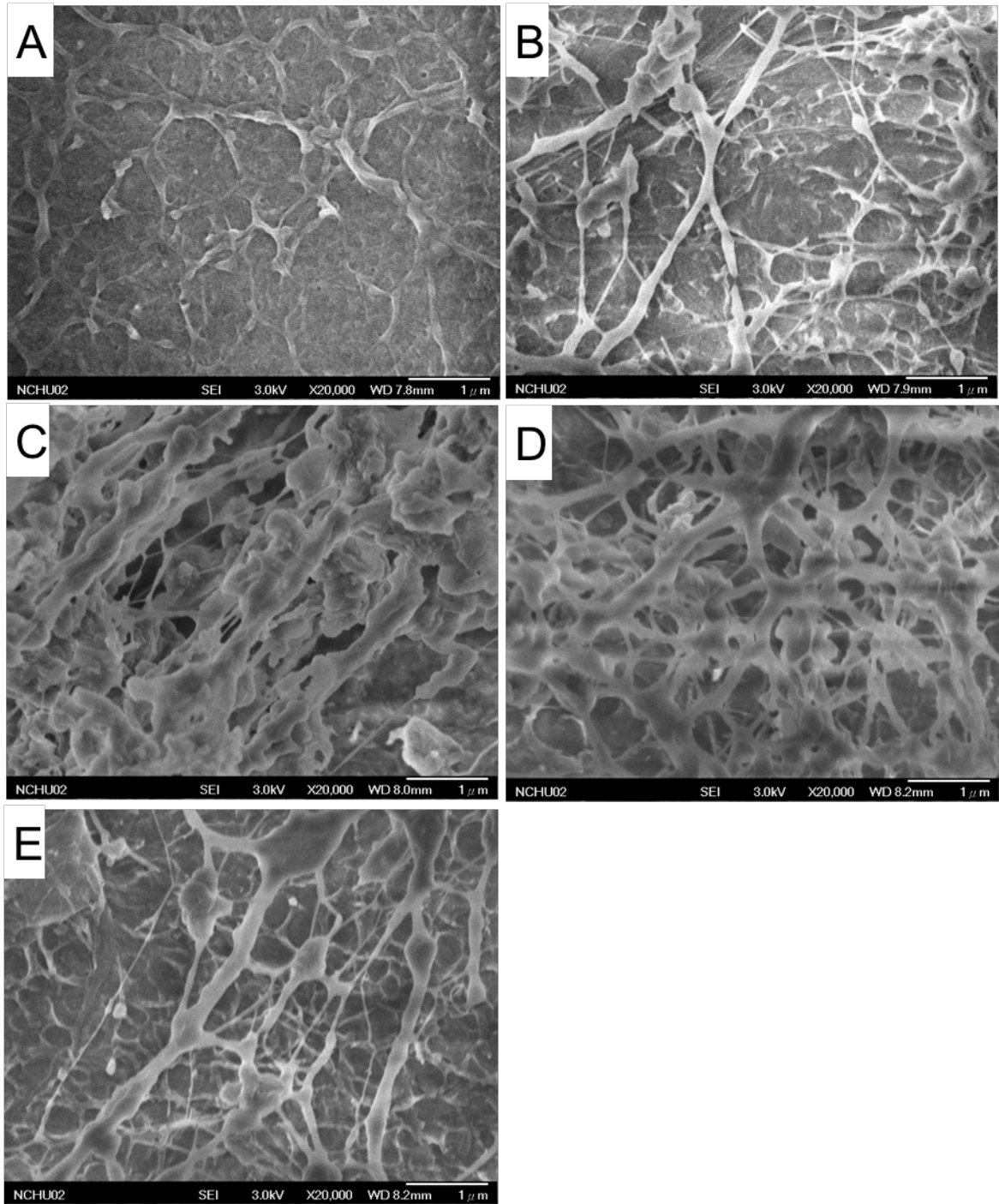


Figure 2. Surface morphology of (A)PVA (B)PVA-HA (C)PVA-HAC (D)PVA-HAN (E)PVA-HAS nanocomposite membranes in distilled water at 37 °C for 1 day.

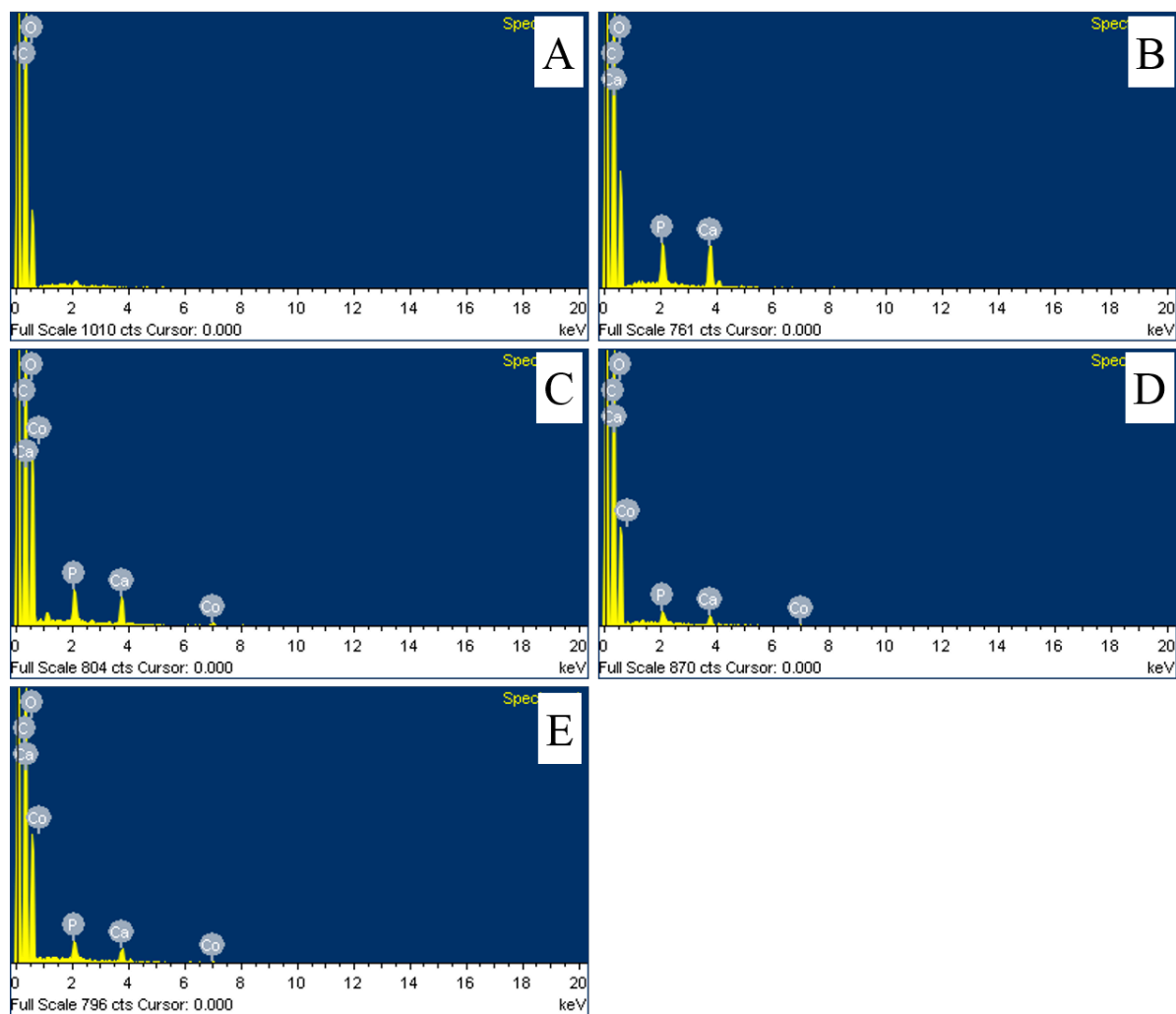


Figure 3. EDS of (A)PVA (B)PVA-HA (C)PVA-HAC (D)PVA-HAN (E)PVA-HAS nanocomposite membranes in distilled water at 37 °C for 1 day.

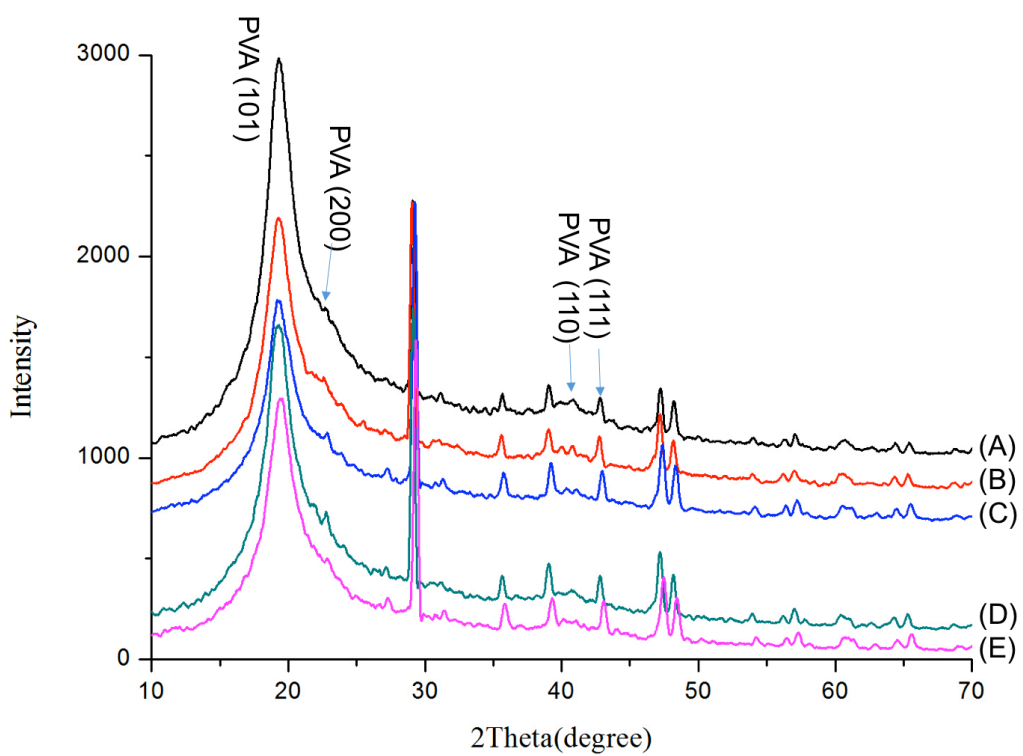


Figure 4. XRD patterns of (A)PVA (B)PVA-HA (C)PVA-HAC (D)PVA-HAN (E)PVA-HAS nanocomposite membranes.

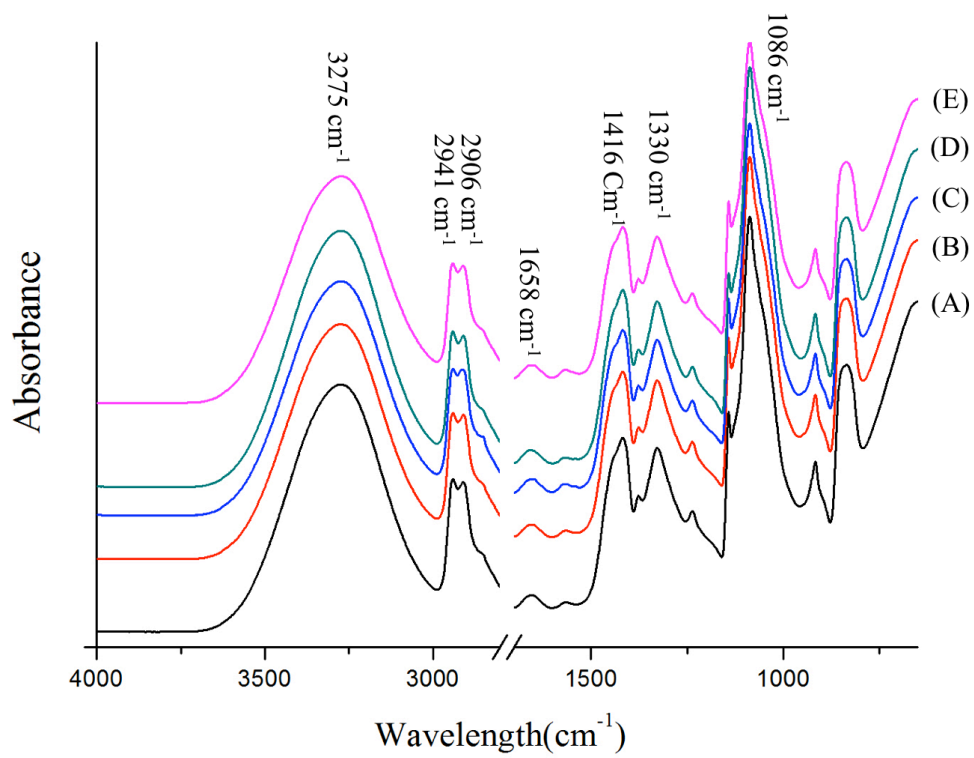


Figure 5. ATR-FTIR spectra of (A)PVA (B)PVA-HA (C)PVA-HAC (D)PVA-HAN (E)PVA-HAS nanocomposite membranes.

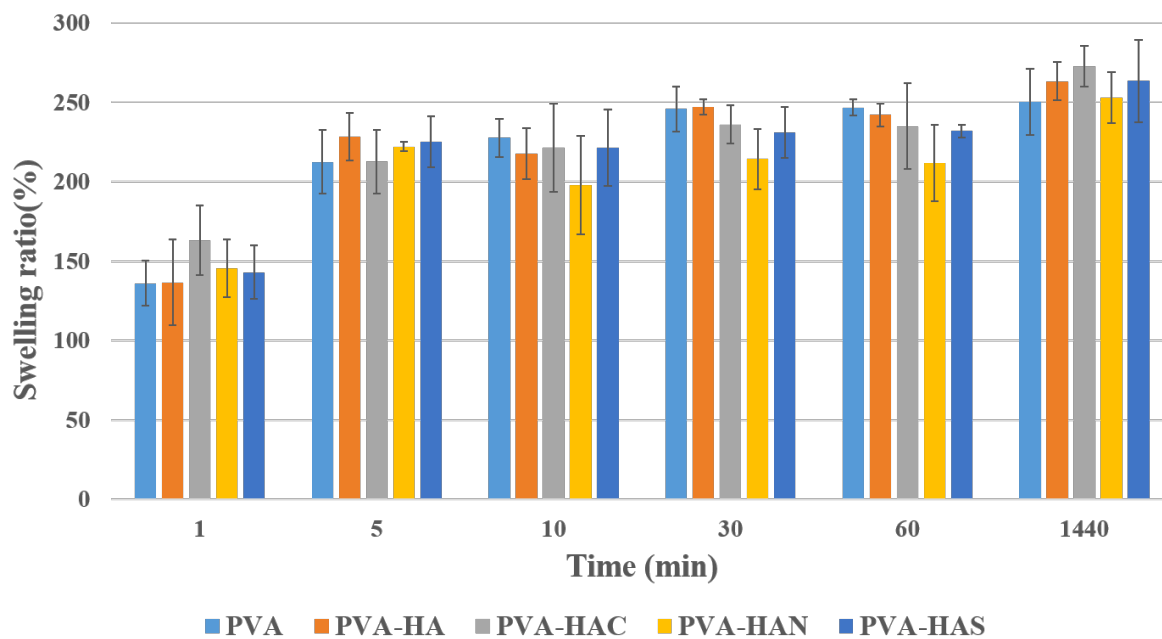


Figure 6. Swelling behaviors of PVA and PVA/ Co-HA nanocomposite membranes in PBS

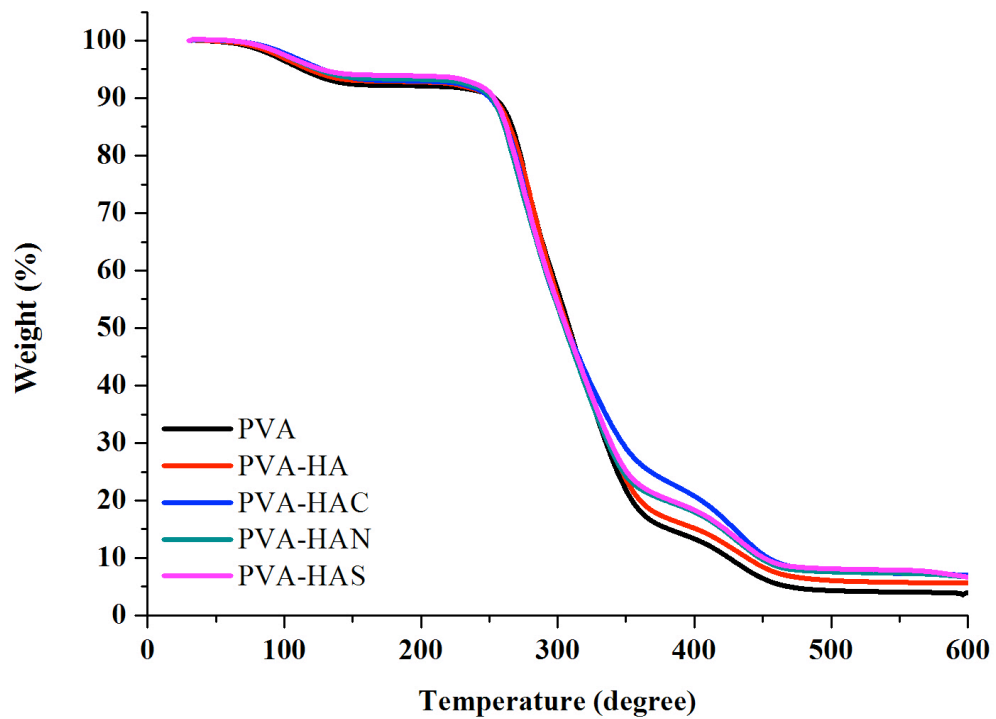


Figure 7. TGA analysis of PVA and PVA/Co-HA nanocomposite membranes.

Table 2. thermal degradation PVA and PVA/Co-HA nanocomposite membranes by TGA

| sample | 100 °C (%) | 200 °C (%) | 300 °C (%) | 400 °C (%) | 500 °C (%) | 600 °C (%) | Ash content(%) |
|---------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|
| PVA | 96.51 | 92.12 | 56.44 | 13.32 | 4.32 | 3.91 | 0 |
| PVA-HA | 96.96 | 92.82 | 55.33 | 15.15 | 6.08 | 5.61 | 1.7 |
| PVA-HAC | 97.84 | 92.96 | 53.79 | 20.75 | 7.72 | 6.99 | 3.08 |
| PVA-HAN | 97.50 | 93.27 | 53.71 | 17.99 | 7.61 | 6.67 | 2.76 |
| PVA-HAS | 97.54 | 93.84 | 54.26 | 18.34 | 8.13 | 6.66 | 2.75 |

Ash content(%) = PVA-HA and PVA-CoHA deduction PVA in 600 °C (%)

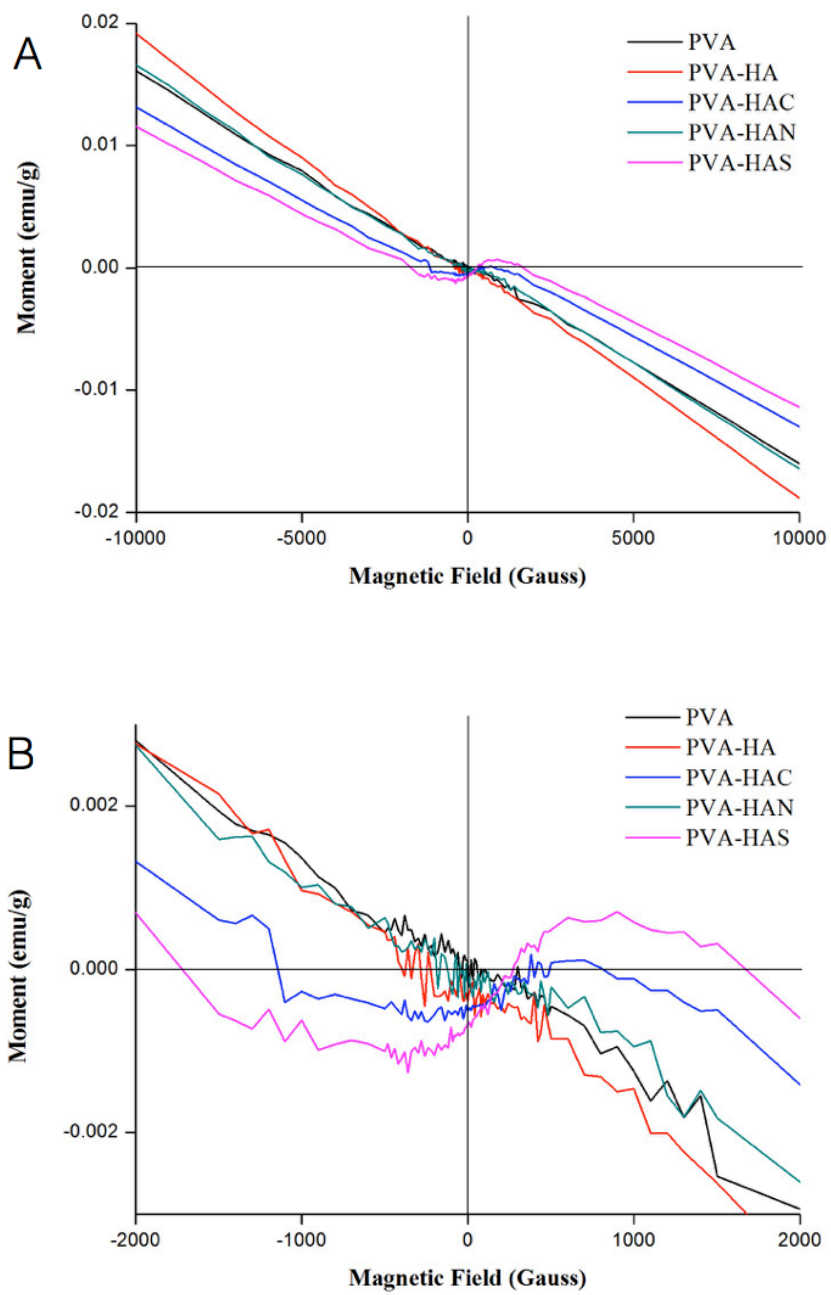


Figure 8. Mass magnetization measurements of PVA and PVA/Co-HA nanocomposite membranes, (A)-10000~10000; (B)-2000~2000 Gauss.

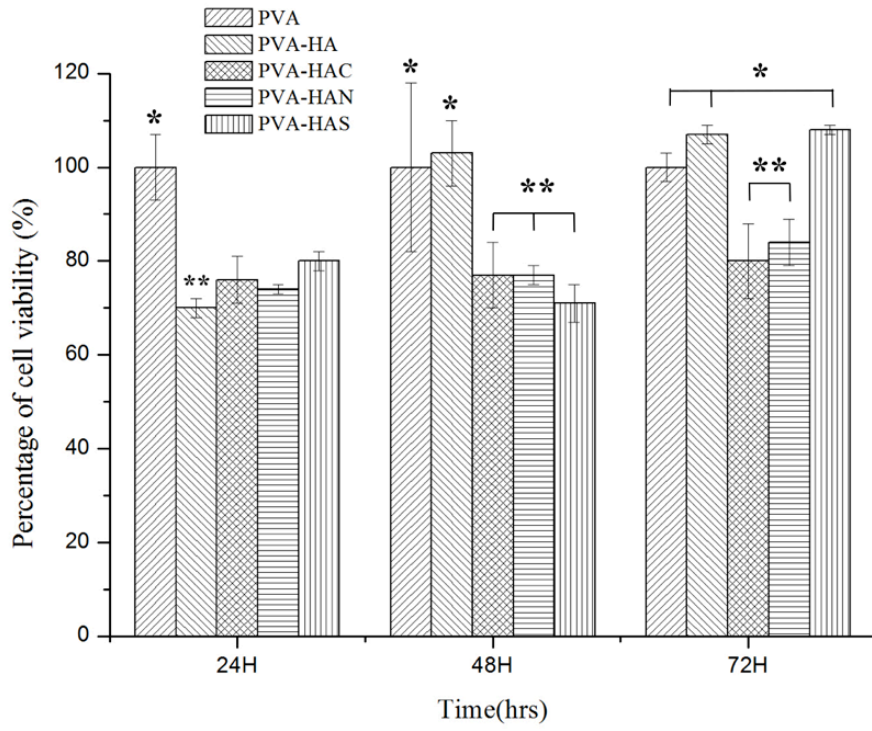


Figure 9. Biocompatibility of the PVA and PVA/Co-HA nanocomposite membranes (P<0.05).

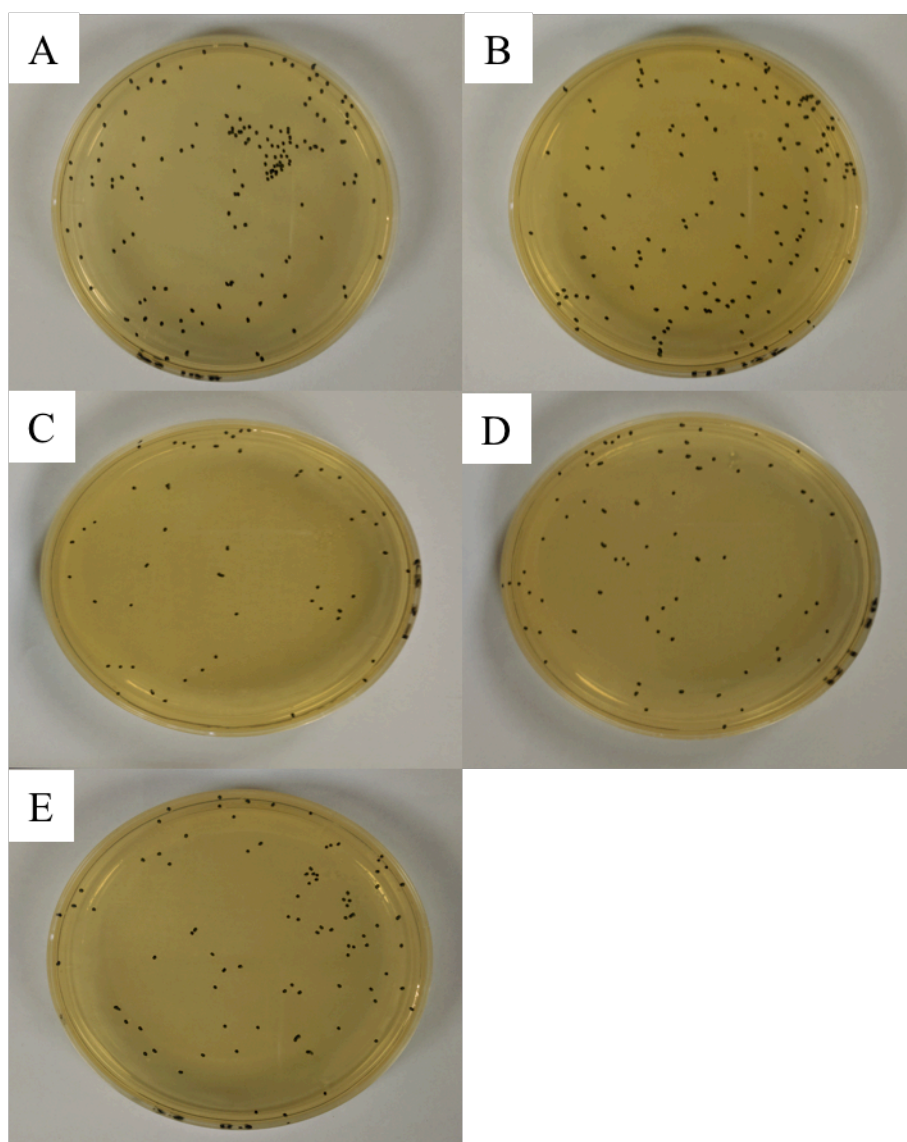


Figure 10. Antibacterial effect of (A)PVA; (B)PVA-HA; (C)PVA-HAC; (D)PVA-HAN; (E)PVA-HAS nanocomposite membranes.

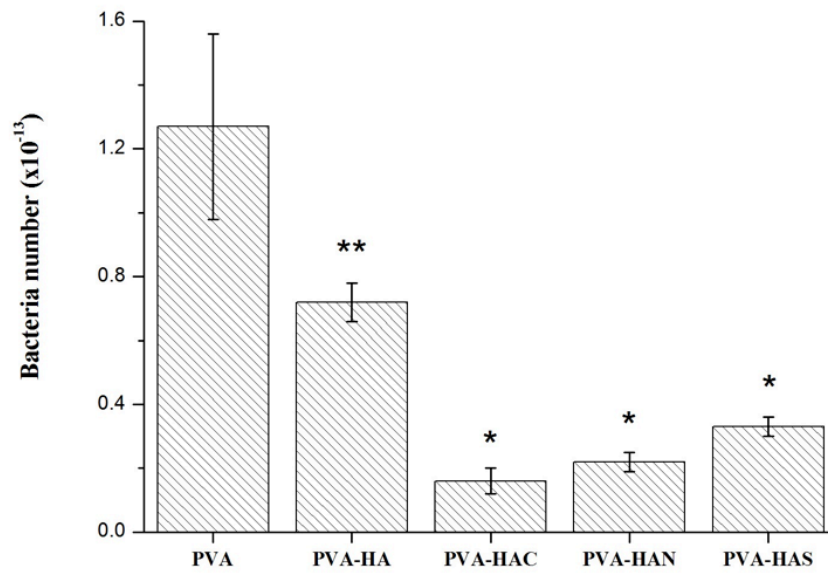


Figure 11. Bacteria adhesion on PVA and PVA/Co-HA nanocomposite membranes ($P < 0.05$).

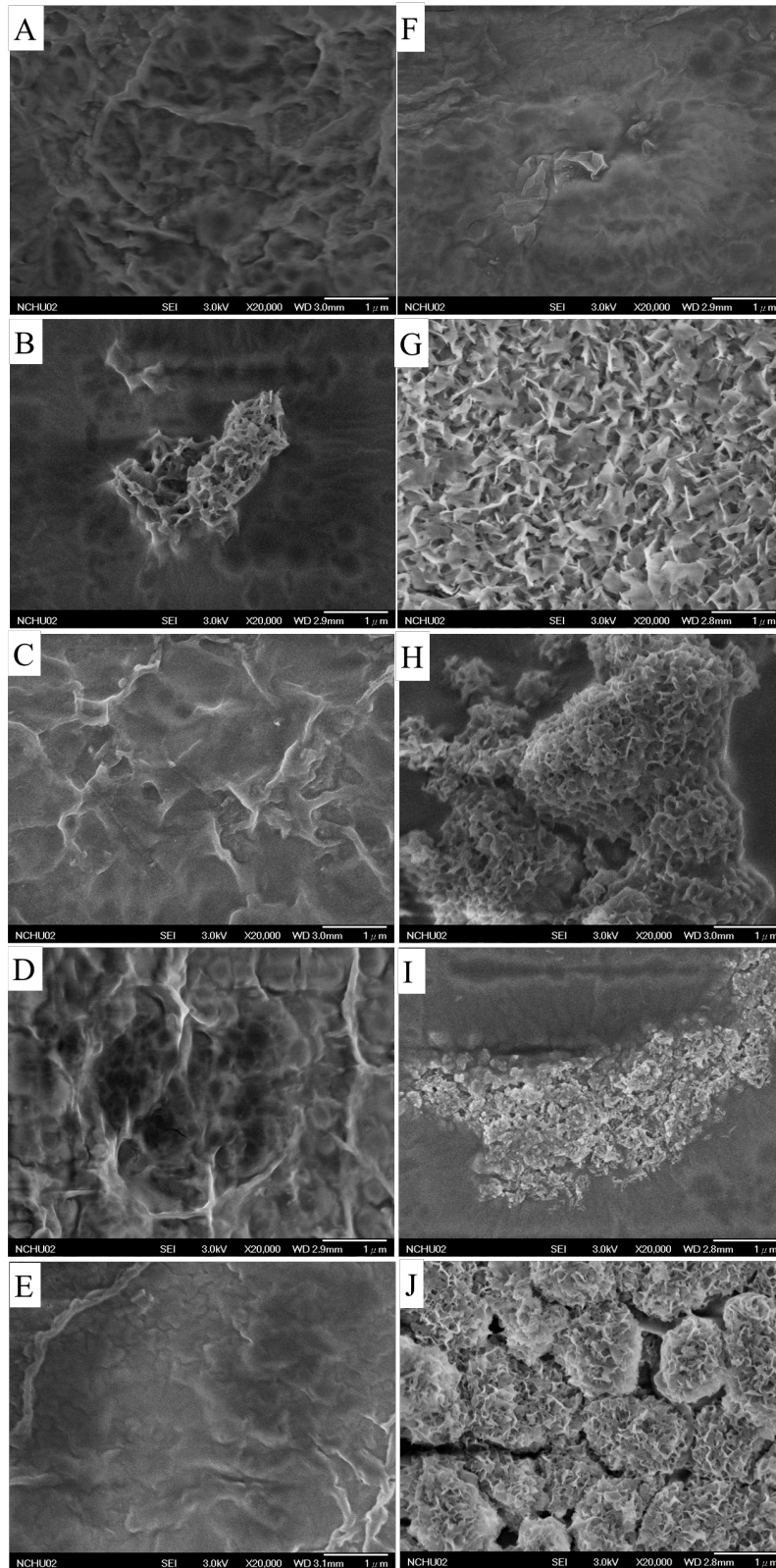


Figure 12. Surface morphology of (A.F)PVA; (B.G)PVA-HA; (C.H)PVA-HAC; (D.I)PVA-HAN; (E.J)PVA-HAS after immersion in simulated body fluid (SBF) for 1 (A-E) and 7 (F-J) days.

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：105 年 10 月 31 日

| | | | |
|--------|---|---------|-----------------------|
| 計畫編號 | MOST 104-2633-E-404-002- | | |
| 計畫名稱 | 鈷取代氫氧基磷灰石與二氧化鈦奈米管複合物/聚乙烯醇膜材運用在糖尿病病足的傷口修復 | | |
| 出國人員姓名 | 湯正明 | 服務機構及職稱 | 中山醫學大學口腔科學研究所 助理教授 |
| 會議時間 | 104 年 12 月 9 至 104 年 12 月 11 日 | 會議地點 | 日本東京醫科齒科大學 |
| 會議名稱 | 第 15 屆亞洲生物陶瓷研討會 15th Asian BioCeramics symposium | | |
| 發表題目 | 通過電沉積方式改變電解液組成對鈷取代羥基磷灰石之影響 Effect of the electrolyte composition of cobalt substituted hydroxyapatite by electrodeposition process | | |

一、參加會議經過

104 年 12 月 9 日下午由桃園國際機場出發至日本東京成田國際機場，於東京東京醫科齒科大學醫學院進行報到。104 年 12 月 10 日與 104 年 12 月 11 日聆聽大會專題演講及大會壁報論文；與與會各國專家學者交流。4. 104 年 12 月 12 日與本所燕敏教授(東京醫科齒科大學校友)參觀東京醫科齒科大學研究室與校園。101 年 12 月 13 日下午返回台灣。

二、與會心得

本人是第一次參加亞洲生物陶瓷學術會議，本次會議主要發表透過不同含鈷離子的藥品來源，採用電化學沈積的方式合成出不同的鈷取代氫氧基磷灰石，其鈷含量介於 25-28%。經由 XRD 的分析可以發現經由退火處理過後的磷灰石結晶度都有明顯的提高。製備成聚乙烯醇/鈷取代氫氧基磷灰石膜材，大腸桿菌貼附在膜材數量遠低於聚乙烯醇及聚乙烯醇/氫氧基磷灰石膜材，以上結果由博士班研究生林煒竣同學在大會上口頭發表論文，會議參與學者也給予許多意見供我們在後續進行改良。本次會議日本國國家先進工業科學技術研究所 Oyane Ayako 博士的報告最讓我注意，其研究團隊運用雷射穿透磷酸鹽溶液，可促使基材表面產生磷灰石的沈積，其結果從 2009 年至 2015 年間發表了六篇研究論文在 ACS applied materials & interfaces, Colloids and Interface Science Communications, Journal of Biomedical Materials Research Part A, Physical Chemistry Chemical Physics 以及 RSC Advances 等期刊上，其中基材的吸熱程度會影響到磷灰石的沉積，因此給了我們一些改善的空間，高分子基材比較不能耐熱，但是可藉由添加填充粒子增加吸熱能力以提高基材溫度，例如本研究室所製備之聚乙烯醇/竹炭奈米複合材料，就可藉由相同方式提高生物礦化能力，而在光源的部分，由於雷射光源要掃描大面積需要花費相當多的

時間，因此遠紅外線光源或許是一個可行的途徑。本次會議也與澳洲昆士蘭大學邊專教授討論相關的研究主題，其團隊是分析鈷離子釋出對於生物相容性之影響，比較偏重在細胞毒性以及其反應機轉，但可共本研究團隊在未來實驗設計上更為精確。

三、發表論文全文或摘要

Objective: Cobalt has been reported to mimic hypoxia, up-regulating hypoxia inducible factor-1 α in many different cell types [1]. This study focuses on the influence of the electrolyte composition in synthesis of cobalt-substituted hydroxyapatite (Co-HA) by electrochemical deposition, including chemical composition, morphology, and dissoluble rate of Co²⁺. Method: The electrolyte was prepared by dissolving 42mM calcium nitrate and 25mM ammonium dihydrogen phosphate in distilled water. A quantity of cobalt ion that would allow for 10.6 % (mole %) substitution was added to the electrolyte. The pH of electrolyte was buffered at 3.52. The titanium and stainless steel plate were used as a cathode and anode, respectively. The electrochemical deposition of hydroxyapatite (HA) was carried out at constant potential, 5.5V, at 55°C for 20 min. The deposition on cathode was cleaned with de-ionized water for several times and dried. The morphology and chemical composition of deposition were analyzed by FESEM and ICP-MS. HA and Co-HA powder was soaked in phosphate buffer solution (PBS) at 37°C for 168h, and the concentration of Ca²⁺, Co²⁺ and PO₄³⁻ in the PBS was determined by ICP-MS. Results and Discussion: In our study, synthesized apatite by XRD and FTIR confirmed is hydroxyapatite [2]. ICP-MS results showed that the synthesis of hydroxyapatite has the presence of cobalt and substitution percentage is 25.7 to 28.9% (Table 1). HA had an irregular needle-like shape. When calcium atom of HA was replaced to cobalt atom. The needle-like crystal was conversed to globular cluster. When substitution rate of cobalt ion was decrease then cluster size was decrease. Degradation is consistent with the above experimental results. Conclusion: In our study, Co-HA was success synthesized by electrochemical methods and have high substitution rates. This subsequent study will examine the behavior of cobalt substituted hydroxyapatite release cobalt ions and its effect on cells, the future hope to use in orthopedic and dental applications.

[1] Ignjatović, N., et al., Nanoparticles of cobalt-substituted hydroxyapatite in regeneration of mandibular osteoporotic bones. *J Mater Sci Mater Med.* 24, 343-354 (2013).

[2] Stanić, V., et al., Synthesis, structural characterization and antibacterial activity of Ag⁺-doped fluorapatite nanomaterials prepared by neutralization method. *Appl Surf Sci.*, 337, 72-80 (2015).

Table 1. Element assay of HA and Co-HA by ICP-MS

| Sample | Electrolyte | Ca/P | (Ca+Co)P | X _{Co} (mole %) | dissoluble rate of Co ²⁺ at 168h (%) |
|--------|-------------------|-------|----------|--------------------------|---|
| HA | - | 1.473 | 1.473 | - | 0 |
| Co-HAC | CoCl ₂ | 1.235 | 2.133 | 28.7 | 0.54 |
| Co-HAN | CoNO ₃ | 1.317 | 2.125 | 25.9 | 1.35 |
| Co-HAS | CoSO ₄ | 1.327 | 2.131 | 25.7 | 0.69 |

四、建議

國際會議的註冊費逐年明顯提高，建議國科會補助是否可以升高。

五、攜回資料名稱及內容

1. 會議論文集一本

六、其他

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/10/31

| | |
|-----------|--|
| 科技部補助計畫 | 計畫名稱: 鈷取代氫氧基磷灰石與二氧化鈦奈米管複合物/聚乙烯醇膜材運用在糖尿病病足的傷口修復 |
| | 計畫主持人: 湯正明 |
| | 計畫編號: 104-2633-E-040-002- 學門領域: 生醫材料 |
| 無研發成果推廣資料 | |

104年度專題研究計畫成果彙整表

| | | | | | | | |
|---|----------|-----------|--------------------------|-----|---|---|--|
| 計畫主持人：湯正明 | | | 計畫編號：104-2633-E-040-002- | | | | |
| 計畫名稱：鈦取代氫氧基磷灰石與二氧化鈦奈米管複合物/聚乙烯醇膜材運用在糖尿病病足的傷口修復 | | | | | | | |
| 成果項目 | | | 量化 | 單位 | 質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等) | | |
| 國內 | 學術性論文 | 期刊論文 | | 0 | 篇 | | |
| | | 研討會論文 | | 0 | | | |
| | | 專書 | | 0 | | 本 | |
| | | 專書論文 | | 0 | | 章 | |
| | | 技術報告 | | 0 | | 篇 | |
| | | 其他 | | 0 | | 篇 | |
| | 智慧財產權及成果 | 專利權 | 發明專利 | 申請中 | 0 | 件 | |
| | | | | 已獲得 | 0 | | |
| | | | 新型/設計專利 | | 0 | | |
| | | 商標權 | | 0 | | | |
| | | 營業秘密 | | 0 | | | |
| | | 積體電路電路布局權 | | 0 | | | |
| | | 著作權 | | 0 | | | |
| | | 品種權 | | 0 | | | |
| | | 其他 | | 0 | | | |
| | 技術移轉 | 件數 | | 0 | 件 | | |
| | | 收入 | | 0 | 千元 | | |
| | 國外 | 學術性論文 | 期刊論文 | | 0 | 篇 | |
| | | | 研討會論文 | | 3 | | |
| 專書 | | | 0 | 本 | | | |
| 專書論文 | | | 0 | 章 | | | |
| 技術報告 | | | 0 | 篇 | | | |
| 其他 | | | 0 | 篇 | | | |
| 智慧財產權及成果 | | 專利權 | 發明專利 | 申請中 | 0 | 件 | |
| | | | | 已獲得 | 0 | | |
| | | | 新型/設計專利 | | 0 | | |
| | | 商標權 | | 0 | | | |
| | | 營業秘密 | | 0 | | | |
| | | 積體電路電路布局權 | | 0 | | | |

| | | | | | |
|--|------|--------|---|----|--|
| | | 著作權 | 0 | | |
| | | 品種權 | 0 | | |
| | | 其他 | 0 | | |
| | 技術移轉 | 件數 | 0 | 件 | |
| | | 收入 | 0 | 千元 | |
| 參與計畫人力 | 本國籍 | 大專生 | 0 | 人次 | |
| | | 碩士生 | 0 | | |
| | | 博士生 | 1 | | |
| | | 博士後研究員 | 0 | | |
| | | 專任助理 | 0 | | |
| | 非本國籍 | 大專生 | 0 | | |
| | | 碩士生 | 0 | | |
| | | 博士生 | 0 | | |
| | | 博士後研究員 | 0 | | |
| | | 專任助理 | 0 | | |
| 其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。) | | | | | |

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

傳統金屬離子交換氫氧基磷灰石多以水熱法進行合成，本研究採用電化學方法進行鈷取代氫氧基磷灰石的合成與性質評估，結果發現本研究所合成之磷灰石生物相容性良好，並具備抗菌活性及超順磁性。結合聚乙烯醇膜材，由生物降解實驗發現，有微量的鈷離子釋出，可增加膜材之抗菌性，並預期可促成血管新生，未來可運用在糖尿病患者之傷口修護，但須進行動物實驗以確定其效果，以上結果可運用到其他金屬離子取代氫氧基磷灰石的製備。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）