RRPC88020380 (// .P)

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

生物可吸收性牙用/骨用複合材的研究與開發

計劃編號：NSC88-2314-B-038-140
執行期限：87 年 8 月 1 日至 89 年 1 月 31 日
主持人：李勝揚　台北醫學院口腔復健醫學研究所

一、　中文摘要

本研究計畫以具有生物分解性之 L 型聚乳酸(poly L-lactic acid ; 簡稱 PLLA)高分子為基質材料，欲發展新型生物可吸收性醫用複合材，應用於牙科或骨科硬組織之修復。

採用熱熔熱壓成型法，製備聚乳酸試塊，以檢視下列項目：(1)PLLA 複合材之基本性質，以 MTS 測試其彎曲強度,用 DSC 來檢測熔點，再以測定其黏度值的方法,換算分子量；(2)量測 PLLA 在溶解、再沈、乾燥、熔融、和熱壓的加工合成過程中,其分子量的降解程度(3)進行動物試驗，觀察組織反應。

另外，利用濕式成膜的方式，製作聚乳酸膜，再以熱壓的方式加工成聚乳酸板，進行聚乳酸板將做機械性質的測試和動物實驗。

實驗發現 220 °C 為所測試聚乳酸熱熔加工的適當溫度。在不同的加溫氣氛中，聚乳酸完全熱熔所需的時間有所不同，空氣下熱熔較有效率，但過程之熱性質變化較為激烈，而真空下加溫的聚乳酸彎曲強度明顯大於在空氣中加溫。不同降溫系統亦造成不同聚乳酸彎曲強度，在氮氣下降溫的彎曲強度較空氣中的值高。亦即，於真空中熱熔並在氮氣下冷卻的聚乳酸所得之彎曲強度(115.9 ± 1.3 MPa)最高，而於空氣中加溫並冷卻的聚乳酸之彎曲強度(76.9 ± 1.8 MPa)最低。研究室所製備出的高彎曲強度聚乳酸經動物實驗及組織切片觀察，無發炎反應，生物相容性良好。

聚乳酸的基本性質和加工條件之研究漸趨成熟，後續為聚乳酸複合材的製備，而目前聚乳酸加工所得最佳化條件可作為重要參考。

二、　英文摘要：

Poly-L-Lactide (PLLA) was used to prepare composite as a useful deantal/orthopedic biomaterial in this investigation. The PLLA was heated at 220 °C under air atomsphere and nitrogen atomsphere, respectively, to achieve a mobile phase for molding. The PLLA was molding immediately by a hot press. \And then cooled down in nitrogen atomsphere or in air atomsphere. The basic characteristics of the obtained composites were performed by Differential Scanning Calorimeter

(DSC) in thermal properties, by X-ray diffraction pattern in crystallinity, and by Material Testing System (MTS) in strength, respectively. The bending strength of the sample prepared under nitrogen atomsphere (or under vacuum) is better than that prepared under air atomsphere. The thermal properties of the sample prepared under nitrogen atomsphere (or under vacuum) is more stable than those prepared under air atomsphere. These results suggest that a better PLLA composite can be obtained under optimal condition, as mentioned above.

三、 緣由及目的

聚乳酸是70年代以來所發展的可吸收性骨接合材料中最受矚目的材料之一，因為它滿足了部份理想骨接合材的需求，如良好的生物相容性，合適的堅硬度，在生物分解後的小分子不會殘留在體內，可被吸收代謝掉[1,2]，而毋需第二次手術移除。若能善加利用這些優點，可應用在生物體硬組織之修復。

1933年，Robert等人將聚乳酸(數目平均分子量=160,000)添加低分子量聚乳酸(數目平均分子量=2,000)製成生物薄膜，將之移植至老鼠腹腔皮下，發現此生物薄膜，不會引起炎性反應。當添加低分子量聚乳酸的含量愈多，有愈高的生物分解速率，添加低分子量聚乳酸的含量達30%(w/w)時生物薄膜於60天後能完全被吸收，可將此生物薄膜應用在引導牙齒周圍組織的再生。

聚乳酸雖然具有以上許多優點，不過對其加工的研究並不多。目前所發表聚乳酸加工方法的文獻中，Ruiyun 和 Peter[3](1997) 用發泡的方式來製備孔洞式的聚乳酸，其compressive modulus 還不到 8 MPa。Mainil-Varlet[4](1997)利用注射成型法(injection moulding)來製備聚乳酸，並植入兔子的脛骨進行動物實驗，10 週後其 molecular weight loss 達 50 %以上。John Wiley 和 Sons(1996)也利用注射成型法，不過試樣經過特殊熱處理，其抗張力降伏強度最高為 70 MPa。聚乳酸經由上述加工方式的成品並不適合應用在硬組織的修復，因為一般硬組織的彎曲強度必須在 120 MPa 以上，同時在骨頭修復的前 24 週內必須提供一定的強度，也就是說聚乳酸在這段時間的降解強度不宜太大。

聚乳酸是一種對溫度和水均非常敏感的材料，因此，要將其製備為具有較強機械性質的複合材並不容易。截至目前為止，因對聚乳酸的降解過程之結構與機制尚無詳細、清楚的瞭解，且受限於現今的合成技術無法得到高分子量的聚合物，以致於作為骨接合固定裝置的聚乳酸成形物之機械性質改良上，難有重大突破，因而無法將其應用於人體中必須承受較大應力的骨折處，也是其臨床應用上的一大缺失。

因此探討並開發能符合人類醫用需求之骨骼固定材料，並由此探討生物可分解高分子之基本分解機制與分解過程中物性的變化，冀能找出控制物性變化之材料設計知識為本研究重點。而由材料結構上改變引起相關物

性的變化，探討高分子微觀行為與巨觀材料性質的關聯，對於目前仍未清楚之高分子材料基本行為，將提供深富洞察力的瞭解。

本研究分為以下幾個階段進行：(1)聚乳酸基本加工條件的探討(2)PLLA之基本性質的測定(3)PLLA 機械性質強化的研究(4)聚乳酸再生膜加工方法之探討。藉由活體外實驗，測試新複合材的被吸收性、機械性質與生物相容性，有系統地進行基礎資料收集與分析，為未來的可吸收性骨釘或骨板複合材之商品提供重要參考。

四、 研究材料及方法

本實驗先以不同條件製備 PLLA 試樣，進行基本性質分析，例如結晶之基本型態與試樣表面觀察，以及彎曲與疲勞強度測試，以便選取較佳化條件加工而成之試樣，進一步做活體外機械性質測驗和退化實驗，並與上述彎曲、疲勞測試結果比較。

壹、聚乳酸試樣製備

由過去的研究可知，加工後分子量為20-25萬的PLLA試樣在動物體內完全被吸收的時間為32週至4年多，在人體內則更久，而且強度在其植入動物體內後25週便降低至近乎零。因此本實驗採用分子量雷同約為21萬的PLLA作為基質，在約6個月之活體外實驗中，觀察不同加工條件所製成試樣之生物與機械性質變化，而與文獻結果比較。

(一) 21 萬分子量聚左乳酸試樣製備

將 7 克 PLLA 置入模具中，於 220 °C 烘箱溫度，分別在不同環境(真空或空氣)下熱融至無氣泡產生。將模具取出，放入 120 °C 熱壓機中預溫十分鐘，再給予壓力(熱壓機的壓力表值分為五組：0、5、10、15、20 kgf/cm^2)五分鐘。接著，將模具自熱壓機中取出，分別放入不同降溫環境(空氣或氮氣)下冷卻。當模具的溫度降至室溫後，脫膜取出 PLLA 的塊狀成型物，進行切割，並以水砂紙加以研磨成大小約為 40x3x4 mm^3 的長方體試片，以進行各種物理化學性質測定。

(二) 不同分子量聚左乳酸試樣製備

(1) 21 萬分子量及 30 萬分子量聚乳酸顆粒分別依不同重量比例(1:0 , 1:1 , 0:1)用攪碎機均勻混合，取 7 克置入模具中，於 220 °C 烘箱溫度，在真空下熱融至無氣泡產生後，將模具取出，放入 120 °C 熱壓機中預溫十分鐘，不給予壓力(熱壓機的壓力表值為：0 kgf/cm^2)。接著，將模具自熱壓機中取出，放入氮氣環境中冷卻。當模具的溫度降至室溫後，脫膜取出 PLLA 成型物，進行切割，並以水砂紙加以研磨成大小約為 40x3x4 mm^3 的長方體試片，以進行各種物理化學性質測定。

(2) 21 萬分子量和 30 萬聚乳酸顆粒分別依不同比例(1:0 , 1:1 , 0:1)均勻混合，混合後聚乳酸置於 500 ml 的燒杯中，加入氯仿，形成 2.5 wt %的

聚乳酸/氯仿高分子溶液，使用電動攪拌機以 600~800 rpm 的轉速攪拌，待聚乳酸溶解(溶液中無顆粒且成透明狀)後，倒入重量比氯仿高的己烷，使聚乳酸再沈析出。而後以水幫浦將大量己烷抽出後，再以冷凍乾燥機持續減壓乾燥。乾燥後的聚乳酸秤重 7 克置入模具中，220 °C 於烘箱溫度，在真空下熱融至無氣泡產生，自烘箱中取出模具，放入 120 °C 熱壓機中預溫十分鐘，不給予壓力(熱壓機的壓力表值為：0 kgf/cm^2)。接著，將模具自熱壓機中取出放入氮氣環境中冷卻。當模具的溫度降至室溫後，脫膜取出 PLLA 成型物，進行切割，並以水砂紙加以研磨成大小約為 40x3x4 mm^3 的長方體試片，以進行各種物理化學性質測定。

貳、PLLA 基質之基本性質測定

(Ⅰ)分別量測上述試樣(每組 3 個)在 2 %氯仿溶液中的本質黏度(intrinsic viscosity)，[η]，經[η]=5.45x10^{-4}xMv$^{0.73}$ 公式計算，求出 PLLA 的平均黏度分子量 (viscosity-average molecular weight，即 Mv)。

(Ⅱ)量測各式 PLLA 長方體條狀試樣的彎曲模數(bending modilus)，彎曲強度(bending strength)，及疲勞強度(fatigue strength)，每組測試 5 片。彎曲模數和彎曲強度以三點彎曲試驗(three-point bending test)求之；以此種方法測試時，試樣的直接受力面會產生壓縮強度，遠離受力點的對側面會產生拉伸強度，而試片兩邊則產生剪切強度，這種應力模式近似臨床上骨接合固定裝置所承受的應力模式；此外，骨內裝置所必然承受的旋轉、彎曲、或振動應力雖可能小於材料的降伏強度，但在此等應力反覆作用下，終會令材料破壞，即所謂的疲勞(fatigue)，疲勞強度即指疲勞破壞不致於在特定循環次數內發生的最高作用應力。基於前述考量，本研究選擇彎曲及疲勞測試，以使 PLLA 能應用於骨釘或骨板之強度參考。

壓斷後的長方體條狀試樣以掃瞄式電子顯微鏡(scanning electron microscope，簡稱 SEM)觀察其斷裂面。

高分子之結晶可由 DSC 熱分析得知，由 Tg 和 Tm peaks 之面積大小，經過 calibration 後，可以合理地計算出來。另外，利用偏光顯微鏡觀察，可得知高分子內 crystallites 之大小、分佈、與大約數量，再與熱分析結果比較。各項物理化學性質的實際測定方法如下:

(1) 三點彎曲試驗

大小約為 42x4x3 mm^3 的聚乳酸試片以拉伸試驗機(MTS System Corporation, Eden Prairie ，Minnesota, USA)進行三點彎曲試驗。試片規格參照日本工業規格 JIS B 0621。試片接觸的三個支點直徑為 6 mm，兩個下支點間的距離為 30 mm，上支點的下降速率為每分鐘 2.5 mm。上支點下降時，正好壓在試片的中心點。測試完成後，依下列公式計算各試片的彎曲強度。

彎曲強度=3FL/2wt^2

F：試片破壞前之荷重 (N)

L：兩個下支點間的距離 (mm)

w：試片的寬度（mm）
t：試片的厚度（mm）

(2) 毛細管黏度的測定

黏度的測定可以估計分子量，從分子量的變化，觀察不同加工條件所造成聚乳酸降解的程度。其測定方式如下：

用 pipptte 吸取約 17.5 ml 的 chloroform 至 0.5 mm 黏度管中，於 25 °C 下測定 chloroform 的黏度；用 pipette 吸取 20 ml chloroform 置於 50 ml 三角燒瓶中，將 0.4 g PLLA 加入並用電磁攪拌器攪拌至完全溶解，或用 pipette 吸取 PLLA 溶液至黏度管，於 25 °C 下測定其黏度，並求得比黏度。

(3) 視差掃描式熱分析儀熱性質測定

藉由視差掃描式熱分析儀（DSC；Differential scanning calorimeter, Perkin Elmer Pyris1）的測定，可以比較在不同的加工環境下，聚乳酸熱性質的變化。其測定的方法為：

將 PLLA 粉末 5~10 mg 裝入 sample 盤中，秤重並記錄下重量，加上鋁蓋，用小型壓片機壓片，而後放到 DSC 的左側 oven，設定條件（溫度範圍 30~220 °C ：升溫: 30 至 220 °C，升溫速率: 10 °C/min；高溫維持在 220 °C , 5 mins；降溫: 220-30 °C，降溫速率: 50 °C/min）。

(4) 紅外線光譜測定

紅外線光譜的測定可以得知有機化合物中官能基的種類以及官能基的量。先將 PLLA 以乾式成膜方式製成薄膜，其方法如下：

取 1 克 PLLA 置於 sample 瓶中，用 pipette 吸取 10 ml dichloromethane 加入 sample 瓶中，用電磁攪拌器於常溫下攪拌至完全溶解，倒出一些溶液於玻璃板上成膜，將玻璃板放在電磁攪拌器上加熱，待膜乾燥後即可把膜取下。將所製作的薄膜利用紅外線光譜測定儀(FT-IR)測定其紅外線光譜。

(5) 接觸角測定

接觸角的測定是親疏水性的指標。使用接觸角測定儀在常溫下測定聚乳酸薄膜即可測得溶液（水體積約為 5.5 dL/滴）與聚乳酸寡聚物的接觸角及其張力。

(6) 廣角 X-ray 測定

廣角 X-ray 的測定可以得到高分子的結晶度(crystallinity)。將乳酸寡聚物以油壓打錠器製作成薄片狀，使用廣角 X-ray 測定，測定範圍為 5°-60°；掃瞄速率為 2 °/min。

(7) 斷面形態觀察

以掃描式電子顯微鏡（scanning electronic microscopy ，簡稱 SEM；S-2400，HITACHI，Japan）觀察經三點彎曲試驗後的試樣斷面形態。

五、 結果與討論

本實驗重點在於對聚乳酸基本性質之瞭解，以找出最佳化加工條件。所使用 21 萬分子量聚乳酸之熔點經 DSC 測定為 172 °C 左右，但要使其完全融熔，所需設定的溫度為 220 °C，如果溫度低於 220 °C，聚乳酸熱熔的效率非常低，溫度太高又會使聚乳酸熱降解效應增加，因此本研究結果發現，220 °C 為所使用 21 萬分子量聚乳酸熱熔的適當溫度。

實驗過程中發現，不同的加溫氣氛中，7 克 21 萬分子量聚乳酸要完全熱熔所需時間有所不同。在空氣中所需的時間大約一小時，而在真空下則需三個小時，所以在空氣下熱熔較有效率。不過，在 DSC 的熱性質分析中發現，聚乳酸在空氣中加溫至 220°C 時，其熱性質變化較為激烈(Fig.1)，當加熱 60 分鐘後，高分子的熔點降低，且 peak 越趨平緩、範圍越寬。範圍越寬是代表分子大小分布越廣。相對地，在氮氣下熱熔，其熱性質變化不大。

21 萬分子量聚乳酸完全熔融後，於熱壓機下熱壓成型，熱壓機的溫度必須控制在 120 °C 較理想，因為溫度太高聚乳酸在熱壓的過程中會從模具邊緣溢出，溫度太低則聚乳酸會固化，熱壓便會造成機械性破壞，使得聚乳酸表面呈現龜裂狀。

聚乳酸熱壓成型後，若給予急速冷卻，所製備出的聚乳酸試樣會成透明狀，乃因聚乳酸分子來不及排列入晶格所造成，然而結晶度不高[5]，機械強度也就降低。而聚乳酸在氮氣下自然冷卻至室溫所製備出的聚乳酸則呈白霧狀，其彎曲強度比急速冷卻的聚乳酸較高(Fig.2)。

在機械性質方面，真空下加溫的聚乳酸，其彎曲強度明顯大於在空氣中加溫。

在不同環境中降溫，也會造成聚乳酸彎曲強度上的變化。在氮氣下降溫的彎曲強度會較空氣中降溫的值高。從實驗數據得知，於真空中熱熔並在氮氣下冷卻的聚乳酸，彎曲強度值最高(115.8 ± 1.3 MPa)，而於空氣中加溫和冷卻的聚乳酸，其彎曲強度值最低(76.9 ± 1.8 MPa)。

高分子的機械性質與其結晶度和分子量有直接關係[6]，因此於實驗中，以黏度值的測定來觀察分子量的變化。結果發現，加溫的環境效應比降溫大，在不同的冷卻系統下，其分子量降解的差異性不大(Fig.3)。未加工過聚乳酸的黏度值約為 4.32 dL/g，在真空下加溫的聚乳酸黏度值約為 3.9 dL/g，而在空氣中加溫則降為 2.5 dL/g。因此，在空氣中加工會造成分子量較大的降解，DSC 的實驗亦發現類似結果。

聚乳酸在不同環境下加工所造成之分子量降解，並非是造成彎曲強度下降的唯一因素，結晶度的變化，將在後續的研究中以 X-ray 和晶像顯微鏡加以觀察。

從接觸角的實驗結果顯示(Fig.4)，PLLA 接觸角約為 45.7 deg。接觸角的大小和親疏水性有直接關係，接觸角越小，代表著材料的親水性越佳，聚乳酸的降解是屬於非酵素型水解，因此本實驗所製備的聚乳酸

有良好的親水性，而動物實驗的結果顯示，在生物體內有良好的相容性和吸收性。

在聚乳酸加工過程中，另一探討的重點在於熱壓對聚乳酸的影響。實驗中給予不同熱壓壓力，觀察彎曲強度上的變化，結果顯示熱壓的效應對於聚乳酸彎曲強度的影響不大。然而過去的研究[7]卻顯示熱壓對聚乳酸影響。本實驗過程中發現，高分子的軟化溫度和流動性會隨著壓力增加而改變，整個實驗設計必須再改良。因此，往後聚乳酸複合材的製備過程，熱壓效應仍是探討的重點。

本研究對於聚乳酸的基本性質和加工條件已多所瞭解，其中加工的最佳化條件，可做為製備聚乳酸複合材的重要參考。屆時將面臨的問題在於複合材內的界面探討和熱壓條件之突破。

六、 參考文獻

1. Higgins N A (1954): Condensation polymers of hydroxyacetic acid U.S.Patent NO.2676945
2. Leenslag J W (1982): Poly(L-lactide) and its biomedical applications Thesis, University of Groningen, The Netherlands
3. Ruiyun Zhang, Peter X. Ma: Poly(α-hydroxyl acids)/ hydroxyapatite porous composites for bone-engineering. I. Preparation and morphology Biodegradable composite scaffolds 446-456
4. P. Mainil-Varlet, B. Rhan and S. Gogolewski: Long-term in vivo degradation and bone reaction to various polylactides Biomaterials 18 (1997) 257-266
5. Carla Marega, Antonio Marigo, Vito Di Noto, Roberto Zannetti: Structure and crystallization kinetics of poly(L-lactic acid) Makromol. Chem. 193, 1599-1606 (1992)
6. Gabriele Perego, Gian Domenico Cella, and Catia Bastioli: Effect of Molrcular Weight and Crystallinity on Poly(lactic acid) Mechanical Properties Journal of Applied Polymer Science. Vol. 59, 37-48 (1996)
7. Nenad Ignjatovic, Simonida Tomic, Momcilo Dakic, Miroslav Miljkovic, Milenko Plavsic, Dragan Uskokovic: Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials Biomaterials 20 (1999) 809-816

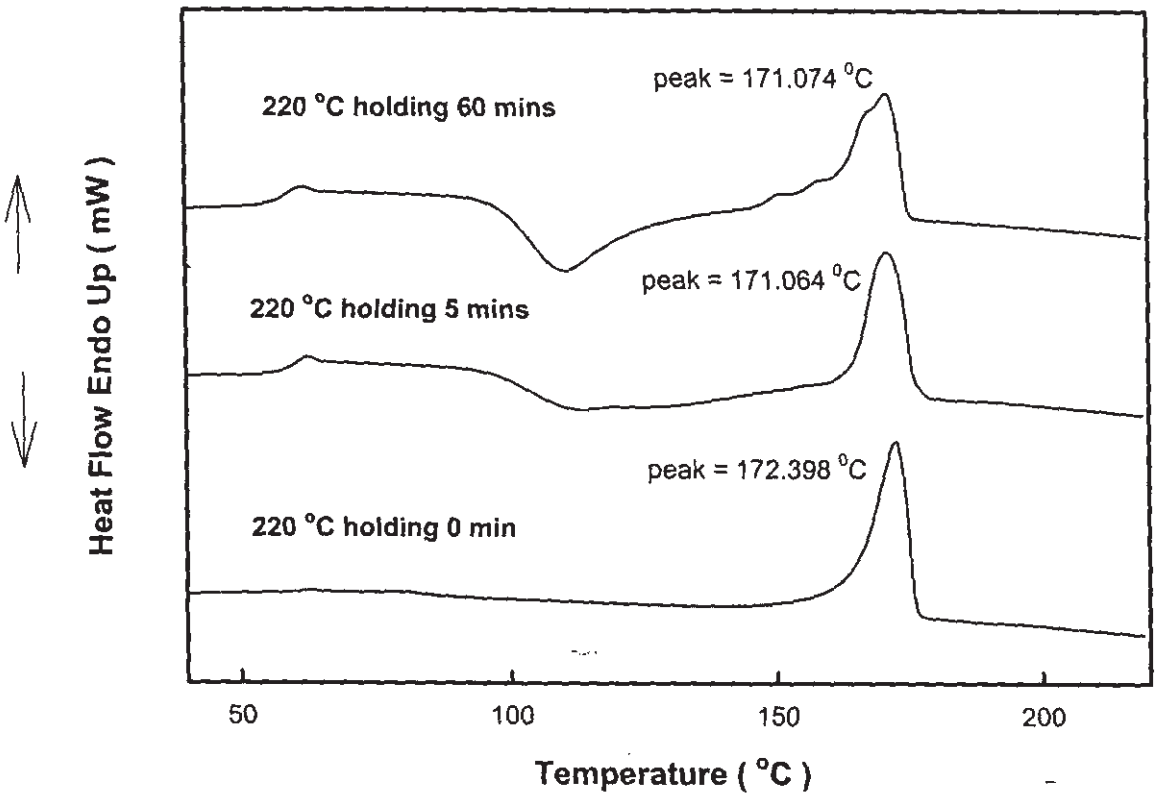

Fig.1 DSC of PLLA ; PLLA melting on air atomsphere , and holding on 220 °C at different time.

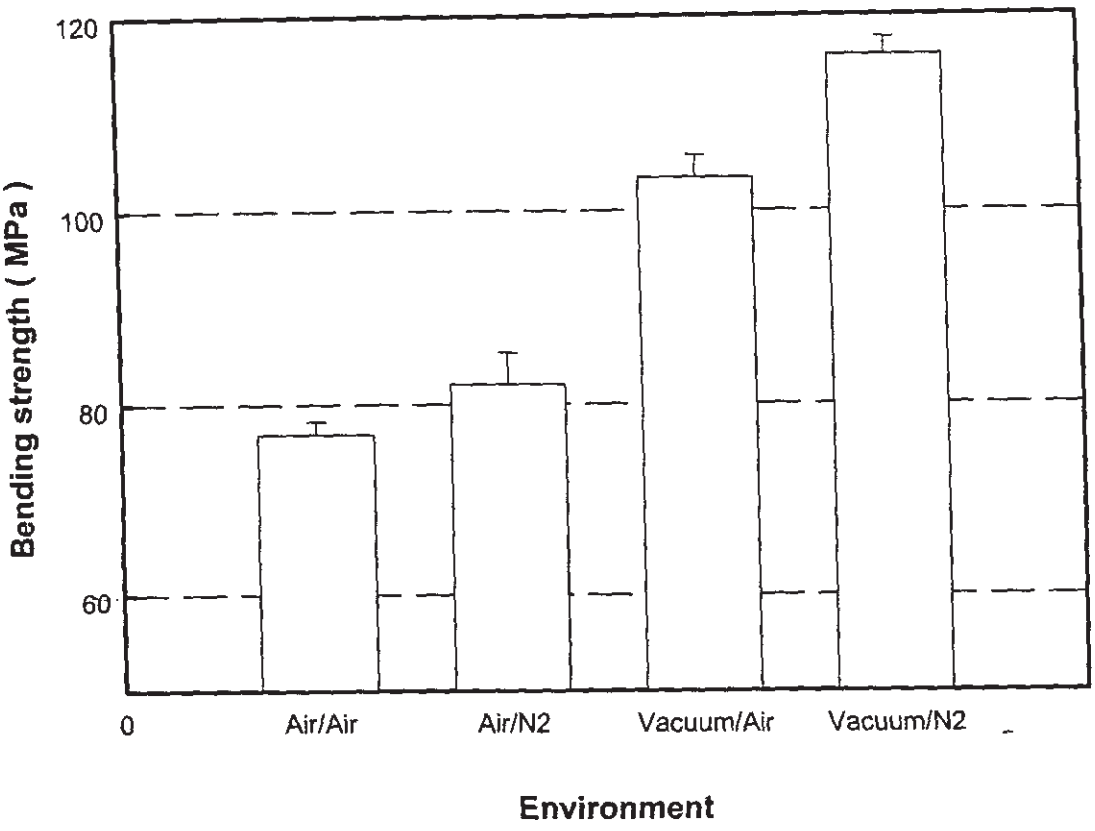

Fig.2 Bending strength of PLLA at different environment

Air/Air : Melting on air,cooling down on air ; Air/N2 : Melting on air , cooling down on Nitrogen ; Vacuum/Air : Melting on vacuum,cooling down on air ; Vacuum/N2 : Melting on vacuum,cooling down on Nitrogen

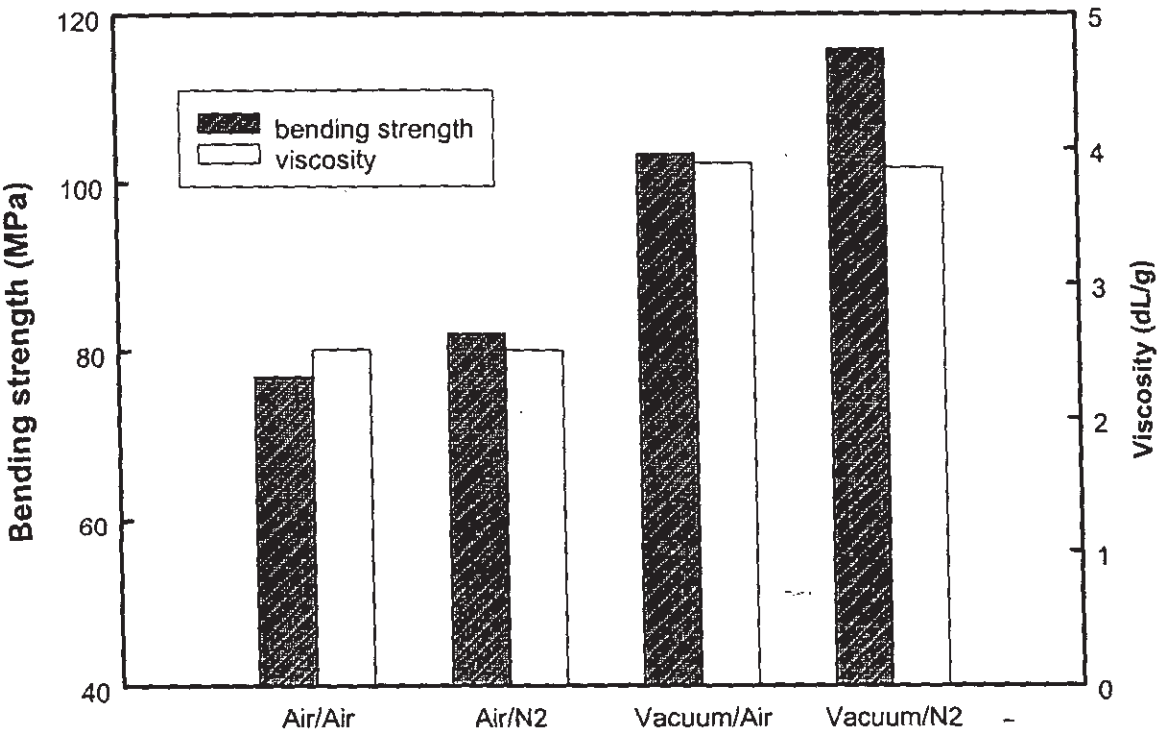

Fig.3 The environment effect for PLLA bending strength and vicosity

Air/Air : Melting on air,cooling down on air ; Air/N2 : Melting on air , cooling down on Nitrogen ; Vacuum/Air : Melting on vacuum,cooling down on air ; Vacuum/N2 : Melting on vacuum, cooling down on Nitrogen

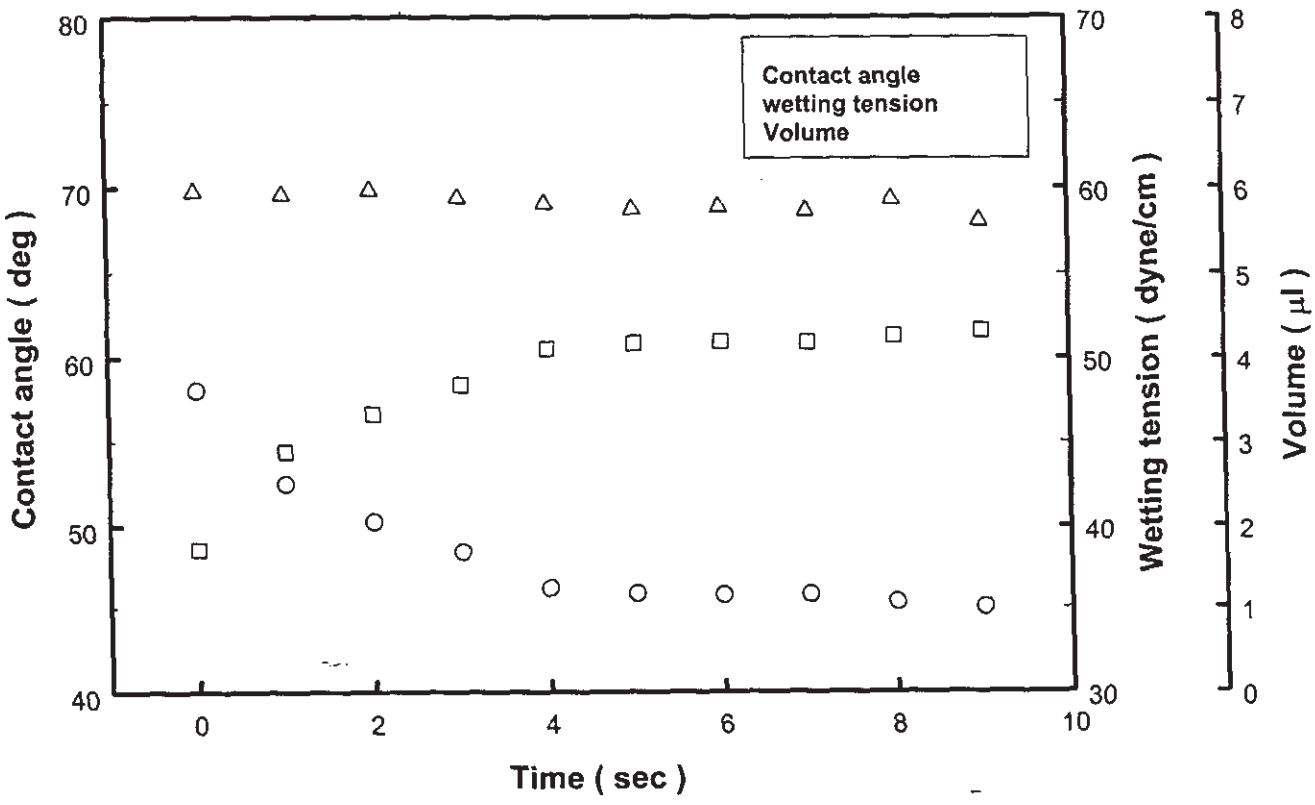

Fig.4 Contact angle of PLLA