

奈米半球結構陣列鎳模仁之製備與其在組織工程支架之製作應用

Nanomolding of Nano-Structured Biodegradable Scaffolds

鍾一誠、王國禎

I-Cheng Chung, Gou-Jen Wang

本研究以陽極氧化鋁膜 (AAO) 之背阻障層結構做為模仁的 3D 奈米結構圖形，於 AAO 阻障層結構上澱鍍一層金薄膜做為電極，接著利用電鑄技術於此電極上鍍上鎳，最後將 AAO 蝕刻掉，即得到具有 3D 奈米結構之鎳模仁。本研究進一步以奈米結構之金屬模仁壓印聚(乳酸-甘醇酸共聚物) (PLGA)、聚乳酸 (PLA)、幾丁聚醣 (Chitosan) 等生物可降解材料，製作奈米結構組織工程支架。

In this study, we demonstrate a replica mold fabrication method for nano-hemisphere arrays nanomolding by nickel electroforming using the highly ordered nano-hemisphere array of the barrier-layer surface of an anodic aluminum oxide (AAO) membrane as the master mold. The feature size of the nano-hemispheres can be controlled by the use of different etching solutions for anodic oxidation of aluminum. Using the nickel replica mold, nano-structured tissue engineering scaffolds in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), polylactide (PLA), and chitosan were fabricated by casting.

一、前言

近年來，奈米材料之製備如奈米粒子 (nanoparticles)、奈米線 (nanowires)、奈米柱陣列 (nanorod arrays)^(1, 2) 廣泛應用於光學、電子、光電以及生物醫學等檢測設備中^(3, 4)，相較於一般平面材料和薄膜材料，將這些零維或一維的奈米材料成長或固定於檢測基材上，將可大幅提升基材之表面積，因此，有效製作整齊排列且大小均勻的奈米結構陣列將具有良好的應用價值⁽⁵⁻⁷⁾。

奈米元件之製作可分為 top-down 與 bottom-up

兩種方式^(8, 9)。Top-down 係對大塊均質材料，利用微影 (lithography)、曝光 (writing)、壓印 (stamping) 等技術雕刻、組合表面之分子，製作出奈米尺寸元件，軟微影 (soft lithography) 以及奈米筆技術 (dip-pen lithography) 即是 top-down 較具發展性的技術；而 bottom-up 則是利用單位分子或原子間自發的聚集與結合現象，使原本分散之奈米元件組合成可運用之機制，通常於基材表面形成原子或分子的奈米結構⁽¹⁰⁾。然而，不論是 top-down 或是 bottom-up，一次流程僅能製作一個奈米元件，相當耗時與耗材，因此，若要低成本且大量生產奈米元件，

則需透過複製模仁壓印的方式^(11, 12)，即利用具有奈米結構且堅固的模仁，對熱塑型材料進行高溫壓印，將模仁上的奈米結構轉印到材料上，因此，需要堅固且耐用的材料作為複製之模仁，故模仁材料的選用非常重要。

Zankovych 等人於矽基材上蒸鍍鉻層 (Cr)，利用電子束微影 (electron-beam lithography) 以及剝蝕 (lift-off) 技術定義不同尺寸之鉻圓柱，壓印高分子材料 PMMA (polymethylmethacrylate)⁽¹³⁾。矽基材與半導體製程具有良好的相容性，但其材質易脆且不耐用，因此，應用將有所限制。Hong 等人將二氧化矽奈米球覆蓋於矽基材上作為模板，將 PVC 聚合物置於其上加壓，分離後將粘附於 PVC 聚合物上的二氧化矽奈米球蝕刻掉，即得到具有奈米球型結構之 PVC 模仁，再利用 UV 壓印技術 (UV nanoimprinting) 將 PVC 模仁上之結構透過光聚合性之高分子材料轉印至矽或 PET 基材上，形成奈米球結構基材⁽¹⁴⁾。

陽極氧化鋁膜 (anodic aluminum oxide, AAO) 正面具有規則的六角形蜂巢狀奈米孔陣列，每個孔皆是筆直的圓柱通道貫穿至膜的背面，特殊的奈米結構可做為製作奈米環 (nanoring) 以及奈米錐 (nanocone) 陣列之模板⁽¹⁵⁾。Zhou 等人將 h-PDMS (hard PDMS) 旋塗在 AAO 薄膜上，因毛細管現象 h-PDMS 將滲透至 AAO 孔洞內，之後將液態 PDMS 注於 h-PDMS 層上，脫模後取得 PDMS 奈米柱陣列模型，搭配奈米壓印可於 GaN 基材上製作光子晶體結構，應用於提升 GaN LED 之光輸出效率⁽¹⁶⁾。Wang 等人將高分子材料 poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) 澆注於 AAO 薄膜上，利用真空抽氣法，使半凝固狀態之 PLGA 受擠壓進入 AAO 之奈米孔洞中，脫模後形成奈米柱狀結

構，可應用於組織工程之細胞貼附研究⁽¹⁷⁾。Kumar 等人利用鎳、矽、AAO 等材料模具熱壓法 (hot embossing) 製作出相應結構之大塊金屬玻璃模仁 (BMGs)，再利用此模仁可壓印玻璃轉換溫度 (T_g) 較低之材料⁽¹⁸⁾。

目前之奈米壓印技術如 LIGA 製程、熱壓式奈米壓印技術、紫外光型奈米壓印技術、微接觸式印刷技術等，這些技術大多需要配合微影蝕刻技術，或是需要 UV 或 X 光照射，成本過高且製程較繁複，製作出的結構多半為二維的奈米結構，要製作出奈米半球結構陣列仍有難度。目前製作 3D 奈米半球陣列結構主要仍以 top down 及 bottom up 二種奈米加工方法為主，需逐件製作，製作時間長且耗成本。

本研究以陽極氧化鋁膜 (AAO) 之背阻障層結構做為模仁的 3D 奈米結構圖形，於 AAO 阻障層結構上澱鍍一層金薄膜做為電極，接著利用電鑄技術於此電極上鍍上一層金屬，金屬之厚度可由電鑄時間控制，最後將 AAO 蝕刻掉，即得到具有 3D 奈米結構之金屬模仁。以本研究之 3D 奈米結構鎳模仁壓印塑膠材料，僅需數分鐘便可壓印出相同結構之奈米元件。可用於翻印如 PLGA、PLA、Chitosan 等生物可降解的生醫材料，大量製作奈米結構組織工程支架，其中 PLGA 與 PLA 為人工合成高分子生醫材料，Chitosan 之主要成分則是天然甲殼素。

二、材料與方法

1. 奈米半球結構陣列模具製備

圖 1 為 3D 奈米半球結構陣列鎳模仁圖，以陽極氧化鋁模背阻障層結構作為母模具，經電鑄鎳沉

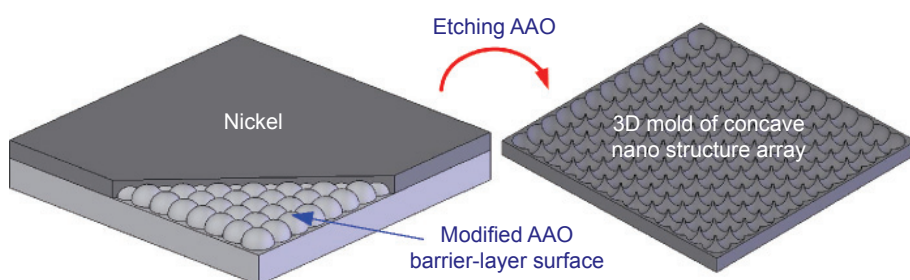


圖 1. 3D 奈米半球結構陣列鎳模仁。

積鍍薄膜於母模具表面，並蝕刻掉殘留的陽極氧化鋁膜，即可獲得具奈米半球結構陣列之錐形孔洞奈鎳模仁。

3D 奈米半球結構陣列鎳模仁製程包含陽極氧化鋁膜製備、背阻障層結構修飾、金薄膜電極濺鍍製備、高溫退火、電鑄鎳模仁，詳細內容如下敘述：

(1) 陽極氧化鋁膜製備

- (a) 將純鋁試片 (99.999%) 依序以丙酮、酒精、去離子水等溶液清洗，將清洗完純鋁試片置於 0.1 M 過氯酸溶液中，施加 20 V 之定電壓電解拋光 2 min，電解拋光後以去離子水清洗純鋁試片並以高壓氮氣移除殘留水氣。
- (b) 將經清洗電解拋光後之純鋁試片置於 0.3 M 草酸溶液中，在 0 °C 環境下施加 50 V 之定電壓，陽極氧化處理 5.5 h，可得奈米半球結構孔徑約為 90 nm 之陽極氧化鋁膜；將經清洗電解拋光之純鋁試片置於 0.1 M 磷酸溶液中，在 0 °C 環境下施加 150 V 之定電壓，陽極氧化處理 6 h，可得奈米半球結構孔徑約為 300 nm 之陽極氧化鋁膜。
- (c) 以 $\text{CuCl}_2 + \text{HCl}$ 溶液去除陽極氧化鋁膜背面之鋁基材。

(2) 背阻障層修飾

將去除鋁基材之陽極氧化鋁膜置於 30 wt% 之磷酸溶液中濕蝕刻 45 min。

(3) 金薄膜電極濺鍍製備

將陽極氧化鋁膜試片置於濺鍍腔體中，四片為單位集中於腔體中央，開啟抽氣幫浦、濺鍍機電源和 Ar 氣鋼瓶閥，調整壓力環境為 3.9×10^{-4} torr，工作壓力為 0.8 mbar，濺鍍 30 s，重複上述步驟三次。

(4) 高溫退火

將濺鍍金之陽極氧化鋁膜試片置於高溫爐中，以每分鐘 6 °C 升溫至 120 °C，持溫 1 h，爐冷至室溫。

(5) 電鑄鎳模仁

- (a) 將濺鍍金之陽極氧化試片背阻障層面朝上固定於玻璃基板，兩端連接導線並塗銀膠固定，將電鑄範圍以外部分以矽膠區隔確保電鑄反應面積，防止液體滲入。
- (b) 將封裝完之陽極氧化鋁膜玻璃基板置於氨基磺酸鎳電鑄溶液中，以鎳鈮材作陽極，電鑄試片作陰極，在 55 °C 環境下施予 0.035 A 之定電流 5.5 h。
- (c) 電鑄完成後將電鑄區域取下，並利用 0.25 M NaOH 去除殘留之陽極氧化鋁膜，即可得到具奈米半球結構陽極氧化鋁膜結構凹槽之鎳模仁。

2. 具奈米半球結構之生物可降解組織工程支架製備

生醫材料須具備良好的生物可降解性和生物相容性，商業上的生醫材料能具有此特性者包括 PLGA、PLA 和 Chitosan 等，其中 PLGA 與 PLA 為人工合成高分子生醫材料，Chitosan 之主要成分則是天然甲殼素，皆已普遍被應用為組織工程支架材料，而表面具有奈米結構圖案之組織工程支架更具發展性，故本研究進一步以具奈米半球結構之鎳模具澆注成形奈米結構組織工程支架。

(1) 奈米半球結構之 PLGA 支架製備

以 1:3 重量比例將 PLGA 加入丙酮溶液中攪拌溶解，取 100 μL PLGA 溶液滴於具奈米半球凹槽結構之鎳模仁，靜置於容器中並緊閉容器避免成膜氣泡的產生，待溶劑揮發後，加入酒精於容器中，使酒精覆蓋樣品，靜置 30 min 後，取下薄膜，即可得到具奈米半球結構之 PLGA 薄膜。

(2) 奈米半球結構之 PLA 支架製備

以 1:3 重量比例將 PLA 加入丙酮溶液中攪拌溶解，取 100 μL PLGA 溶液滴於具奈米半球凹槽結構之鎳模仁，靜置於容器中並緊閉容器避免 PLA 溶液滴於具奈米半球凹槽結構之鎳模仁，靜置於容器中並緊閉容器避免成膜氣泡的產生。待溶劑揮發後，加入酒精於容器中，使酒精覆蓋樣品，

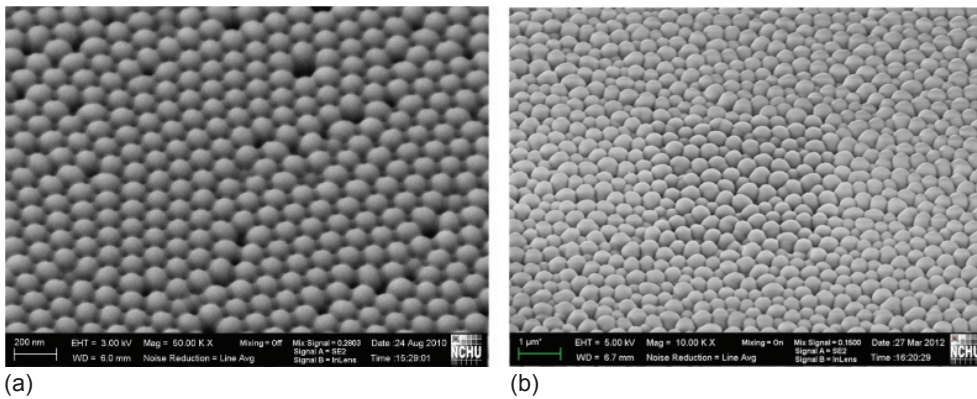


圖 2. 經背阻障層修飾的背阻障層表面 SEM 圖；(a) 草酸陽極氧化之 AAO，(b) 磷酸陽極氧化之 AAO。

靜置 30 min 後，取下薄膜，即可得到具奈米半球結構之 PLA 薄膜。

(3) 奈米半球結構之 Chitosan 支架製備

將 Chitosan 粉末加入 0.1 M CH_3COOH 溶液中，製備 3 wt% (w/w) Chitosan 溶液，取 100 μL Chitosan 溶液滴於具奈米半球凹槽結構之鎳模仁，靜置於容器中，置入烘箱中，以 50 $^\circ\text{C}$ 環境中去除水分，Chitosan 溶液成膜於鎳模仁，加入酒精於容器中，使酒精覆蓋樣品，靜置 30 分鐘後，取下薄膜，即可得到具奈米半球結構之 Chitosan 薄膜。

三、結果與討論

1. 陽極氧化鋁膜製備結果

圖 2 為背阻障層在經 30 wt% 磷酸蝕刻 15 min

後之 SEM 圖，因陽極氧化過程中內應力關係，半球結構間與半球表面相比較下有更多的鋁材被蝕刻，因此可獲得規則奈米半球結構陣列。圖 3 為背阻障層在經 30 wt% 磷酸蝕刻 15 min 後之 AFM 檢測結果，草酸陽極氧化處理之奈米半球結構高度與半徑分別為 30 nm 與 86 nm，磷酸陽極氧化處理之奈米半球結構高度與半徑分別是 114 nm 與 228 nm。

2. 奈米鎳模仁製備結果

圖 4 為電鑄成形之奈米鎳模仁 SEM 與 AFM 圖，其結構乃是與背阻障層奈米半球結構陣列相互補的奈米錐形結構陣列。經草酸陽極氧化處理之 AAO 之互補奈米錐形結構陣列半徑與深度分別是 86 nm 與 22 nm，經磷酸陽極氧化處理之 AAO 之互補奈米錐形結構陣列半徑與深度則分別為 199

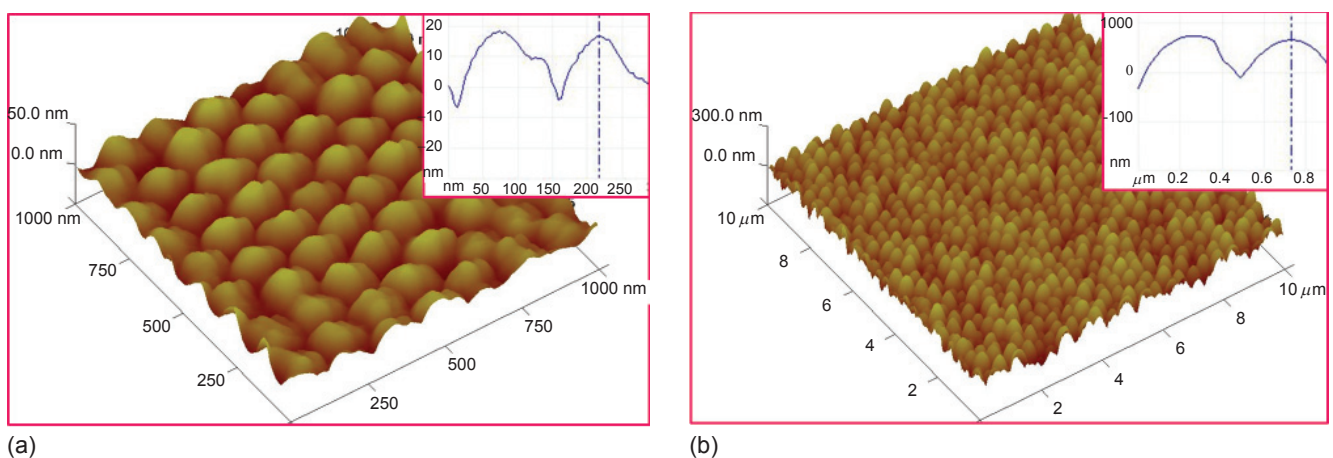


圖 3. 經背阻障層修飾的背阻障層表面 AFM 圖與切面高度圖；(a) 草酸陽極氧化之 AAO，(b) 磷酸陽極氧化之 AAO。

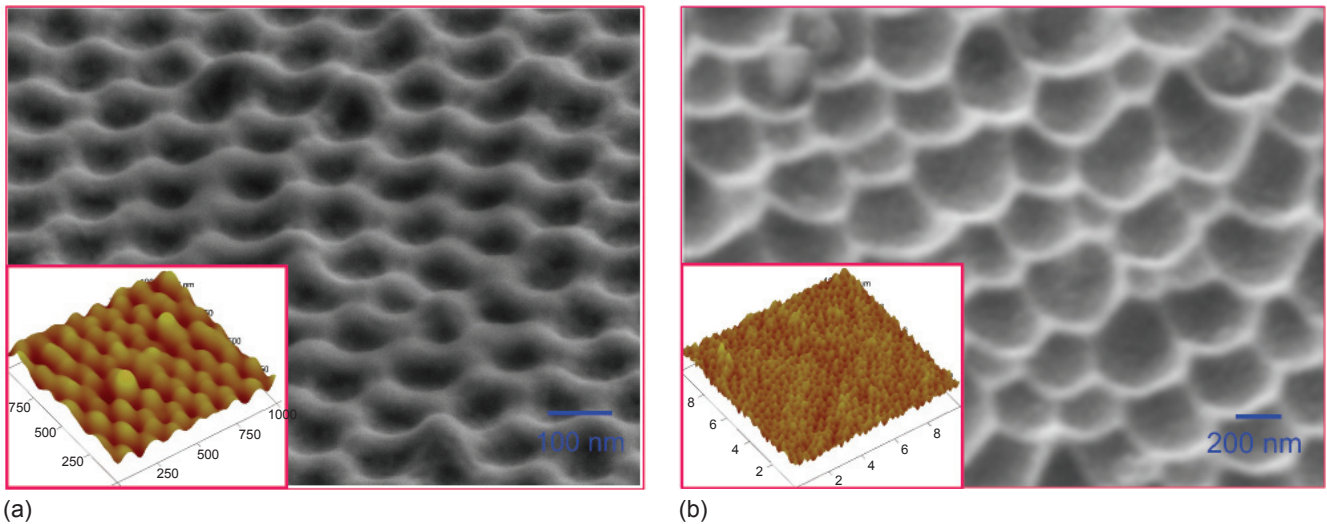


圖 4. 電鑄成形之奈米鎳模仁 SEM 與 AFM 圖 (插入圖)；(a) 經草酸陽極氧化處理之 AAO 互補奈米錐形結構陣列，(b) 經磷酸陽極氧化處理之 AAO 互補奈米錐形結構陣列。

nm 與 99 nm，與陽極氧化處理之背阻障層奈米半球結構陣列半徑與高度相較，深度較高度為小，此乃是由於電鑄過程中鎳離子無法完全地貼緊奈米半球結構之結果。

3. 具奈米半球結構之生物可降解組織工程支架

圖 5 為具奈米半球結構陣列之 PLGA、PLA、Chitosan 支架 AFM 圖，由 AFM 圖可清楚地觀察到奈米半球結構陣列可翻印至 PLGA、PLA 和 Chitosan 表面。

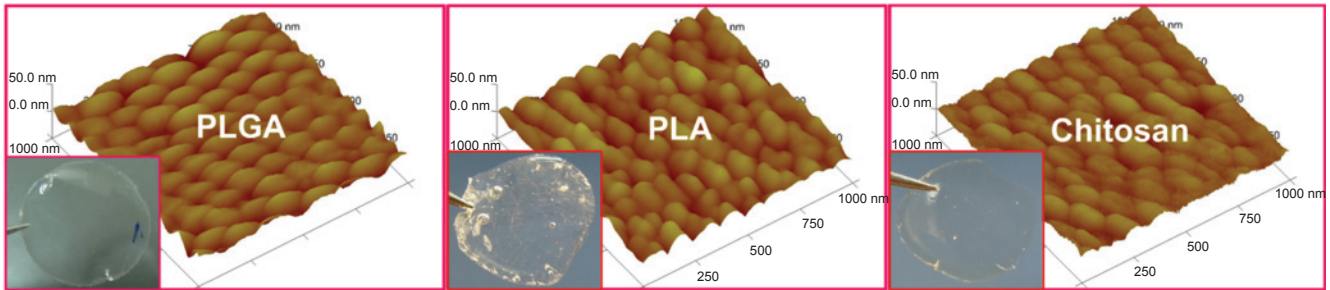
表 1 表列澆注成形之奈米結構組織工程支架之相關尺寸，其中圖 5(a) 之 PLGA、PLA、Chitosan 支架之奈米半球結構高度分別為 20、10、25 nm，

因溶液表面張力之故，溶液未能完全流入模具的奈米半球結構陣列孔洞中，與鎳模仁奈米半球結構陣列孔洞深度 30 nm 相較，PLGA 溶液流入孔洞百分率為 66%，PLA 溶液流入孔洞百分率為 33%，Chitosan 則是 83%，以 Chitosan 溶液流入孔洞之百分率最高，然而 Chitosan 卻未有較佳的奈米半球結構陣列半徑，其半徑為 66 nm，與鎳模仁和其他生醫材料相比較，與鎳模仁有 20 nm 差距，而與其他生醫材料則相似。此乃因 Chitosan 支架於製備過程中加熱所造成，Chitosan 溶液熱脹使其具有較高的奈米半球結構陣列。

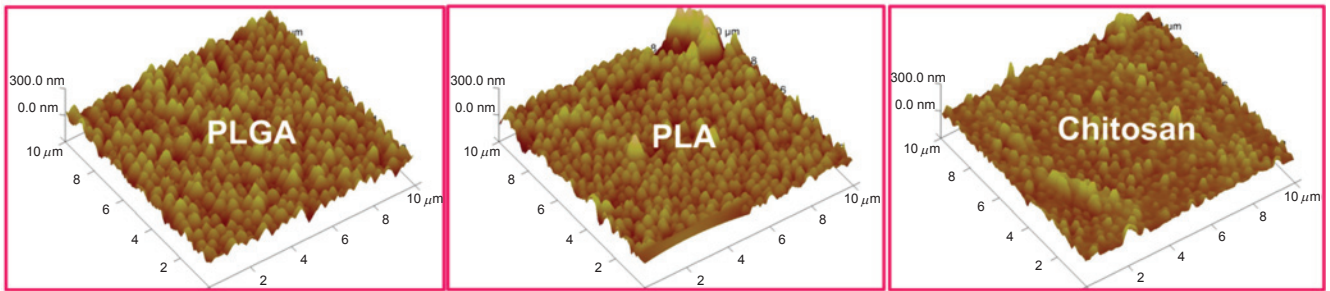
三種組織工程支架之的平均粗糙度分別是 PLGA 為 4.28 nm、PLA 為 2.46 nm、Chitosan 為 3.79 nm，平均粗糙度並無明顯差異性，與鎳模仁

表 1. 澆注成形之奈米結構組織工程支架相關尺寸。

	草酸陽極氧化 AAO				
	AAO	Ni mold	PLGA	PLA	Chitosan
Hight (nm)	30	22	20	10	25
Diameter (nm)	86	86	68	68	66
R_a (nm)	7.45	6.69	4.28	2.46	3.76
	磷酸酸陽極氧化 AAO				
	AAO	Ni mold	PLGA	PLA	Chitosan
Hight (nm)	114	99	85	76	75
Diameter (nm)	228	199	222	215	162
R_a (nm)	39.8	32.1	32.4	34.6	21.9



(a)



(b)

圖 5. 澆注成形之奈米結構組織工程支架；(a) 由草酸陽極氧化處理之 AAO 互補奈米錐形結構陣列澆注成形，(b) 由磷酸陽極氧化處理之 AAO 互補奈米錐形結構陣列澆注成形。

6.69 nm 相比較，平均粗糙度皆小於鍍模仁之平均粗糙度，因此判斷生醫材料溶液並未完全流入奈米半球結構孔洞中，此結果與深度之結果相符。由磷酸陽極氧化處理之 AAO 之互補奈米錐形結構陣列澆注成形之支架尺寸與草酸 AAO 之翻印結果相似，因磷酸 AAO 背阻障層奈米半球結構之半徑為草酸 AAO 半徑之 3-4 倍，故翻印成形之支架尺寸亦為草酸 AAO 之 3-4 倍，PLGA 支架奈米半球結構陣列高度為 85 nm，PLA 為 76 nm，Chitosan 為 75 nm，流入鍍模仁孔洞百分比分別為 75%、67%、65%，皆大於草酸 AAO 之澆注結果。

因孔徑變大溶液表面張力相對較小，生醫材料溶液較易流入奈米孔洞中，而奈米半球結構陣列半徑分別為 222 nm、215 nm、162 nm，其中 Chitosan 奈米半球結構之半徑較小是因為在製備過程中之加熱所造成。薄膜平均粗糙度分別為 32.4 nm、34.6 nm、21.9 nm，與奈米半球結構陣列之半徑接近，較草酸 AAO 澆注成形之奈米半球結構陣列更符合原鍍模仁之粗糙度，因磷酸 AAO 奈米半球結構之尺寸較草酸 AAO 者大。實驗結果之 Chitosan 支架皆未經過鹼洗，而鹼洗可能會使得

Chitosan 支架中之酸液與鹼洗溶液行酸鹼中和反應，脫水造成薄膜捲曲。

四、結論

本研究以陽極氧化鋁膜之背阻障 3D 奈米半球陣列結構做為母模，利用精密電鑄技術製作出具奈米半球陣列凹槽結構之金屬鍍模仁，其製程包含陽極氧化鋁膜之製備、阻障層處理、濺鍍金導電層、高溫退火以及電鑄鍍製程。陽極氧化鋁膜背阻障層經過磷酸蝕刻處理產生均勻之奈米半球陣列結構，再於經蝕刻處理之 AAO 阻障層結構上濺鍍一層金薄膜做為導電層，接著利用電鑄技術於此導電 AAO 阻障層電鑄成形奈米鍍模仁，鍍之厚度可由電鑄時間控制，最後將 AAO 蝕刻掉，即得到具有 3D 奈米半球凹槽結構之奈米鍍模仁。接著利用此奈米鍍模仁大量翻印如 PLGA、PLA、Chitosan 等生物可降解生醫材料，製作奈米結構組織工程支架。實驗結果驗證本研究所開發之奈米半球結構陣列鍍模仁適合應用於組織工程奈米圖案化薄膜的製備。

參考文獻

1. C. R. Martin, *Science*, **266**, 1961 (1994).
2. Y. Yamauchi, N. Suzuki, L. Radhakrishnan, and L. Wang, *Chem Rec.*, **9** (6), 321 (2009).
3. B. Y. Kim, J. T. Rutka, and W. C. Chan, *N Engl J Med.*, **363** (25), 2434 (2010).
4. R. Subbiah, M. Veerapandian, and K. S. Yun, *Curr Med Chem.*, **17** (36), 4559 (2010).
5. G. Cao and D. Liu, *Advances in Colloid and Interface Science*, **136** (1-2), 45 (2008).
6. H. T. Chen and G. J. Wang, *Current Nanoscience*, **5** (3), 297 (2009).
7. Y. Li, N. Koshizaki, and W. Cai, *Coord. Chem. Rev.*, **255** (3-4), 357 (2011).
8. B. D. Gates, Q. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C. G. Willson, and G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, **105**, 1171 (2005).
9. B. K. Teo and X. H. Sun, *J of Cluster Science*, **17** (4), 529 (2006).
10. J. V. Barth, G. Costantini, and K. Kern, *Nature*, **437**, 671 (2005).
11. S. Y. Chou, P. R. Krauss, and P. J. Renstrom, *Science*, **272**, 85 (1996).
12. L. J. Guo, *Adv. Mater.*, **19**, 495 (2007).
13. S. Zankovych, T. Hoffmann, J. Seekamp, J. U. Bruch, and C. M. S. Torres, *Nanotechnology*, **12**, 91 (2001).
14. S. H. Hong, B. J. Bae, J. Y. Hwang, S. Y. Hwang, and H. Lee, *Microelectronic Engineering*, **86**, 2423 (2009).
15. S. Zhao, H. Roberge, A. Yelon, and T. Veres, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 12352 (2006).
16. W. Zhou, X. Niu, G. Min, Z. Song, J. Zhang, Y. Liu, X. Li, J. Zhang, and S. Feng, *Microelectronic Engineering*, **86**, 2375 (2009).
17. G. J. Wang, Y. C. Lin, J. W. Lee, C. C. Hsueh, S. H. Hsu, and H. S. Hung, *Biomedical Microdevices*, **11**, 843 (2009).
18. G. Kumar, H. X. Tang, and J. Schroers, *Nature*, **457**, 868 (2009).



鐘一誠先生現為中興大學生醫工程研究所碩士班學生。

I-Cheng Chung currently is a Master student in the Graduate Institute of Biomedical Engineering at National Chung-Hsing University.



王國禎先生為美國加州大學洛杉磯分校機械工程博士，現任中興大學機械系教授與生醫工程研究所合聘教授。

Gou-Jen Wang received his Ph.D. in mechanical engineering from the University of California at Los Angeles, USA. He currently is a professor in the Department of Mechanical Engineering and an adjunct professor in the Graduate Institute of Biomedical Engineering at National Chung-Hsing University.