

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：95136618

※ 申請日期：95.10.02

※IPC 分類：C01G1/10 (2006.01)

H01F1/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

官能化可磁化微球及其製備方法

Functionalized magnetizable microspheres and preparation thereof

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國防大學中正理工學院

CHUNG CHENG INSTITUTE OF TECHNOLOGY, NATIONAL
DEFENSE UNIVERSITY

代表人：(中文/英文)(簽章) 陸續 / LU, SU

住居所或營業所地址：(中文/英文)

桃園縣大溪鎮三元一街 190 號

No. 190, Sanyuan 1st St., Dashi Jen, Taoyuan, Taiwan

國籍：(中文/英文) 中華民國 / R.O.C.

三、發明人：(共 6 人)

姓名：(中文/英文)

1. 歐進祿 / OU, JINN-LUH

2. 宋鈺 / SUNG, YUH

3. 張章平 / CHANG, CHANG-PING

4. 葛明德 / GER, MING-DER

5. 蕭思菁 / SINO, SAI-JING

6. 陳彥丞 / CHEN, YAN-CHENG

國籍：(中文/英文) 1.-6. 中華民國 / R.O.C.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

發明所屬之技術領域

本發明係關於一種官能化可磁化微球及其兩階段的製備方法，該可磁化微球可用於生物應用。

先前技術

美國專利第 5356713 號揭示一種粒徑範圍 0.05~10 μm 的可磁化複合微球，其核心為表面被塗佈有單層的水不可溶分散劑的可磁化奈米粒子及包覆該可磁化奈米粒子的交聯的聚合物的外殼。此前案所揭示的的製備方法包括將可磁化奈米粒子分散於一含有乙烯芳香族單體與乙烯不飽和乳化單體及選擇性的一分散劑的混合物中；將一起始劑加入該分散液中並且一起分散於水中；及共聚合該等單體。此方法所得可磁化微球中仍有大於 10% 的不含可磁化材料的空白聚合物微球，需要在磁場下加以分離。用此法製得的可磁化微球，其粒徑分佈單分散性不好。所得到的可磁化微球或其水分散液可用來以吸附或共價鍵結合方式固定生物活性物質，例如蛋白質(抗體和酵素)、抗原及醫藥產品。根據該生物活性物質的本質，所獲得的產品較有利地被使用在診斷分析，例如膠合分析(agglutination)、放射免疫分析(radioimmunoassay, RIA)、免疫放射分析(immunoradiometric assay, IRMA)及酵素免疫分析(enzyme immunoassay, EIA)；親合力層析法(affinity chromatography)方面的應用，作為一種生技的酵素催化劑；及作為細胞培

養載體。此美國專利的內容以考方式被併入本案。

美國專利第 5976426 號揭示一種粒徑範圍 0.1~5 μm 的單分散性可磁化微球，其包含一親脂性聚合物基質(matrix)及可磁化填料。此前案所得的可磁化微球其可磁化填料有部份裸露在親脂性聚合物基質外層，造成其在生醫領域應用上會有所限制。此美國專利的內容以考方式被併入本案。

發明內容

本發明的一主要目的在提供一種官能化可磁化微球，其具有可磁化奈米粒子的核心及鍵結有硫酸根(SO_4^-)的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物的外殼。

本發明的另一目的在提供一種表面附著有奈米貴金屬粒子的可磁化微球，其具有可磁化奈米粒子的核心及外表面附著有奈米貴金屬粒子的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物的外殼。

本發明的另一目的在提供一種官能化可磁化微球的製備方法。

依本發明內容所完成的官能化可磁化微球的製備方法是一種兩階段的製備方法。第一階段以懸浮聚合法在表面被塗佈有單層的水不可溶分散劑的可磁化奈米粒子形成包覆該可磁化奈米粒子的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物內殼；第二階段使用過硫酸鹽起始劑進行自由基聚合形成包覆該內殼的外殼，該外殼為鍵結有硫酸根(SO_4^-)的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物。所獲得的可磁化微球具有介於

100-1000 nm 的粒徑，及該內殼對外殼的厚度比為 10 : 1 至 1 : 10。

目前可磁化微球的製備過程中常需添加界面活性劑，須進行界面活性劑之移除才能應用在生醫領域。本發明方法先對可磁化奈米粒子進行第一層聚合物包覆，再於不含界面活性劑的條件下進行第二層聚合物包覆，可避免移除界面活性劑之困擾，並且在可磁化微球表面形成具有反應性之硫酸根基團。硫酸根基團除了可以穩定該可磁化微球外，更可以進一步與使貴金屬離子被還原而附著在該可磁化微球的表面上，使其進一步被金屬化，而在生醫領域上有更廣泛的應用。

實施方式

本發明提供一種官能化可磁化微球，包含粒徑介於 1-30 nm 的可磁化奈米粒子，其表面被塗佈有單層的水不可溶分散劑；包覆該可磁化奈米粒子的內殼，其為苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物；及包覆該內殼的外殼，其為鍵結有硫酸根(SO_4^-)的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物，其中該可磁化微球具有介於 100-1000 nm 的粒徑，及該內殼對外殼的厚度比為 10 : 1 至 1 : 10。

本發明進一步提供本發明的官能化可磁化微球的一種製備方法，包含下列步驟：

a)於一包含表面被塗佈有單層的水不可溶分散劑之粒徑介於 1-30 nm 的可磁化奈米粒子，水，苯乙烯單體

及選擇性的第一乙烯不飽和單體，一自由基起始劑及一界面活性劑的混合物中，在攪拌下懸浮聚合苯乙烯單體及選擇性的乙烯不飽和單體，以形成包覆該可磁化奈米粒子的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物內殼；及

b)將步驟 a)所獲得的乳化液與苯乙烯單體、選擇性的第二乙烯不飽和單體，及過硫酸鹽起始劑混合，進行苯乙烯單體及選擇性的第二乙烯不飽和單體的自由基聚合，而獲得包覆該內殼的外殼，該為鍵結有硫酸根(SO_4^-)的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物，於是形成官能化可磁化微球。

較佳的，本發明的可磁化微球進一步包含附著於該外殼的表面上的奈米貴金屬粒子。

較佳的，該可磁化奈米粒子為磁鐵礦(magnetite)或赤鐵礦(haematite)，以磁鐵礦(magnetite)為更佳。

較佳的，該可磁化奈米粒子的水不可溶分散劑為含有12-24個碳的脂肪族酸或脂肪族胺。

較佳的，該內殼及外殼均為苯乙烯聚合物。該苯乙烯聚合物，較佳的，具有一介於500-10000的數平均分子量。

較佳的，該貴金屬為金(Au)、銀(Ag)、鈀(Pd)、鉑(Pt)或鈦(Ru)，以金(Au)為更佳。

於本發明方法，該過酸鹽起始劑較佳的為過硫酸鹼金屬鹽，以過硫酸鉀為更佳。

較佳的，本發明方法進一步包含將步驟 b)獲得的官能化可磁化微球與一含有貴金屬離子的水溶液接觸，於是該

貴金屬離子被還原成元素態並且附著於該外殼的表面。更佳的，該接觸係在 50-95°C 的溫度進行。

較佳的，該第一乙烯不飽和單體未被使用於本發明方法的步驟 a)。

較佳的，該第二乙烯不飽和單體未被使用於本發明方法的步驟 b)。

於本發明方法中較佳的該含有貴金屬離子的水溶液為含有金 (Au)、銀 (Ag)、鈀 (Pd)、鉑 (Pt) 或鈦 (Ru) 離子的水溶液，以含有金離子的水溶液為更佳。

於本發明方法中較佳的該第一及第二共聚合單體係獨立的為丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯單體。

於製備本發明的官能化可磁化微球的一較佳具體例中，平均粒徑約 8 nm 的表面具有不溶於水官能基的磁鐵礦粒子 (Fe_3O_4) 被用作為可磁化奈米粒子；及苯乙烯單體被使用作為包覆的聚合物的原料。於第一階段，磁鐵礦粒子被摻入一預先溶解有一自由基起始劑的苯乙烯單體，另一方面一界面活性劑被溶解於一適量的水中，於一低溫例如冰浴下將該油相與水相以一均質機加予混合而形成一懸浮液；將該懸浮液於一升高溫度及攪拌下進行懸浮聚合反應，以形成包覆該可磁化奈米粒子的苯乙烯聚合物內殼。此時所得到的中間可磁化微球具有約 100-500nm 的粒徑，且粒徑分佈呈單一分散性。由高解析 TEM 分析證實，可磁化奈米粒子完全被苯乙烯聚合物包覆，可磁化奈米粒子在

高分子內部仍呈現分散狀態。

使用於本發明的可磁化奈米粒子可為前述美國專利第 5356713 號及第 5976426 號所揭示者，

第一階段所使用的自由基起始劑以可溶於單體中為原則，例如前述美國專利第 5356713 號所揭示之偶氮腈 (azonitriles) 及過氧化物，其用量為單體的 1-10 重量%。適用於本發明的界面活性劑可以陰離子、陽離子或非離子界面活性劑，其用量為可磁化奈米粒子的 0.1-5 重量%，以陰離子界面活性劑為較佳，例如脂肪酸鹽、烷基硫酸鹼金屬鹽、烷基磺酸鹽等。

於第二階段，將第一階段所獲得的聚合後乳化液與溶解有過硫酸鹽起始劑的水溶液於一低溫例如冰浴下混合，再將苯乙烯單體加入所獲得的混合物，於一升高溫度及攪拌下進行自由基聚合反應，以形成包覆該內殼的苯乙烯聚合物外殼。經由簡單的過濾即可將官能化可磁化微球產物由反應混合物中取出。由於本發明方法於第二階段使用過硫酸鹽起始劑，因此該苯乙烯聚合物外殼被鍵結有硫酸根 (SO_4^-) 基團。該苯乙烯聚合物外殼具有約 100-500nm 的厚徑。本發明方法於第二階段未導入界面活性劑，中間產品表面上原有之界面活性劑，受到來自第二階段的單體自由基聚合所形成的聚合物的堆疊，至該聚合物成長至一定厚度時，該界面活性劑受到聚苯乙烯分子鏈之糾纏 (Entanglement)，而被埋入於苯乙烯聚合物外殼內。於是所製得的官能化可磁化微球的表面不含界面活性劑，而是位

於聚苯乙烯鏈端之硫酸根基團。官能化可磁化微球藉由硫酸根基團之電荷斥力穩定的分散於水中。由高解析 TEM 分析證實，該苯乙烯聚合物外殼贊有一均勻的厚度，因此最終官能化可磁化微球仍然具有單一分散性粒徑分佈。此官能化可磁化微球可進一步與貴金屬離子反應，進行奈米金屬沉積反應，使官能化可磁化微球的表面附著有奈米貴金屬粒子而更具功能性。

實施例一

將以苯乙烯單體重量計 1.28% 的過氧二苯甲醯 (benzoyl peroxide, BPO) 起始劑溶於苯乙烯單體中，導入平均粒徑約 8 nm 的表面具有不溶於水官能基的磁鐵礦粒子 (Fe_3O_4) (購自 Taiwan Advance Nanotech Inc. 公司，代號 USPIO-202)，在冰浴條件下，與十二烷基硫酸鈉水溶液以一均質機高速均質混合 (1200 rpm) 20 分鐘。苯乙烯單體及磁鐵礦粒子的用量如表一所列。該十二烷基硫酸鈉水溶液含有 54 ml 去離子水及以去離子水重量計 1.28% 的十二烷基硫酸鈉。所獲得的懸浮液再置於 250 ml 錐形瓶中，在溫水浴 75°C 及 200 rpm 攪拌速度下進行聚合反應，反應時間為 8 小時。

如圖 1 高解析 TEM 所示，磁鐵礦粒子已完全被苯乙烯聚合物包覆，磁鐵礦粒子在苯乙烯聚合物內部仍呈現分散狀態，且磁鐵礦粒子被包覆在苯乙烯聚合物內未呈現核-殼結構，顯示磁性奈米粒子與油相相容性好，有利於製備各種粒徑之可磁化複合微球。

表一列出不同磁鐵礦粒子用量的實驗結果，從表一的數據可以看出包覆有苯乙烯聚合物之磁鐵礦粒子之複合微球的平均粒徑(D)隨著磁鐵礦粒子的添加量增加而增大。另外經由粒徑分析儀(Zeta Plus, BIC)觀察到複合微球的粒徑分佈具有單一分佈性。

表一

磁鐵礦粒子(mg)	苯乙烯(ml)	BPO (M)	D (nm)
50	6	3.17×10^{-4}	140
100			169
200			211
300			216
400			301
500			344

實施例二

重覆實施例一的步驟，但改變十二烷基硫酸鈉的用量，其用量由 1.28 重量% 改變成以 0.32 重量%(以去離子水重量計)。結果列於表二。

由表一及二的數據可以得知，隨著界面活性劑含量減少，包覆有苯乙烯聚合物之磁鐵礦粒子之複合微球的平均粒徑(D)會增大。

表二

磁鐵礦粒子 (mg)	苯乙烯 (ml)	BPO (M)	D (nm)
100	6	3.17×10^{-4}	375
200			421
300			432
400			449

實施例三

取實施例一中磁鐵礦粒子用量為 100mg 所製備的乳化液 (內含包覆有苯乙烯聚合物之磁鐵礦粒子之複合微球) 17 ml 及 54 ml，再分別添加作為水相起始劑之過硫酸鉀 (KPS) 水溶液。在冰浴條件下，以超音波震盪 30 分鐘。該過硫酸鉀 (KPS) 水溶液含有 54 ml 去離子水及過硫酸鉀莫耳濃度為 3.4×10^{-3} M。接著加入 6 ml 的苯乙烯單體，於 -75°C 溫水浴反應 24 小時。經由過濾取出最終可磁化微球產物，並以去離子水清洗。表三列出複合微球乳化液的用量及所獲得的最終可磁化微球產物的平均粒徑。

表三

複合微球乳化液 (ml)	17	54
最終可磁化微球產物的粒徑 (nm)	154	200

如圖 2 的 TEM 照片所示，本實施例所獲得的最終可磁化微球產物具有一淡灰色的外殼，厚度約為 5 nm。

實施例四

取實施例三中所製備的可磁化微球產物複合微球 20 ml (粒徑 154 nm) 浸於 20 ml 的濃度為 600 ppm 的氯酸金水溶液 (gold chloride, HAuCl_4) 中，加熱至 80°C ，反應 10 分鐘。過濾取出可磁化微球產物，並以去離子水清洗。如圖 3 的 TEM 照片所示，該可磁化微球的表面附著有奈米金粒子。

圖式簡單說明

圖 1 示出本發明實施例一所得之包覆有苯乙烯聚合物之磁鐵礦粒子之複合微球的穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 照片。

圖 2 示出本發明實施例三所得之最終可磁化微球產物的 TEM 照片。

圖 3 示出本發明實施例四所得之表面附著有奈米金粒子的可磁化微球的 TEM 照片。

五、中文發明摘要：

本發明揭示一種兩階段的官能化可磁化微球的製備方法，第一階段以懸浮聚合法在表面被塗佈有單層的水不可溶分散劑的可磁化奈米粒子形成包覆該可磁化奈米粒子的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物內殼；第二階段使用過硫酸鹽起始劑進行自由基聚合形成包覆該內殼的外殼，該外殼為鍵結有硫酸根(SO₄⁻)的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物。較佳的該外殼的表面進一步被附著有奈米貴金屬粒子。所獲得的可磁化微球具有介於 100-1000 nm 的粒徑，及該內殼對外殼的厚度比為 10 : 1 至 1 : 10。

六、英文發明摘要：

The present invention discloses a two-stage process for preparing functionalized magnetizable microspheres. The first stage includes forming an inner shell of styrene polymer or styrene copolymer on magnetizable nano particles having a monolayer of a non-water-soluble dispersing agent coated thereon. The second stage includes forming an outer shell of styrene polymer or styrene copolymer with sulfate (SO₄⁻) bounded thereto on the inner shell by free radical polymerization. Preferably, nano particles of a noble metal are deposited on the surface of the outer shell. The magnetizable particles prepared by the process of the present invention have a particle size of 100-1000 nm, and the thickness ratio of the inner shell to the outer shell ranges from 10 : 1 to 1 : 10.

公告本

十、申請專利範圍：

1. 一種官能化可磁化微球，包含粒徑介於 1-30 nm 的可磁化奈米粒子，其表面被塗佈有單層的水不可溶分散劑；包覆該可磁化奈米粒子的內殼，其為苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物；及包覆該內殼的外殼，其為鍵結有硫酸根 (SO_4^-) 的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物，其中該可磁化微球具有介於 100-1000 nm 的粒徑，及該內殼對外殼的厚度比為 10 : 1 至 1 : 10。
2. 如申請專利範圍第 1 項的可磁化微球，其進一步包含附著於該外殼的表面上的奈米貴金屬粒子。
3. 如申請專利範圍第 1 項的可磁化微球，其中該可磁化奈米粒子為磁鐵礦 (magnetite) 或赤鐵礦 (haematite)。
4. 如申請專利範圍第 3 項的可磁化微球，其中該可磁化奈米粒子為磁鐵礦 (magnetite)。
5. 如申請專利範圍第 1 項的可磁化微球，其中該可磁化奈米粒子的水不可溶分散劑為含有 12-24 個碳的脂肪族酸或脂肪族胺。
6. 如申請專利範圍第 1 項的可磁化微球，其中該內殼及外殼均為苯乙烯聚合物。
7. 如申請專利範圍第 6 項的可磁化微球，其中該苯乙烯聚合物具有一介於 500-10000 的數平均分子量。
8. 如申請專利範圍第 2 項的可磁化微球，其中該貴金屬為金 (Au)、銀 (Ag)、鈀 (Pd)、鉑 (Pt) 或鈦 (Ru)。
9. 如申請專利範圍第 8 項的可磁化微球，其中該貴金屬為

金 (Au)。

10. 一種如申請專利範圍第 1 項的官能化可磁化微球的製備方法，包含下列步驟：

- a) 於一包含表面被塗佈有單層的水不可溶分散劑之粒徑介於 1-30 nm 的可磁化奈米粒子，水，苯乙烯單體及選擇性的第一乙烯不飽和單體，一自由基起始劑及一界面活性劑的混合物中，在攪拌下懸浮聚合苯乙烯單體及選擇性的乙烯不飽和單體，以形成包覆該可磁化奈米粒子的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物內殼；及
- b) 將步驟 a) 所獲得的乳化液與苯乙烯單體、選擇性的第二乙烯不飽和單體，及過硫酸鹽起始劑混合，進行苯乙烯單體及選擇性的第二乙烯不飽和單體的自由基聚合，而獲得包覆該內殼的外殼，該為鍵結有硫酸根 (SO_4^-) 的苯乙烯聚合物或苯乙烯共聚物，於是形成官能化可磁化微球。

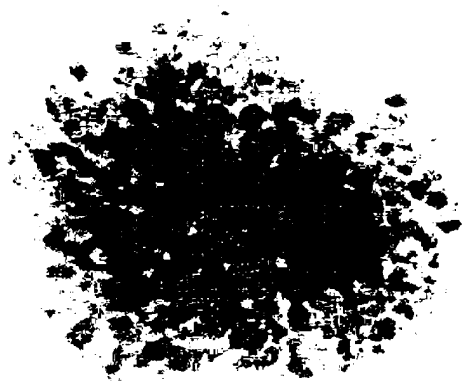
11. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該過酸鹽起始劑為過硫酸鹼金屬鹽。

12. 如申請專利範圍第 11 項的方法，其中該過硫酸鹼金屬鹽為過硫酸鉀。

13. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其進一步包含將步驟 b) 獲得的官能化可磁化微球與一含有貴金屬離子的水溶液接觸，於是該貴金屬離子被還原成元素態並且附著於該外殼的表面。

14. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該第一乙烯不飽

- 和單體未被使用於步驟 a)。
- 15.如申請專利範圍第 14 項的方法，其中步驟 a)所獲得苯乙烯聚合物具有 500-10000 的數平均分子量。
 - 16.如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該第二乙烯不飽和單體未被使用於步驟 b)。
 - 17.如申請專利範圍第 16 項的方法，其中步驟 b)所獲得苯乙烯聚合物具有 500-10000 的數平均分子量。
 - 18.如申請專利範圍第 13 項的方法，其中該含有貴金屬離子的水溶液為含有金(Au)、銀(Ag)、鈀(Pd)、鉑(Pt)或鈦(Ru)離子的水溶液。
 - 19.如申請專利範圍第 18 項的方法，其中該含有貴金屬離子的水溶液為含有金離子的水溶液。
 - 20.如申請專利範圍第 13 項的方法，其中該接觸係在 50-95 °C 的溫度進行。
 - 21.如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該第一及第二共聚合單體係獨立的為丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯單體。
 - 22.如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該可磁化奈米粒子為磁鐵礦(magnetite)或赤鐵礦(haematite)。
 - 23.如申請專利範圍第 22 項的方法，其中該可磁化奈米粒子為磁鐵礦(magnetite)。
 - 24.如申請專利範圍第 10 項的可磁化微球，其中該可磁化奈米粒子的水不可溶分散劑為含有 12-24 個碳的脂肪族酸或脂肪族胺。



*200K 20mm

圖 1

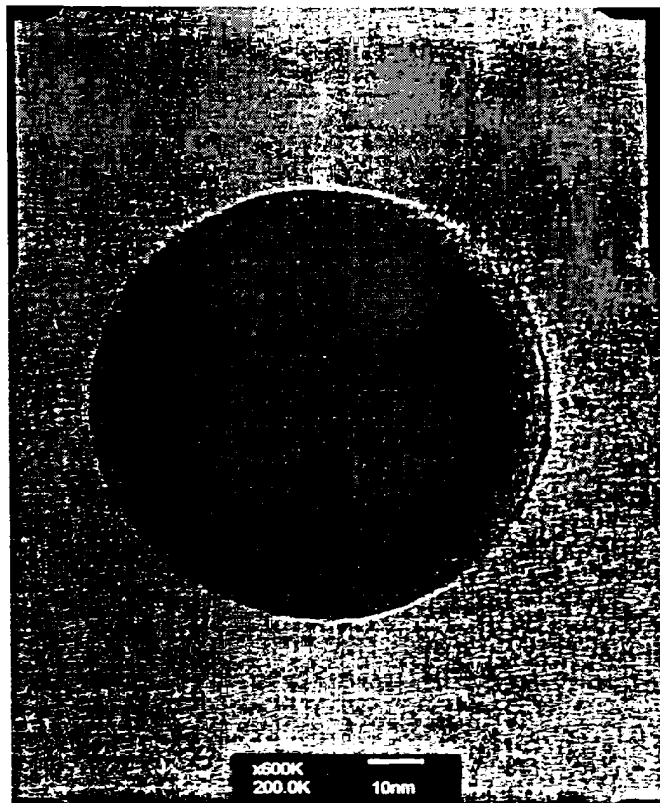


圖 2

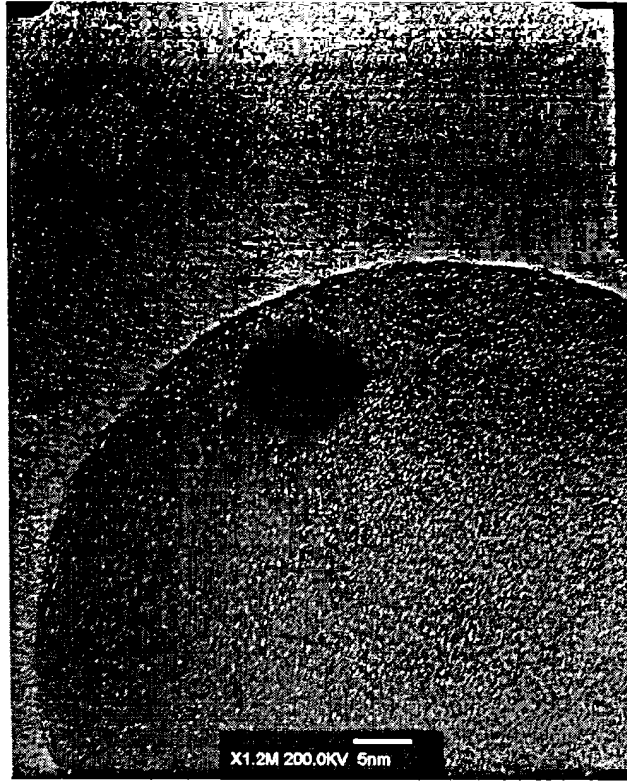


圖 3

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 3。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：