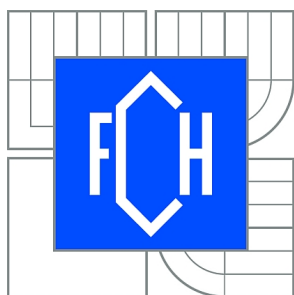


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH TECHNIK NA BÁZI PLYNOVÉ A KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S RŮZNÝM TYPEM DETEKTORŮ PRO STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK A VYBRANÝCH XENOBIOTIK

THE APPLICATION OF SEPARATION TECHNIQUES BASED ON GAS AND LIQUID
CHROMATOGRAPHY WITH DIFFERENT TYPES OF DETECTORS FOR THE DETERMINATION
OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS AND SELECTED XENOBIOTICS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. LUDMILA MRAVCOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2011

KLÍČOVÁ SLOVA:

BIODEGRADOVATELNÉ POLYMERY, KYSELINY GLYKOLOVÁ, KYSELINA MLÉČNÁ
PAU, SALÁM, DVOJDIMENZIONÁLNÍ PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE, TOF-MS

KEY WORDS:

BIODEGRADABLE POLYMERS, GLYCOLIC ACID, LACTIC ACID
PAH, SALAMI, TWO DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY, TOF-MS

Disertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího disertační práce a děkana FCH VUT.

**Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118
612 00 Brno**

ISBN (80-214-)
ISSN (1213-4198)

OBSAH

OBSAH	2
ÚVOD	3
1 SYNTETICKÉ BIODEGRADOVATELNÉ POLYMERY	5
1.1 Degradace	5
1.2 Polymerní gely, hydrogely	5
1.2.1 Použití hydrogelů	6
1.2.2 Hydrogely reagující na vnější podněty	6
Teplotně-citlivé hydrogely	7
Triblokový kopolymer PEG-PLGA-PEG	7
2 POLYCYKlickÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY V POTRAVINÁCH	8
2.1 Metabolismus PAU	8
2.2 Výskyt PAU v potravinách	8
2.3 Analýza PAU	9
2.3.1 Extrakce	9
2.3.2 Clean-up	9
2.3.3 Metody analýzy	10
VYBRANÉ PODSTATNÉ VÝSLEDKY PRÁCE	11
3 STUDIUM DEGRADACE SYNTETICKÉHO BIODKOMPATIBILNÍHO POLYMERU	11
3.1 Seznam testovaných polymerů	11
3.2 Používané metody a zařízení	11
3.3 Fázové sol-gel diagramy	12
3.4 Studium degradace blokového kopolymeru	13
3.4.1 Sledování degradace různých kopolymerů PLGA-PEG-PLGA	13
3.4.2 Porovnání rychlosti degradace vzorků bez modifikace a s modifikací kyselinou itakonovou	16
3.5 Závěr	18
4 STANOVENÍ POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ V SALÁMU POLIČAN. 20	
4.1 Odběr a úprava vzorku	20
4.2 Seznam sledovaných analytů	20
4.3 Výsledky	21
4.4 Závěr	23
PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	25
ŽIVOTOPIS	29
ABSTRAKT	32

ÚVOD

Biologicky rozložitelné polymery jsou rychle a intenzivně se rozvíjející oblastí výzkumu. Nejvíce je pozornost zaměřena na vyvíjení nových typů biologicky rozložitelných polymerních materiálů, vhodných pro biomedicínské aplikace. Biologicky rozložitelné polymery mají dvě hlavní výhody, které syntetické rozložitelné materiály nemají. Za prvé nevyvolávají chronické reakce těla (imunitního systému) na přítomnost cizího tělesa, protože jsou postupně v lidském těle vstřebávány. Za druhé některé z nich mohou být použity v tkáňovém inženýrství [1-2]. Materiál, který může být použit v lékařských aplikacích, musí splňovat řadu požadavků jako je biokompatibilita, biodegradovatelnost, tvorba netoxických degradačních produktů; zároveň musí mít dobré mechanické vlastnosti.

Snahy o napodobení přírodních materiálů, které mají jak hydrofilní, tak hydrofobní vlastnosti, vedly k vývoji biokompatibilních amfifilních syntetických polymerů. Do této klasifikace jsou zahrnuty hydrogely, k jejichž vytvoření došlo pomocí fyzikálního nebo chemického zesíťování polymerních řetězců. Polymery mají zvláštní povrchové a fyzikální vlastnosti a schopnost absorbovat více než 20 % vody [3], v poměru k jejich celkové hmotnosti. Biomedicínská aplikace hydrogelů je velmi široká, od kontaktních čoček přes diagnostické a terapeutické nástroje na implantabilních biosenzorech s krátkou nebo dlouhou životností. Vývoj degradovatelných polymerů (hydrogelů), které mohou být injekčně vpraveny do postižených oblastí kostí a kloubů, má řadu výhod v oblasti tkáňového inženýrství v porovnání s předem připravenými kostrami. Hlavní výhodou je možnost vstříknout roztok polymeru do těla, kde vznikne gel. Toho je možné využít k zaplnění volných (postižených) míst s často velmi složitými tvary [1].

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) tvoří velkou skupinu organických sloučenin obsahujících dva nebo více kondenzovaných aromatických kruhů. K uvolňování PAU dochází nejen antropogenní činností člověka, ale také během přirozených procesů probíhajících v přírodě. PAU vznikají během nedokonalého spalování, pyrolýzou organických látek, během průmyslových procesů a přirozeným zuhelnatováním organické hmoty (uhlí). Skupina PAU zahrnuje stovky sloučenin, přičemž některým je věnována velká pozornost, a to především pro jejich již prokázané karcinogenní účinky. Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou poměrně chemicky stabilní látky (díky konjugovanému systému π -elektronů). Probíhají na nich substituční nebo adiční reakce, při nichž často dochází ke vzniku nasycených sloučenin při zachování cyklu. Většina PAU podléhá fotooxidaci, která je také nejdůležitější reakcí vhodnou pro odstraňování PAU z atmosféry. Nejčastější reakcí je vznik *endo*-peroxidů, které dále přechází na chinony. Fotooxidační reakce PAU adsorbovaných na částicích probíhají mnohem rychleji, než volných PAU (plynná fáze, roztok). Možné substituční deriváty PAU, jako jsou např. nitro- a chlor-deriváty, vykazují často větší karcinogenní aktivitu než samotné PAU. PAU můžeme v životním prostředí najít téměř všude, v ovzduší, ve vodách, půdách a v organismech. Z hlediska expozice jsou pro nekuřáky hlavním zdrojem PAU inhalace kouře a také příjem potravou. Ostatní cesty, jako příjem pitnou vodou a průnik přes pokožku, jsou pouze minoritní. Expozice PAU obsažených ve vzduchu může nastat ve vnitřním i venkovním prostředí. Ve venkovním prostředí je koncentrace PAU v ovzduší značně ovlivněna průmyslovými podniky vyskytujícími se v dané lokalitě.

Potraviny mohou být kontaminovány PAU dvěma cestami. Jednak je to příjem PAU ze složek životního prostředí (voda, půda, vzduch), ale především je to tepelná úprava aplikovaná při kulinářské přípravě jídla. PAU vznikají při tepelných procesech, jakými jsou grilování, pražení, smažení nebo uzení. Rizikové potraviny jsou zejména ty, které se dostávají do přímého kontaktu se zplodinami hoření; látky obsažené v kouři se na ně mohou přímo vázat.

1 SYNTETICKÉ BIODEGRADOVATELNÉ POLYMERY

Kromě přírodních polymerů, které mají tu výhodu, že jsou v mnoha případech tělu vlastní, a proto není problém s jejich toxicitou popř. degradací, se syntetizuje celá řada dalších polymerů nebo kopolymerů. Tyto polymery jsou rovněž hojně používány v lékařství nebo ve farmacii. Jejich hlavní výhodou je to, že se dají připravit konkrétní typy polymerů (většinou kopolymerů), což umožňuje kombinovat potřebné vlastnosti. Z velkého množství syntetických polymerů byla pro účely našeho výzkumu vybrána skupina polymerů popř. kopolymerů (např. polyestery), které tvoří hydrogely a podléhají především hydrolytické degradaci.

Alifatické polyestery, jako jsou hydrofobní poly(mléčná kyselina) (PLA), poly(glykolová kyselina) (PGA), poly(β -butyrolakton) (PBL) a hydrofilní poly([RS]-3,3-dimethyljablečná kyselina) (PdMMLA), reprezentují důležitou skupinu biodegradovatelných makromolekul s výbornou biokompatibilitou a degradovatelností. Jsou získávány z obnovitelných zdrojů. Doba degradace se pohybuje v rozmezí několika dní až roků, a to v závislosti na typu polymeru nebo kopolymeru. Značnou roli zde hraje molekulová hmotnost, funkční skupiny, typy vazeb, případně enzymatická degradace [5].

1.1 DEGRADACE

Degradace polymeru je charakterizována poklesem jeho molekulové hmotnosti doprovázeném zvýšením množství kratších polymerních řetězců v objemu nebo okolním prostředí.

Všechny biodegradovatelné polymery obsahují vazby podléhající hydrolýze (labilní vazby esterů, ortoesterů, anhydridů, karbonátů, amidů, aj.). Nejdůležitějším mechanismem degradace je u těchto polymerů hydrolýza nebo enzymaticky katalyzovaná hydrolýza. V případě hydrolýzy má velký vliv na rychlost degradace struktura polymeru, protože molekuly vody musí mít přístup k labilním vazbám.

Rychlost hydrolýzy ovlivňuje řada faktorů jako např.:

- relativní stabilita vazby
- hydrofobní/ hydrofilní vlastnosti
- sterické efekty
- tvorba produktů autokatalýzy
- difúzní koeficienty fragmentů
- mikrostruktura (fázová separace)
- krystalinita.

Hodnota pH výrazně ovlivňuje reakce, které probíhají během degradace. Při kyselém pH dochází k rychlejší degradaci než při pH neutrálním. Jestliže je pH okolního prostředí neutrální, dochází k neutralizaci vznikajících kyselých produktů degradace. Zásadité pH zase urychluje povrchovou erozi [6].

Teplota okolního prostředí rovněž hraje při degradaci značnou roli. Při nižších inkubačních teplotách vykazovaly částice z PLGA krátkou počáteční periodu, než začala vlastní degradace. Rychlost degradace se zvyšuje se zvyšující se teplotou [7]. K vyjádření závislosti rychlosti degradace na teplotě může být použita Arrheniova rovnice, ze které lze vypočítat aktivační energii [8].

1.2 POLYMERNÍ GELY, HYDDROGELY

Některé polymery v rozpouštědlech bobtnají a jsou schopné vytvářet trojrozměrné sítě – gely. Xerogel tak může zvýšit svůj objem více jak o 100 %. Rozpouštědlo je hlavní součástí gelového

systemu. Gely mohou být rozděleny do dvou kategorií: *chemické gely* vznikající tvorbou kovalentních vazeb a *fyzikální gely* tvořené sekundárními silami. Jestliže je rozpouštědlem zabudovaným v síti voda, nazýváme tento systém **hydrogel**.

1.2.1 Použití hydrogelů

Hydrogely jsou používány ve velkém počtu různých aplikacích, např.:

- nosiče v tkáňovém inženýrství
- nosiče léčiv
- biosenzory (hydrogely, které specificky reagují na některé molekuly – glukosa, antigeny, aj.)
- kontaktní čočky
- lékařské elektrody
- bio-lepidla, obvazy, obklady
- hrudní implantáty

granule (např. pro udržení vlhkosti v půdě v aridních oblastech).

1.2.2 Hydrogely reagující na vnější podněty

Hydrogely reagující na vnější podněty (SRH – stimuli responsive hydrogel) jsou polymery, které dramaticky změny své vlastnosti se změnou vnějšího prostředí. Mohou vykazovat změny v bobtnání, struktuře polymerní sítě, permeabilitě nebo mechanické pevnosti. Podle typu vnějšího podnětu jsou polymery rozděleny na polymery citlivé na změnu teploty, pH, iontovou sílu, světlo, elektrické nebo magnetické pole [9]. Některé polymery mohou reagovat na více než jeden podnět [10]. Reverzibilní hydrogely (fyzikální hydrogely) vykazují vratné sol-gel přechody. Jedná se o nižší přechod, při kterém roztok (sol) přechází na gel a o vyšší přechod z gelu na sol, kdy může dojít ke kolapsu sítě, k vypuzení částic nebo všeho, co bylo absorbováno. Hydrogelům, u kterých dochází k přechodu sol-gel v prostředí lidského těla, se také říká „chytré“ (smart) hydrogely.

Hydrogely (polymery) citlivé na vnější prostředí mají ohromný potenciál v různých aplikacích. Některé změny prostředí, jako nízké pH a zvýšená teplota, jsou běžné v lidském těle. Proto mohou být polymery reagující na tyto změny použity jako nosiče léčiv. Hydrogely, které reagují na specifickou molekulu (glukosa, antigen), mohou být použity jako biosenzory i jako nosiče léčiv. Světlo-citlivé, dále na tlak reagující nebo elektro-citlivé hydrogely mají také podobné uplatnění v lékařství.

Při používání SRH může být významnou slabinou to, že odpověď na vnější podnět je často velmi pomalá. Jedním z možných řešení je tvorba menších nebo tenčích výrobků (mikročástice nebo nanočástice, tenké filmy). Zmenšení rozměrů s sebou přináší další problém. Zvyšuje se křehkost objektů a často nemusí být dosažena potřebná mechanická odolnost.

Důležitou vlastností pro SRH je jejich biokompatibilita. Syntéza stále nových polymerů, v mnoha případech kopolymerů, je zaměřena na vývoj nových materiálů s větší biokompatibilitou a biodegradovatelností, které zaručují úspěšné použití v lékařských aplikacích. Pozornost je zaměřena především na biopolymery lidskému tělu vlastní nebo syntetické polymery, které obsahují řetězce z látek tělu vlastních [11].

V posledních letech došlo k výzkumu vstřikovatelných (injectable) polymerů, které tvoří gel až v místě potřeby. Tento systém má několik výhod: tekutý materiál může vyplnit prostor nepravidelného tvaru, případně může obsahovat různé léčebné prostředky, neobsahuje zbytky rozpouštědel, které mohou být přítomny u předem připravených skeletů (scaffolds). Pokud jsou

použity biodegradovatelné polymery, není zapotřebí následné operace z důvodu odstranění použitého materiálu [12]. Vzhledem k jejich vlastnostem je možné jejich použití jako nosičů léčiv, tkáňové bariéry a také použití v tkáňovém inženýrství [13].

Teplotně-citlivé hydrogely

Změna teploty je nejpoužívanějším stimulem pro tvorbu hydrogelů. Je lehce kontrolovatelná a testy *in vitro* a *in vivo* jsou dobře proveditelné [11, 14]. Proto se teplotně-citlivé hydrogely hodí k nejrůznějším aplikacím v oblasti farmaceutického průmyslu [2, 15] a stále je jim při výzkumu věnována velká pozornost.

V případě, že při gelovatění nedochází k tvorbě kovalentních vazeb a gel vzniká pouze díky slabým interakcím, vykazují gely přechod sol-gel a gel-sol. Proto jsou hydrogely teplotně reverzibilní. Teplotně reverzibilní hydrogely mohou být přírodní i syntetické polymery.

Do skupiny teplotně reverzibilních gelů patří přírodní polymery gelatin, agarosa a deriváty celulosy. Proces gelovatění je u nich již dobře prostudován. Při vyšších teplotách zaujmou náhodnou svinutou konformaci. Při snižování teploty se začínají formovat dvojité šroubovice a agregáty. Většina z přírodních hydrogelů jsou ve fázi gelu při nižší teplotě, tzn. že mají horní kritickou teplotu roztoku (Upper Critical Solution Temperature – UCST). Nicméně vodné roztoky derivátu celulosy vykazují opačnou termogelaci. Ke gelovatění dochází při vyšší teplotě a této teplotě se říká spodní kritická teplota roztoku (Lower Critical Solution Temperature – LCST). Se zvyšující se teplotou klesá rozpustnost polymerů ve vodě [2].

Triblokový kopolymer PEG-PLGA-PEG

Syntéza nového typu biodegradovatelného triblokového kopolymeru poly(ethylenglykol)-poly(mléčná-co-glykolová kyselina)-poly(ethylenglykol) (PEG-PLGA-PEG) byla poprvé publikována Jeongem a spol. [16-19]. Jedná se o typ termoreverzibilního kopolymeru BAB (hydrofilní-hydrofobní-hydrofilní), který vykazuje fázové přechody při kontinuální změně teploty. První je přechod sol-gel (nižší teplota) a poté přechod gel-sol (vyšší teplota). Změny ve fázovém přechodu mohou být zaznamenány ve fázovém diagramu jako závislost teploty a koncentrace. Z diagramu lze potom určit kritickou teplotu gelovatění (CGT) a kritickou koncentraci gelovatění (CGC). Molekulová hmotnost PLGA ovlivňuje velikost CGT a CGC. Zvýšení molekulové hmotnosti (z 2 320 na 2 480 g·mol⁻¹) mělo za následek posun CGC k nižším hodnotám (z 26% na 15% roztok), avšak CGT zůstala nezměněna.

Studie ukázaly, že triblokový kopolymer PEG-PLGA-PEG je vhodný pro použití jako vstříkovatelný nosičový systém. V publikaci Jeonga a spol. [20] byly popsány *in situ* testy na krysách. Po podkožní aplikaci 33% roztoku PEG-PLGA-PEG byly pozorovány změny vlastností vzniklého gelu v místě vstříknutí. Gel vykazoval dobrou mechanickou odolnost a integrita gelu zůstala nezměněna po dobu delší než měsíc.

2 POLYCYKLIČKÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY V POTRAVINÁCH

PAU se vyskytují ve všech složkách životního prostředí; vznikají při velkém množství různých procesů, ať již přírodních nebo antropogenních. Dostupná data z toxikologických testů prováděná na zvířatech dokumentují významné účinky některých PAU, které mohou být imunotoxické, genotoxické, karcinogenní a toxické pro reprodukci [21]. Klasifikace PAU vychází především z jejich karcinogenních účinků [22].

Přesto, že toxické účinky PAU jsou známé již dlouhou dobu, dochází neustále k novým výzkumům v této oblasti. V minulých letech došlo k přehodnocení pohledu na PAU v rámci Evropské unie. Bylo vydáno několik zpráv expertních skupin, na základě kterých byly upraveny i jednotlivá nařízení EU. Také byla upravena klasifikace karcinogenity PAU podle IARC.

2.1 METABOLISMUS PAU

K expozici člověka PAU dochází především přes ovzduší a potraviny. V těle se PAU nekumulují příliš dlouho, protože dochází k jejich metabolizaci. K metabolismu dochází ve všech tkáních. Metabolická dráha a enzymy, které se jí účastní, jsou závislé na typu tkáně. Vznikají sloučeniny rozpustné ve vodě, které mohou být vyloučeny z těla. Bohužel však také dochází k metabolické aktivaci PAU a vzniklé produkty mají mutagenní a karcinogenní účinky [23].

V současné době jsou známé tři hlavní cesty metabolické aktivace PAU a některé další specifické minoritní postupy [24]. Odborníky byla jako cesta s dominantním mechanismem akceptována jako teorie „oblasti zálivu“, kde dochází k tvorbě dihydrodiol epoxidů [25]. Druhou cestou je vznik radikál kationtů pomocí jedno-elektronové oxidace katalyzované peroxidásami cytochromu P450 [24]. Třetí metabolická aktivace PAU zahrnuje vznik *orto*-chinonů, který je katalyzován dihydrodiol dehydrogenásami [26].

2.2 VÝSKYT PAU V POTRAVINÁCH

K nejvýznamnější kontaminaci potravy PAU však může docházet při vlastní tepelné úpravě potravin. Procesní a kulinářské postupy aplikované při úpravě potravin, jakými jsou uzení, sušení, smažení, vaření, pražení a grilování jsou často hlavními zdroji jejich kontaminace [27].

Tvorba PAU v potravinách může probíhat endogenní a exogenní cestou. Při endogenním vzniku se tvoří PAU uvnitř potravy během její tepelné přípravy. Toto množství xenobiotik je obvykle zanedbatelné. V extrémních případech, jako je například připálení tuku, může obsah PAU v potravine prudce stoupat. Významné výchozí látky (prekurzory) PAU jsou peptidy, lipidy, sacharidy a rostlinné pigmenty. PAU vznikají nejnázne pyrolýzou lipidů, které se rozpouští a dopadají na zdroj tepla.

K exogenní kontaminaci potravin PAU dochází takovým způsobem, že potravina přichází do styku se zplodinami hoření; to platí zejména pro grilování, přímé sušení, pražení a uzení. Pokud jsou použity vhodné technologické postupy, je množství PAU, které se dostanou do styku s potravinou minimální, v porovnání s množstvím PAU, které jsou již obsaženy ve složkách životního prostředí.

Při grilování nebo opékání jídla nad dřevěným uhlím nebo přímo v ohni rovněž vznikají PAU. Při přímém kontaktu se zdrojem tepla dochází v mase k pyrolýze tuků a takto jsou přímo generovány PAU. Jestliže maso není v přímém kontaktu (mřížka grilu), kape tuk na uhlí nebo do ohně a opět mohou vznikat PAU, které se zpětně, a to spolu s kouřem, dostávají k potravě. Při vertikálním

grilování je kontaminace nižší než při klasickém horizontálním grilování [28]. Tvorbu PAU při grilování významně snižuje tepelná předúprava nebo zabalení masa do hliníkové fólie [29]. Uzení masných výrobků je rovněž deklarováno jako častý zdroj PAU v potravinách. Koncentrace PAU jsou v tomto případě významně závislé na spoustě faktorů, jakými jsou např. druh použitého dřeva, teplota, přístup kyslíku, typ udící komory a doba uzení [30-31]. Obecně lze říci, že uzení v malých domácích udírnách je převážně zdrojem vyšších koncentrací PAU, v porovnání s moderními udícími komorami používanými ve výrobních podnicích [32]. Kromě přímého uzení kouřem se používají také kouřová aroma (liquid smoke flavorings).

2.3 ANALÝZA PAU

Při analýze polycyklických aromatických uhlovodíků se shodně, stejně jako u jiných analytů, odvíjí celý pracovní postup od typu matrice, ve které chceme PAU stanovit. Ve všech případech zahrnuje postup vzorkování, extrakci, přečištění a analýzu. Vše je spojeno s následujícími problémy: jak zajistit kvantitativní izolaci PAU z matrice, jakým způsobem dostatečně přečistit získaný extrakt bez významných ztrát analytů, jak docílit dostatečné separace individuálních sloučenin (problém s polohovými izomery) a v neposlední řadě jak zajistit jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci sledovaných PAU.

2.3.1 Extrakce

Po vzorkování (aktivním nebo pasivním) je dalším důležitým krokem při analýze izolace analytů z matrice. Zvolený postup vždy odráží charakter testovaného vzorku; nejčastěji používanou metodou je extrakce. U vzorků vody je nejběžnější extrakční a pre-koncentrační technikou extrakce kapalina-kapalina nebo extrakce tuhou fází (SPE). Pro pevné vzorky (biologický materiál, potraviny, sediment, půda, apod.) je možné volit mezi více metodami. Jsou to především Soxhletova extrakce, extrakce za zvýšeného tlaku (PLE), mikrovlnná extrakce (MAE), superkritická fluidní extrakce (SFE), saponifikace methanickým roztokem KOH a extrakce ultrazvukem. Pro těkavé PAU lze použít i mikroextrakci na tuhou fází (SPME). Spolu s extrahovanými PAU dochází k extrakci dalších látek, které jsou typické pro danou matici. U potravin živočišného původu jsou koextrahovanými látkami především tuky, ve kterých jsou PAU především deponovány. Sloučeniny přítomné v matici mohou výrazným způsobem rušit stanovení stopových množství PAU, a proto je nezbytné získané extrakty dočistit. Clean-up je dalším důležitým krokem při analýze stopových koncentrací PAU. Nejčastěji používanými technikami je kolonová chromatografie (silikagel, florisil, alumina), gelová permeační chromatografie (GPC) a extrakce tuhou fází (SPE).

2.3.2 Clean-up

Po extrakci je ve většině případů nezbytné přečištění extraktu (odstranění nežádoucích koextrahovaných látek). K tomuto účelu je doporučováno několik vhodných metod. Moderní a rychlá metoda, která může být automatizována, je gelová permeační chromatografie (GPC), kde dochází k dělení molekul na základě jejich velikosti. Pokud zvolíme správnou stacionární fázi, lze GPC použít pro odstranění různých koextrahovaných látek. Pro další analýzu se odebírá frakce, ve které jsou přítomny hledané analyty. Pro odstranění tuků se nejčastěji používá stacionární fáze Bio-Beads S-X3 [33-35], dále pak Sephadex LH20 (na bázi hydroxypropyldextranu). Jako mobilní fáze se v tomto případě používá směs n-hexanu a ethylacetátu, dichlormethan nebo chloroform. V některých případech jsou i po přečištění GPC

přítomny v extraktu lipidy; v případě, že by rušily při stanovení, musí být vzorek ještě dočištěn (např. SPE nebo kolonovou chromatografií). Výhodou GPC je její možná automatizace.

2.3.3 Metody analýzy

Analýza polycyklických aromatických uhlovodíků je vždy spojena s chromatografickou koncovkou. Používá se zejména chromatografie na tenké vrstvě (TLC), kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GC). Pro kapalinovou chromatografii je nezbytné spojení s fluorescenční detektorem, případně s UV/VIS detektorem. U plynové chromatografie se dříve hojně využíval plamenově-ionizační detektor (FID), dnes už se nepoužívá a používá se převážně hmotnostní detektor.

Dvojdímenzionální plynová chromatografie GC × GC–TOF–MS

Mezi nejnovější přístupy v analýze PAU patří využití orthogonální dvojdímenzionální plynové chromatografie s hmotnostním detektorem s analyzátozem doby letu (TOF–MS).

Princip multidímenzionální plynové chromatografie je znám už téměř 50 let [36]. V roce 1991 byla publikována práce Liu a Phillipse [37], ve které bylo představeno nové řešení dvojdímenzionální plynové chromatografie využívající termálního desorpčního modulátoru. Principem této GC × GC je spojení dvou kapilárních kolon s rozdílnou stacionární fází a jinými rozměry. Vzorek separovaný na primární koloně je poté separovaný na nezávislé sekundární koloně. Celý analyzovaný vzorek je separován na obou kolonách, které mají odlišnou selektivitu. „Nástřik“ z primární kolony na sekundární se děje s využitím modulátoru, který zamražením a opětovným zahřátím postupně dávkuje vzorek z primární kolony na kolonu sekundární. Každá sloučenina je charakterizována dvěma retenčními časy. Výhodou metody je větší kapacita píků v porovnání s běžnou GC, zvýšení poměru signál–šum, získání strukturovaného 2D chromatogramu. K využití všech výhod získaných použitím 2D GC (GC × GC) je nutné mít vhodný detektor, který je schopný rychlého sběru dat (50 Hz a více). Ve spojení s 2D GC se dnes používá především TOF–MS, ale také FID a ECD [38].

Kolony

- Primární kolona
 - preferovány nepolární nebo mírně polární
 - separační mechanismus – bod varu
 - teplotní gradient
 - šířka píku v sekundách
 - kolony klasických rozměrů (15 – 30) m × (0,25–0,32) mm ID, (0,1 – 1) μm
- Sekundární kolona
 - různé kolony s rozdílným separačním mechanismem než primární
 - převažuje dělení podle polarity
 - teplotně izokratická, velmi rychlá separace
 - šířka píku 50 – 100 ms (v milisekundách)
 - kolony krátké, s malým průměrem, (0,5 – 2) m × 0,1 mm ID, 0,1 μm
 - vlastní termostat

Pro analýzu PAU GC × GC lze použít klasické uspořádání kolon, a to jako primární kolonu mírně polární (např. DB-5MS) a jako sekundární kolonu semipolární (např. DB-17MS); případně lze polaritu kolon vyměnit a použít jako primární semipolární kolonu a jako sekundární mírně polární kolonu.

VYBRANÉ PODSTATNÉ VÝSLEDKY PRÁCE

V této kapitole jsou rozepsány pouze vybrané výsledky. V závěru jsou shrnuty všechny výsledky odpovídající dizertační práci.

3 STUDIUM DEGRADACE SYNTETICKÉHO BIOKOMPATIBILNÍHO POLYMERU

3.1 SEZNAM TESTOVANÝCH POLYMERŮ

V tab. 1 je seznam a charakteristika připravených polymerů (v rámci Fakulty chemické VUT v Brně, na Ústavu chemie materiálů), které byly použity ke studiu jejich hydrolytické degradace. Připravené polymery byly typu ABA (hydrofobní-hydrofilní-hydrofobní) a ITA-ABA-ITA (funkcionalizovaný polymer kyselinou itakonovou). Ve většině případů byly připraveny k sobě příslušné kopolymery PLGA-PEG-PLGA a ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA.

Tab. 1: Charakteristika zkoumaných polymerů

vzorek	typ	M_n PEG g·mol ⁻¹	PLGA/PEG	PLA/PGA	M_n reálná g·mol ⁻¹
1	PLGA-PEG-PLGA	1 500	2,50	3,00	6 470
2	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	1 500	2,50	3,00	6 310
3	PLGA-PEG-PLGA	1 500	2,50	3,00	7 100
4	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	1 500	2,50	3,00	6 770
5	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	1 500	2,50	3,00	5 630
6	PLGA-PEG-PLGA	1 500	2,50	3,00	5 830
7	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	1 500	2,50	3,00	5 460
8	PLGA-PEG-PLGA	1 500	2,50	3,00	7 200
9	PLGA-PEG-PLGA	1 000	3,75	3,00	6 360
10	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	1 000	3,75	3,00	5 550
14	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	1 500	2,00	2,42	4 660
16	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	1 500	2,00	3,00	5 560
17	PLGA-PEG-PLGA	1 500	2,00	3,00	5 850

Jednotlivé vzorky jsou charakterizovány molekulovou hmotností M_n , která byla zjištěna pomocí GPC, molekulovou hmotností komerčně dodávaného PEG, hmotnostním PLGA/PEG a molárním poměrem PLA/PGA. Dále byly na Ústavu materiálů provedeny analýzy NMR a IČ, pomocí kterých byla ověřována modifikace kyselinou itakonovou a struktura vzniklého polymeru. Jejich výsledky zde nejsou prezentovány, protože nejsou součástí této práce. U všech vzorků byl sestaven sol-gel diagram. U některých byla sledována rychlost a průběh degradace.

3.2 POUŽÍVANÉ METODY A ZAŘÍZENÍ

Pro sledování sol-gel přechodů byla použita inverzní vialková metoda. Ta je založena na přímém pozorování změny stavu vzorku při postupném zvyšování teploty o 1 °C. Pro analýzu

molekulové hmotnosti byla použita gelové permeační chromatografie s refraktometrickým detektorem. Molekulová hmotnost byla určena použitím externí kalibrační křivky (polystyrenové standardy). Koncentrace kyseliny glykolové a mléčné v roztoku pufru, ve kterém probíhala degradace, byla zjišťována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

3.3 FÁZOVÉ SOL-GEL DIAGRAMY

U všech připravených vzorků byl sestaven fázový diagram na základě vizuálního pozorování (inverzní vialková metoda). Kromě sledování změny viskozity byla pozorována i změna zbarvení roztoku. Všechna pozorování byla zaznamenána pomocí grafu. Podle typu vzorku byly připraveny koncentrace a také zvolena počáteční teplota pro prováděný experiment.

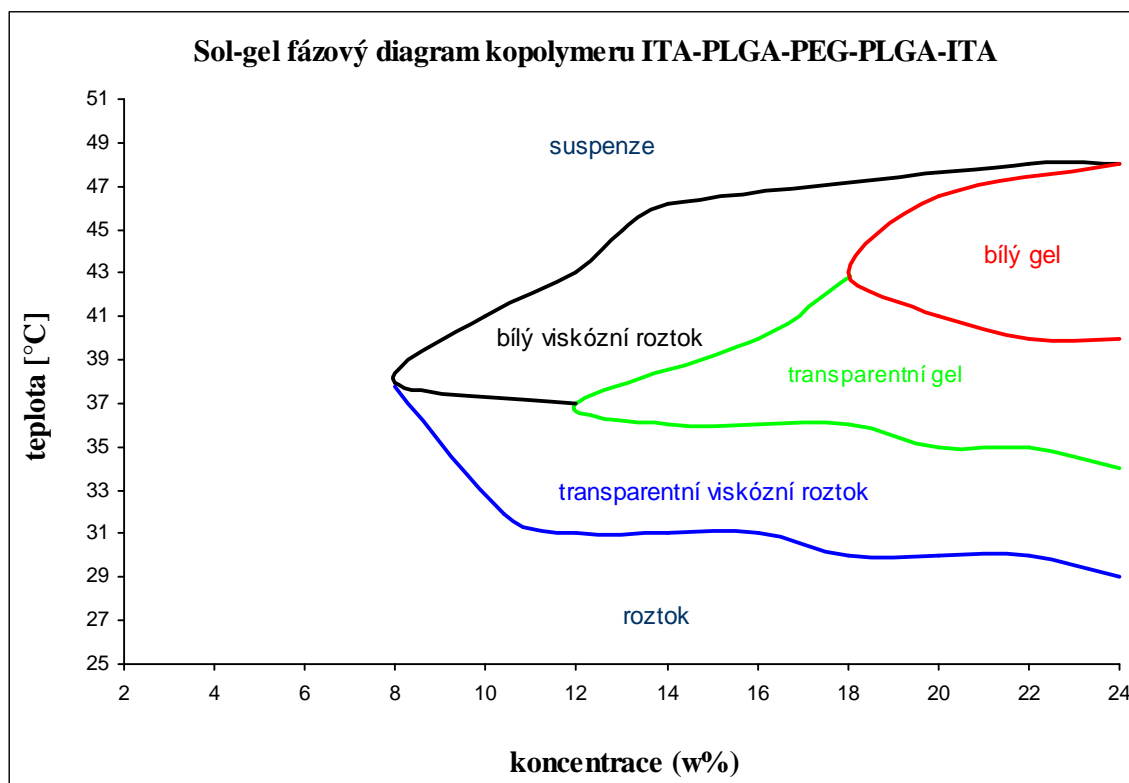
U všech vzorků bylo vizuální pozorování průběhu vzniku gelu obdobné. Z tekutého roztoku polymeru se při postupném zvyšování teploty stává viskózní roztok, a to buď transparentní, nebo bílý, v závislosti na daném vzorku, teplotě a koncentraci. Při nízkých koncentracích zůstávají vzorky jenom tekuté a s teplotou mění pouze barvu. Okolo teploty 37 °C vzniká transparentní gel, který se zvyšující se teplotou přechází na bílý gel. Při teplotách okolo 45 °C dochází k vysrážení polymeru a rozdělení vzorku na dvě fáze (polymer a voda). Při opětovném zchlazení se vzorek polymeru znovu rozpustí a vykazuje opět sol-gel přechod.

Jako příklad takto sestaveného diagramu jsou použity výsledky získané pro vzorek 6 a 7 (tab. 2 a graf. 1). Stejně pak bylo postupováno i u vzorků ostatních.

Vzorek 6 a 7 má poměry PLGA/PEG 2,50 a PLA/PGA 3,00, M_n PEG je 1 500 g·mol⁻¹, shodně s předchozími vzorky. Pro oblast transparentního gelu byla určena kritická teplota (CGT) a kritická koncentrace gelovatění (CGC) (tab. 2). Pro modifikovaný gel je CGT při teplotě 37°C. Transparentní gel se tvoří od 12 % do 24 %, pro nemodifikovaný transparentní gel je toto rozmezí 14 % až 24 %. U vzorku 6 (bez ITA) se tvoří gel již od 8 % a od teploty 39 °C; gel však byl zakalený až bílý. Z grafů je zřetelně vidět, že celková oblast gelu je u modifikovaného polymeru mnohem užší. Vzorky byly použity pro sledování průběhu degradace.

Tab. 2: Kritická teplota a koncentrace gelovatění pro vzorek 6 a 7

vzorek	CGT (°C)	CGC (w%)
6 (bez ITA)	39	14
7 (s ITA)	37	12



Graf 1: Sol-gel fázový diagram vzorku 7 (ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA)

3.4 STUDIUM DEGRADACE BLOKOVÉHO KOPOLYMERU

Ze vzorků popsaných výše byly pro sledování degradace vybrány vzorky 6, 7, 8, 16 a 17. U všech těchto vzorků byly sestaveny sol-gel diagramy; všechny tvořily gel při teplotě 37 °C. Kopolymery byly naváženy do vialek v potřebných množstvích, zality MilliQ vodou a ponechány rozpouštět při laboratorní teplotě. Většina vzorků byla připravena v koncentracích 16, 20 a 24 %. U všech vzorků to však nebylo možné buď z nedostatku vzorku nebo vzhledem k jeho horší rozpustnosti ve vodě. V tomto případě byly připraveny pouze některé vybrané koncentrace nebo byla koncentrace snížena.

Byly vytvořeny sady vzorků pro předpokládaný 7 – 12 denní odběr vzorků. Každý den byla u jednoho vzorku (v jedné vialce) přerušena degradace a vzorek byl upraven pro následující analýzy. Připravený roztok kopolymery byl napipetován do malých vialek (1,8 ml). Ty se umístily do inkubátoru nastaveného na teplotu 37 °C. Po ztuhnutí roztoku byl gel v každé vialce zalit 0,7 ml fosfátového pufru (pH 7,4). Vzorky byly zavíčkované a umístěny zpět do inkubátoru.

Po přerušení degradace bylo z roztoku pufru nad gelem odebráno 0,4 ml pro analýzu obsahu konečných degradačních produktů kopolymery, zjišťovaných pomocí HPLC. Zbytek polymeru ve vialce byl zmrazen a poté lyofilizován. Bezvodý zbytek polymeru byl po degradaci navážen a rozpuštěn v tetrahydrofuranu a následně analyzován GPC, v souladu s literaturou [16, 39-44].

3.4.1 Sledování degradace různých kopolymerů PLGA-PEG-PLGA

Pro samotné pozorování degradace byly použity vzorky různého složení. Nutná podmínka byla, že musí být rozpustné a tvořit gel, a to nejlépe v rozmezí 36 – 42 °C. Pro tyto účely byly vhodné vzorky 5, 6, 7, 8, 16 a 17. V publikacích se pro studium degradace nejčastěji používají metody

pro sledování změny hmotnosti předmětu, molekulové hmotnosti a termoanalytické metody jako DSC [45-47].

Za účelem posouzení celkového průběhu degradace pomocí sledování molekulové hmotnosti bylo nejvhodnější spočítat procentuální pokles molekulové hmotnosti v průběhu degradace. Doba degradace byla zvolena pro všechny vzorky stejná, a to 11 dnů. Hodnota pH pufru, ve kterém degradace probíhala, byla 7,4. V tab. 3 jsou uvedeny všechny vypočítané hodnoty poklesu M_n (%) pro různé koncentrace polymeru. Procentuální vyjádření je vhodnější z toho důvodu, že počáteční molekulová hmotnost polymeru nebyla nikdy úplně stejná a přímé porovnání by nemělo smysl. Vzorek 5 a 7 má v souladu s podmínkami syntézy stejné složení. Mezi vzorky jsou přesto rozdíly, i když ne příliš velké. Vzorek 6 a 8 také patří svým složením do stejné skupiny. U těchto vzorků však již byly rozdíly výrazné. U vzorku 8 byl mírně změněn postup při syntéze, vzorek byl připraven z přesublimovaných látek (větší čistota). Vzorek byl tvrdší a špatně rozpustný ve vodě, a proto nejvyšší koncentrace byla pouze 20 %. Přes jeho horší rozpustnost degradoval rychleji, než stejný vzorek 6. U kopolymerů 16 a 17 byl nižší poměr PLGA/PEG. To bylo také důvodem rychlejší degradace, ve srovnání se vzorky 6 a 7.

Při degradaci byl rovněž sledován nárůst kyseliny glykolové a kyseliny mléčné v roztoku pufru. Ve všech vzorcích bylo trojnásobné množství kyseliny mléčné oproti kyselině glykolové (PLA/PGA = 3,00). Nalezené koncentrace kyseliny mléčné v pufru byly rovněž větší než u kyseliny glykolové. Při proměření vzorků odebraných po 24 hodinách se u nižších koncentrací polymeru (a především u polymeru bez ITA) stávalo, že koncentrace GA byla pod detekčním limitem a první pozorovatelná koncentrace byla zjišťována až po více dnech (graf 2). Naopak u kyseliny mléčné je z uvedených závislostí patrné, že nějaká LA se do pufru uvolnila hned po zalití hydrogelu. To je zřejmě způsobeno částečnou degradací kopolymeru už při přípravě a rozpouštění xerogelu v MilliQ vodě. Lze předpokládat, že shodně se chová i kyselina glykolová, kterou však vzhledem k její nižší koncentraci nebylo možné v roztocích detekovat.

Tab. 3: Pokles molekulové hmotnosti M_n (%) po 11 dnech degradace

	pokles molekulové hmotnosti M_n (%)			
	12%	16%	20%	24%
5 (s ITA)		38,9	42,1	36,9
6 (bez ITA)		21,4	26,4	34,9
7 (s ITA)		40,2	36,6	41,0
8 (bez ITA)	45,1	42,0	40,8	
16 (s ITA)		46,8	53,5	50,3
17 (bez ITA)		26,2	28,8	35,8

Při úvahách o degradaci a nárůstu koncentrace kyseliny glykolové v roztoku bylo počítáno pouze s teoretickou koncentrací, pravděpodobně pocházející z polymeru PGA a PEG, který také degraduje na kyselinu glykolovou. Při optimalizacích metody byl sledován i výskyt ethylenglykolu a PEG 100, ten se však v žádném roztoku nepodařilo identifikovat. Bohužel techniky, které byly dostupné pro provádění analýz, neumožňovaly lépe specifikovat degradační produkty a příspěvek k celkové koncentraci GA.

Zajímavá situace nastala u některých vzorků (vzorky 5, 6, 7), u kterých rychlost degradace měla po určitém čase zlomový charakter a probíhala rychleji [48]. Tento jev nebyl pozorován u všech vzorků. Pro tento případ byla získaná experimentální data proložena dvěma lineárními

závislostmi a pro výpočet 5 % byla použita ta, u které byl předpoklad k dosažení této hodnoty (příkladem je graf 3). V Tab. 4: jsou v hodinách uvedeny hodnoty ($t_{5\%}$), při kterých bylo přítomno v roztoku pufru 5 % kyseliny glykolové a kyseliny mléčné z teoretického množství výchozího polymeru. Závislost koncentrace kyselin na době degradace byla vyjádřena pomocí lineární regrese. Z rovnic přímky byla potom vypočítána doba odpovídající zdegradovaným 5 % polymeru. Z hodnocení závislosti nárůstu kyseliny glykolové je patrné, že se zvyšující se koncentrací roztoku polymeru se rychlost degradace zvyšuje. Je to pravděpodobně způsobeno zvyšující se koncentrací kyseliny glykolové v roztoku (z důvodu vyšší koncentrace polymeru), to má za následek mírné snížení pH, které způsobuje rychlejší vnitřní degradaci. Dále bylo prokázáno, že u vzorků modifikovaných kyselinou itakonovou je 5 % dosaženo mnohem dříve než u vzorků nemodifikovaných (až téměř o polovinu času v porovnání s příslušnými vzorky nemodifikovanými). Pro dvojici vzorků 6 (bez ITA) a 7 (s ITA) byla pro koncentraci 16 % stanovena doba 224 hodin, resp. 111, pro 20 % 181 hodin, resp. 91 a pro 24 % 170 hodin, resp. 86. Pro kyselinu mléčnou není tento vliv koncentrace polymeru tak výrazný. Dokonce bylo prokázáno, že u některých vzorků vedla zvýšená koncentrace k posunutí $t_{5\%}$ k vyšší hodnotě, než u koncentrace nižší (vzorky 6, 8, 16 a 17). Na základě toho lze konstatovat, že změna koncentrace nemá na degradaci bloku polymeru kyseliny mléčné takový vliv, jako u kyseliny glykolové.

Tab. 4: Doba (hod), po které bylo zdegradováno 5 % původního polymeru na jednotlivé kyseliny (glykolovou a mléčnou)

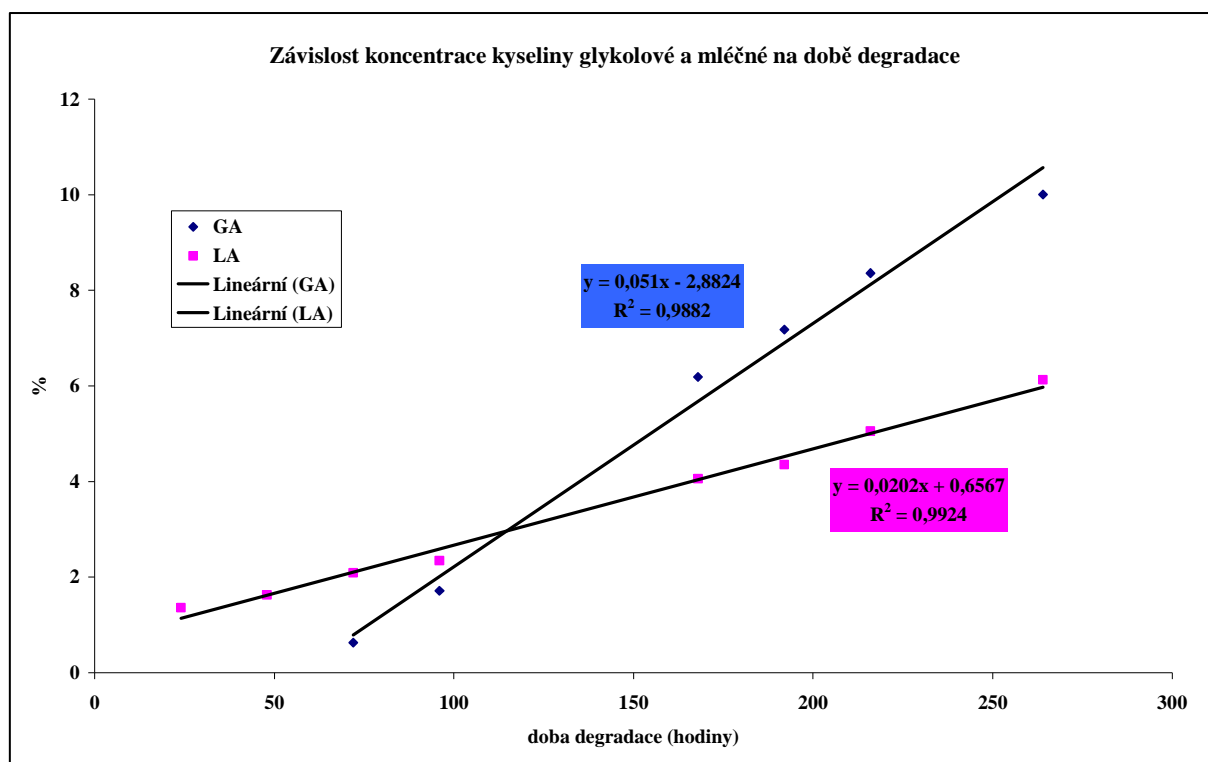
	koncentrace	kyselina glykolová	kyselina mléčná
	%	(hod)	(hod)
5 (bez ITA)	16	173	184
	20	151	155
	24	128	141
6 (bez ITA)	16	224	270
	20	181	292
	24	170	286
7 (s ITA)	16	111	165
	20	91	149
	24	86	142
8 (bez ITA)	12	113	118
	16	108	135
	20	98	136
16 (s ITA)	16	77	90
	20	103	110
	24	71	73
17 (bez ITA)	16	163	196
	20	155	215
	24	128	222

3.4.2 Porovnání rychlosti degradace vzorků bez modifikace a s modifikací kyselinou itakonovou

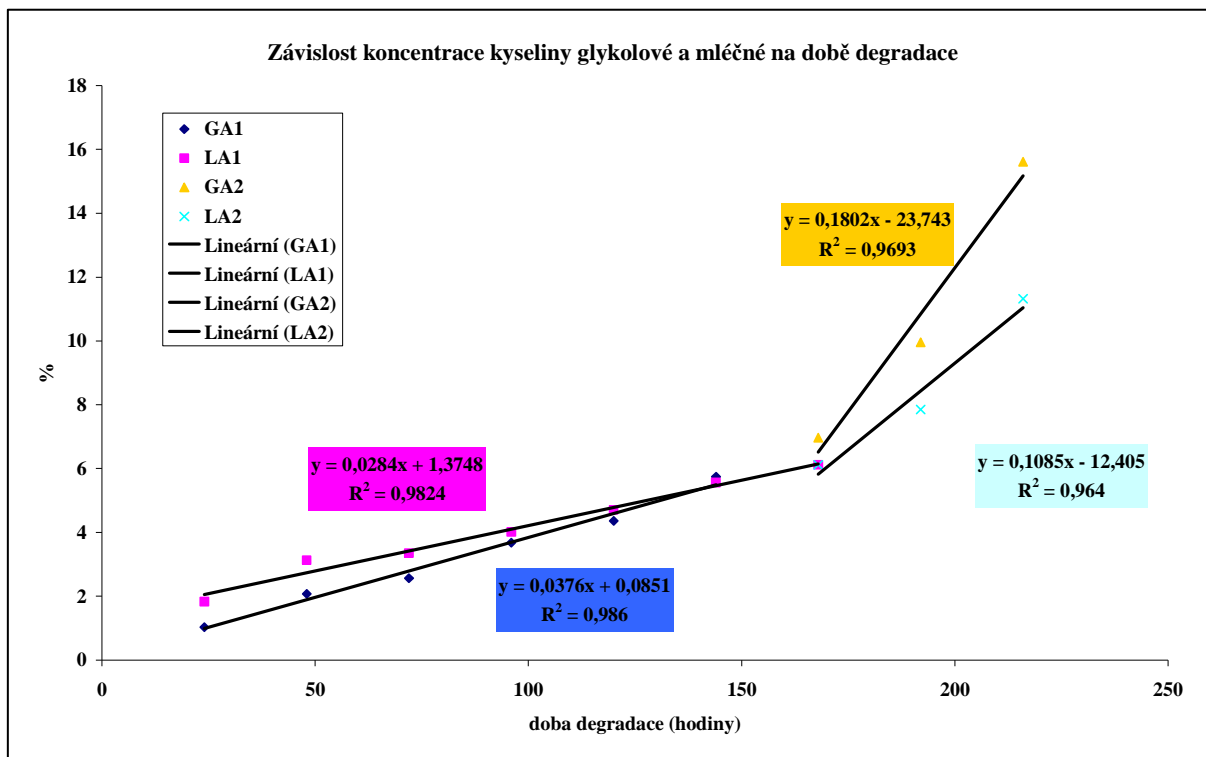
Pro porovnání vlivu modifikace kyselinou itakonovou na degradační vlastnosti hydrogelu byly vybrány vzorky 6 a 7; 16 a 17. Rozdíly byly hodnoceny podle poklesu molekulové hmotnosti M_n polymeru a koncentrací kyseliny glykolové a mléčné v pufru.

V grafu 4 jsou porovnány vzorky nemodifikovaného (6) a modifikovaného (7) kopolymeru. U kopolymeru s ITA byl pokles molekulové hmotnosti M_n po 11 dnech vyšší než u druhého kopolymeru. Vliv koncentrace byl větší u nemodifikovaného kopolymeru (21 – 35 %), u kopolymeru s ITA nebyl tento rozdíl tak výrazný (37 – 41 %).

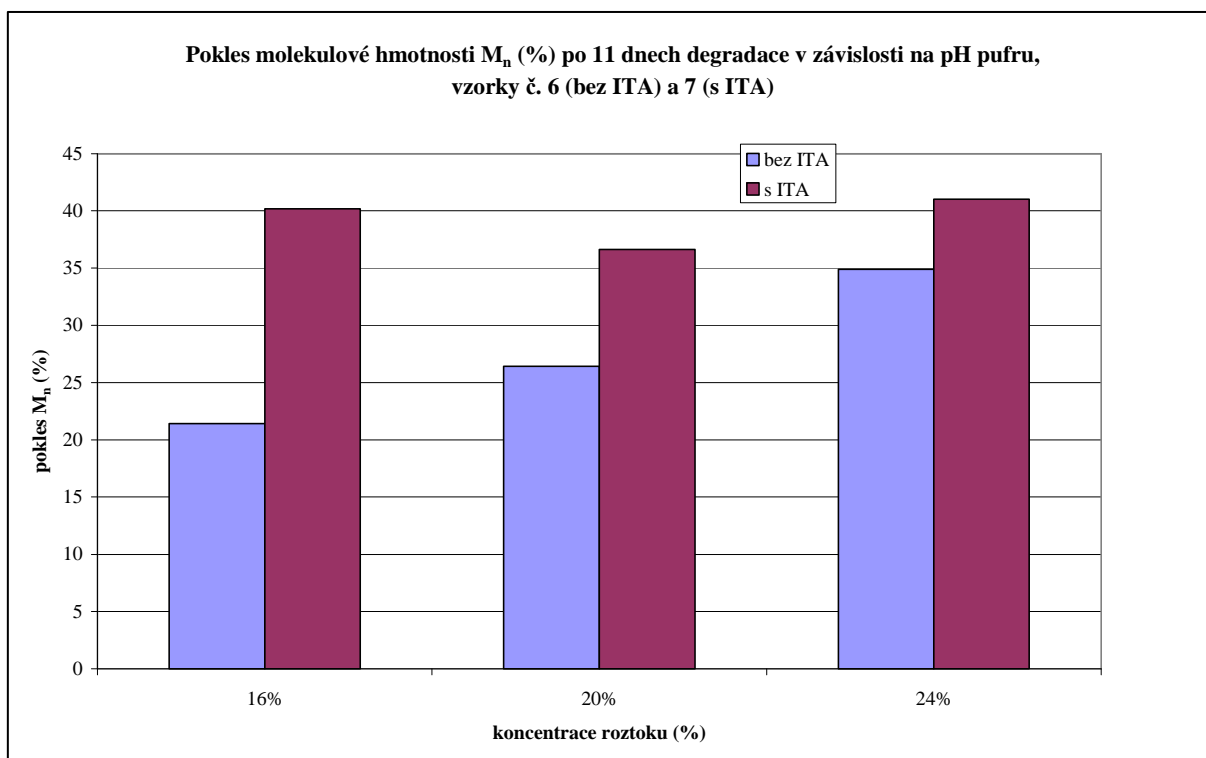
Pro porovnání koncentrace kyseliny glykolové a mléčné uvolněných do vzorku pufru, byly spočítány teoretické koncentrace, které by se v závislosti na poměrech v kopolymeru a na navázce měly uvolnit do pufru při 100% degradaci. Od této hodnoty byla odečtena koncentrace zjištěná v roztoku pomocí HPLC a nárůst těchto dvou kyselin v roztoku pufru (v %), resp. úbytek z původního kopolymeru, byl brán jako další hodnotící kritérium.



Graf 2: Vzorek 17, koncentrace 20 %; závislost nárůstu koncentrace kyseliny glykolové a mléčné v procentech (vztaženo k teoretickému množství obsaženém v polymeru); rozdíl mezipočáteční koncentrací kyselin v roztoku

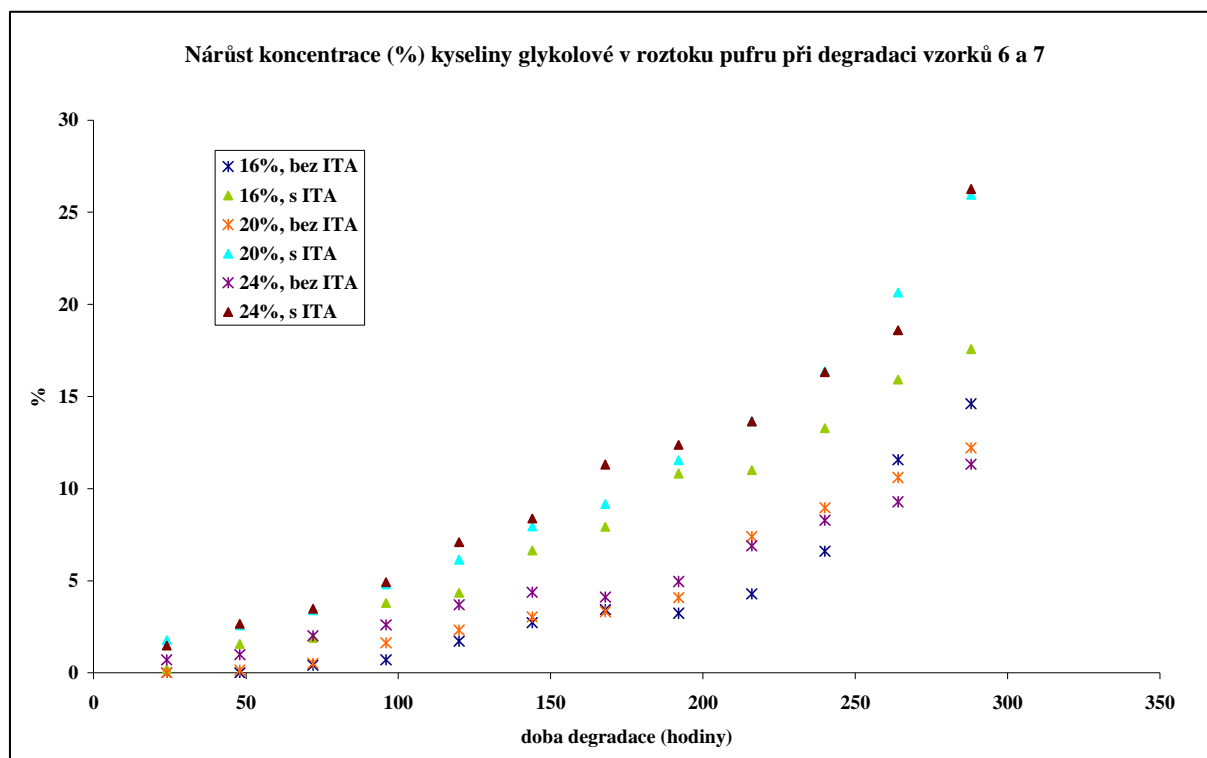


Graf 3: Vzorek 5, koncentrace 16 %; závislost nárůstu koncentrace kyseliny glykolové a mléčné v procentech (vztaženo k teoretickému množství obsaženém v polymeru); změna rychlosti degradace charakterizována proložení dvěma lineárními závislostmi



Graf 4: Pokles molekulové hmotnosti M_n v % vztažený k molekulové hmotnosti před začátkem degradace pro tři koncentrace kopolymerů.

Na grafu 5 (obdobně vypadá graf pro kyselinu mléčnou) je zřetelně viditelné oddělení dvou skupin, a to podle modifikace kopolymeru. U modifikovaného kopolymeru byl nárůst monomerů kyseliny glykolové a kyseliny mléčné v pufru vyšší. Z toho lze také usoudit na rychlejší degradaci tohoto polymeru. Mezi různými koncentracemi u obou vzorků byly rovněž patrné rozdíly.



Graf 5: Závislost zvyšování koncentrace kyseliny glykolové v roztoku pufru (pH 7) vyjádřené jako procentuální úbytek z původního degradovaného kopolymeru; bez ITA vz. 6 (hvězdičky), s ITA vz. 7 (trojúhelníky)

3.5 ZÁVĚR

V předložené práci byly studovány zejména degradační vlastnosti blokových kopolymerů na bázi kyseliny mléčné, kyseliny glykolové a poly(ethylenglykolu) PLGA-PEG-PLGA a ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA (modifikovaný kyselinou itakonovou). S využitím těchto kopolymerů (především jejich termosensitivních hydrogelů) se počítá v ortopedické oblasti na léčbu zlomenin (jako „lepidlo“), s možností přenosu Ca^{2+} nebo protizánětlivých léčiv.

Byly optimalizovány metody pro studium gelovatění roztoků kopolymerů, dále metody degradace a následné analýzy pomocí GPC a HPLC. Pomocí všech těchto separačních technik byly jednotlivé vzorky, které se vesměs lišily svým složením, charakterizovány. Původní molekulové hmotnosti všech vzorků se pohybovaly kolem hodnoty $6\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Pro sestavení sol-gel diagramů byly vybrány vzorky vhodné pro studium degradace. Daný vzorek by měl tvořit gel (nejlépe čirý) při $37\text{ }^\circ\text{C}$, v hmotnostních koncentracích alespoň 12 až 24%. Se zvyšující se koncentrací se prodlužovala doba rozpuštění xerogelu (až 14 dní), což u vzorků vedlo k mírnému snížení původní molekulové hmotnosti ($\text{max } 300\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Při vyšší degradaci už byl vzorek hydrolyzovaný a v tom případě již nevytvářel gel. Byla potvrzena termoreversibilní schopnost tvorby fyzikálního hydrogelu (přechod sol-gel a gel-sol) u kopolymeru nemodifikovaného, ale především modifikovaného kyselinou itakonovou (ITA).

K samotnému porovnání průběhu degradace (pH 7,4) bylo použito porovnání změn v molekulové hmotnosti zbylého polymeru a nárůst koncentrace kyseliny glykolové a kyseliny mléčné v roztoku pufru. Po asi 12 dnech degradace byly vzorky degradované tak, že už netvořily gel a polymer byl sedimentován na dně vialek. Proto byla delší doba degradace již zcela zbytečná.

Bylo zjištěno, že kopolymer modifikovaný kyselinou itakonovou má lehce odlišné vlastnosti od vlastností odpovídajícího kopolymeru bez ITA. Je lehce nahnědlý (jantarová barva), lépe rozpustný ve vodě a gel se tvoří při vyšších koncentracích a při nižší teplotě.

Studium degradace kopolymerů potvrdilo jejich hydrolytický rozpad, který byl charakterizován poklesem molekulové hmotnosti zbylého polymeru po degradaci a nárůstem koncentrace kyselin glykolové a mléčné (nejmenších molekul jako produktů degradace) v roztoku fosfátového pufru. Molekulová hmotnost kopolymeru bez ITA a s ITA klesla po 11 dnech degradace na hodnoty v rozmezí 25 – 30 %, resp. 40 – 50 %. Pokud se týče nárůstu koncentrací kyseliny glykolové a kyseliny mléčné v roztoku pufru, byly spočítány hodnoty $t_{5\%}$ (tj. nárůst, resp. pokles koncentrace o 5 %). Závislost nárůstu koncentrace kyseliny glykolové na době degradace měla strmější charakter (větší hodnoty směrnic) než tomu bylo u kyseliny mléčné. Při porovnání vlivu různých koncentrací roztoku kopolymeru bylo patrné, že zvýšení koncentrace vede ke zvýšení rychlosti degradace (větší pokles molekulové hmotnosti).

Rozdíly mezi výsledky u vzorků kopolymeru bez ITA a s ITA potvrdily předpoklad rychlejší degradace modifikovaného kopolymeru. Je to způsobeno funkcionalizací koncových skupin kopolymeru kyselinou itakonovou, která tak do řetězce vnáší polární karboxylovou skupinu. V důsledku toho dochází ke změně při tvorbě polymerních micel ve vodě, což má za následek snadnější přístup molekul vody k polymeru, což usnadňuje jeho hydrolyzu. Při porovnání dvou typů kopolymerů s poměry PLGA/PEG 2,5, resp. 2,0 můžeme konstatovat, že snížení tohoto poměru mělo za následek větší rychlost degradace kopolymerů, a to jak bez ITA tak také s ITA. Je to způsobeno vyšším obsahem PEG.

Poslední zkoumanou oblastí bylo degradační chování kopolymeru bez ITA při různém pH (hodnoty pH byly 4,0, 7,4, 9,0). Jak bylo prokázáno, hodnota pH měla na rychlost degradace podstatný vliv. Se zvyšující se hodnotou pH se rychlost degradace zvyšovala. To platilo především pro kopolymer s poměrem PLGA/PEG 2,5; u poměru 2,0 byly rozdíly menší (především mezi pH 7,4 a 9). Pokles molekulové hmotnosti u tohoto kopolymeru byl srovnatelný pro pH 4 a 7,4 (mezi 30 – 40 %).

4 STANOVENÍ POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ V SALÁMU POLIČAN

4.1 ODBĚR A ÚPRAVA VZORKU

Ve firmě KMOTR – Masna Kroměříž byly po dobu 1 měsíce odebírány vzorky salámu Poličan. V jeden den odběru bylo vždy odebráno 10 vzorků salámu ze tří různých zakuřovacích a zracích komor. První komora a druhá komory (1. a 2. komora) jsou nové komory, využívající nejmodernějších technologií, třetí komora (3. komora) byla komora staršího typu. Celkem bylo odebráno 120 vzorků (4 × 30). Vzorky byly upraveny podle dále popsanych metod. Data odběru odpovídala jednotlivým fázím výroby salámu: po naplnění a zavěšení, po zakouření, zrání a fermentaci a konečný výrobek před odvozem do balírny.

Tab. 5: Seznam odebraných vzorků

číslo vzorku	umístění	datum odběru
1...10	1. komora	21.11.2007
11...20	2. komora	21.11.2007
21...30	3. komora	21.11.2007
31...40	1. komora	28.11.2007
41...50	2. komora	28.11.2007
51...60	3. komora	28.11.2007
61...70	1. komora	19.12.2007
71...80	2. komora	19.12.2007
81...90	3. komora	19.12.2007
91...100	1. komora	2.1.2008
101...110	2. komora	2.1.2008
111...120	3. komora	2.1.2008

4.2 SEZNAM SLEDOVANÝCH ANALYTŮ

V následujících tabulkách jsou prezentovány sledované PAU a hodnoty m/z, vybrané pro kalibrace. Jako vnitřní standardy byly použity deuterované polycyklické aromatické uhlovodíky. Před vlastní analýzou vzorků byla optimalizována metoda extrakce a přečištění extraktu pomocí GPC. Jako nejvhodnější se jevílo použití undekanu (jako „keeper“) a nezbytné bylo vyhodnocení s vnitřními standardy. V rámci optimalizace metody byla modifikována především separace pomocí 2D GC (Pegasus IVD, LECO, USA). Výsledné podmínky analýzy jsou uvedeny v Tab. 7:.

Tab. 6: Seznam sledovaných PAH podle US EPA a jejich hodnoty m/z, které byly použity pro kvantifikaci.

Sloučenina	m/z	Vnitřní standard
Naftalen	128	Naftalen – D8
Acenaftylen	152	Acenaften – D10
Acenaften	153	Acenaften – D10
Fluoren	166	Acenaften – D10
Fenanthren	178	Anthracen – D10
Anthracen	178	Anthracen – D10
Fluoranthren	202	Anthracen – D10
Pyren	202	Anthracen – D10
Benz(a)anthracen	228	Chrysen – D12
Chrysen	228	Chrysen – D12
Benzo(b)fluoranthren	252	Perylen – D12
Benzo(k)fluoranthren	252	Perylen – D12
Benzo(a)pyren	252	Perylen – D12
Benzo(ghi)perylene	276	Perylen – D12
Dibenz(a,h)anthracen	278	Perylen – D12
Indeno(1,2,3-cd)pyren	276	Perylen – D12

Tab. 7: Optimalizované podmínky analýzy ve 2D GC použité pro analýzu PAU v salámech

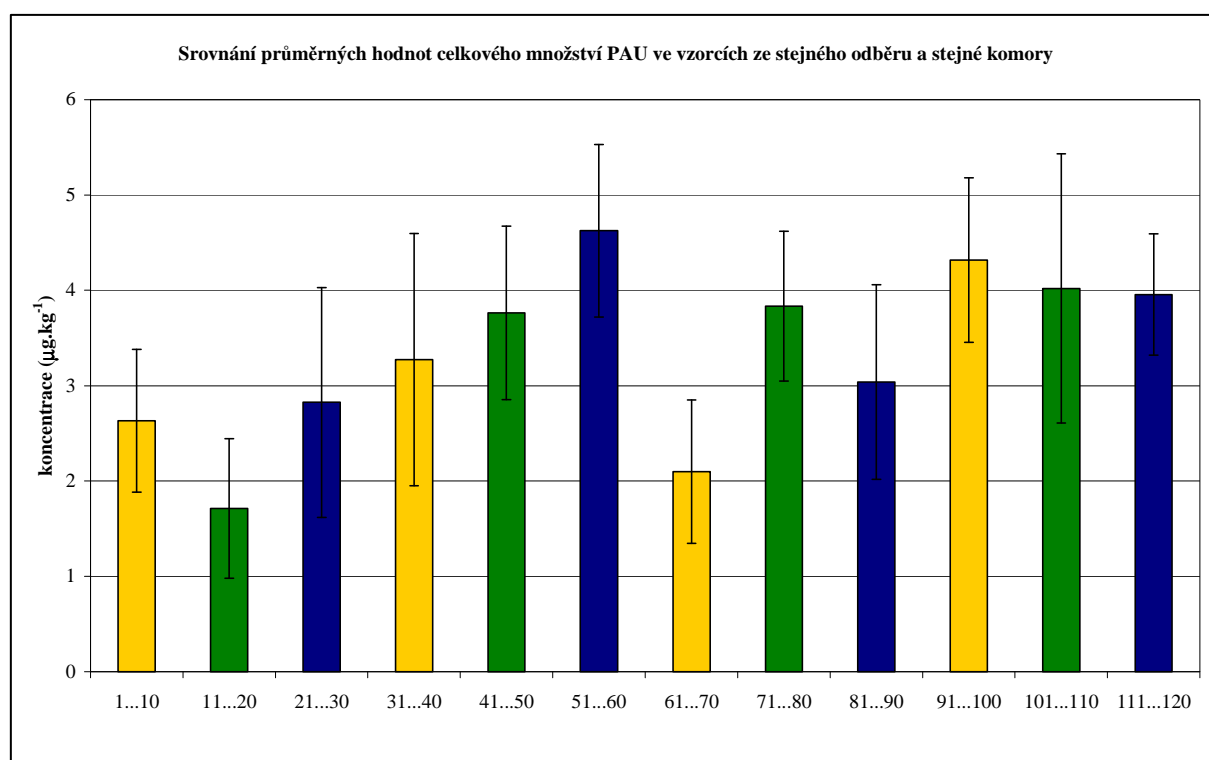
Teplota nástřiku	290 °C
Napětí detektoru	1900 V
EI	70 eV
Sběr dat	100 sp/s
Teplotní program na primární koloně	počáteční teplota 50°C, konstantní 1 min 10 °C/min do 220 °C 5 °C/min do 320 °C, konstantní 6 min
Teplotní program na sekundární koloně (offset + 20 °C)	počáteční teplota 70 °C, konstantní 1 min 10 °C/min do 240 °C 5 °C/min do 340 °C, konstantní 6 min teplota + 30 °C
Modulátor	modulační perioda 4 s (second dimension separation time) horký pulz 0,8 s (hot pulse) studený pulz 1,2 s (cool time)

4.3 VÝSLEDKY

Při porovnání celkových koncentrací PAU (Σ PAU) ve vzorcích a jejich průměrných hodnot zjištěných v rámci této studie není viditelný výrazný rozdíl mezi jednotlivými komorami používanými v masně KMOTR Kroměříž (starší a dva nové typy). Obsah PAU v salámu po zavěšení do komor před zakouřením byl ve všech třech komorách nejnižší. Po zakouření se

Σ PAU zvýšila, avšak ne výrazným způsobem. Během zrání a sušení se Σ PAU už nezvyšovala. Hodnoty PAU z posledního odběru (2.1. 2008) vzorků před balením do ochranného obalu a před distribucí nepřesahovaly povolené limity v rámci české a evropské legislativy. Jejich koncentrace byla podobná jako v předchozích odběrech. Pokud se týče počtu nalezených PAU, bylo identifikováno největší množství individuálních PAU, avšak hodnoty koncentrací se pohybovaly převážně pod LOD nebo LOQ a v celkové hodnotě PAU ve vzorcích se tyto nálezy nijak neprojeví. V grafu 6 a tab. 8 jsou shrnuty všechny konkrétní Σ PAU v jednotlivých odběrech pro daný typ zakuřovací a zrací komory.

Ve srovnání s výsledky analýz prezentovaných v publikacích [49-51] jsou zjištěné hodnoty PAU v Poličanu nižší. Z publikací jednoznačně vyplývá, že výskyt PAU je výrazně spojen s metodou úpravy potravin, kde přímé uzení (nebo grilování) má za následek vyšší koncentrace PAU v těchto potravinách, než průmyslová výroba potravin [34].



Graf 6: Průměrné hodnoty celkových koncentrací PAU ve vzorcích; žlutá – 1. komora, zelená – 2. komora, modrá – 3. komora. Chybové úsečky jsou směrodatné odchylky pro 10 stanovení.

Nejvyšší koncentrace byly nalezeny pro fenanthren, který byl identifikován a kvantifikován téměř ve všech vzorcích. Jeho koncentrace je největším příspěvkem do celkové koncentrace PAU ve vzorcích. Tato koncentrace byla více než dvojnásobná, v porovnání s individuálními koncentracemi dalších PAU. Fluoren se také vyskytoval téměř ve všech vzorcích, ale v nižší koncentraci než fenanthren (fenanthren v rozmezí 2,0 až 2,7 µg.kg⁻¹ a fluoren v intervalu 0,8 až 1,0 µg.kg⁻¹). V publikaci od M. Lorenza a spol. [50] byly analyzovány dva druhy tradičních španělských (Androlla a Botillo) salámů. V rámci této studie byly také ve všech analyzovaných vzorcích zjištěny největší koncentrace fenanthrenu. Koncentrace BaP nepřekročily limit stanovený EU. V rozsáhlé práci pojednávající o příjmu PAU potravou v Katalánsku, v rámci které byly analyzovány stejné PAU jako v naší studii, bylo rovněž potvrzeno, že nejvyšší koncentrace byly prokázány u fenanthrenu a pyrenu, a to bez ohledu na typ potravin [52]. Z rozsáhlé publikace

o dietárním příjmu PAU ve Švédsku, v rámci které bylo porovnááno velké množství uzeného masa a ryb také vyplývá, že nejnižší koncentrace PAU (pod limity EU) jsou při průmyslové výrobě (uzení, zakouření) potravin [51]. Podle zpráv Státní zemědělské a potravinářské inspekce z roku 2008 nebyl v testovaných uzených masných výrobcích (20 vzorků) nalezen BaP [53].

Tab. 8: Průměrné hodnoty celkových koncentrací PAU v sadě vzorků po 10

číslo vzorku	průměr koncentrací ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	směrodatná odchylka ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD (%)	medián ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
1...10	2,633	0,748	28,4	2,650
11...20	1,713	0,732	42,8	1,562
21...30	2,825	1,205	42,7	2,281
31...40	3,273	1,322	40,4	3,933
41...50	3,764	0,910	24,2	3,552
51...60	4,625	0,905	19,6	4,589
61...70	2,098	0,752	35,9	2,169
71...80	3,833	0,787	20,5	3,840
81...90	3,038	1,019	33,6	2,715
91...100	4,318	0,863	20,0	4,443
101...110	4,020	1,412	35,1	3,863
111...120	3,956	0,636	16,1	3,935

4.4 ZÁVĚR

Předložená studie byla zaměřena na analýzu PAU (16 EPA PAH) ve vzorcích fermentovaného salámu Poličan z výroby masny Kmotr Kroměříž. Bylo analyzováno 120 vzorků salámů odebíraných postupně v různých fázích výroby (zrání).

Součástí práce bylo vypracování metody pro zpracování těchto vzorků a analýzu PAU pomocí dvojdimenzionální plynové chromatografie s hmotnostním detektorem (analyzátor doby letu), GC \times GC–TOF-MS. K extrakci tuku byl použit extraktor Soxtec. K přečištění získaného extraktu byla využita GPC s kolonou BioBeds SX3. V průběhu prováděné analýzy byly optimalizovány podmínky pro separaci ve 2D GC. Zejména byl stanoven teplotní program a doba modulační periody (4 s jako optimální).

V rámci optimalizace přípravy vzorků bylo určeno, že způsob odpařování rozpouštědel po GPC má velký vliv na výtěžnost metody. Vzhledem k nízkým koncentracím PAU ve vzorcích bylo nutné extrakty co nejvíce zakoncentrovat do malých objemů, což mělo za následek „problém nízkých výtěžností“. Řešení bylo nalezeno v použití undekanu jako „keeperu“, a to zejména pro těžavější PAU. Dále bylo nezbytné do všech vzorků již před přečištěním pomocí GPC přidávat směs vnitřních standardů (naftalen-D8, acenaften-D10, anthracen-D10, chrysen-D12 a perylen-D12). Po této úpravě bylo dosaženo maximální výtěžnosti v intervalu 90 – 105 %. Výpočty konečných koncentrací PAU byly provedeny s použitím metody vnitřního standardu.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že v žádném ze 120 vzorků salámu nebyly překročeny limity stanovené platnou českou a evropskou legislativou. Nejvyšších koncentrací dosahoval fenanthren (až $2,7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), dále fluoren a pyren (oba do $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). PAU od

molekulové hmotnosti $228 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (benzo(a)anthracen) se ve vzorcích vyskytovaly pouze výjimečně.

Odebírané vzorky pocházely ze tří komor, kde první dvě byly nového typu a třetí staršího typu. Na základě výsledků je možné konstatovat, že stáří zakuřovacích komor nemělo podstatný vliv na výskyt PAU v salámech. V salámech odebraných po zakouření byl prokázán pouze mírný nárůst koncentrace PAU, která se dále v průběhu zrání již neměnila. V souladu s námi zjištěnými údaji a výsledky prezentovanými v dříve uvedených publikacích lze říci, že v průmyslově vyráběných masných výrobcích koncentrace PAU nepřekračují dané limity.

PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Gunatillake, P.A. and Adhikari, R.: Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials* 2003, vol. 5, no., p. 1-16. ISSN 1473-2262.
- [2] Vadgama, P.: *Surfaces and interfaces for biomaterials*. 1st ed, Cambridge: Woodhead Publishing Limited. 2005. p. 802. ISBN 1-85573-930-5.
- [3] Kim, S.W., Bae, Y.H., and Okano, T.: Hydrogels - Swelling, Drug Loading, and Release. *Pharmaceutical Research*, 1992, vol. 9, no. 3, p. 283-290. ISSN 0724-8741.
- [4] Scientific Opinion of the Panel Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *The EFSA Journal*, 2008, vol. no. 724, p. 1-114.
- [5] Griffith, L.G.: Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, 2000, vol. 48, no. 1, p. 263-277. ISSN 1359-6454.
- [6] von Burkersroda, F., Schedl, L., and Gopferich, A.: Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*, 2002, vol. 23, no. 21, p. 4221-4231. ISSN 0142-9612.
- [7] Dunne, M., Corrigan, O.I., and Ramtoola, Z.: Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*, 2000, vol. 21, no. 16, p. 1659-1668. ISSN 0142-9612.
- [8] Deng, M., Zhou, J., Chen, G., Burkley, D., Xu, Y., Jamiolkowski, D., and Barbolt, T.: Effect of load and temperature on in vitro degradation of poly(glycolide-co-L-lactide) multifilament braids. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 20, p. 4327-4336. ISSN 0142-9612.
- [9] Jeong, B. and Gutowska, A.: Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 2002, vol. 20, no. 7, p. 305-311. ISSN 0167-7799.
- [10] Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., and Ichikawa, H.: Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, vol. 50, no. 1, p. 27-46. ISSN 0939-6411.
- [11] Qiu, Y. and Park, K.: Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, vol. 53, no. 3, p. 321-339. ISSN 0169-409X.
- [12] Gutowska, A., Jeong, B., and Jasionowski, M.: Injectable gels for tissue engineering. *Anatomical Record*, 2001, vol. 263, no. 4, p. 342-349. ISSN 0003-276X.
- [13] Jeong, B., Kim, S.W., and Bae, Y.H.: Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, no. 1, p. 37-51. ISSN 0169-409X.
- [14] Chitkara, D., Shikanov, A., Kumar, N., and Domb, A.J.: Biodegradable injectable in situ depot-forming drug delivery systems. *Macromolecular Bioscience*, 2006, vol. 6, no. 12, p. 977-990. ISSN 1616-5187.
- [15] Hoffman, A.S.: Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, no. 1, p. 3-12. ISSN 0169-409X.
- [16] Jeong, B., Bae, Y.H., and Kim, S.W.: Biodegradable thermosensitive micelles of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 1999, vol. 16, no. 1-4, p. 185-193. ISSN 0927-7765.
- [17] Jeong, B., Bae, Y.H., and Kim, S.W.: Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions. *Macromolecules*, 1999, vol. 32, no. 21, p. 7064-7069. ISSN 0024-9297.

- [18] Jeong, B., Choi, Y.K., Bae, Y.H., Zentner, G., and Kim, S.W.: New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 1999, vol. 62, no. 1-2, p. 109-114. ISSN 0168-3659.
- [19] Jeong, B., Kibbey, M.R., Birnbaum, J.C., Won, Y.Y., and Gutowska, A.: Thermogelling biodegradable polymers with hydrophilic backbones: PEG-g-PLGA. *Macromolecules*, 2000, vol. 33, no. 22, p. 8317-8322. ISSN 0024-9297.
- [20] Jeong, B., Bae, Y.H., and Kim, S.W.: In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, vol. 50, no. 2, p. 171-177. ISSN 0021-9304.
- [21] U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, *Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. dostupné z > <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69-p.pdf> [cit. 20.5. 2010]
- [22] *Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*, in IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. 2010: Lyon, France. vol. 92. p. 868.
- [23] Mahadevan, B. and Luch, A.: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. in Encyclopedia of Cancer*. 2nd Edition, Schwab M. Editor. 2009. p. 2388-2391. Heidelberg Germany. ISBN 978-3-540-36847-2
- [24] Xue, W. and Warshawsky, D.: Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, vol. 206, no. 1, p. 73-93. ISSN 0041-008X.
- [25] Harvey, R.G.: *Polycyclic aromatic hydrocarbons: Chemistry and carcinogenicity*. 1991, Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press. 405. ISBN 0-521-364-582.
- [26] Penning, T.M., *Aldo-Keto Reductases and Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon o-Quinones*, in *Methods in Enzymology*, S. Helmut and P. Lester, Editors. 2004, Academic Press. p. 31-67. ISBN 0076-6879
- [27] Phillips, D.H.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 1999, vol. 443, no. 1-2, p. 139-147. ISSN 1383-5718.
- [28] Farhadian, A., Jinap, S., Abas, F., and Sakar, Z.I.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. *Food Control*, 2010, vol. 21, no. 5, p. 606-610. ISSN 0956-7135.
- [29] Farhadian, A., Jinap, S., Hanifah, H.N., and Zaidul, I.S.: Effects of meat preheating and wrapping on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled meat. *Food Chemistry*, vol. In Press, Accepted Manuscript, ISSN 0308-8146.
- [30] Simko, P.: Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat foods and liquid smoke flavorings. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005, vol. 49, no. 7, p. 637-647. ISSN 1613-4125.
- [31] Stumpe-Viksna, I., Bartkevics, V., Kukare, A., and Morozovs, A.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chemistry*, 2008, vol. 110, no. 3, p. 794-797. ISSN 0308-8146.
- [32] Suchanova, M., Hajslova, J., Tomaniova, M., Kocourek, V., and Babicka, L.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, vol. 88, no. 8, p. 1307-1317. ISSN 0022-5142.
- [33] Jira, W.: A GC/MS method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked meat products and liquid smokes. *European Food Research and Technology*, 2004, vol. 218, no. 2, p. 208-212. ISSN 1438-2377.

- [34] Ziegenhals, K., Jira, W., and Speer, K.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in various types of tea. *European Food Research and Technology*, 2008, vol. 228, no. 1, p. 83-91. ISSN 1438-2377.
- [35] DjinoVIC, J., Popovic, A., and Jira, W.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in traditional and industrial smoked beef and pork ham from Serbia. *European Food Research and Technology*, 2008, vol. 227, no. 4, p. 1191-1198. ISSN 1438-2377.
- [36] Mondello L., Lewis. A.C., Bartle K. D.: *Multidimensional Chromatography*. 1st ed. 2002, John Wiley and Sons Ltd.: Chichester, UK. ISBN 9780471988694
- [37] Liu, Z.Y. and Phillips, J.B.: Comprehensive 2-dimensional gas-chromatography using an on-column thermal modulator interface. *Journal of Chromatographic Science*, 1991, vol. 29, no. 6, p. 227-231. ISSN 0021-9665.
- [38] Ryan, D. and Marriott, P.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, vol. 376, no. 3, p. 295-297. ISSN 1618-2642.
- [39] Giunchedi, P., Conti, B., Scalia, S., and Conte, U.: In vitro degradation study of polyester microspheres by a new HPLC method for monomer release determination. *Journal of Controlled Release*, 1998, vol. 56, no. 1-3, p. 53-62. ISSN 0168-3659.
- [40] Grayson, A.C.R., Cima, M.J., and Langer, R.: Size and temperature effects on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 14, p. 2137-2145. ISSN 0142-9612.
- [41] Park, T.G.: Degradation of Poly(D,L-Lactic Acid) Microspheres - Effect of Molecular-Weight. *Journal of Controlled Release*, 1994, vol. 30, no. 2, p. 161-173. ISSN 0168-3659.
- [42] Park, T.G.: Degradation of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microspheres - Effect of Copolymer Composition. *Biomaterials*, 1995, vol. 16, no. 15, p. 1123-1130. ISSN 0142-9612.
- [43] Jeong, B., Bae, Y.H., and Kim, S.W.: Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *Journal of Controlled Release*, 2000, vol. 63, no. 1-2, p. 155-163. ISSN 0168-3659.
- [43] Li, X.H., Deng, X.M., Yuan, M.L., Xiong, C.D., Huang, Z.T., Zhang, Y.H., and Jia, W.X.: In vitro degradation and release profiles of poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped proteins. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000, vol. 78, no. 1, p. 140-148. ISSN 0021-8995.
- [44] Li, S.M. and McCarthy, S.: Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide). *Biomaterials*, 1999, vol. 20, no. 1, p. 35-44. ISSN 0142-9612.
- [45] Holy, C.E., Dang, S.M., Davies, J.E., and Shoichet, M.S.: In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials*, 1999, vol. 20, no. 13, p. 1177-1185. ISSN 0142-9612.
- [46] Proikakis, C.S., Mamouzelos, N.J., Tarantili, P.A., and Andreopoulos, A.G.: Swelling and hydrolytic degradation of poly(D,L-lactic acid) in aqueous solutions. *Polymer Degradation and Stability*, 2006, vol. 91, no. 3, p. 614-619. ISSN 0141-3910.
- [48] Witt, C., Mader, K., and Kissel, T.: The degradation, swelling and erosion properties of biodegradable implants prepared by extrusion or compression moulding of poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers. *Biomaterials*, 2000, vol. 21, no. 9, p. 931-938. ISSN 0142-9612.
- [49] Simko, P.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2002, vol. 770, no. 1-2, p. 3-18. ISSN 1570-0232.

- [50] Lorenzo, J.M., Purriños, L., Fontán, M.C.G., and Franco, D.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Spanish traditional smoked sausage varieties: "Androlla" and "Botillo". *Meat Science*, vol. In Press, Accepted Manuscript, ISSN 0309-1740.
- [51] Wretling, S., Eriksson, A., Eskhult, G.A., and Larsson, B.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, vol. 23, no. 3, p. 264-272. ISSN 0889-1575.
- [52] Martorell, I., Perelló, G., Martí-Cid, R., Castell, V., Llobet, J.M., and Domingo, J.L.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: Temporal trend. *Environment International*, 2010, vol. 36, no. 5, p. 424-432. ISSN 0160-4120.
- [53] Státní zemědělská a potravinářská inspekce. *Zpráva o výsledcích plánované kontroly cizorodých látek v potravinách v roce 2008*. Dostupné z www.szpi.gov.cz/ViewFile.aspx?docid=1022891. [cit. 20.12. 2010]

ŽIVOTOPIS

Osobní údaje

Jméno a příjmení, titul: Ludmila Mravcová, Ing. (roz. Nová)
Datum narození: 25.6.1981
Stav: vdaná
E-mail: mravcova@fch.vutbr.cz

Vzdělání

1999 – 2004 Vysoké učení technické v Brně (Fakulta chemická, obor Chemie a technologie životního prostředí, téma diplomové práce: *Úprava huminových vod různými koagulanty*)

2004 – dosud Vysoké učení technické v Brně – doktorské studium (Fakulta chemická, obor Chemie a technologie životního prostředí, téma disertační práce: *Využití separačních technik na bázi plynové a kapalinové chromatografie s různým typem detektorů pro stanovení biologicky aktivních látek a vybraných xenobiotik*)

Ostatní školní aktivity

- členka organizační komise na mezinárodní konferenci **EMEC7**, konané na Fakultě chemické v termínu 6. – 9. 12. 2006, Brno, ČR
- členka organizační komise **Dne chemie**, konaného na FCH dne 8. 3. 2007, Brno
- členka organizační komise **8. školy hmotnostní spektrometrie**, konané v Lednici 10. – 14. 9. 2007
- aktivní účast na Dnech chemie a Nocích vědců v letech 2007 – 2010

Účast v projektech

- v roce 2006 hlavní řešitelka projektu FRVŠ 2295/2006/G4
- v roce 2010 spoluřešitelka projektů FRVŠ 2891/2010/F6 a 2892/2010/F4
- spoluřešitel projektu COST 636 „Zavedení nových postupů pro monitorování xenobiotik ve vodách vypouštěných z vybraných čistíren odpadních vod ve městě Brně“, evidovaný MŠMT pod č. OC 183, řešeno v letech 2007 – 2009, hlavní řešitel prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

Znalosti

Jazykové znalosti:

Angličtina - aktivní

Počítačové znalosti

Uživatelská znalost kancelářského balíku Microsoft Office:
Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Powerpoint - pokročilý

Další dovednosti:

Řidičský průkaz sk. B

SEZNAM PUBLIKACÍ

Impaktované publikace

Mravcová, L.; Vávrová, M.; Čáslavský, J.; Stoupalová, M.; Hlaváčková, I.; Vítečková, H.: Volatile Organic Substances Present in Spices and Spruce Needles. *Chemické listy*. 2008. vol. 102. (15). p. 437-438. ISSN 1213-7103.

Vítečková, H.; Vydrová, L.; Vávrová, M.; Mravcová, L.: Antibiotics in the environment. *Chemické listy*. 2008. vol. 102(15). p. 511 - 512. ISSN 1213-7103.

David, J.; Vojtová, L.; Michlovská, L.; Kučerík, J.; Mravcová, L.; Chytil, M.; Pekař, M.; Vávrová, M.; Jančář, J.: Physico-Chemical Properties of Functionalized Temperature-Sensitive Biocompatible Block Copolymers. *Chemické listy*. 2008. vol. 105. (15). p. 1238-1241 . ISSN 1213-7103.

Vávrová, M.; Stoupalová, M.; Mravcová, L.; Večerek, V. Purification process influence on the PAH determination in real soil samples. *Chemické listy*. 2008. vol.102. (15). p. 459 - 460. ISSN 1213-7103.

Vítečková, H.; Vávrová, M.; Mravcová, L.; Vydrová, L.: Assessment of sulfathiazole in wastewater. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2008. vol. 17. (11a). p. 1846 - 1851. ISSN 1018-4619.

Obruča, S.; Márová, I.; Staňková, M.; Mravcová, L.; Svoboda, Z.: Effect of Ethanol and Hydrogen Peroxide on Poly(3-hydroxybutyrate) Biosynthetic Pathway in *Cupriavidus necator* H16. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2010. vol. 26. (10). p. 1 - 7. ISSN 0959-3993.

Michlovská, L.; Vojtová, L.; Mravcová, L.; Hermanová, S.; Kučerík, J.; Jančář, J.: Functionalization Conditions of PLGA-PEG-PLGA Copolymer with Itaconic Anhydride. *Macromolecular Symposia*. 2010. vol. 295. (1). p. 119 - 124. ISSN 1022-1360.

Obruča, S.; Márová, I.; Šnajdar, O.; Mravcová, L.; Svoboda, Z.: Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*. 2010. vol. 32. (12). p. 1925 - 1932. ISSN 0141-5492.

Ostatní vybrané publikace (příspěvky na konferencích a seminářích)

Vávrová, M.; Vojtová, L.; Jančář, J.; Nová, L.; Čáslavský, J.; Rathouský, M.: Možnost kontaminace životního prostředí odpady z polymerů a biopolymerů. In *Zborník proceedings*. 1. Hrádok pri Jelšave, Slovensko, Ústav geotechniky SAV Košice. 2005. p. 173 - 177. ISBN 80-8077-022-0.

Nová, L.; Vávrová, M.; Čáslavský, J.; Vojtová, L.: Optimization of LC method for the characterization of biocompatible polymers degradation products. In *The 6th european meeting on environmental chemistry*. 1. Belgrade, The Serbian Chemical Society. 2005. p. 310 - 310. ISBN 86-7132-024-3.

Vítečková, H.; Mravcová, L.; Vávrová, M.: Stanovení reziduí léčiv v odpadních vodách. In *Zborník prednášok*. 1. Tatranské Zruby. Slovenská Republika, AČE. 2006. p. 8 - 13. ISBN 80-89088-48-1.

Vítečková, H.; Mravcová, L.; Vávrová, M.: Determination of sulphonamides in wastewater. *Book of abstracts*. Brno, Brno University of Technology, Faculty of Chemistry. 2006. p. 224 - 224. ISBN 80-214-3320-5.

Mravcová, L.; Vojtová, L.; Vávrová, M.; Čáslavský, J.; Jančář, J.: Characterization and degradation behaviour of biocompatible triblock copolymer. *Book of abstracts*. Brno, Czech Republic, Faculty of Chemistry. 2006. p. 212 - 212. ISBN 80-214-3320-5.

Mravcová, L.; Vojtová, L.; Vávrová, M.; Čáslavský, J.; Jančář, J.: HPLC and GPC as methods for study of degradation behavior of biocompatible triblock copolymer. In *Abstrakt Book*. 1. Kortrijk, Belgium, I.O.P.M.S. 2007. p. 861 - 861.

Vojtová, L.; Mravcová, L.; Vávrová, M.; Jančář, J.: Injectable resorbable adhesives for bone repair application. 1st. Bratislava Young Polymer Scientists Workshop. Bratislava, Slovak Republic, Polymer Institute SAS. 2007. p. 83 - 83. ISBN 978-80-968433-4-3.

Vojtová, L.; Mravcová, L.; Vávrová, M.; Chytil, M.; Pekař, M.; Jančář, J.: Functionalization and Characterization of Thermoreversible Amphiphilic Hydrogels for Biomedical Applications. In *Macro 2008 The 42nd IUPAC World Polymer Congress*. Taipei, Taiwan, The Polymer Society, Taipei. 2008. p. 691 - 692.

Vítečková, H.; Vávrová, M.; Mravcová, L.; Vydrová, L.: Stanovení antibiotik v odpadních vodách. In *Analýza organických látek v životním prostředí*. 1. Český Těšín, 2 THETA P.S. 2008. p. 99 - 104. ISBN 978-80-86380-45-2.

Michlovská, L.; Vojtová, L.; Mravcová, L.; Hermanová, S.; Jančář, J.: Optimizing conditions for functionalization of PLGA-PEG-PLGA Copolymers with Itaconic Anhydride. *New Frontiers in Macromolecular Science: From Macromolecular Concepts of Living Matter to Polymers for Better Quality of Life*. Prague, Institute of Macromolecular Chemistry AS CR. 2009. p. 156 - 156. ISBN 978-80-85009-59-0.

Michlovská, L.; Vojtová, L.; Mravcová, L.; Jančář, J.: Sol-gel transitions of PLGA-PEG-PLGA Triblock Copolymers: Effect of Composition and Itaconic anhydride. *Young Scientists Towards the Challenges of Modern Technology*. Warsaw, Warsaw University of Technology. 2010. p. 37 - 37.

ABSTRAKT

Předložená práce se zabývá využitím separačních technik pro analýzu degradace polymerů a polycyklických aromatických uhlovodíků. Je rozdělena na dvě části, které jsou zpracovány samostatně.

V první části práce byly studovány zejména degradační vlastnosti blokových kopolymerů na bázi kyseliny mléčné, glykolové a poly(ethylenglykolu) PLGA-PEG-PLGA a ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA (modifikovaný kyselinou itakonovou). S využitím těchto kopolymerů (především jejich termosensitivních hydrogelů) se počítá v ortopedii na léčbu zlomenin (jako „lepidlo“). U vybraných vzorků kopolymerů byly sestaveny diagramy jejich fázového přechodu sol-gel. Pro další studium byly použity vzorky tvořící gel při 37 °C. Vzorky byly degradovány ve fosfátovém pufru o pH 7,4, při teplotě 37 °C. Degradace vzniklých fyzikálních hydrogelů byla popsána poklesem molekulové hmotnosti polymeru a nárůstem koncentrací kyseliny mléčné a glykolové v roztoku pufru. Bylo zjištěno, že polymer modifikovaný kyselinou itakonovou podléhá rychlejší degradaci než stejný nemodifikovaný polymer; rovněž bylo prokázáno, že vzorky s nižším poměrem PLGA/PEG degradují rychleji než s poměrem vyšším. Rychlost degradace je také závislá na hodnotě pH pufru a to v pořadí $\text{pH } 4,0 < \text{pH } 7,4 < \text{pH } 9,0$.

V druhé části práce byl ve vzorcích salámu Poličan, odebraných ve výrobním závodě KMOTR, spol. s r.o., sledován obsah 16 PAH stanovených US EPA. Jako vhodná analytická metoda byla zvolena plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (GC × GC–TOF-MS). Vzorky salámů byly odebírány v různé fázi výroby, celkem byly v průběhu 5 týdnů provedeny 4 odběry; odebráno bylo celkem 120 vzorků. Obsah jednotlivých polyaromatických uhlovodíků byl posuzován i z hlediska platné legislativy. Bylo zjištěno, že v žádném z analyzovaných vzorků nebyly překročeny limity pro výskyt BaP. Nejvyšší koncentrace byly nalezeny pro fenanthren (až $2,7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Pomocí obsahu PAU byla posuzována také technologie výroby Poličanu používaná ve výrobním závodě. Na základě porovnání zjištěných kvantifikovaných PAU lze konstatovat, že při porovnání staršího a novějšího typu zakuřovací komory nebyl nalezen významný rozdíl v obsahu sledovaných xenobiotik.