

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 化學科

佳作

050205

透過超音波敏感性聚合物微胞達成藥物投遞減少根管治療癒後復發的應用

學校名稱：臺北市立建國高級中學

作者： 高二 林奕丞 高二 祝楷棣	指導老師： 劉燕孝
-------------------------	--------------

關鍵詞：藥物載體、超音波響應

摘要

本研究利用自行合成之聚合前驅物 PEG-Br 與 THPMA(tetrahydropyranyl methacrylate)經由原子轉移自由基聚合(ATRP)合成兩親性的嵌段共聚物 PEG-*b*-PTHPMA。將此二嵌段共聚物分別與藥物 SC5005 混合，在水溶液中透過自組裝形成包覆藥物的聚合物微胞。將微胞暴露於高能聚焦式超聲波(HIFU)，使其分解後釋出藥物。

我們利用 $^1\text{H-NMR}$ 、凝膠滲透色譜法(GPC)檢測，確認合成出的 PEG-*b*-PTHPMA 之結構與圖譜相符，測得平均分子量約為 37710、聚合物分散性指數(PDI)為 1.3。以動態光散射光譜(DLS)、掃描式電子顯微鏡(SEM)檢驗聚合物微胞的合成結果，觀測到微胞具球形外觀和 80.80 nm 的平均粒徑。進一步利用超音波震盪實驗前後的 $^1\text{H-NMR}$ 差異，觀察到震盪後相較原先譜線多出了嵌段共聚物水解的訊號，據此變化得知聚合物微胞結構在超音波震盪下遭破壞並成功釋出藥物。

壹、前言

一、研究動機

在根管治療方面，牙本質小管常在治療過程受細菌污染，在根管治療封填過程後，仍然會有細菌殘留於管徑約 3 μm 的牙小管中，這會導致治療後仍有約 70% 的復發率。

然而，一般治療方法對牙本質小管的殺菌功效欠佳，由於牙本質小管的孔徑太小，導致組織液無法完全滲透，讓藥物難以進入到牙本質最深處，使其無法徹底消毒殺菌。

除此之外，欲用以消毒之藥物 SC5005，可殺死耐甲氧西林金黃色葡萄球菌 (MRSA) 與部分的格蘭氏陽性菌。但這一藥物為疏水性，並且當其暴露於血漿環境中，會和其中的白蛋白反應，使藥物活性下降到原本的 2% 以下。

因此我們希望透過聚合物微胞包覆藥物，保護藥物 SC5005 在藥物運輸途中不會被血清分解，到達牙小管中液體無法進入之處，使微胞在接近開口處或進入牙本質小管後再釋放藥物。看看是否可以讓微胞脫離血清的影響，讓藥物在管中作用。

二、研究目的

(一) 搜尋文獻，找出適合做為藥物的聚合物單體。

(二) 合成前驅物 PEG-Br。

(三) 合成嵌段共聚物(block copolymer)—PEG-*b*-PTHPMA(polyethylene glycol block 2-tetrahydropyranyl methacrylate)，含有生物相容性的外層，具容納藥物性質，內層有超音波敏感性的單體聚合而成。

(四) 測量微胞藥物包覆率、釋放時間、釋放率、細胞毒性等，評估其效果。

三、文獻探討

(一) 藥物刺激類型及原理

1. 熱

微胞局部升溫超出低臨界溶液溫度(Lower critical solution temperature, LCST) 時，可轉變為疏水性。這些微胞的結構變化是可逆的，因此可利用其在通過 LCST 的加熱/冷卻熱波動期間釋放藥物。

2. 超音波

在高能聚焦式超音波(HIFU)照射下使微胞發生水解反應，導致 THP 基團的斷裂和甲基丙烯酸的形成，該甲基丙烯酸顯示出比室溫更高的臨界溶液溫度 (Lower critical solution temperature, LCST)^[1]。

3. 電磁波

紫外誘導的沃爾夫重排反應可以導致水溶性的急劇變化，DNQ 在 800 奈米鐳射(紅外光)下通過雙光子過程也會經歷這一相同的反應。

4. 磁場

脂質體膜的通透化和熱敏穩定鍵的斷裂。

5. 酸鹼值

通過改變羧乙基化的程度，可以調節脫組裝的 pH 值，使其處於腫瘤微環境的 pH 範圍內。

6. 氧化還原

設計了膠囊，在存在谷胱甘肽(GSH)的情況下具有可控的 Dox 釋放，這是由於硫醇具有切割的二硫鍵。

7. 酶活性

含有側鏈 QPA (quinone propionic acid)基團的兩性嵌段共聚物，可以通過 NQO1 (quinone oxidoreductase-1)引發的 PCL (polycaprolactone)骨架及聯環化反應來發生降聚。

8. 上轉換(upconverting nanoparticles)

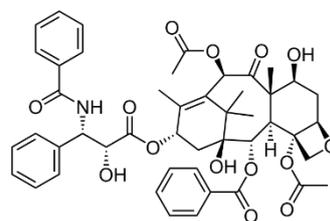
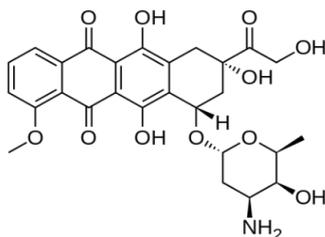
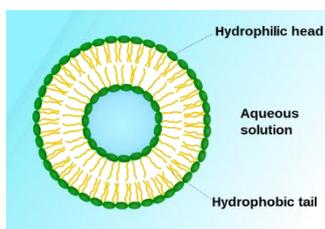
利用具有上轉換功能的奈米粒子(通常由鐳系元素或鈷系元素摻過度金屬元素而形成)，將低能量的光子打入奈米粒子，一連串的電子越遷促使最後有一更高能量的電子釋放能量回到基態，最後釋放更高能量的光子。此技術常使用於癌細胞顯影與病灶確認、或利用高強度的光子產生 Singlet Oxygen，殺死癌細胞。

(二)藥物載體形式^[7]

藥物載體：聚合物或脂質體形成圓球形微胞，包覆藥物。

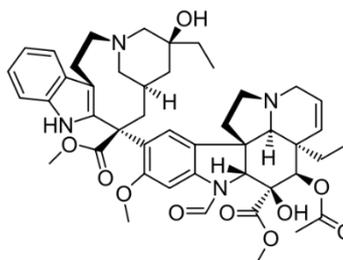
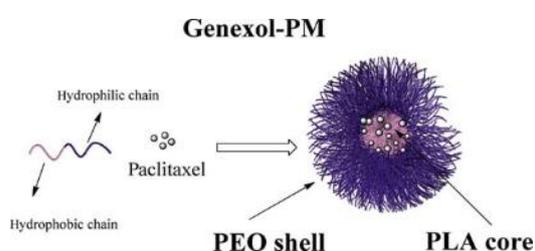
分類與比較：

1. 脂質體(Liposome)為早期主要採用的藥物載體形式，有穩定運輸、長時間維持穩定形態的性質，盛裝水溶性藥物的效果較不佳，製作微胞的技術也比較繁複。



圖一：Liposome 示意圖^[10] 圖二：doxorubicin 結構圖^[11] 圖三：Abraxane 結構圖^[12]

2. Doxil 藥物能夠對 DNA 發生嵌入作用，在治療乳癌、卵巢癌、卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)，可能的副作用有：心臟毒性的反應、B 型肝炎病毒再活化、壞死性盲腸炎等。
3. 紫杉醇(Abraxane)藥物，可治療胰腺癌，以及對蔥環類藥物無效果的轉移性乳腺癌，缺點為造成落髮。
4. Genexol-PM 首次通過臨床試驗的可控式藥物載體形式，由聚乙二醇和聚乳酸嵌段構成的聚合型藥物載體。
5. 長春新鹼(Marqibo)藥物可治療 HER2 陽性晚期乳癌，也可用於輔助化療中。副作用可能造成肝損傷



圖四：Genexol-PM 示意圖^[13] 圖五：Marqibo 結構^[14]

(三)超音波刺激投放

聚合物微胞的結構多是由嵌段共聚物中內層的疏水性所致形成，經由選擇聚合物單體組成可以使其擁有因應刺激產生改變或擾亂結構的性質，是此類藥物投放的基本原理。而在廣泛的刺激投放種類中我們選擇超音波刺激投放，是由於不需特定的環境條件和不會造成人體負擔，且能夠精確對目標部位造成刺激的性質。

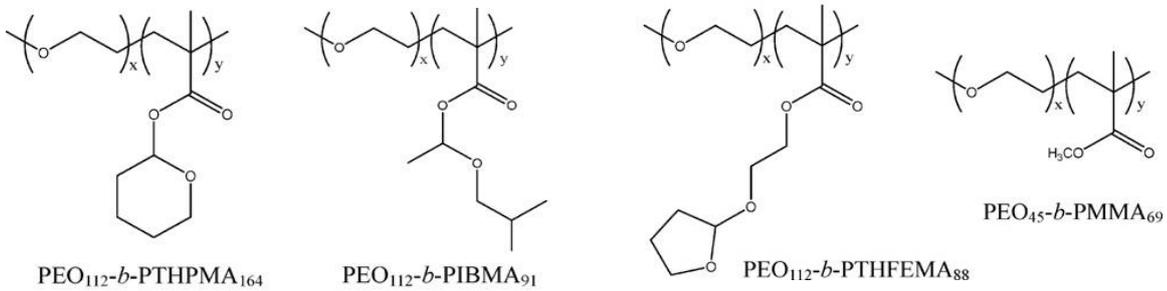
藉由高能聚焦式超音波(High intensive focused ultrasound)在介質中產生空穴現象(cavitation)和震動升溫，提供載體微胞卸載藥物的動力來源，達到非侵入型的局部藥物治療。針對卸載藥物的反應機構可以分成三種，分別為：

1. 水解特定官能基增進微胞內的親水性、用超音波擾動使微胞重排(re-assembled)

2. 形成微胞前改變聚合鏈構型以生成結構鬆散的微胞(如 janus particle 型的微胞)

3. 重排型一樣受超音波擾動使結構崩散。

其中效果顯著的水解型是由於水解使基團極性增加，讓聚合物的低臨界溶解溫度(Lower critical solution temperature)提升，改變溶解性致使微胞的分解。



圖六：超音波響應嵌段共聚物部分單體例子^[3]

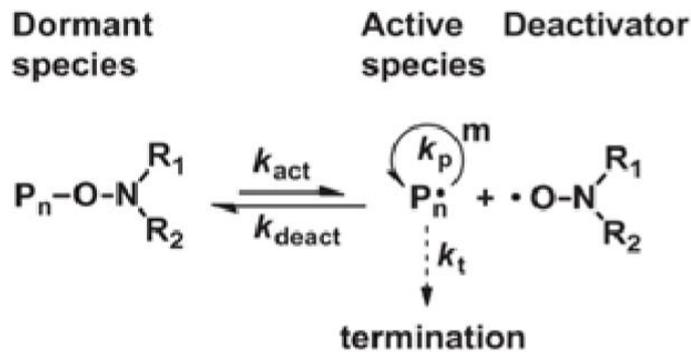
(四) 聚合方式—自由基聚合^[4]

在自由基聚合方式之中常使用的技術是 living polymerization，據 IUPAC 的定義是沒有鏈終止的聚合反應，且引發聚合鏈自由基的反應速率遠大於鏈延長的速率。由於聚合反應的聚合速率正比於自由基濃度，終止反應反應速率正比於自由基濃度的平方，可藉由調控自由基濃度使終止反應的反應速率比聚合反應慢，降低終止反應的影響，達到聚合的效果。此類聚合方法的特性為結果的聚合物分子量大小相近。

以下的自由基聚合均貼近此性質但因仍無法避免兩自由基連結而中止反應，被歸類在 controlled radical polymerization，通常其性質由自由基配基決定。

1. 氮氧自由基聚合(NMP)

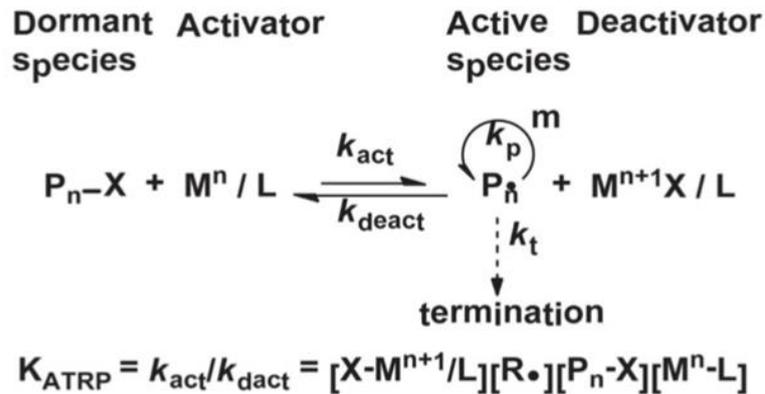
氮氧自由基聚合是利用帶單電子的氮氧化合物作為自由基的穩定劑，可與聚合反應中的自由基結合形成休眠物種(dormant species)。在這個過程中，由於永久自由基效應(persistent radical effect)，絕大部分的自由基都會形成烷氧化合物而不會進行終止反應。由於其適用的單體較少且反應時間較長，此方法僅被用於特定單體的工業合成。



圖七：氮氧自由基聚合的反應機構示意圖^[4]

2. 原子轉移自由基聚合(ATRP)

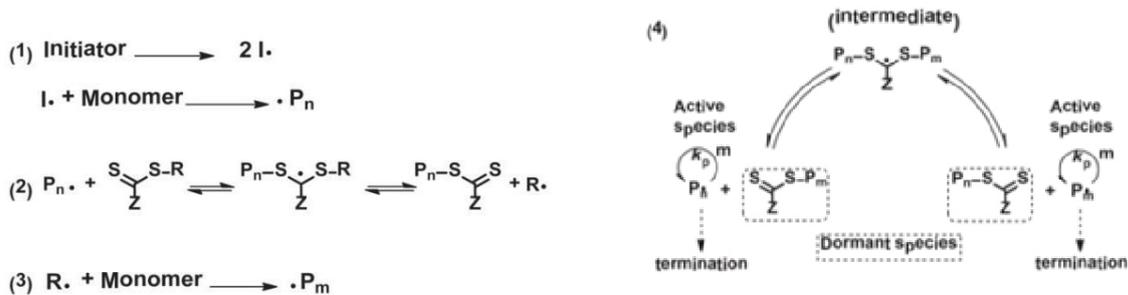
以鹵烷化合物作為休眠物種，高價態金屬錯合物作為去活化劑，低價態過度金屬錯合物作為活化劑。原理和 NMP 相似，但 ATRP 有更廣的可應用單體，因其可根據條件更換不同的錯合物有機配基、陰離子、鹵烷化合物調整反應平衡。



圖八：原子轉移自由基聚合的反應機構示意圖^[4]

3. 可逆加成-斷裂鏈轉移聚合(RAFT)

可使聚合中的聚合物鏈快速交換而有同樣的成長機會，讓聚合後的分子量分佈集中。雖然適用的聚合物單體多，且溶劑選擇寬鬆，但因 RAFT 並無法有效抑制自由基終止反應，使其無法合成分子量較高的聚合物(>10⁶ g/mol)。



圖九：可逆加成-斷裂鏈轉移自由基聚合的反應反應機構示意圖^[4]

考量單體特性與反應時間，實驗中選擇的聚合方法為 ATRP 法。

(五)單體分類和效果比較^[3]

因考量生物相容性，選擇嵌段共聚物單體外層都使用 PEO(聚環氧乙烷)，中層因應藥物相容性選擇單體，內層會決定膠體的分散與否，也是超音波的主要作用位置。

以下列出幾種效果較佳的內層單體：

1. THPMA(Tetrahydropyranyl methacrylate)

(1)分類：透過水解 THPMA 的側基(tetrahydropyran (THP))變成羧酸基提高此微胞核內的親水性，屬於水解型

(2)超音波參數：釋放頻率 1.1 MHz 和功率 100 W

(3)作用時間及效果：5 min(釋放率接近 100%)

2. THFEMA(Tetrahydrofuranloxy methacrylate)

(1)分類：透過水解酯基去除側基提高微胞內的親水性，屬於水解型

(2)超音波參數：釋放頻率 1.1 MHz 和功率 40 W

(3)作用時間及效果：5 min(釋放率 35%)

3. IBMA(Iso-butyl methacrylate)

(1)分類：水解型

(2)超音波參數：釋放頻率 1.1 MHz 和功率 100 W

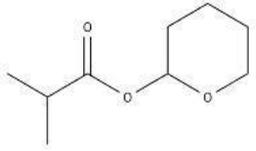
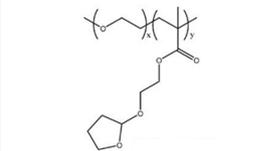
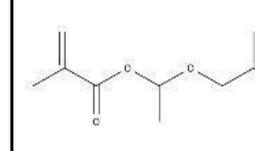
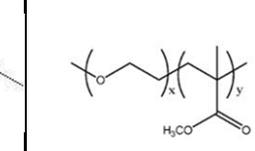
(3)作用時間及效果：5 min(釋放率接近 100%)

4. MMA(Methyl methacrylate)

(1)分類：水解型

(2)超音波參數：釋放頻率 1.1 MHz 和功率 40 W

(3)作用時間及效果：5 min(釋放率 25%)

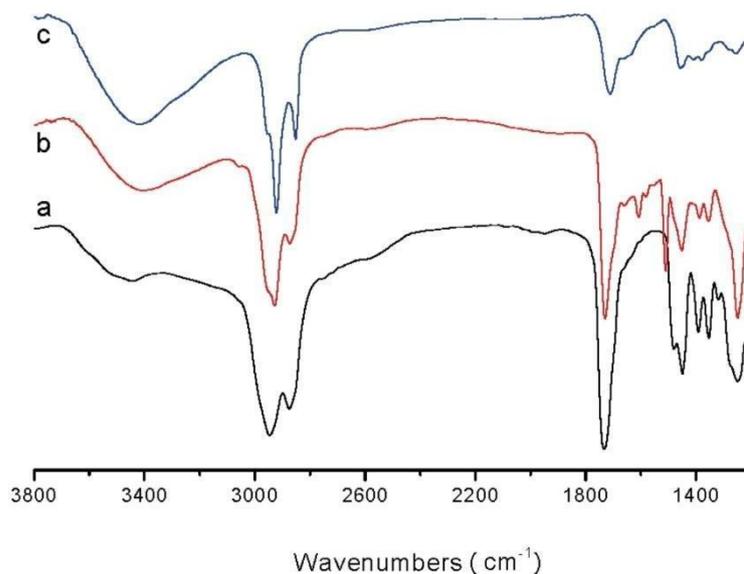
內層單體	THPMA	THFEMA	IBMA	MMA
結構式				
釋放率	釋放率 100%	釋放率 35%	釋放率接近 100%	釋放率 25%
釋放時間	5 min	5 min	5 min	5 min

表一：文獻 THPMA, THFRMA, IBMA, MMA 之結構及暴露在超音波下的釋放結果比較。^[4]

考量穩定性與實用性，本研究選擇 THPMA 作為聚合單體

(六)文獻合成 PEG-PHPMA 資料

1.PEG-PTHPMA 的 IR 光譜圖



圖十：PEG-PTHPMA 在未照射超音波(圖 a)，暴露在超音波 1 hr(b)，以及暴露 2 hr(c)的紅外線光譜。^[1]

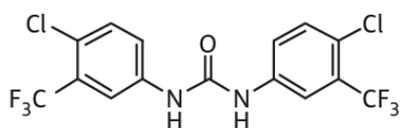
2.PEG-PTHPMA 的 ¹H NMR 光譜訊號數值

- 5.95 (broad, 1H, -OCHO-, THPMA),
- 3.90 (m, 2H, -OCHOCH₂-, THPMA),
- 3.65 (s, 4H, -CH₂CH₂O-, PEO),
- 1.60 (broad, 6H, (OCHCH₂CH₂CH₂-, THPMA),
- 1.25 (s, 3H, CH₃CCOO-, THPMA)

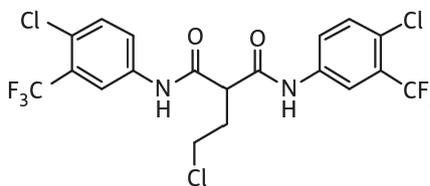
3.PEG-PTHPMA 以 GPC 測得的平均分子量(Mn)與重均分子量(Mn)

Mn (GPC) 32800 g mol⁻¹, Mw/Mn=1.20

(七) 包覆藥物：



圖十一：SC 78 結構圖^[8]



圖十二：SC 5005 結構^[8]

SC 78 和 SC 5005 皆為作用於超級細菌耐甲氧西林金黃色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)(MRSA)的藥物，其可以直接作用在細菌的外膜，進而破

壞細菌。其中又以 SC-5005 具有較高的選擇性(抑制百分之五十細胞增生之藥物濃度/最低抑制細菌濃度)，較佳的活體內的細胞毒性，比較適合作為抗細菌藥物。若將 SC 5005 跟 DHA 共同作用，可增加藥物的活性。但由於此藥物對水溶解度低，在血管中不易運輸，且 SC 5005 在血清中活性會大幅降低，因此需要藥物載體運輸至患部^[8]。

貳、研究設備及器材

一、研究設備

實驗儀器	型號&廠牌
DLS 動態光散射儀	MALVERN
SEM 掃描式電子顯微鏡	Hitachi (S-4800) 益弘代理
手套箱	Vigor
迴旋濃縮儀	EYELA
FTIR 傅立葉轉換紅外光譜儀	Thermo Scientific
GPC	Agilent

二、研究器材

舒倫克瓶	燒杯	冰、油浴	色譜柱	磁攪拌子
樣品瓶	移液器(pipette)	氮氣氣球	冷凝管	抽濾裝置
玻璃滴管	溫度計	NMR tube	GPC 瓶	微試管
錐形瓶	微針筒	針筒	針筒過濾器	

三、藥品

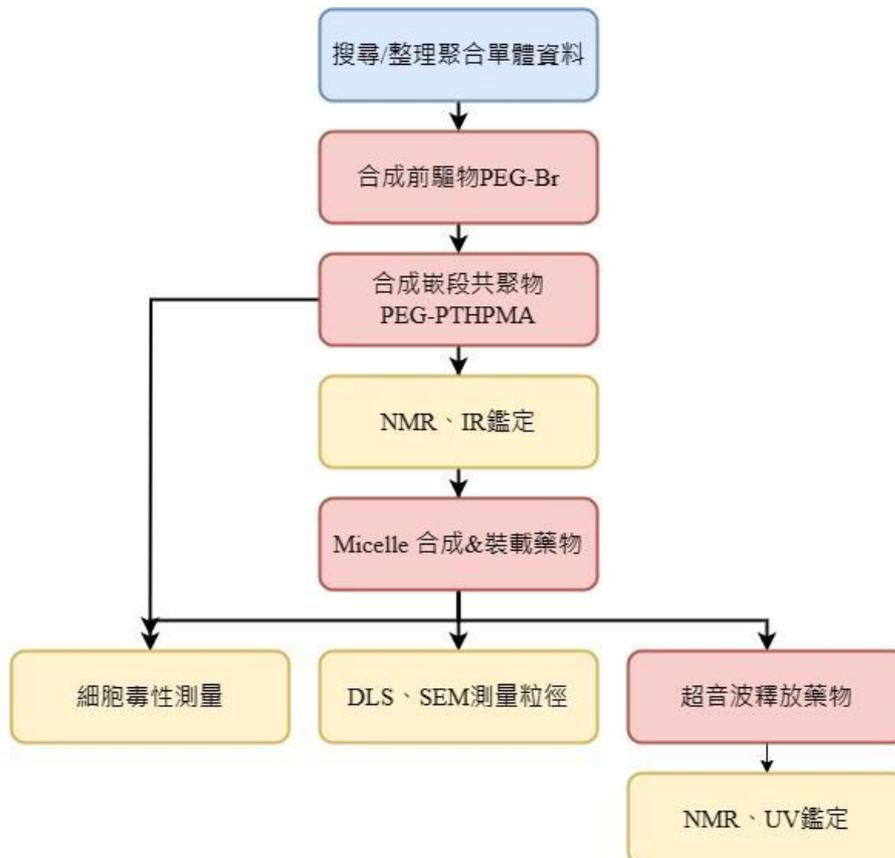
研究藥品	英文全名	中文
PEG-OH	Polyethylene glycol	聚乙二醇(聚環氧乙烷)
CH ₃ C(CH ₃)(Br)COBr	2-bromoisobutyryl bromide	2-溴異丁醯溴
Et ₃ N	triethylamine	三乙胺
HCl(aq)	hydrochloric acid	氫氯酸
CH ₃ OH	Methanol	甲醇
CuBr	Copper(I) bromide	溴化亞銅
PMDETA	N,N,N',N'',N'''- Pentamethyldiethylenetriamin e	N,N,N',N'',N'''-五甲基二亞乙 基三胺
DCM	Dichloromethane	二氯甲烷
pyrene	pyrene	芘
PBS buffer	Phosphate buffered saline	磷酸鹽緩衝生理鹽水
NaCl(aq)	Sodium Chloride	氯化鈉

MgSO ₄ (s)	Magnesium sulfate	硫酸鎂
MAA	Methacrylic acid	甲基丙烯酸
(CH ₃) ₂ CHCH ₂ OCHCH ₂	isobutyl vinyl ether	異丁乙醚
P4VP·HCl	Poly(4-vinylpyridine hydrochloride)	聚(4-乙基吡啶)
S(C ₆ H ₄) ₂ NH	phenothiazine	吩噻嗪
C ₆ H ₅ OCH ₃	Anisole	苯甲醚
DEA	2,2'-Iminodiethanol	二乙醇胺
Al ₂ O ₃	Aluminium oxide	氧化鋁
CH ₃ COCH ₃	Acetone	丙酮
THF	Tetrahydrofuran	四氫呋喃
SC5005		

參、研究過程及方法

一、研究設計與變因

- (1) 搜尋、整理聚合物單體資料。
- (2) 合成聚合前驅物 PEG-Br。
- (3) 以 $^1\text{H-NMR}$ 、IR、Mass 確認結構及分子量。
- (4) 將前驅物 PEG-Br 和單體 THPMA 合成為兩親性嵌段共聚物 PEG-*b*-PTHPMA。
- (5) 以 $^1\text{H-NMR}$ 、IR、GPC 確認結構及測定平均分子量、PDI 值。
- (6) 測量嵌段共聚物的細胞毒性。
- (7) 將合成出的嵌段共聚物與藥物 SC5005 混和，在水溶液中形成聚合物微胞。
- (8) 以 DLS 和 SEM 檢測微胞粒徑並觀察其外觀。
- (9) 紀錄 $^1\text{H-NMR}$ 光譜資訊
- (10) 將以裝載藥物的聚合物微胞暴露於 HIFU。
- (11) 比對受超音波刺激前後 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜變化。
- (12) 測量藥物釋放率。
- (13) 使用其他種聚合物單體並重複步驟四到十二。

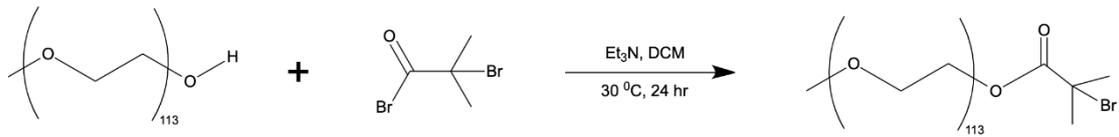


圖十三：實驗流程圖(作者自行繪製)

二、合成步驟

(一)前置作業

1.前驅物 PEG-Br 之合成



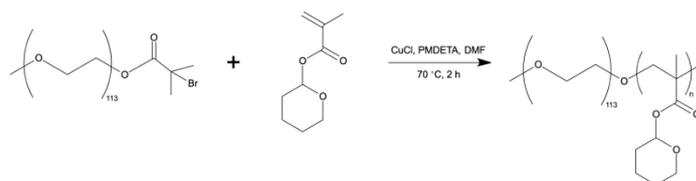
圖十四：PEG-Br 合成(作者自行繪製)

- (1)在 100 mL 圓底燒瓶中加入 PEG₍₁₁₃₎(5 g,1 mmol)、DCM(50 mL)、TEA(triethylamine)(420 μ L,3 mmol)，在冰浴靜置 30 min。
- (2)degas(使用 freeze/pump/thaw procedure 三次)。
- (3)緩慢加入 2-bromoisobutyryl bromide(370.8 μ L, 3 mmol)。
- (4)在 30 度油浴反應 24 hr。
- (5)加鹽酸水溶液終止反應。
- (6)以 NaCl_(sat., aq)+DCM(二氯甲烷)萃取三次，取有機層。
- (7)以 MgSO_{4(s)}去水，迴旋濃縮去除溶劑。
- (8)滴入冰乙醚得到黃色固體，再溶解於 DCM，此步驟重複兩次得白色產物 PEG-Br。



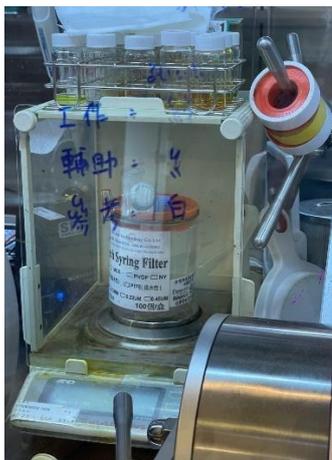
圖十五：冰浴靜置(作者拍攝)十六：油浴反應(作者拍攝)十七：片狀(粉狀)產物(作者拍攝)

(二)聚合 PEG-PHPMA (使用 ATRP)



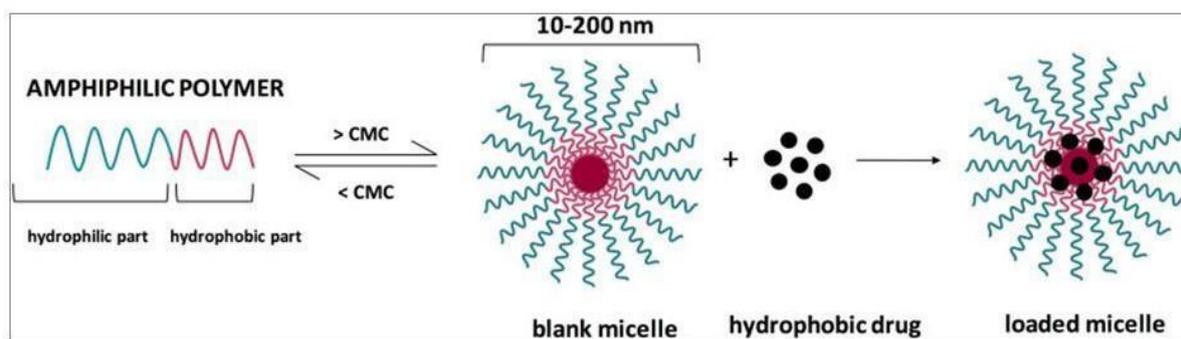
圖十八：PEG-PHPMA 合成反應示意圖(作者自行繪製)

1. 由手套箱取出 CuBr。
2. 混合 THPMA(用鹼性 column 過單體) (2.25 g, 13.2 mmol)、 PMDETA (32.45 mg, 0.185 mmol)、 CuBr (11.66 mg, 0.08 mmol)、 PEG₁₁₃-Br (275.92 mg, 0.055 mmol) 溶解在二氯甲烷(DCM)(1.7 g)中。
3. degas(使用 freeze/pump/thaw procedure 三次)。
4. 室溫下攪拌 30 分鐘。
5. 以 70 度油浴浸泡兩小時。
6. 經 Al₂O₃ 的管柱層析(以二氯甲烷作為沖提液)，再負壓蒸餾取出產物。
7. 在冷水浴中析出，過濾後用真空烘箱除去溶劑。(yield ~ 45%)



圖十九：從手套箱秤取 CuBr(作者拍攝)圖二十：反應裝置(作者拍攝)圖二十一：除去催化劑 CuBr(作者拍攝)

(三)自組裝形成微胞^[2]



圖二十二：兩親性聚合物形成微胞示意圖^[15]

1. 聚合物(1.3 mg)、溶解在 THF(5.0 mL)中。
2. 緩慢加入去離子水(30 μ L/30 sec)重複到共加入到 5.0 mL，期間持續攪拌(總共 83 分鐘)。
3. 用 45 $^{\circ}$ C 加熱器將溶液中的 THF 蒸發。
4. 放入透析膜(Mw3500)置於去離子水，透析三天，期間經常換水。
5. 取出後通過 0.45 μ m 的針頭過濾器(醋酸纖維素膜)。

(四)SC5005 裝載

1. 聚合物(1.6 mg)、溶解在 THF(5.0 mL)中。
2. 將 0.3 mg SC5005 溶解在 THF(1.0 mL)中，取 30 μ L SC5005 溶液加入聚合物溶液中
3. 緩慢加入去離子水(30 μ L/30 sec)重複到共加入到 5.0 mL，期間持續攪拌(總共 83 分鐘)。
4. 用 45 $^{\circ}$ C 加熱器將溶液中的 THF 蒸發。
5. 放入透析膜(Mw3500)置於去離子水，透析三天，期間經常換水。
6. 取出後通過 0.45 μ m 的針頭過濾器(醋酸纖維素膜)。

(五)測定 micelle 的臨界微胞濃度(CMC)^[6]

1. 以 10^{-6} M 濃度的 pyrene 裝載於 micelle 中，以螢光光譜儀測量在 372 與 383 奈米的螢光波長，計算 I_{273}/I_{383} 的值。
2. 改變聚合物濃度重複測量

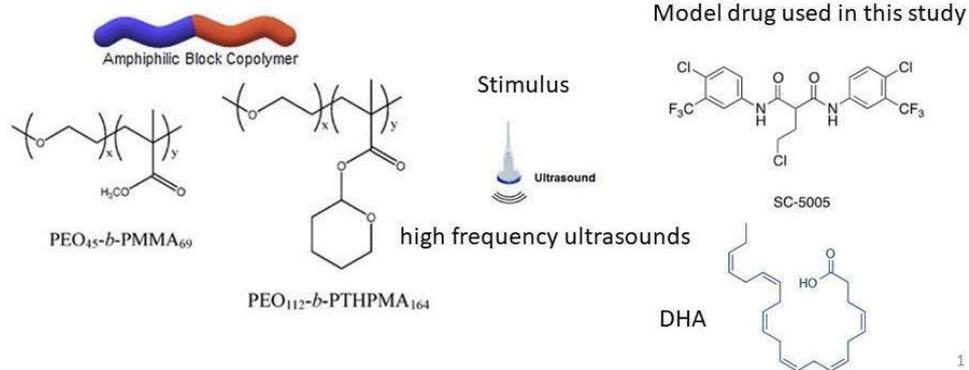
(六)測定 micelle 的藥物包覆率

1. 測量不同濃度的藥物 SC5005 的 UV 吸收峰峰值
2. 繪製 SC5005 檢量線
3. 使用間接測量法，用 UV 光譜測量包覆微胞前後溶液中的藥物含量，帶入公式

$$LC\% = \frac{m_{drug} - m_{drug(f)}}{m_{np}} \times 100\%$$

求得藥物包覆率。

(七) 超音波釋放



圖二十三：聚合物微胞在超音波震盪後釋放藥物示意圖(作者自行繪製)

使用高能聚焦式超音波(HIFU)，由於超音波產生瞬間的高能量，破壞聚合物微胞的結構，使內部藥物釋放。

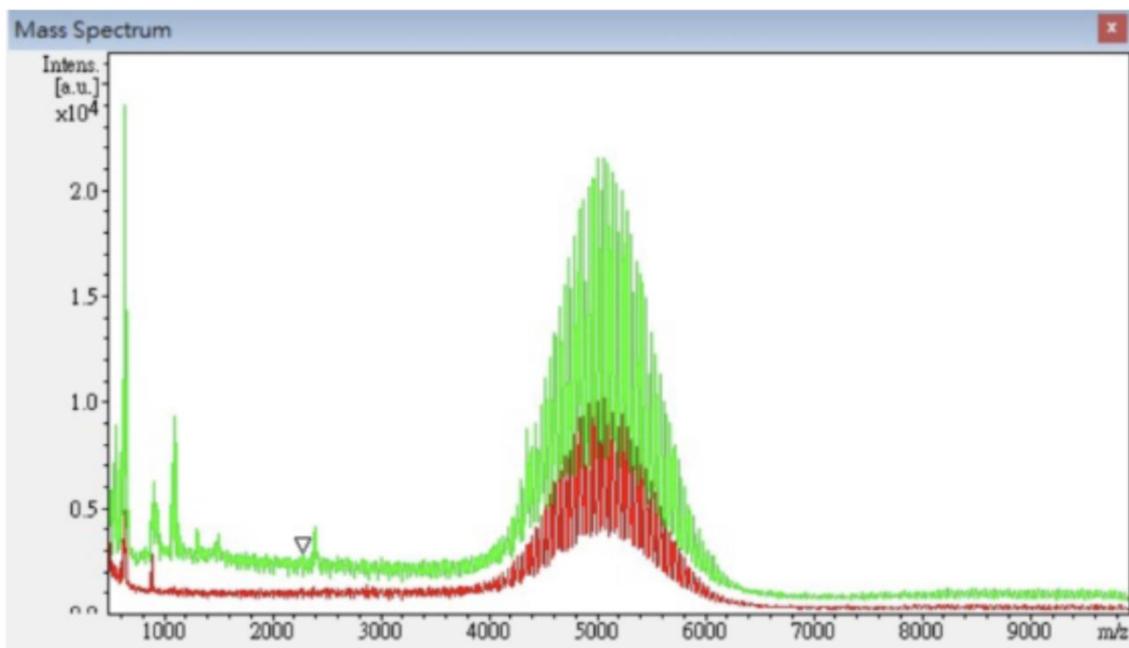
(八) 細胞毒性

使永 MTT assay 測量嵌段共聚物 PEG-PHPMA、SC5005 的細胞毒性。

肆、研究結果與討論

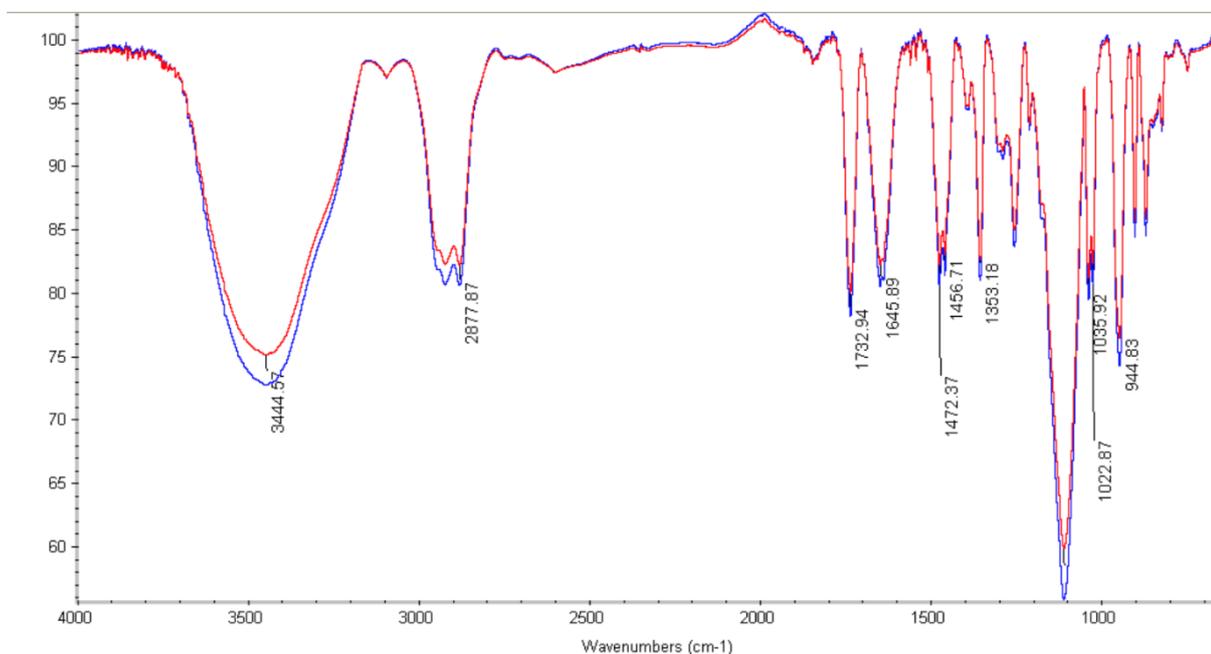
一、前驅物 PEG-Br :

(一) 質譜儀(Mass Spectrometer)



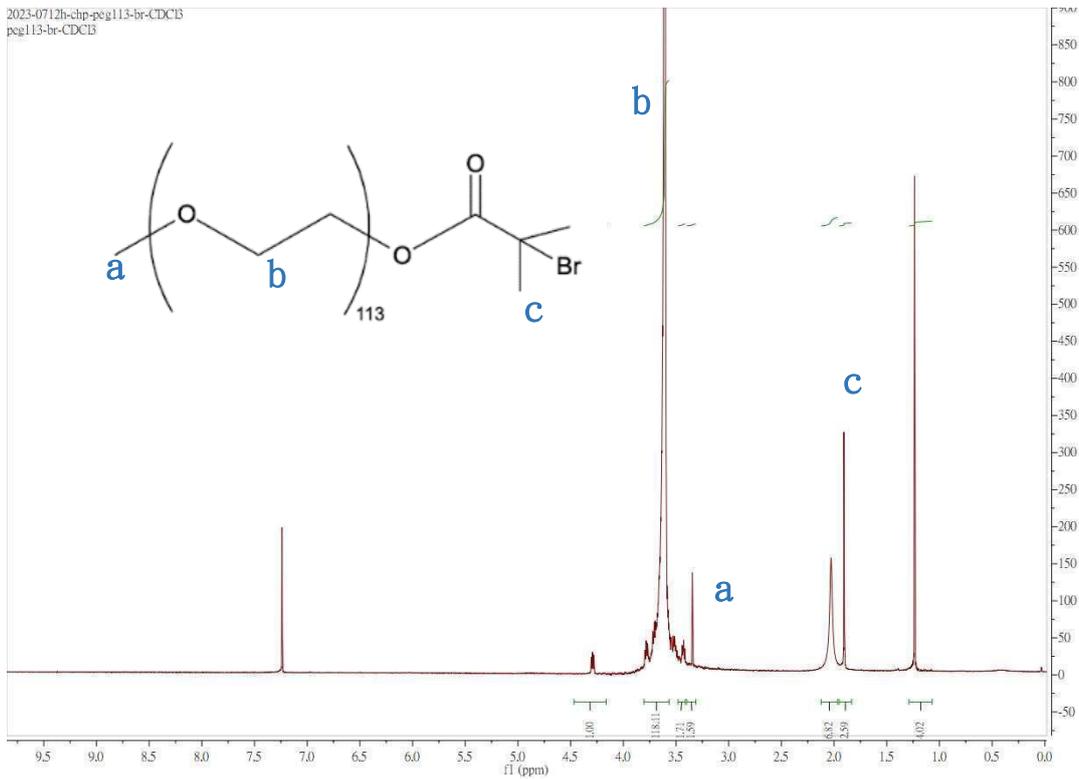
圖二十四：測定 PEG-Br 分子量，在分子量 5000 處有明顯峰值(作者自行繪製)

(二) FTIR 紅外線光譜



圖二十五：PEG-Br 的紅外線光譜圖(作者自行繪製)

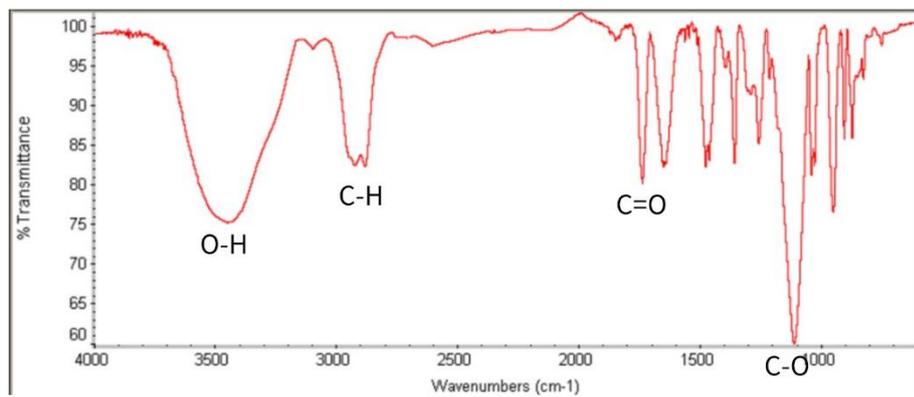
(三) ^1H NMR 光譜



圖二十六：PEG₁₁₃-Br 引發劑之 ¹H NMR (400 MHz), CDCl₃ 圖譜(作者自行繪製)

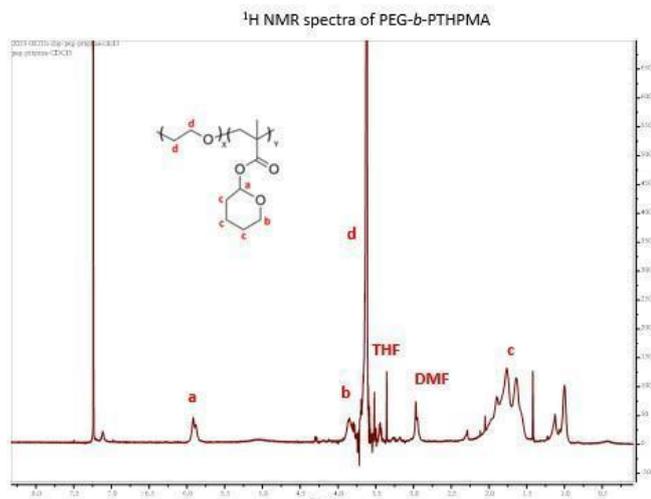
二、嵌段共聚物 PEG-b-PHPMA：

(一) IR 光譜



圖二十七：實驗合成 PEG-b-PHPMA 在未照射超音波時的紅外線光譜(作者自行繪製)

(二) ^1H NMR 光譜



圖二十八：實驗合成 PEG-PHPMA 的 ^1H NMR 光譜(作者自行繪製)

(三)以 GPC 測得的分子量，依序分別為數均分子量 (M_n)、重均分子量 (M_w)、Z 均分子量 (M_z)、黏均分子量 (M_v)和分子量分布寬度指數(PDI)，其中可透過 PDI 的值了解聚合物的分散程度，兩者呈正相關。

MW Averages						
Peaks	Mp	M_n	M_w	M_z	M_v	PDI(M_w/M_n)
(g/mol)	45932	37710	49131	64370	47313	1.3077

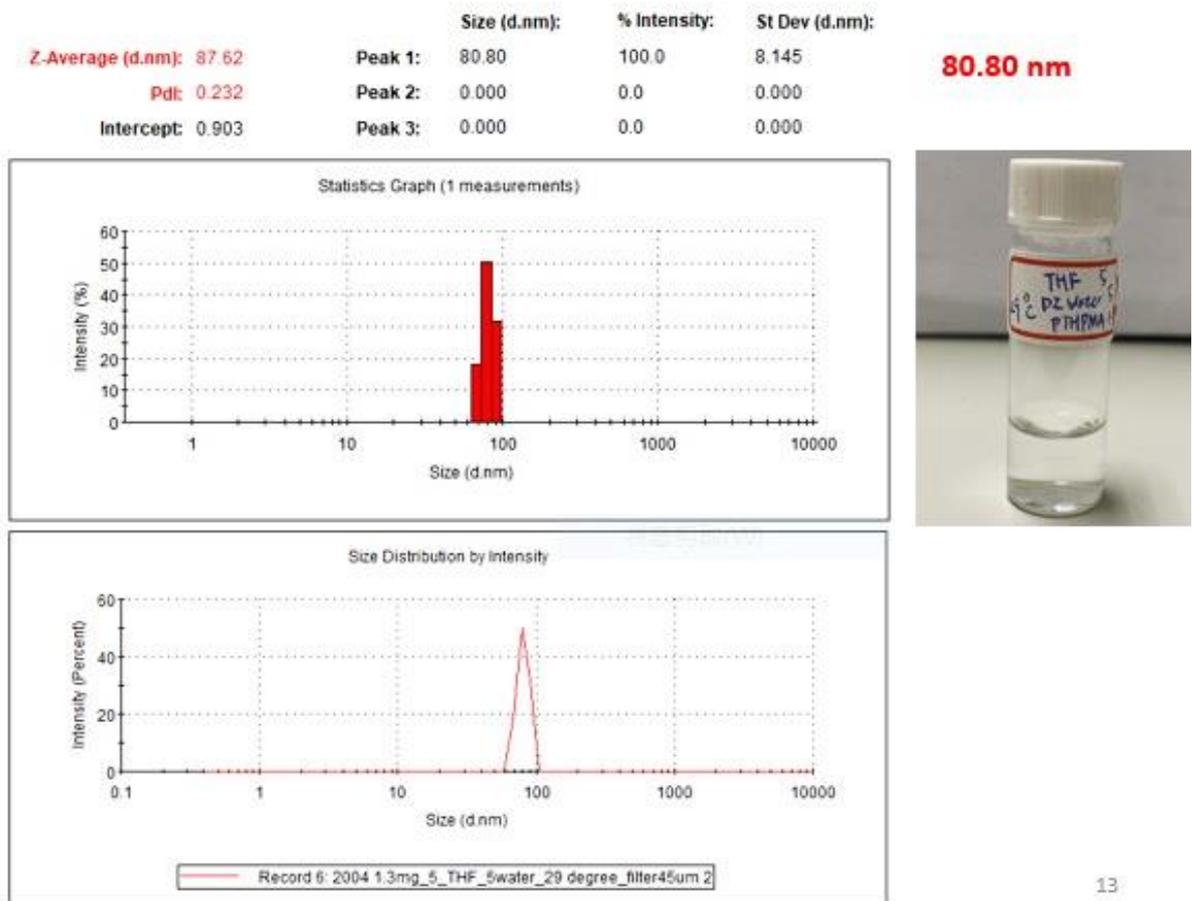
表二：GPC 測出之 M_p , M_n , M_w , M_z , M_v , PDI 值(作者自行繪製)

有部分文獻使用 CuCl 當作合成 block copolymer 的催化劑，而部分是用 CuBr ，雖就 NMR 以及 IR 圖譜來看，聚合物組成沒有差別，但是在數均分子量方面，卻有將近 5000g/mol 的差異，然而，從重均分子量(M_w)以及數均分子量(M_n)的比值(PDI)來看，分子量的離散情形差異不大，從文獻有找到 CuCl 和 CuBr 在鍵能上有一些差異，推測對催化以及反應時間會有所影響，綜上而論，可推測是因為催化劑改變與反應時間拉長，得到較高分子量的聚合物。

三、Micelle 合成粒徑分析

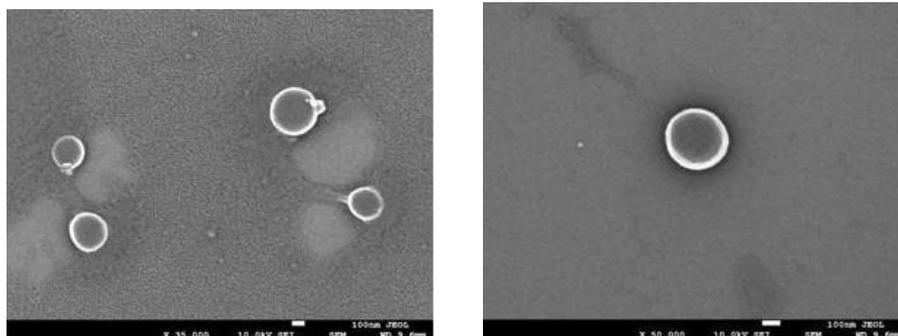
(一) DLS 動態光散射儀

Exp 1002_1.3mg_5mL_THF_5mL_water_83mins



圖二十九：室溫下測量 PEG-b-PHPMA，在 80 nm 區間有明顯的峰值(作者自行繪製)

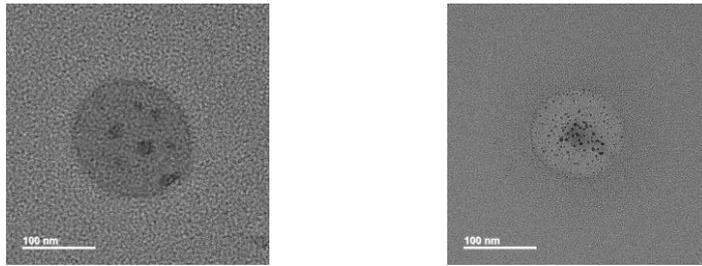
(二) SEM 掃描式電子顯微鏡



圖三十：掃描式電子顯微鏡掃描出的聚合物微胞影像，可見其圓球形結構(作者自行繪製)

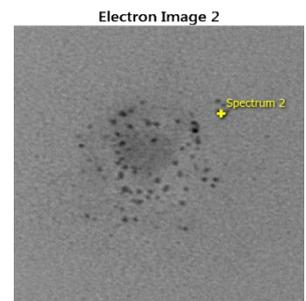
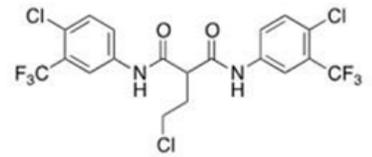
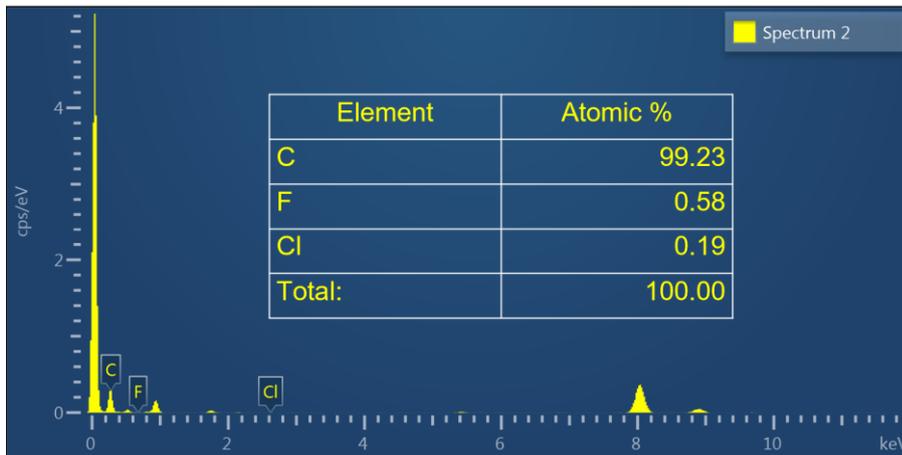
四、包覆藥物結果分析

(一) TEM 分析



圖三十一：穿透式電子顯微鏡(TEM)偵測影像，可見其內部包覆物質的影像(作者自行繪製)

(二)EDS 分析

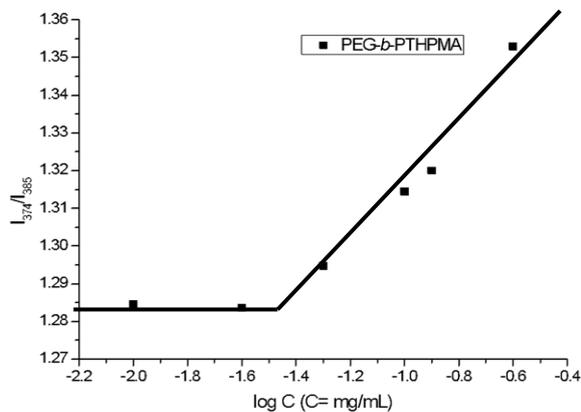


圖三十二：能量色散 X 射線譜(EDS)分析譜，進一步測得前述 TEM 包覆之物質為藥物(作者自行繪製)

雖然在 EDS 譜中，氟原子的訊號並不是特別明顯，然而，氟元素在自然界中的比例極低，並不是常見的訊號汙染物質，因此可判斷，此氟元素訊號源自於藥物。

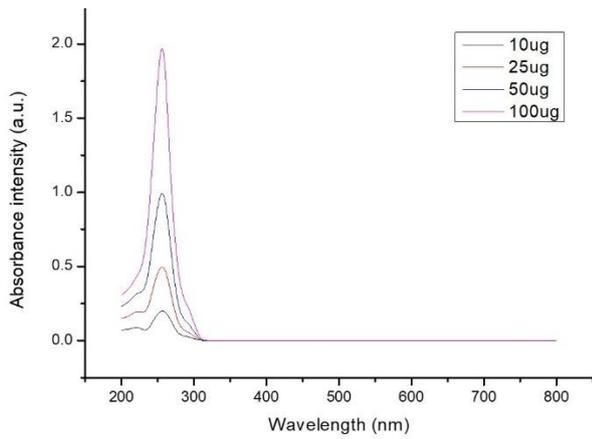
五、Micelle 臨界微胞濃度(CMC)分析

經由聚合物微胞臨界微胞濃度測定，我們得到臨界微胞濃度大約在 log CMC 等於-1.4 的地方，也就是 PEG-b-PTHPMA 濃度約為 10^{-6} M(40 μ g/mL)，也驗證了我們實驗使用的濃度是一個合理的聚合物濃度。

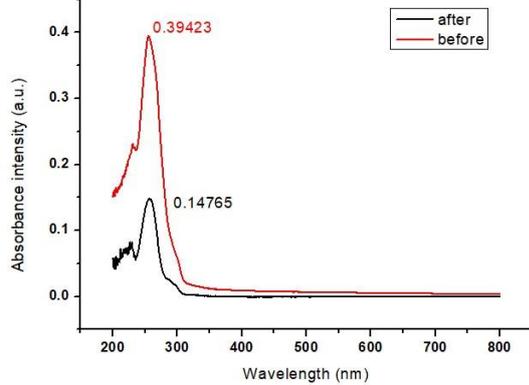


圖三十三：CMC 測定結果(作者自行繪製)

六、藥物包覆率測量

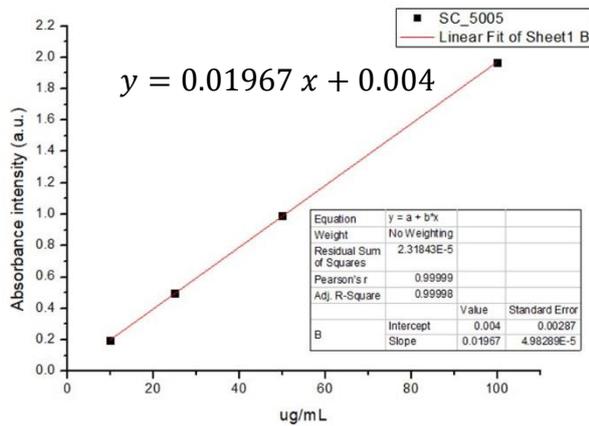


圖三十四：不同濃度 SC5005 的 UV 譜線



圖三十五：包覆藥物前後 SC5005 吸收風強

度(作者自行繪製)

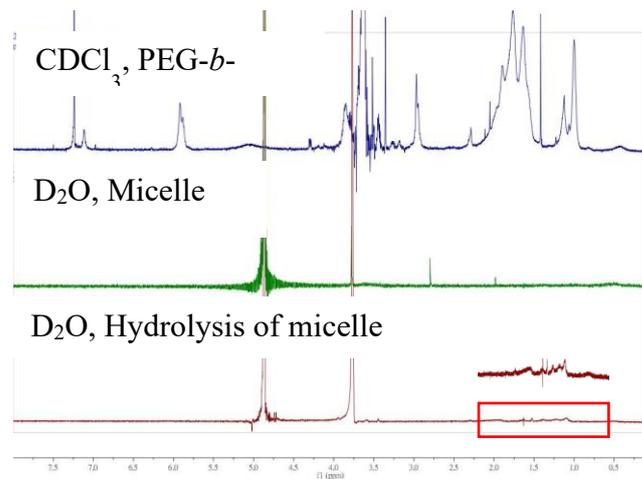


圖三十六：SC5005 藥物檢量線(作者自行繪製)

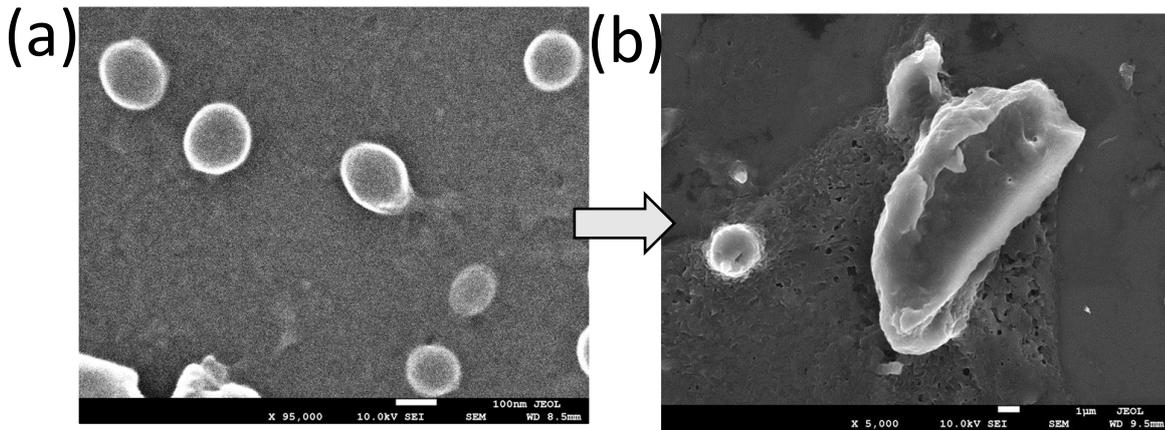
$$LC\% = \frac{m_{drug} - m_{drug(f)}}{m_{np}} \times 100\% = 4.33\%$$

$$EE\% = \frac{m_{drug} - m_{drug(f)}}{m_{drug}} \times 100\% = 56.76\%$$

七、超音波釋放結果



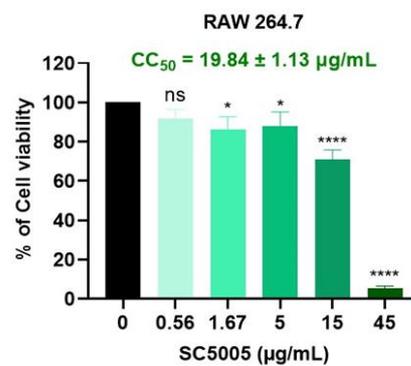
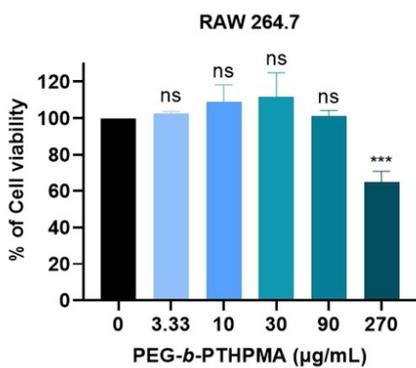
圖三十七：受超音波刺激前後，聚合物微胞的 ^1H NMR 圖譜變化(作者自行繪製)



圖三十八(a)超音波刺激前(b)超音波刺激後 SEM 影像(作者自行繪製)

在受超音波刺激前，聚合物微胞只有水的譜線以及自己本身的譜線，經過超音波刺激後，多出了聚合物水解的譜線，由此 ^1H NMR 可得知，我們的藥物確實有裝載到微胞中，且有如預期釋放，但由於譜線不夠明顯，釋放率尚需進一步確認。

八、細胞毒性結果



圖三十九：PEG-PHPMA 細胞毒性(作者自行繪製) 圖四十：SC5005 細胞毒性(作者自行繪製)

從細胞毒性的結果，我們可以看到在低濃度情況，聚合物以及藥物在人體中的細胞毒性極低，也可以推知，當聚合物微胞在人體中水解，回到聚合物鏈，仍然不會危害到身體一般細胞。

伍、結論與未來展望

一、結論：

(一) 合成聚合前驅物 PEG-Br：

1. 對照 NMR 譜線確認結構
2. Mass 質譜測得平均分子量約為 5000

(二) 合成嵌段共聚物：

1. 對照 NMR 其化學位移分別在 3.5~4 ppm 和 1~3 ppm、3.8 ppm、5.9 ppm 有 PEG 和 THPMA 上氫的訊號、以 IR 對照聚合物的官能基、確認結構符合預期。以 GPC 測得平均分子量約為 37000、PDI 為 1.3

(三) 合成 Micelle：

1. 根據 SEM 圖譜，可以確定合成出圓球狀微胞，粒徑大小約為 80~100 nm。
2. 根據 TEM 與 EDS 進行分析，確認藥物可被包覆於聚合物微胞內。
3. 透過 UV 圖譜比較測出藥物包覆率，LC%=4.33%，EE=56.76%。

(四) 超音波藥物釋放：

1. 經過超音波刺激後的藥物微胞，可見到多出來的水解後聚合物鏈譜線，釋放實驗有成功。
2. 已確認聚合物鏈水解後低濃度下無細胞毒性。

二、展望：

- (一) 嘗試其他具有超音波響應的單體，如 PIBMA。
- (二) 親水端 PEG 改成玻尿酸、殼聚糖等天然聚合物或可生物降解的高分子。
- (三) 包覆其他種藥物，如：抗癌藥物 Doxorubicin。
- (四) 與牙醫系合作，進行動物實驗或細胞實驗，確認藥物釋放效率。
- (五) 在聚合物微胞做官能基改質，藉以調整藥物輸送之效率。

陸、參考文獻

1. Xuan J, Boissière O, Zhao Y, Yan B, Tremblay L, Lacelle S, Xia H, Zhao Y. Ultrasound-responsive block copolymer micelles based on a new amplification mechanism. *Langmuir*. 2012 Nov 27;28(47):16463-8. doi: 10.1021/la303946b. Epub 2012 Nov 12. PMID: 23145990.
2. Wang J, Pelletier M, Zhang H, Xia H, Zhao Y. High-frequency ultrasound-responsive block copolymer micelle. *Langmuir*. 2009 Nov 17;25(22):13201-5. doi: 10.1021/la9018794. PMID: 19572509.
3. Xuan, Juan et al. "Ultrasound-Induced Disruption of Amphiphilic Block Copolymer Micelles." *Macromolecular Chemistry and Physics* 212 (2011): 498-506.
4. 彭之皓(2016年)·活性/可控自由基聚合反應·化工第63卷第3期
5. Pelletier M, Babin J, Tremblay L, Zhao Y. Investigation of a new thermosensitive block copolymer micelle: hydrolysis, disruption, and release. *Langmuir*. 2008 Nov 4;24(21):12664-70. doi: 10.1021/la802522b. Epub 2008 Oct 2. PMID: 18828616.
6. Lei B, Sun M, Chen M, Xu S, Liu H. pH and Temperature Double-Switch Hybrid Micelles for Controllable Drug Release. *Langmuir*. 2021 Dec 21;37(50):14628-14637. doi: 10.1021/acs.langmuir.1c02298. Epub 2021 Dec 9. PMID: 34882421.
7. Li Z, Tan S, Li S, Shen Q, Wang K. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review). *Oncol Rep*. 2017 Aug;38(2):611-624. doi: 10.3892/or.2017.5718. Epub 2017 Jun 14. PMID: 28627697; PMCID: PMC5562049.
8. Investigation of a Novel Antibacterial Agent SC-5005 against *Staphylococcus aureus*
9. Krzysztof Matyjaszewski and Nicolay V. Tsarevsky *Journal of the American Chemical Society* 2014 136 (18), 6513-6533
10. <https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E8%84%82%E8%B4%A8%E4%BD%93>
11. <https://zh.wikipedia.org/wiki/%E9%98%BF%E9%BB%B4%E7%B4%A0>
12. <https://zh.wikipedia.org/wiki/%E7%B4%AB%E6%9D%89%E9%86%87>
13. Du, J. and H. Lu, *Encyclopedia Of Polymer Science and Technology*. 2012.
14. <https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E9%95%BF%E6%98%A5%E6%96%B0%E7%A2%B1>
15. Hessari, M. and S. Raizada, *Nanotechnology for Breast Cancer Diagnosis and Therapy*. 2023.

【評語】 050205

此一研究工作設計在合成聚合前驅物 PEG-Br，再合成嵌段共聚物，接著合成 Micelle，並確認藥物可被包覆於聚合物微胞內。經過超音波刺激後的藥物微胞，可見到多出來的水解後聚合物的鏈譜線，顯示釋放實驗有成功。也確認聚合物鏈水解後且於低濃度下無細胞毒性。下列給予幾項建議：1) 在數據呈現上，除了放入圖片以外，應要加以說明，解釋數據為什麼符合、或是不符合預期。例如：圖 10，那些光譜特徵是什麼？什麼數據說明了聚合物在超音波處理後發生變化？有其他證據或是可以支持解釋的文獻？ 2) 可以加強分子化學結構與其化學性質間的關聯性，如：在報告中已經加入了 block copolymer 的化學式，可以多加入用化學的觀點來說明是什麼原因使這些聚合物對超音波敏感。 3) 作品完整度夠，唯引言或文獻回顧的部分應多說明此一研究和最接近的發表文獻工作上的差異和創新性。 4) 此外，指導的實驗室中是否有學長姊(或研究生)進行相似性的工作或研究。此部分應多加說明。 5) 圖三十七：受超音波刺激前後，聚合物微胞的 $^1\text{H NMR}$ 圖譜變化(作者自行繪製)。此圖中聚合物微胞的 $^1\text{H NMR}$ 圖譜變化非常小，似乎在 $^1\text{H NMR}$ 圖譜中可以視為誤差值內。應如何處理？

作品簡報

透過超音波敏感性聚合物微胞達成藥物投遞

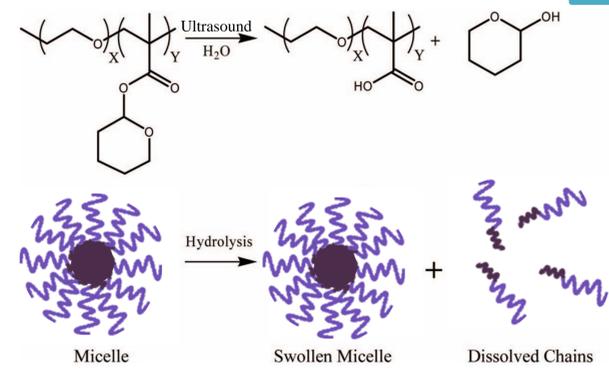
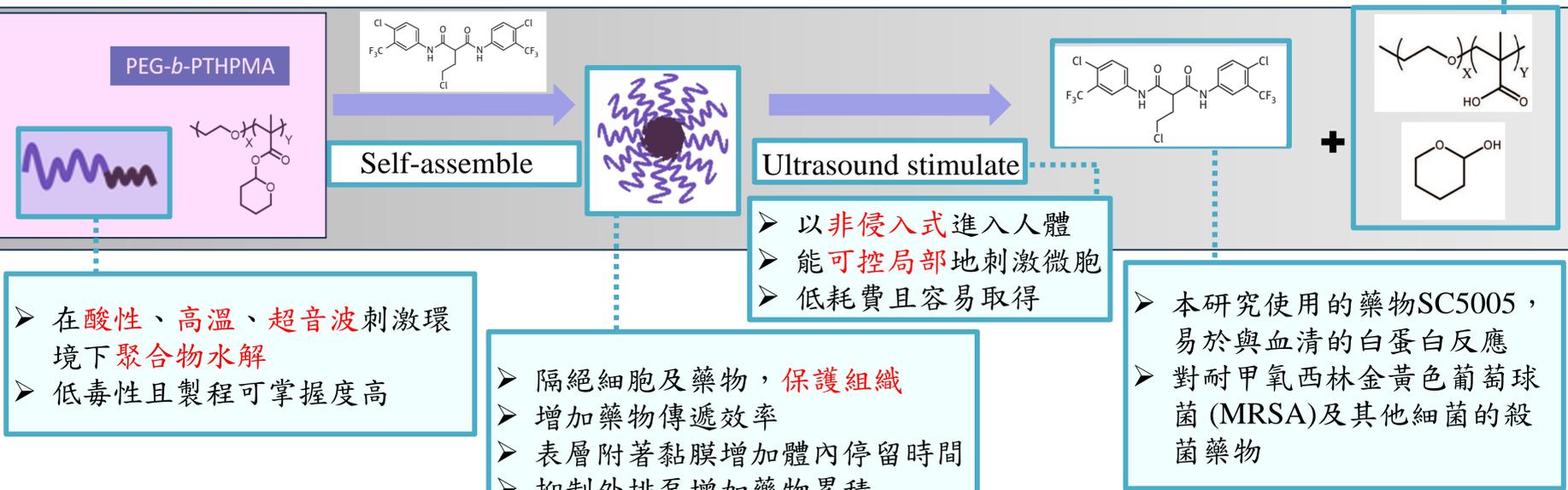
減少根管治療癒後復發的應用

壹、前言

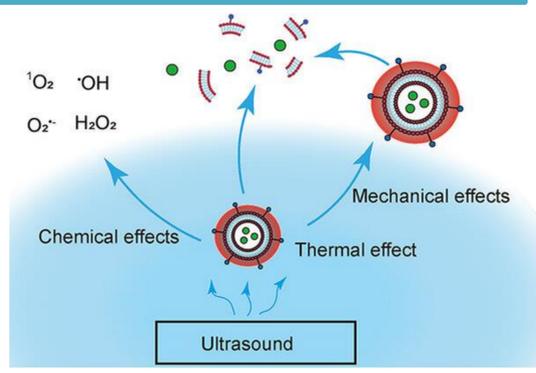
由於牙齦結構複雜，一般治療方法對牙本質小管內的殺菌功效欠佳。我們藉由超音波在牙小管(3 μm)中運送奈米微胞粒子的能力，讓微胞進入牙小管後釋放藥物來抑制牙小管深處病菌。

我們設計的可作為藥物載體聚合物微胞，由同時具有親水端和疏水結構的有機高分子，在水中聚集而成。微胞內側為疏水性，能包裹牙根治療藥物。將藥物載體聚合物微胞投放至患部後，配合超音波破壞微胞結構，達成藥物精準投放目的。

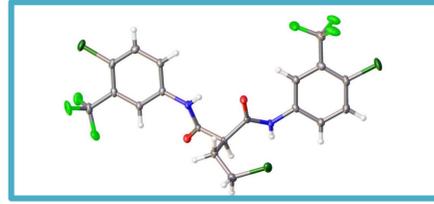
在超音波震盪下，**聚合物水解**，使微胞結構變得鬆散後釋出藥物



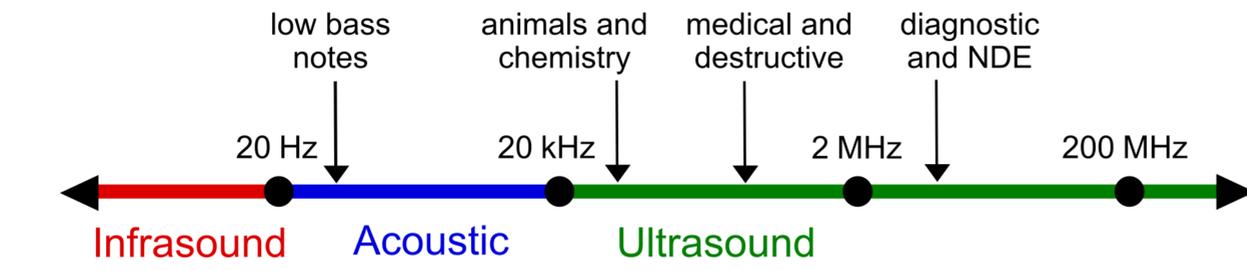
圖一：微胞水解機制



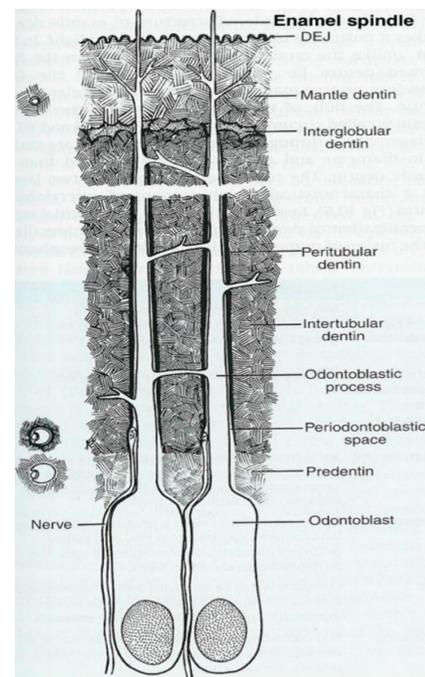
圖二：超音波作用示意圖^[1]



圖三：SC5005晶體結構圖



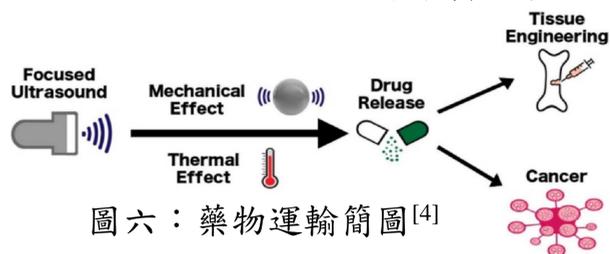
圖四：不同頻段的聲波與其應用^[2]



圖五：牙本質小管^[3]

PEG-PHPMA 性質	外層聚合物 (聚合度約為113)	內層單體	超音波規格	釋放效果
	<chem>[*]OCCO[*]</chem>	<chem>CC(=C)OC1OCCO1</chem>	頻率: 1.1 MHz 功率: 40 W	40% (5 min)

表一：PEGPHPMA聚合物結構性質表

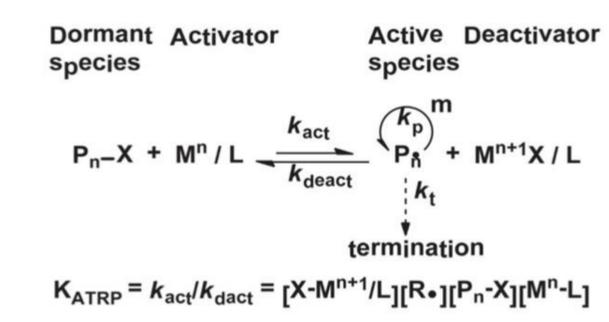


圖六：藥物運輸簡圖^[4]

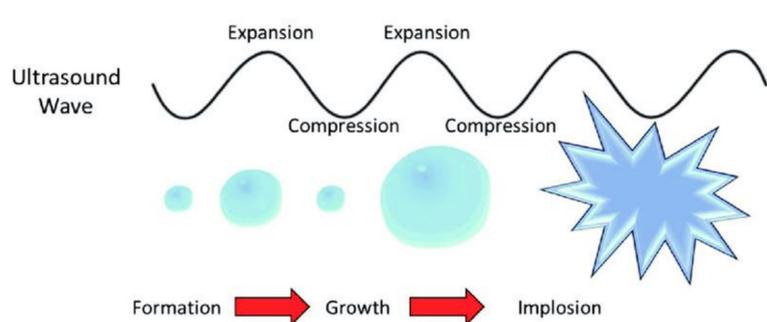
貳、研究目的

- 一、搜尋文獻，找出適合做為藥物的聚合物單體。
- 二、合成前驅物PEG-Br。
- 三、合成嵌段共聚物(block copolymer)—PEG-b-PHPMA，含有生物相容性的外層，具容納藥物性質，內層有超音波敏感性的單體聚合而成。
- 四、測量聚合物和藥物之細胞毒性，以及微胞的藥物釋放率、穩定性等。

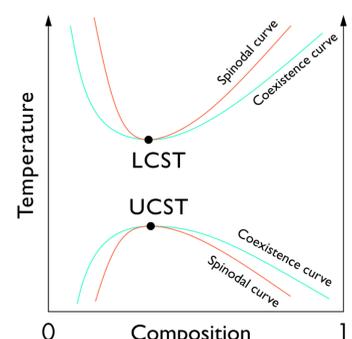
參、實驗原理



圖七：原子轉移自由基聚合(ATRP)機制^[5]

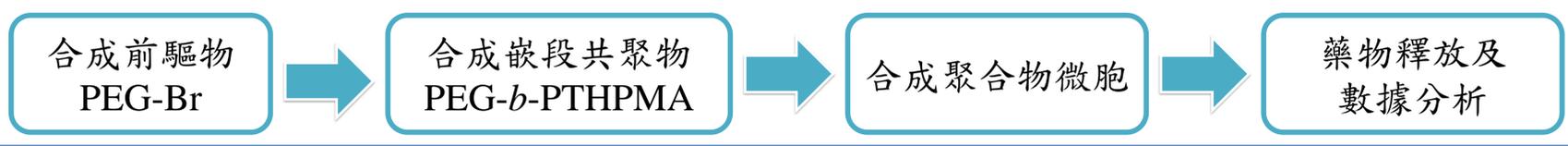


圖八：空穴效應示意圖^[6]

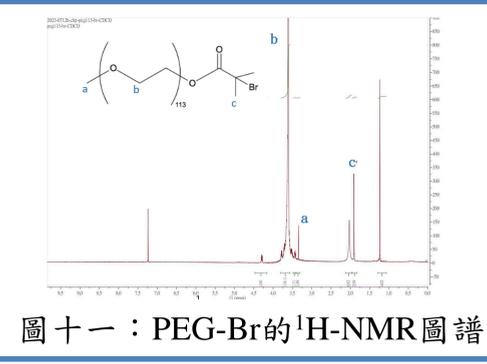
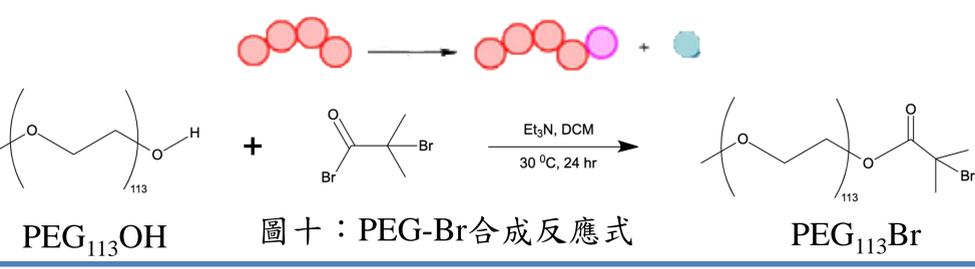


圖九：下臨界溶液溫度(LCST)^[7]

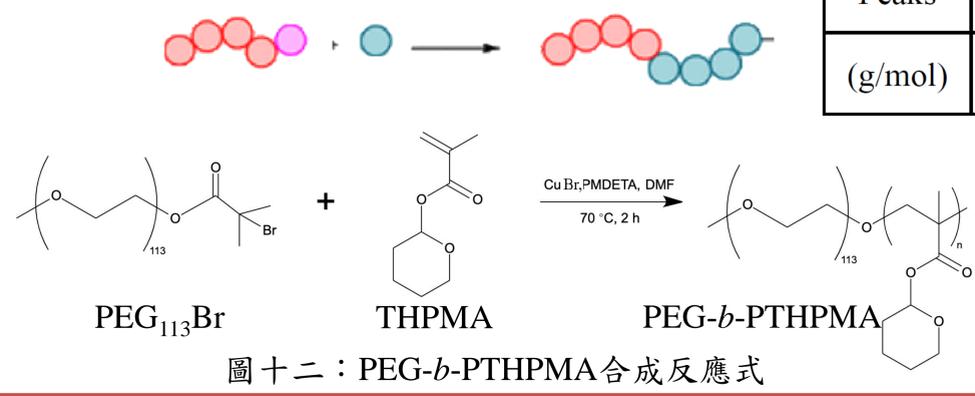
肆、研究過程及結果



一、合成前驅物PEG-Br



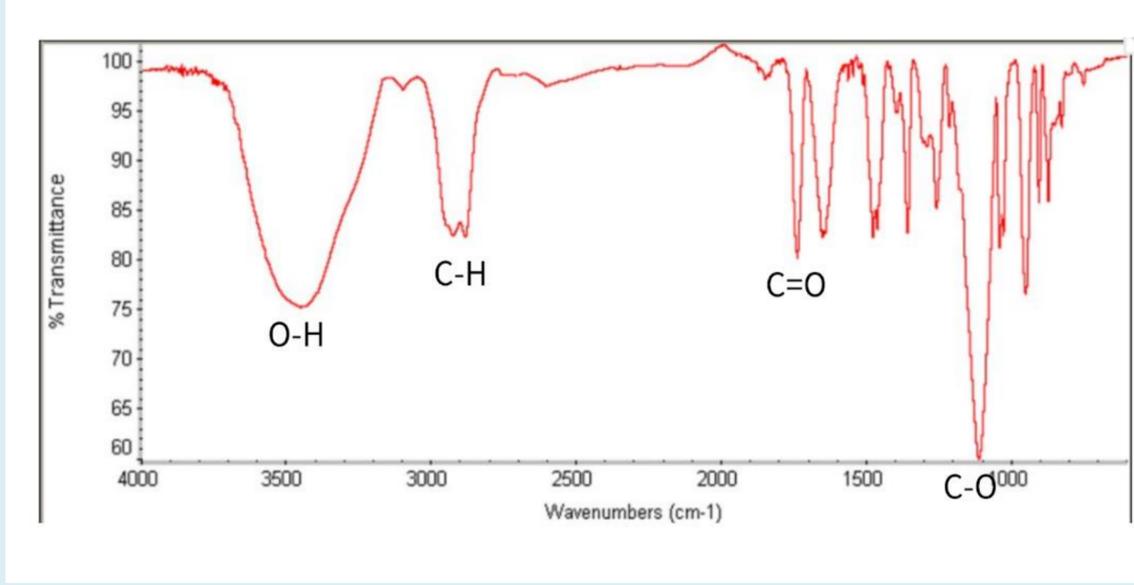
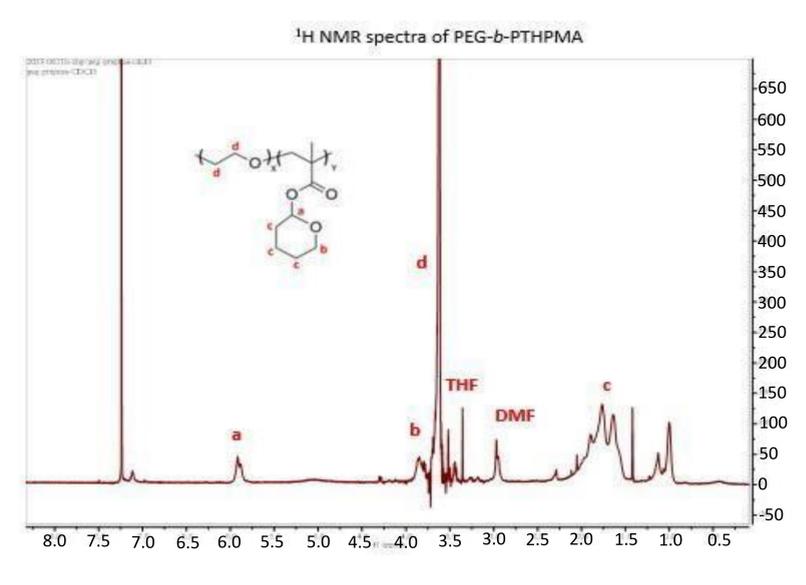
二、合成嵌段共聚物PEG-b-PHPMA



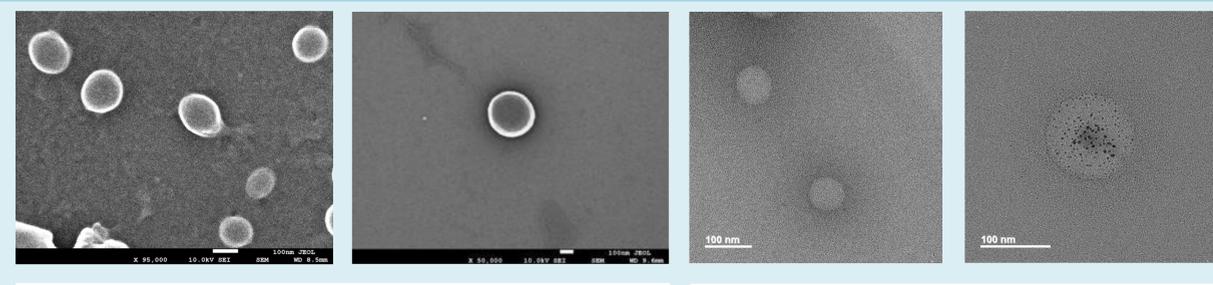
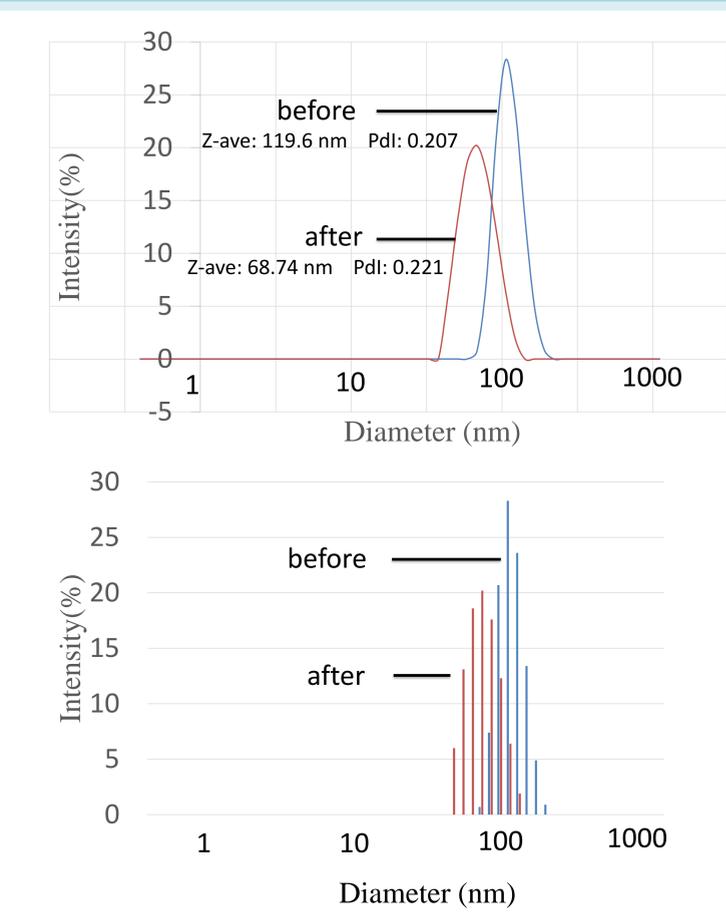
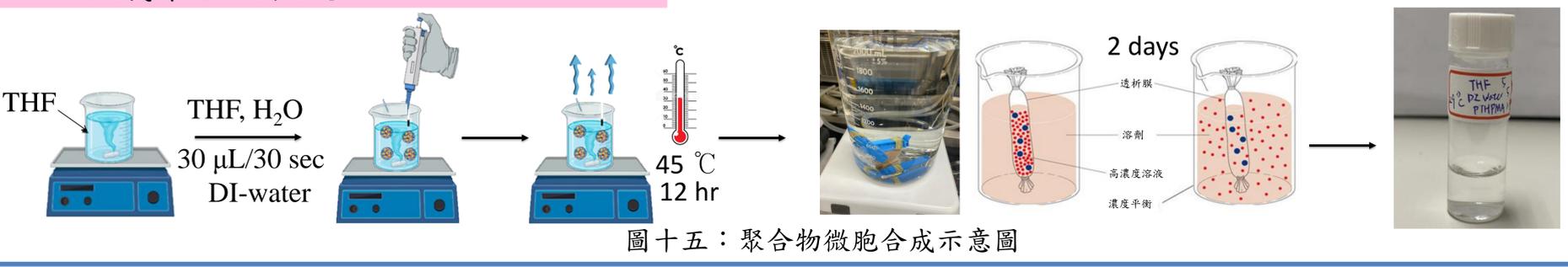
Peaks	Mp	Mn	Mw	Mz	Mv	PDI(Mw/Mn)
(g/mol)	45932	37710	49131	64370	47313	1.3077

表二：PEG-b-PHPMA的GPC數據

➤ 測得平均分子量約為37710，聚合物分散係數為1.3，也由數據確認PEG-b-PHPMA的結構。



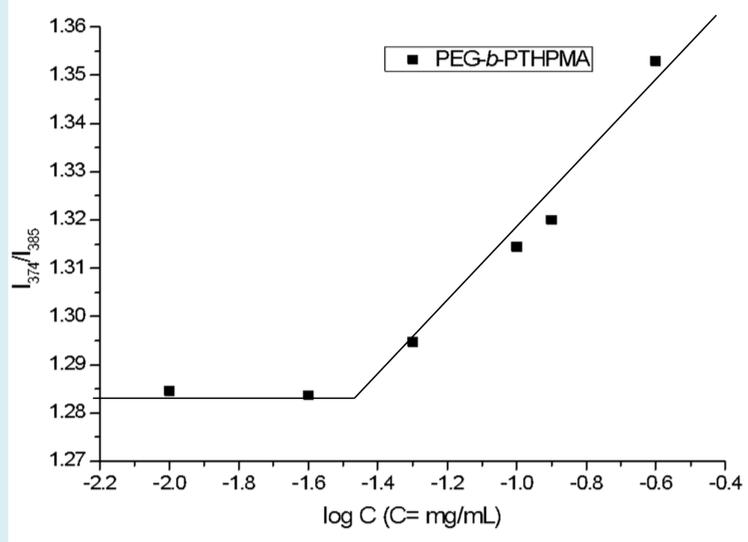
三、合成聚合物微胞



圖十六：聚合物微胞透析前後DLS分析結果

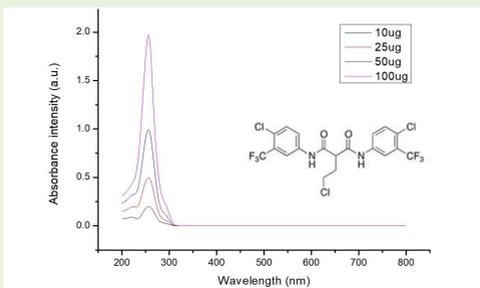
圖十九：聚合物微胞EDS分析結果

聚合物臨界微胞濃度(CMC)

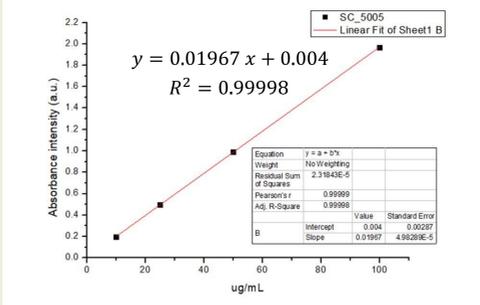


圖二十：CMC實驗結果：CMC=10⁻⁶ M 相當於40 µg/mL

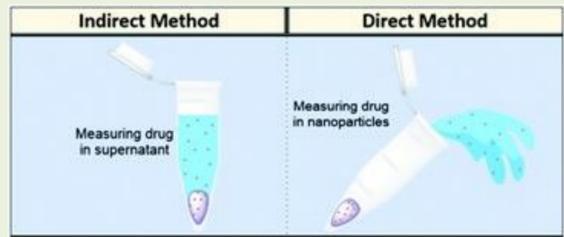
微胞的藥物包覆率



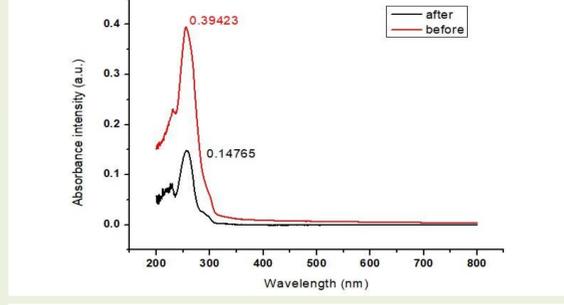
圖二十一：SC5005 UV特徵峰



圖二十四：SC5005檢量線



圖二十二：藥物包覆率測量方法

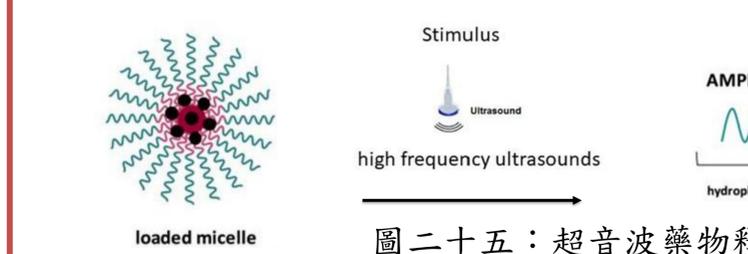


圖二十三：包覆藥物前後UV圖譜

$$LC\% = \frac{m_{drug} - m_{drug(f)}}{m_{np}} \times 100\% \quad LC\% = 4.33\%$$

$$EE\% = \frac{m_{drug} - m_{drug(f)}}{m_{drug}} \times 100\% \quad EE\% = 56.76\%$$

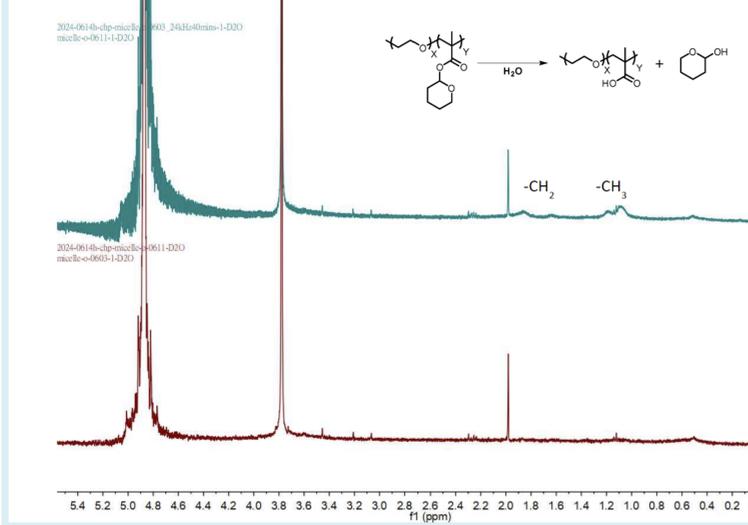
四、超音波藥物釋放



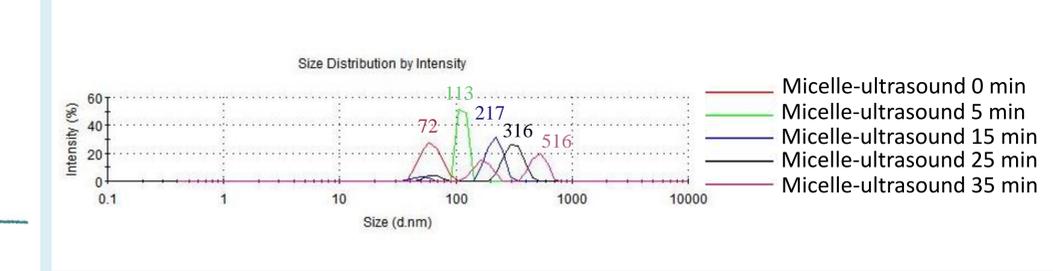
圖二十五：超音波藥物釋放示意圖



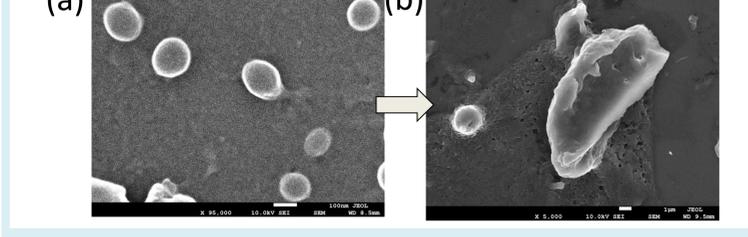
圖二十六：超音波藥物釋放裝置圖



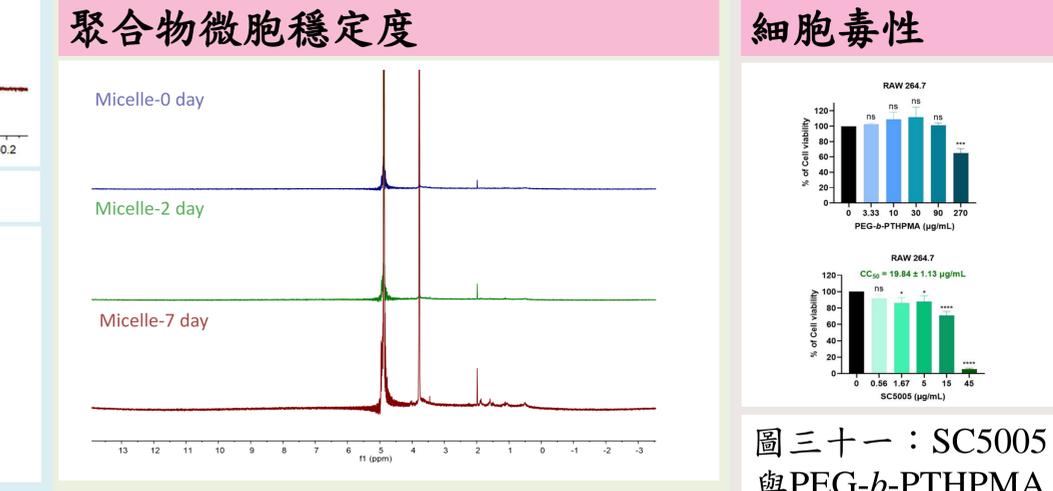
圖二十七：超音波刺激前後¹H-NMR圖譜變化



圖二十九：超音波刺激的DLS圖譜變化



圖二十八：超音波刺激(a)前(b)後微胞的SEM影像



圖三十：聚合物微胞穩定度實驗

圖三十一：SC5005與PEG-b-PHPMA的細胞毒性

伍、結論與未來展望

- 一、合成聚合前驅物PEG-Br
 - 結論：
 - 對照NMR譜線確認結構
 - Mass質譜測得平均分子量約為5000
- 二、合成嵌段共聚物PEG-b-PHPM
 - 結論：
 - 對照NMR其化學位移分別在3.5~4 ppm和1~3 ppm、3.8 ppm、5.9 ppm有PEG和THPMA上氫的訊號、以IR對照聚合物的官能基、確認結構符合預期。以GPC測得平均分子量約為37000、PDI為1.3
 - 展望：
 - 嘗試其他具有超音波響應的單體，如PIBMA。
 - 親水端PEG改成玻尿酸、殼聚糖等天然聚合物或可生物降解的高分子。

- 三、合成聚合物微胞
 - 結論：
 - 根據SEM圖譜，可以確定合成出圓球狀微胞，粒徑大小約為80~100 nm。
 - 根據TEM與EDS進行分析，確認藥物可被包覆於聚合物微胞內
 - 透過UV圖譜比較測出藥物包覆率，LC%=4.33%，EE=56.76%。
 - 四、超音波藥物釋放
 - 結論：
 - 經過超音波刺激後的藥物微胞，可見到新增的水解後聚合物鏈所產生之譜線，釋放實驗成功。
 - 確認聚合物鏈水解後低濃度下無細胞毒性。
 - 展望：
 - 包覆其他種藥物，如：抗癌藥物Doxorubicin。
 - 與牙醫系合作，進行動物實驗或細胞實驗，確認藥物釋放效率
 - 在聚合物微胞做官能基改質，藉以調整藥物輸送之效率。

陸、參考文獻

- Li, Y., Zhang, R., Xu, Z., & Wang, Z. (2022). Advances in Nanoliposomes for the Diagnosis and Treatment of Liver Cancer. International journal of nanomedicine, 17, 909–925. <https://doi.org/10.2147/IJN.S349426>
- slideshare.net.(2023, April 23). UNIT_2_1_ULTRASONIC INSPECTION.ppt. <https://www.slideshare.net/slideshow/unit21ultrasonic-inspectionppt/257387004#2>
- slideshare.net.(2017, August 09). UNIT_2_1-Tooth Dentin and dentinogenesis ppt. <https://www.slideshare.net/slideshow/tooth-dentin-and-dentinogenesis-ppt/78686105>
- Yeingst, T. J., Arrizabalaga, J. H., & Hayes, D. J. (2022). Ultrasound-Induced Drug Release from Stimuli-Responsive Hydrogels. Gels (Basel, Switzerland), 8(9), 554. <https://doi.org/10.3390/gels8090554>
- 彭之皓(2016年)活性/可控自由基聚合反應·化工 第63卷 第3期
- Lopes de Mello, H., Anastacio Alves, L., Araujo Dias, E., de Sá Pereira Magalhães, S., Cotta-de-Almeida, V., & da Cunha Bisaggio, R. (2021). Sonodynamic and Photodynamics Used as a Combined Therapy in the Treatment of Malignant Neoplasms: Facts and Open Questions. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.94600
- Mao, Hui, Qiu, Zhengsong, Xie, Binqiang, Wang, Zaiming, Shen, Zhonghou, and Weichao Hou. "Development and Application of Ultra-High Temperature Drilling Fluids in Offshore Oilfield Around Bohai Sea Bay Basin, China." Paper presented at the Offshore Technology Conference Asia, Kuala Lumpur, Malaysia, March 2016. doi: <https://doi.org/10.4043/26384-MS>
- Shrestha A, Fong SW, Khoo BC, Kishen A. Delivery of antibacterial nanoparticles into dentinal tubules using high-intensity focused ultrasound. J Endod. 2009 Jul;35(7):1028-33. doi: 10.1016/j.joen.2009.04.015. PMID: 19567328
- Xuan J, Boissière O, Zhao Y, Yan B, Tremblay L, Lacelle S, Xia H, Zhao Y. Ultrasound-responsive block copolymer micelles based on a new amplification mechanism. Langmuir. 2012 Nov 27;28(47):16463-8. doi: 10.1021/la303946b. Epub 2012 Nov 12. PMID: 23145990

海報之結果圖表皆由作者自繪，其他引用圖表於圖說中註明出處。