

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

STUDIUM DEGRADACE BIOKOMPATIBILNÍCH KOPOLYMERŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

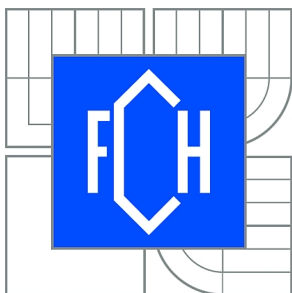
Bc. JANA OBORNÁ

BRNO 2011



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

STUDIUM DEGRADACE BIOKOMPATIBILNÍCH KOPOLYMERŮ

STUDY OF DEGRADATION OF BIOCOMPATIBLE COPOLYMERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JANA OBORNÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0511/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Jana Oborná	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Studium degradace biokompatibilních kopolymerů

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Sestavení sol-gel diagramů pro jednotlivé vzorky
3. Degradace vzorků hydrogelu
4. Analýza degradačních produktů pomocí GPC, HPLC
5. Identifikace degradačních produktů pomocí HPLC/MS6. Zhodnocení získaných výsledků a jejich interpretace

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jana Oborná
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na sledování degradace biokompatibilních polymerů. Byly studovány kopolymery založené na poly(mléčné), poly(glykolové) kyselině a poly(ethylenglykolu) PLGA-PEG-PLGA a dále tyto kopolymery modifikované kyselinou itakonovou ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA.

Byl sledován vliv pH fosfátového roztoku na degradaci kopolymerů. Degradace probíhala při teplotě 37 °C v prostředí fosfátového roztoku při pH 4,2; 7,4 a 9,2. Pro kvantitativní stanovení kyseliny mléčné a glykolové, které jsou konečné produkty degradace, byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV-VIS detekcí pomocí diodového pole. Pro kvalitativní stanovení dalších produktů degradace bylo využito tandemového spojení kapalinové chromatografie a hmotnostního detektoru. Pro stanovení poklesu molekulové hmotnosti řetězce kopolymerů po degradaci byla použita gelová permeační chromatografie s refraktometrickým detektorem.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on biocompatible polymers degradation study. Copolymers were studied based on poly(lactic-co-glycolic) acid and poly(ethylene glycol) PLGA-PEG-PLGA and further these copolymers modified with itaconic acid ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA.

This paper investigated the influence of pH phosphate solution on the degradation of polymers. Degradation of polymers occurred at 37 °C in phosphate solution with pH 4.2, 7.4 and 9.2. High performance liquid chromatography with UV-VIS detection of diode-array type was used for quantitative determination of lactic acid and glycolic acid as the final degradation products. For qualitative identification of additional degradation products were used tandem connection liquid chromatography and mass spectrometry. Gel permeation chromatography with refractive index detector was used to determine the molecular weight decrease polymer chain after the degradation.

KLÍČOVÁ SLOVA

biokompatibilní polymery, degradace, hydrogely

KEYWORDS

biocompatible polymers, degradation, hydrogels

OBORNÁ, J. Studium degradace biokompatibilních polymerů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 87 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

DECLARATION

I declare that the diploma thesis has been worked out by myself and that all the quotations from the used literary sources are accurate and complete. The content of the diploma thesis is the property of the Faculty of Chemistry of Brno University of Technology and all commercial uses are allowed only if approved by both the supervisor and the dean of the Faculty of Chemistry, BUT.

.....
Student's signature

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. a Ing. Ludmile Mravcové Ph.D. za jejich vstřícnost, čas, odborné vedení a cenné rady.

Velký dík patří i mé rodině, a to za podporu a pochopení při studiu na Fakultě chemické VUT v Brně.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Biologicky rozložitelné polymery	8
2.1.1	Přírodní biologicky rozložitelné polymery	8
2.1.2	Syntetické biologicky rozložitelné polymery	9
2.1.2.1	Polyestery	9
2.1.2.2	Polyanhydridy	10
2.1.2.3	Polyurethany	10
2.1.2.4	Polyethylenglykol (PEG)	10
2.2	Biodegradace polymerů	11
2.2.1	Degradace poly(mléčné kyseliny) (PLA)	11
2.2.2	Degradace poly(glykolové kyseliny) (PGA)	12
2.2.3	Degradace kopolymeru PLGA	13
2.3	Biokompatibilita a cytotoxicita	14
2.3.1	Toxicita kyseliny mléčné	14
2.3.2	Toxicita kyseliny glykolové	15
2.3.3	Toxicita kopolymeru PLGA	16
2.4	Polymery, gely, hydrogely	17
2.4.1	Aplikace hydrogelů	17
2.5	Hydrogely reagující na změnu vnějšího podmínek prostředí	17
2.5.1	Hydrogely citlivé na pH	18
2.5.2	Hydrogely citlivé na elektrické pole	18
2.5.3	Hydrogely citlivé na světlo	19
2.5.4	Specificky citlivé hydrogely	19
2.5.5	Hydrogely citlivé na teplo	19
2.5.5.1	Komerčně využívané hydrogely citlivé na teplo	20
2.5.5.2	Triblokový kopolymer PEG-PLGA-PEG	21
2.5.6	Triblokový kopolymer PLGA-PEG-PLGA	21
2.5.7	Kopolymery s poly(itakonovou kyselinou)	22
2.5.8	Vliv složení kopolymeru na sol - gel fázový přechod	23
2.6	Voda v hydrogelech a její odstranění	24
2.7	Metody charakterizace rozkladu polymerních produktů	26
2.7.1	Chromatografie	26
2.7.1.1	Separace pomocí HPLC	26
2.7.1.2	Detektory pro HPLC	27
2.7.2	Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií	28
2.7.3	Hmotnostní spektrometrie	28
2.7.3.1	Ionizace vzorku	29
2.7.3.2	Analyzátory	31
2.7.3.3	Vakuový systém a detekce	33
2.8	Metody stanovení molekulové hmotnosti polymeru	34
2.8.1	Přímé metody	35
2.8.1.1	Osmometrie	35
2.8.1.2	Rozptyl světla	35
2.8.2	Nepřímé metody	35
2.8.2.1	Viskozimetrie	35

2.8.2.2	Gelová permeační chromatografie	36
2.8.2.3	Refraktometrický detektor	37
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
3.1	Přístroje, zařízení, software	39
3.1.1	Příprava vzorků	39
3.1.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí	39
3.1.3	Gelová permeační chromatografie	39
3.1.4	Software pro zpracování a prezentaci dat	39
3.2	Používané chemikálie a standardy	40
3.2.1	Chemikálie	40
3.2.2	Standardy	40
3.3	Pracovní postupy	40
3.3.1	Vlastnosti kopolymerů založených na poly(mléčné kyselině), poly(glykolové kyselině) a polyethylenglykolu PLGA-PEG-PLGA a tyto kopolymery modifikované kyselinou itakonovou	40
3.3.2	Stanovované analyty a jejich vlastnosti	40
3.3.2.1	Kyselina mléčná	40
3.3.2.2	Kyselina glykolová	41
3.3.3	Příprava vzorků	41
3.3.4	Stanovení kritické koncentrace gelu a kritické teploty gelu	41
3.3.5	Degradace vzorků	41
3.3.6	Identifikace a kvantifikace degradačních produktů na HPLC	42
3.3.6.1	Nastavení HPLC	42
3.3.6.2	Nastavení iontové pasti	42
3.3.7	Příprava vzorků na GPC analýzu	43
3.3.8	Kvantifikace poklesu molekulové hmotnosti degradovaných vzorků na GPC	43
3.3.8.1	Nastavení GPC	43
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	44
4.1	Přehled testovaných kopolymerů	44
4.2	Sol-gel fázové diagramy	45
4.3	Sledování degradace PLGA-PEG-PLGA a ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA kopolymerů	49
4.4	Identifikace a kvantifikace uvolněných kyselin pomocí HPLC	57
4.5	Identifikace degradačních produktů pomocí HPLC/MS	63
4.5.1	Vysvětlení principu fragmentace degradačních produktů PLGA-PEG-PLGA kopolymerů	64
5	ZÁVĚR	77
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	78
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	85
8	SEZNAM PŘÍLOH	86
9	PŘÍLOHY	87

1 ÚVOD

V oblasti vývoje nových druhů polymerů se v posledních letech upíná pozornost na materiály, které podléhají přirozené degradaci. Tyto materiály nacházejí své významné využití v medicíně, zejména pro jejich několik nesporných výhod. Za prvé – nevyvolávají chronické reakce na cizí těleso, které při chirurgických zákrocích zůstává v těle, protože jsou postupně vstřebávány. Za druhé – není zapotřebí následné operace pro odstranění implantátu. Významné je také jejich uplatnění v oboru tkáňového inženýrství, kde se používají jako nosiče buněk. Buňky se na této opěrné matici z polymeru rozrůstají a vytváří tak novou tkáň. Po vytvoření nové silné tkáně není už „kostra“ z polymeru zapotřebí, a proto je pro tyto účely používán vstřebatelný materiál [1].

Snahy o napodobení přírodních materiálů, které mají jak hydrofilní, tak hydrofobní vlastnosti, vedly k vývoji biokompatibilních amfifilních syntetických polymerů [2]. Do této klasifikace jsou zahrnuty hydrogely, které mohou být fyzikální nebo chemické povahy, se schopností absorbovat více než 20 % vody v poměru k jejich celkové hmotnosti [3]. Biomedicínská aplikace hydrogelů je velmi široká, od kontaktních čoček přes diagnostické pomůcky, jakými jsou biosensory nebo lékařské implantáty s krátkou, případně dlouhou dobou životnosti.

V poslední letech byly připraveny tzv. „chytré“ hydrogely, u kterých je jejich chování (gelace) ovlivňováno reakcí na externí podmínky [4]. Tato citlivost na okolní prostředí může být řízena změnou teploty, pH, elektrickým polem, světlem, iontovou povahou, magnetickým polem nebo napětím [5]. Aktuální metoda přípravy hydrogelů je založena na zesíťování makromonomerů pomocí fotopolymerizace nebo přes přechodnou fázi mezi roztokem a gelem [6, 7, 8]. Gel, který vznikne při reverzibilním procesu v přechodné fázi, má schopnost přecházet z roztoku (solu) na gel a zpět. Jednotlivé přechody mohou být ovlivněny např. změnou teploty. Tyto vlastnosti mají gely skládající se z hydrofilního poly(ethylenglykolu) PEG a hydrofobní poly(mléčné kyseliny) PLA a poly(glykolové kyseliny) PGA [2]. Termoreversibilní gely mohou být použity jako injekční implantáty nebo jako systémy s postupným uvolňováním léčiv [8].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biologicky rozložitelné polymery

Biologicky rozložitelné polymery disponují především velkým potenciálem využití v lékařství, zemědělství a v průmyslu obalových materiálů. Významné uplatnění získávají v tkáňovém inženýrství, při výzkumu umělých orgánů a při vývoji nových systémů léků s postupným uvolňováním účinné látky. Podle lékařské definice jsou „biomateriály“ látky jiné než potraviny nebo léky, které jsou obsaženy v diagnostických nebo léčebných systémech a zároveň jsou v přímém kontaktu s tělními tekutinami [9]. Materiály, které mohou být použité při výzkumu v tkáňovém inženýrství a následně jsou aplikovány v lékařství, musí splňovat velmi přísné požadavky, zejména na jejich biokompatibilitu, biodegradaci na netoxické látky, schopnost podporovat růst a dělení buněk. Neopomenutelnou vlastností je také mechanická pevnost, která je důležitá při regeneraci tkání [10].

Nadále zůstává klíčovým faktorem pro rozvoj tkáňového inženýrství a následující lékařskou aplikaci výběr vhodných přírodních nebo syntetických degradabilních materiálů [11].

Syntetické polymery disponují obecně velmi dobrou mechanickou pevností. Požadovaný tvar a rychlost rozkladu lze lehce modifikovat pro každou aplikaci. Nevýhodou je hydrofobní povrch, který postrádá interakci mezi materiálem a okolními buňkami. Na druhou stranu, přírodní polymery nedisponují takovými mechanickými vlastnostmi jako syntetické polymery, avšak jsou tělu vlastní a jsou více hydrofilní, a proto lépe interagují s okolní tkání [12]. Vlastnosti nových biologicky rozložitelných polymerů mohou být navrženy pomocí kombinace obou systémů.

Mezi biologicky rozložitelné polymery, které se rozpouští ve vodě a v tělních tekutinách, se řadí dnes běžně využívané dextransy, želatina a polyethylenglykol. Tyto látky se používají pro zvýšení objemu krevní plazmy [13]. Pro detoxikaci těla se aplikuje polyvinylalkohol a při podávání léků se používají např. poly(α -aminokyseliny) [5]. Nerozpustné biologicky rozložitelné polymery mohou být hydrofobní nebo zesíťované. Jejich nejčastější lékařská aplikace je ve formě tkáňových implantátů (např. chitosan, kolagen) nebo jako makromolekulární systémy s řízeným uvolňováním léčivých látek [14]. Polyurethan bývá často využit jako tkáňové pojivo. Významnou skupinou polymerů používaných v lékařství jsou polyester, mezi které patří např. semikrystalický poly(ϵ -kaprolaktan), poly(α -hydroxykyseliny) a dále polymery založené na semikrystalické nebo amorfni kyselině mléčné (PLA) a semikrystalické kyselině glykolové (PGA) [10].

2.1.1 Přírodní biologicky rozložitelné polymery

Přírodní biologicky rozložitelné polymery se také mohou zkráceně nazývat biopolymery. Biopolymery jsou cíleně vytvářeny během růstového cyklu ve všech organismech. Jejich syntéza je enzymaticky katalyzovaná. Při takto katalyzované reakci dochází k aktivaci monomerů a rozvoji polymerizační reakce, která vede k růstu polymerního řetězce. Mezi přírodní biologicky rozložitelné polymery patří např. škrob, kolagen, celulóza, chitin, chitosan a mnoho dalších [14]. Přírodní biopolymery byly odnedaвна používány jako součást potravin. Zpracování těchto biopolymerů a jejich využívání je dobře známo i ve farmacii.

Želatina patří mezi známé přírodní termoreversibilní polymery [8]. Je to polypeptid. Vzniká při hydrolytickém rozkladu kolagenu. Je ve vodě dobře rozpustná a biologicky rozložitelná. Tento biopolymer má rozsáhlé využití ve farmaceutickém průmyslu, zejména v potahování tablet. Další využití je i pro přípravu biologicky rozložitelných hydrogelů.

Škrob se běžně vyskytuje v rostlinách ve formě zrn. Tyto zrna jsou různě velká a záleží na tom, z jakého druhu rostliny škrobové zrno pochází. Nejvíce je škrob obsažen v bramborách, kukuřici a rýži. Skládá ze dvou polymerů – z lineární ve vodě rozpustné amylosy a větveného amylopektinu, který je naopak v horké vodě nerozpustný. Škrob byl široce používán na výrobu filmů. Tyto škrobové filmy na bázi pryskyřic jsou charakteristické svou nízkou propustností a jsou proto vhodné pro balení potravin. Škrob se dnes mimo jiné používá na výrobu zemědělských mulčovacích materiálů, protože degraduje na neškodné produkty při styku s půdními organismy. Další perspektivní využití má ve funkci plniva, které se přidává například do polyethylenů pro zlepšení jejich degradačních vlastností [14].

Chitin a chitosan jsou biopolymery vyskytující se zejména v pevných schránkách garnátů, krabů a hmyzu. V posledních letech tyto biopolymery vyvolaly senzaci, protože se o nich zjistilo, že podporují rychlé hojení ran, jsou biokompatibilní a biologicky rozložitelné. Jejich unikátní vlastnosti tak nabízejí aplikaci v mnoha oborech, nejvíce by mohly být využívány jako chirurgické nitě a obvazy [14].

2.1.2 Syntetické biologicky rozložitelné polymery

Kromě přírodních biopolymerů je i celá řada syntetických polymerů biologicky i environmentálně odbouratelná. Základní řetězec polymeru, obsahující pouze atomy uhlíku, podstupuje degradaci hůře než polymer, který má ve své struktuře heteroatomy. Tohoto poznatku se cíleně využívá, a tak degradovatelnost může být do polymeru projektována přesným zařazením vhodných chemických vazeb a substituentů, jako např. amidů, anhydridů nebo esterů.

Obecným mechanismem degradace je hydrolýza. Ta může být prostá, případně spojená s enzymatickou katalýzou. Hydrolyzovaný polymer je rozštěpen na menší podjednotky a v důsledku toho degraduje. Syntetické, biologicky rozložitelné polymery s chemickými vazbami podléhajícími hydrolýze, jsou intenzivně zkoumány nejen pro biomedicínské, farmaceutické nebo zemědělské účely, ale také pro využití při výrobě obalů. Aby nějaký materiál mohl být použit v lékařství, musí být kvalifikován jako biomateriál. Biomateriál musí splňovat řadu požadavků, mezi které např. patří biokompatibilita. O biokompatibilitě polymerů často rozhodují produkty štěpení více než samotný polymer. Jako biomateriály jsou nejčastěji využívány polyester založené na polylaktanu (PCL) dále na polylaktidu (PLA), polyglykolidu (PGA) a jejich kopolymery. Degradace těchto materiálů vytváří odpovídající hydroxykyseliny, které nejsou toxické, a proto jsou bezpečné pro použití *in vivo* [15].

2.1.2.1 Polyester

Syntetické alifatické polyester byly poprvé použity v chirurgii před 40 lety jako vstřebatelné chirurgické nitě a materiál pro kostní fixaci. Stále patří mezi nejčastěji používané syntetické rozložitelné polymery [16].

Alifatické polyester, mezi které například patří hydrofobní polylaktidy (PLA), polyglykolidy (PGA), poly(ϵ -kaprolactony) (PCL), poly(β -butyrolactony) (PBL) a hydrofilní poly([R,S]-3,3-dimethyl-2-hydroxybutandiová kyselina) (PDMMLA), představují důležitou skupinu biologicky rozložitelných makromolekul s výbornou biokompatibilitou a variabilní rozložitelností.

Esterová vazba je příčinou, proč výše zmíněné polymery podléhají tak dobře degradaci. Aby byl syntetický polymer biodegradabilní pomocí enzymatické hydrolýzy, musí být řetězec polymeru schopen se správně prostorově uspořádat do aktivního místa enzymu. To je také hlavní důvod, proč přizpůsobivý řetězec alifatických polyesterů podléhá biodegradaci, a to na rozdíl od aromatických polyesterů [14]. Doba degradace také závisí na složení a původní molekulové hmotnosti polymeru. Může být v rozsahu od několika dnů až roků [17].

Poly(mléčná kyselina) (PLA), poly(glykolová kyselina) (PGA) a jejich kopolymery (PLGA) jsou součástí většiny zkoumaných polymerů ze skupiny polyesterů. Tyto polymery byly použity jako chirurgické nitě, vyztužovací pláty a pomůcky pro fixaci zlomeniny a výztuže pro buněčné transplantace. Diblokový kopolymer PLGA může být použit pro další vývoj nových kopolymerů s novým potenciálem pro klinické využití (např. systémy podávání léků, injekční polymery) [18].

2.1.2.2 Polyanhydridy

Polyanhydridy (PA) patří do skupiny polymerů, které se syntetizují ve formě vláken. Tato skupina polymerů je velmi náchylná k hydrolýze a povrchovému rozkladu, který je velice žádoucí zvláště u biomedicínických aplikací. Stupeň degradace může být definován výměnou hlavního řetězce polymeru. Alifatické PA degradují během několika dní, zatímco aromatické se mohou rozkládat velmi pomalu řádově i několik let [14]. Polyanhydridy jsou zařazeny mezi biokompatibilní polymery s výbornou vlastností kontroly uvolňování, proto je jejich hlavní aplikace řízené uvolňování léčiv [10].

2.1.2.3 Polyurethany

Polyurethany (PU) zařazujeme do hlavní skupiny syntetických elastomerů. Vynikají výbornými mechanickými vlastnostmi a dobrou biokompatibilitou. Tyto hlavní přednosti určují jejich využití zejména jako dlouhodobé medicínské implantáty. Dnes jsou používány pro výrobu lékařských implantátů, jako jsou kardiostimulátory a cévní štěpy [10].

PU mohou být navrženy tak, aby chemické vazby byly rozložitelné v biologickém prostředí. Obecně biologická rozložitelnost polyurethanů závisí na tom, zda je vícesytný alkohol založen na polyesteru, nebo na polyetheru. Polyurethany založené na polyesteru jsou snadno degradovatelné mnoha mikroorganismy a enzymy, zatímco PU zakládající se na polyetheru jsou rezistentní vůči takové biodegradaci [14].

2.1.2.4 Polyethylenglykol (PEG)

Polyethylenglykol patří mezi syntetické polymery rozpustné ve vodě. PEG a jeho deriváty jsou široce využívány v kosmetickém průmyslu na výrobu zvláčňujících látek, které se přidávají do krémů, dále se z něho vyrábí surfaktanty, čisticí prostředky atd. Farmaceutický průmysl z PEG připravuje základy pro masti, kapsle, tablety a plniva do pilulek. Další využití má v textilním průmyslu, při výrobě pryskyřic a v mnohých dalších odvětvích [19].

Po perorálním nebo intravenózním podání je polyethylenglykol vylučován převážně v nezměněné podobě v exkretech. Podmínkou odstranění polyethylenglykolu z těla je, že PEG blok musí mít nižší molekulovou hmotnost jak $5\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [20]. Větší řetězec nedokáže ledviny odfiltrovat z krve. Polyethylenglykol se může částečně vstřebávat a částečně metabolizovat. PEG je metabolizován do nižších oligomerů kyseliny glykolové, kyseliny hydroxyglykolové a diglykolové kyseliny, jako jejího homologu. Částečně je PEG metabolizován na oxid uhličitý a je vyloučen pomocí plicní ventilace. Procentuální vylučování ve formě CO_2 klesá se zvyšující se metabolizovanou dávkou a s rostoucí molekulovou hmotností homologické řady [19, 21, 22].

2.2 Biodegradace polymerů

Degradace polymerů je charakteristická svým poklesem molekulové hmotnosti vzorku polymeru, která je doprovázena zvýšením koncentrace nízkomolekulárních segmentů řetězce polymeru, které se uvolnily do okolního prostředí. Tento proces je doprovázen i ztrátou mechanické pevnosti polymeru [10].

Lze obecně říci, že téměř všechny biologicky rozložitelné polymery obsahují některou z hydrolizovatelných labilních vazeb, jako jsou vazby esterové, anhydridické, uhličitánové, amidické a mnohé další. Jejich nejvýznamnější degradační mechanismus, probíhající v živých organismech, je enzymaticky katalyzovaná hydrolýza. Pro abiotické prostředí převažuje mechanismus chemické hydrolýzy. Na hydrolytické štěpení vazeb má silný vliv složení polymeru a sterické uspořádání makromolekuly, které ovlivňuje přístup molekul vody k labilním vazbám. Celkovou rychlost hydrolýzy ovlivňuje mnoho faktorů, mezi které patří hydrofobnost/hydrofilnost, relativní stabilita vazeb, rozpustnost degradačních produktů, vznik autokatalyzujících produktů degradace, mikrostruktura a schopnost krystalizace [10].

2.2.1 Degradace poly(mléčné kyseliny) (PLA)

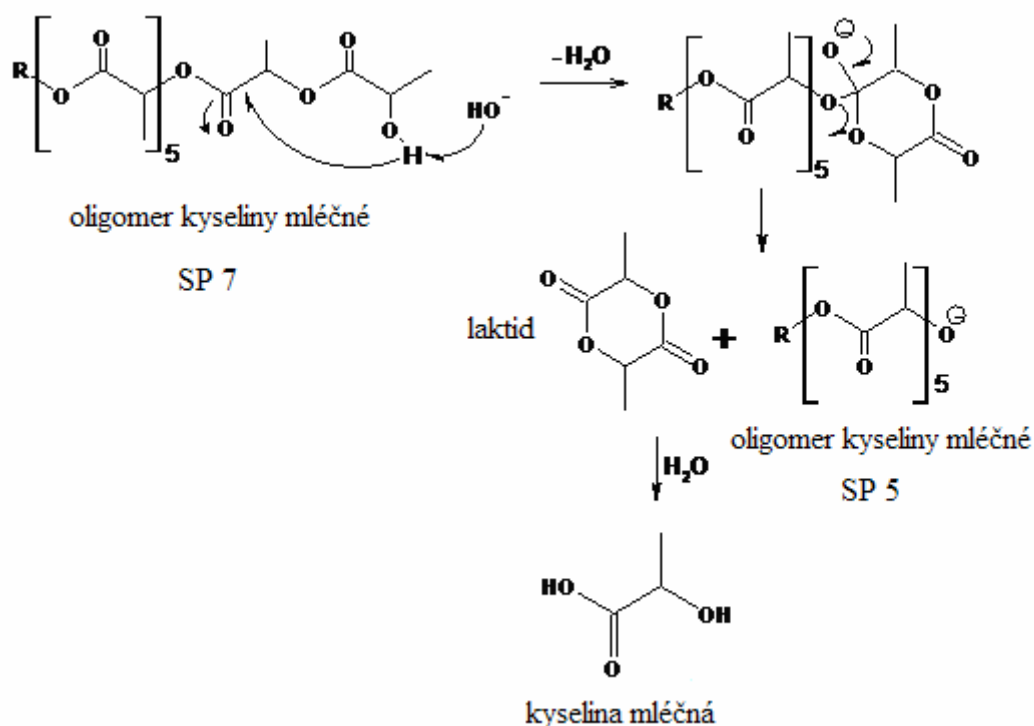
Molekula kyseliny mléčné má chirální centrum, a proto se poly(mléčná kyselina) vyskytuje ve dvou izomerních formách D (-), L (+) a v racemické směsi (D, L). Polymery z této sloučeniny jsou obvykle zkráceně označovány pomocí jejich chiralit. Poly(L-mléčná kyselina) a poly(D-mléčná kyselina) patří mezi semikrystalické pevné látky s podobným stupněm hydrolytické degradace jako PGA. V kontrastu s poly(glykolovou kyselinou) je poly(mléčná kyselina) méně náchylná k hydrolytickému štěpení, a to díky methylové skupině, která brání v přístupu molekul vody k labilním vazbám. Ve většině biomedicínských aplikací je přednostně vybrán (L) izomer kyseliny mléčné, protože pouze tento izomer je metabolizován v lidském těle [10].

Obecný rozklad PLA probíhá za přístupu molekul vody k řetězci, které hydrolyzují esterové vazby. Pro hydrolýzu těchto polyesterů je důležitým faktorem pH vodného prostředí, protože hydrolýza může být katalyzována jak kyselé, tak i zásaditě [23].

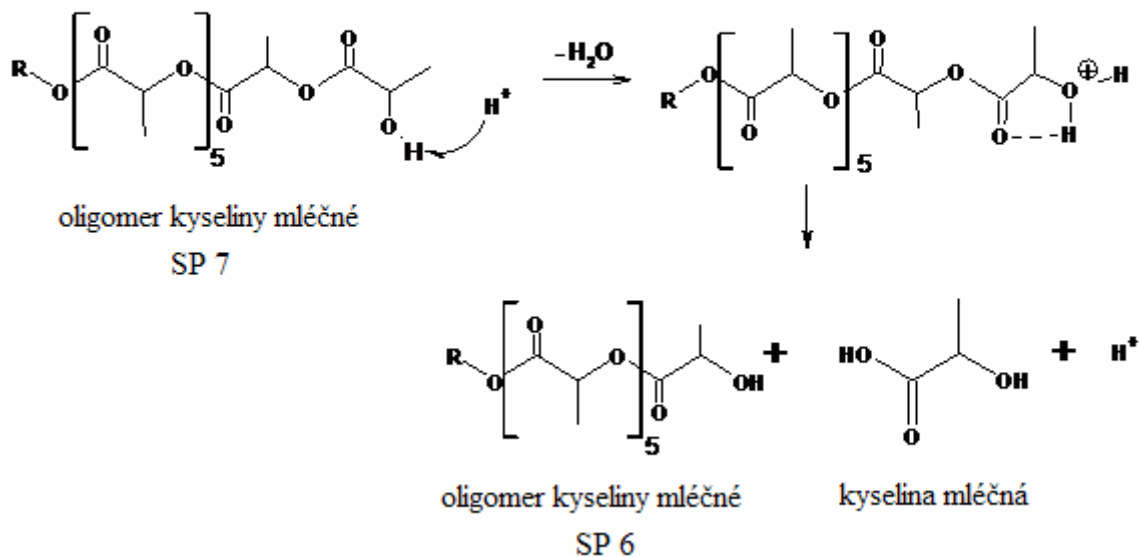
V neutrálním a v zásaditěm prostředí je vysvětlován pozorovaný rozklad oligomeru PLA mezimolekulární transesterifikací, která se také nazývá zpětné štěpení [23, 24].

Nukleofilní štěpení hydroxylové skupiny na konci druhé karbonylové skupiny vede k odštěpení molekuly vody a k vytvoření stabilního šestičlenného uzavřeného cyklu jako meziproduktu (obr. 1). Tato reakce je zásaditě katalyzována, protože zásada interaguje s koncem hydroxylové skupiny, čímž se zvyšuje nukleofilita na atomu kyslíku. Podle tohoto mechanismu se tvoří během rozkladu oligomer kyseliny mléčné (stupeň polymerace $SP = 5$) a laktát. Přestože laktát nebyl zjištěn při rozkladu vzorků, to ještě nedokazuje, že tento mechanismus není pravdivý. Poločas rozkladu laktátu je v rámci zadaných podmínek méně než 1 minuta [23].

Mechanismus hydrolýzy při kyselém pH postupuje od konce řetězce. Štěpení probíhá prioritně na esterové vazbě (obr. 2) koncového hydroxyly tohoto oligomeru [25]. To lze vysvětlit takto: rozklad je zahájen protonací na OH koncových skupinách, po kterém následuje vytvoření mezimolekulárních vodíkových můstků. Ze všech možných struktur meziproduktů je nejvíce stabilní uzavřený pětičlenný kruh. Elektrofilita karbonylové skupiny vzroste po vytvoření vodíkových můstků. Kyselina mléčná je odštěpena, přičemž zůstane oligomer kyseliny mléčné, jehož SP bude mít o jeden monomer méně, než výchozí sloučenina [23].



Obr. 1: Schéma mechanismu hydrolýzy PLA v zásaditém prostředí [23]



Obr. 2: Schéma mechanismu hydrolýzy PLA v kyselém prostředí [23]

2.2.2 Degradace poly(glykolové kyseliny) (PGA)

Poly(glykolová kyselina) (PGA) je charakterizována jako tuhý termoplastický materiál s vysokou schopností krystalizace (46 – 50 %). Vysoká schopnost krystalizace způsobuje nerozpustnost PGA ve většině organických rozpouštědel; výjimku tvoří vysoce fluorovaná rozpouštědla jako je hexafluorisopropanol.

Atraktivita PGA jako biologicky rozložitelného polymeru spočívá v tom, že její konečný degradační produkt, tj. kyselina glykolová, je přirozeným metabolitem lidského organismu. Hlavní použití PGA je v resorbovatelných nitích používaných k šití v chirurgii. Dnes jsou k dispozici pod obchodními názvy jako Dexon a American Cyanamide Co.

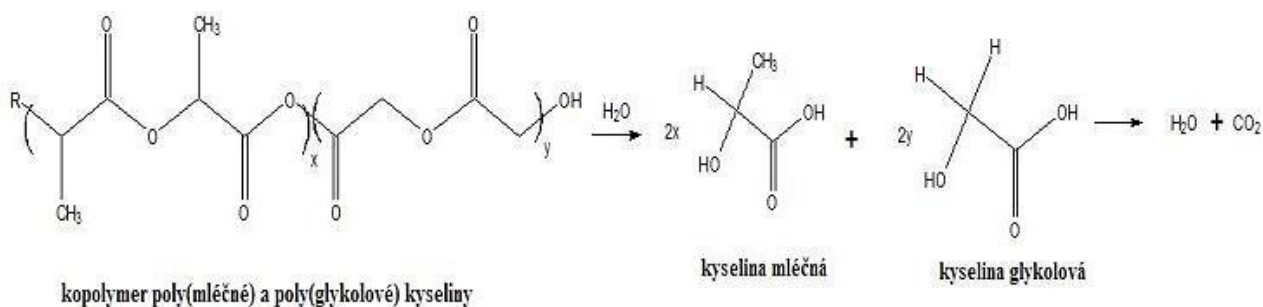
Degradace PGA je shodná i pro kopolymery, které jsou tvořeny pouze poly(mléčnou kyselinou). Skládá ze dvou fází. První fáze zahrnuje difúzi vody do amorfních částí matrice, kde probíhá jednoduché hydrolytické štěpení na esterových skupinách řetězce. Druhá fáze je započata, když už je zcela degradována amorfní část. Hydrolytické štěpení pokračuje od amorfních okrajů řetězce polymeru ke krystalickému středu [10, 23].

2.2.3 Degradace kopolymeru PLGA

Užívání PLGA kopolymerů v běžné biomedicíně vedlo k dalším studiím zaměřeným zejména na mechanické vlastnosti těchto kopolymerů, případně na objasnění způsobu degradace. Podrobení PLGA mechanickým zkouškám by mělo vést k rozšíření užívání těchto polymerů např. na výrobu lékařských implantátů pro části těla, které jsou zatěžovány tlakem, jako jsou klouby, nebo tahem to jsou svaly [26]. Zatím jsou PLGA používány v lékařství k fixaci kostí ve formě plátů nebo filmů, eventuálně jako chirurgické nitě.

Způsob degradace PLGA byl objasněn mechanismem autokatalýzy. Jedná se o hydrolytické štěpení jedné esterové vazby PLGA kopolymeru, která rozštěpením poskytne jednu karboxylovou a jednu hydroxylovou skupinu. Takto vytvořené konce karboxylových skupin jsou schopny katalyzovat hydrolýzu dalších esterových vazeb [23].

Faktorů, které ovlivňují rychlost degradace předmětů z PLGA, je velmi mnoho. Mezi nejvýznamnější patří velikost a tvar předmětu, teplota, pH, základní vlastnosti polymeru, autokatalýza a délka řetězce vytvářejícího se oligomeru [26].



Obr. 3: Schéma mechanismu degradace PLGA

Obecně platí, že míra degradace alifatických polyesterů se určí podle jejich molekulové hmotnosti a složení. Další vliv na degradaci má struktura polymeru (může být amorfní nebo krystalická). Významný vliv na degradaci ve vodném prostředí má i hydrofilnost nebo hydrofobnost dané struktury [27].

Rychlost degradace nanočásticových systémů závisí na celkové hydrofilitě polymeru. Bylo potvrzeno, že čím více je polymer hydrofilní, tím rychleji podléhá degradaci. Celková hydrofilita polymeru je také ovlivněna poměrem krystalické části k části amorfní [28]. Vliv na degradační rychlost má rovněž samotná stereochemie monomerů. Experimenty prokázaly, že PLGA kopolymer, připravený z poly(glykolové kyseliny) a poly(L-mléčné kyseliny), patří mezi krystalické kopolymery, zatímco kopolymery připravené z D,L-PLA a PGA jsou amorfní. Bylo

zjištěno, že rozdíly ve složení polymerů a jejich následný vliv na degradaci jsou vlastnosti, které mohou způsobovat samotné užité monomery. Obsahuje-li kopolymer monomery PLA je méně hydrofilní, než kopolymer složený pouze z PGA. Zpomalení procesu degradace kopolymerů obsahujících PLA způsobuje methylová skupina nacházející se na monomeru kyseliny mléčné, která brání v přístupu molekulám vody a tím i hydrolýze [29].

Z poznatků, které jsou výše uvedeny vyplývá, že složení polymerního řetězce (tzn. obsah L-LA, D-LA, anebo GA jednotek) výrazně určuje degradaci PLGA polymeru [27, 30, 31, 32]. Kopolymer, obsahující vyšší procento jednotek kyseliny glykolové v hlavním řetězci, následně generuje více kyseliny mléčné do okolního prostředí. Příčinou tohoto chování je vazba mezi jednotkami monomeru kyseliny glykolové a mléčné, která podléhá primárně hydrolýze. U testovaných polymerů (PLA/PGA: 90/10, 80/20, 70/30 a 50/50) bylo prokázáno, že nejrychlejší degradace je u polymeru PLA/PGA: 50/50 [32]. Kromě toho se amorfni kopolymer PLGA rozkládá rychleji, než jeho semikrystalická forma.

Biologický rozklad PLGA *in vivo* je rychlejší než biodegradace semikrystalického PLA. Při hydrolytickém rozkladu *in vitro* jsou produkty převážně rozpustné dioly [33].

2.3 Biokompatibilita a cytotoxicita

Hodnocení biokompatibility, např. u implantátů využívaných v lékařství, je prováděno s cílem zjistit možné negativní efekty (toxicitu), které by pravděpodobně mohly vzniknout při kontaktu tkáně a tělních tekutin s použitým materiálem implantátu. Materiál by neměl mít nepříznivé lokální nebo systematické účinky (karcinogenní, škodlivé účinky na reprodukci a vývoj), a to ať již přímo, nebo prostřednictvím uvolnění degradačních produktů z materiálu. Systematické testování zajišťuje, že přínosy plynoucí z konečného výrobku budou mít převažující kladné vlastnosti nad potenciálními riziky.

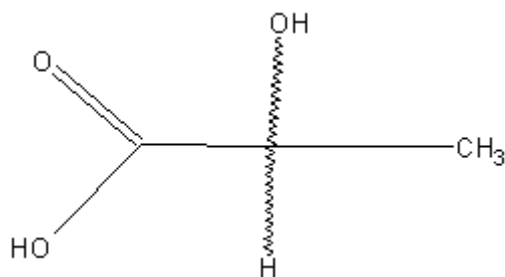
Při určování vhodných testů je nutné vzít v úvahu vlastnosti lékařské pomůcky, vlastnosti použitých materiálů, povahu stupně četnosti a trvání expozice mající vliv na orgán. Bylo zjištěno, že použitý materiál v jednom výrobku (implantátu), nemusí být vhodný pro jiné využití. Závěrečné hodnocení výrobku musí zahrnovat všechny použité materiály, avšak důležitější je komplexní hodnocení výrobku braného jako celek [34]. Mezi nejdůležitější testy, které se provádí na nových lékařských pomůckách tohoto typu, patří test na akutní, subchronickou a chronickou toxicitu, test negativního vlivu na kůži, oči a sliznice, přecitlivělost na jednotlivé složky materiálu, test na hemokompatibilitu, genotoxicitu, karcinogenitu a test vlivu na reprodukci a vývoj. V závislosti na specifickém použití dané pomůcky mohou být tyto testy zcela nezbytné nebo pouze dostačující. Mezi další testy, které se používají při hodnocení nových výrobků, je test na neurotoxicitu a imunotoxicitu [35].

K hodnocení toxicity hydrogelů se používají testy na cytotoxicitu. V těchto testech jsou intenzivně využívány různé buněčné kultury. Většina problémů spojená s toxicitou hydrogelů jsou nezreagované monomery, oligomery a iniciátory, které se uvolňují a vyluhují v průběhu používání. Proto pochopení toxicity různých monomerů, které jsou používány jako stavební kameny hydrogelů, je velice důležité [36].

2.3.1 Toxicita kyseliny mléčné

Kyselina mléčná vykazuje dráždivé účinky především na kůži a sliznice. Bylo zjištěno, že laktát vznikající během metabolismu buňky je méně toxický než samotná kyselina mléčná. Pro lidský organismus je tolerance při perorálním podání kyseliny mléčné až 1 500 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti. Letální koncentrace v krvi se pohybuje okolo 20 mM. Perorální podávání D, L-kyseliny mléčné

v oblasti smrtelné koncentrace u potkanů způsobuje úbytek tělesné hmotnosti, chudokrevnost a také snižuje koncentraci oxidu uhličitého v krvi [37].



Obr. 4: Struktura D, L-mléčné kyseliny

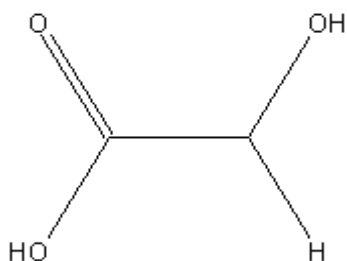
Klinický obraz intoxikace kyselinou mléčnou je kompenzován metabolickou acidózou se zvýšeným podrážděním, dušností a zrychlením srdeční frekvence [37].

Tabulka 1: Akutní toxicita D, L-mléčné kyseliny [37]

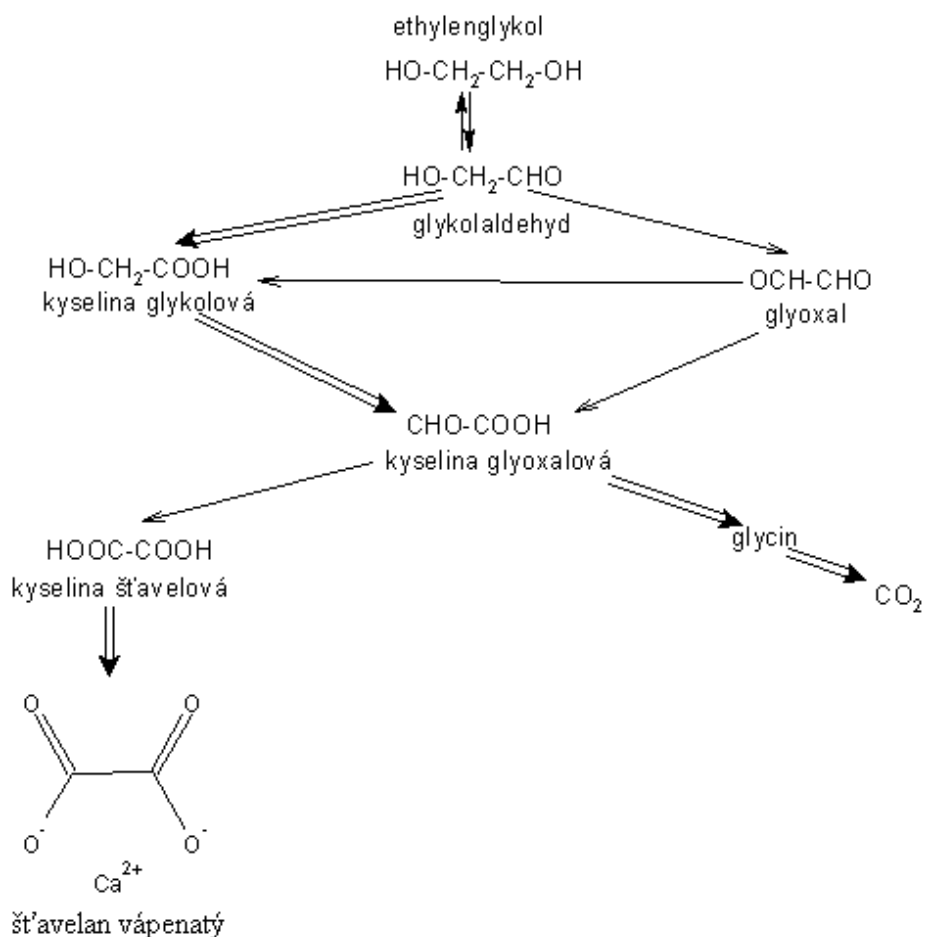
Druh	Aplikace	DL ₅₀ mg.kg ⁻¹
potkan	perorální, subkutánní	3 730
potkan	intraperitoneální	2 000
myš	perorální, subkutánní	4 875
morče	perorální	1 810

2.3.2 Toxicita kyseliny glykolové

Akutní toxicita kyseliny glykolové je nízká. Stejně jako v případě kyseliny mléčné má dráždivé účinky. Je předpokládáno, že prekursor kyseliny glykolové je ethylenglykol, který je v metabolismu přeměněn na glykolaldehyd a posléze na kyselinu glykolovou. Ta je následně přeměněna na glyoxalátovou kyselinu a poté na kyselinu šťavelovou. Během vylučování se může kyselina šťavelová slučovat s vápenatými ionty. Tyto soli se mohou ve vysokých koncentracích vysrážet do tubulů. Vzniklé tubuly vyskytující se v moči pak mohou způsobit poruchu filtrace ledvin [38]. Kyselina mléčná i glykolová ve formě šťavelanů tak vstupují do Krebsova cyklu, odkud jsou potom z těla vyloučeny močí. [10, 39].



Obr. 5: Vzorec kyseliny glykolové



Obr. 6: Schéma metabolismu ethylenglykolu [38]

Tabulka 2: Akutní toxicita kyseliny glykolové [37]

Druh	Aplikace	DL ₅₀ mg.kg ⁻¹
potkan	perorální	1 950
potkan	intravenózní	1 000
morče	perorální	1 920

2.3.3 Toxicita kopolymeru PLGA

PLGA polymery již byly v minulosti mnohokrát testovány na toxicitu a biokompatibilitu. Tyto dlouhodobé rozsáhlé studie byly prováděny *in vitro* na zvířatech i lidech. Bylo zjištěno, že biodegradace PLGA kopolymerů je velmi pomalá, a proto produkty rozkladu nemají vliv na normální buněčné funkce. Byly testovány vstřebatelné chirurgické nitě, kostní implantáty, šrouby využívající se v ortopedii a antikoncepční implantáty. Dále byly testovány tyto kopolymery sloužící jako nosiče buněk v tkáňovém inženýrství [29].

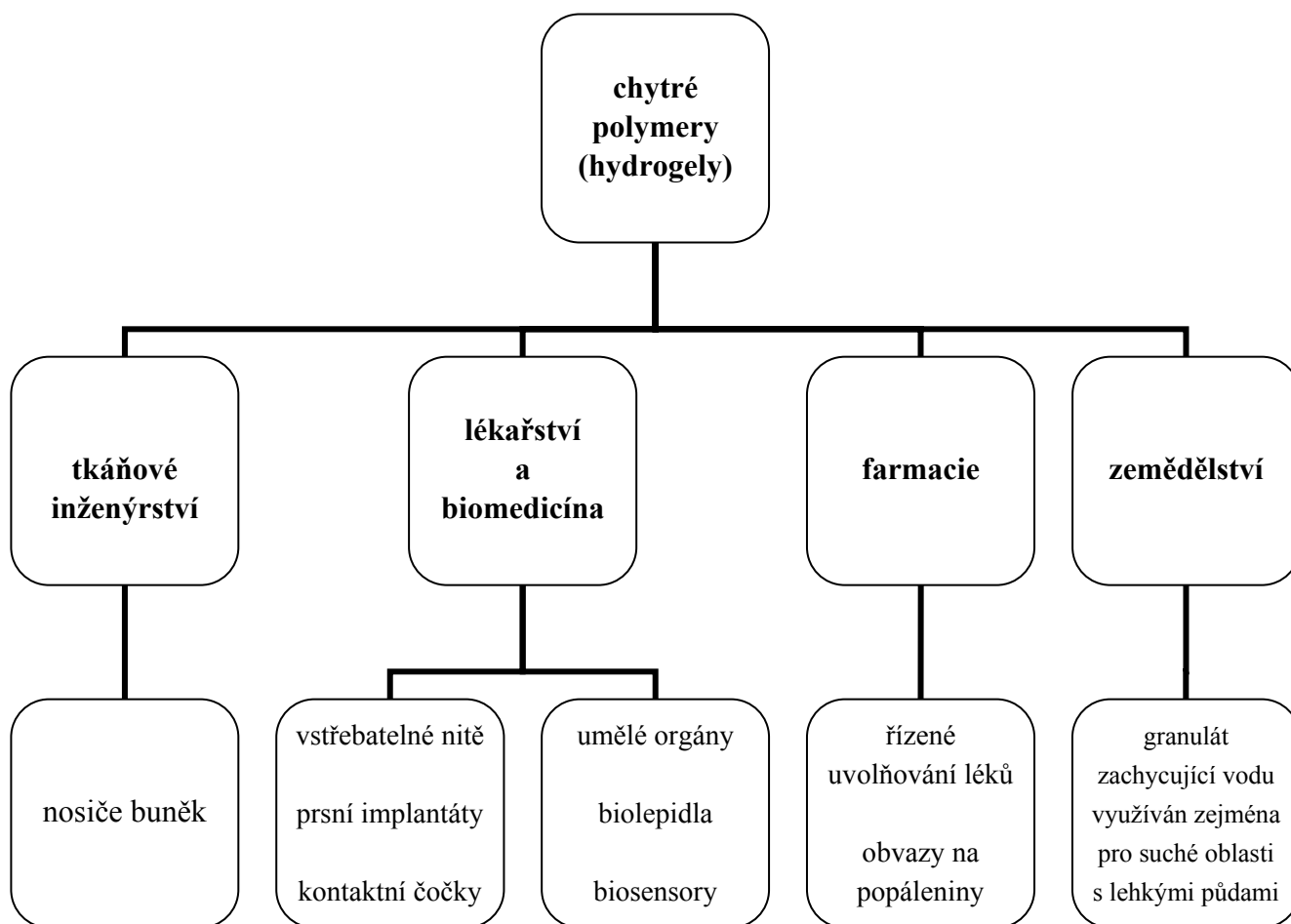
Obecně lze říci, že PLA-PGA biomateriály prokázaly uspokojivou biokompatibilitu a absenci výrazné toxicity, i když bylo někdy zaznamenáno snížení buněčné proliferace. Následujícími

klinickými aplikacemi pomůcek z PLGA pak bylo prokázáno, že mají pouze specifické uplatnění, v jiných případech pak mohou vyvolávat opakující se záněty [34].

2.4 Polymery, gely, hydrogely

Gel je definován jako trojrozměrná síť obtékaná rozpouštědlem. Obvykle je rozpouštědlo hlavní složkou gelového systému. Pokud je rozpouštědlem voda, v níž se struktura gelu nachází, pak se gel nazývá hydrogel. Hydrogely mohou být rozdělovány z několika hledisek. Nejčastěji se však rozdělují na gely chemické a fyzikální. U chemických gelů dochází k zesíťování pomocí kovalentních vazeb na rozdíl od fyzikálních gelů, které jsou tvořeny pomocí druhotných sil. [40].

2.4.1 Aplikace hydrogelů



Obr. 7: Oblasti využití hydrogelů

2.5 Hydrogely reagující na změnu vnějšího prostředí

Tzv. „chytré“ polymery reagují i na malou změnu vnějších podmínek prostředí změnou svých fyzikálně-chemických vlastností a změnou svého chování, jako je např. změna struktury nebo mechanická pevnost. Tyto „chytré“ polymery můžeme dále rozdělit podle jednoho a nebo více podnětů, na které jsou schopny reagovat. Jako vnější podněty jsou nejčastěji využívány teplota, pH, iontová síla, světlo, elektrické a magnetické pole [5]. Stále častěji jsou syntetizovány polymery, které reagují na dva odlišné podněty zároveň, jako je např. kombinace změny teploty a pH [36].

Tyto polymery by mohly mít velké uplatnění v medicíně, kde by sloužily pro řízené uvolňování léků. Specifitu těchto „chytrých“ hydrogelů lze přesně navrhnout tak, aby byly schopny reagovat pouze na jeden typ molekuly, jako je glukóza nebo molekula antigenu. S touto nastavitelnou citlivostí se otevírají další možnosti využití hydrogelů, například pro oblast genové terapie nebo výroby biosenzorů.

Častým nedostatkem hydrogelů citlivých na vnější prostředí stále zůstává dlouhá doba odezvy na signál. Proto se i nadále vyvíjí nové materiály, které budou i z tohoto hlediska splňovat náročné požadavky živých systémů.

Využití hydrogelů jako vstříkovatelných matric (plnidel) patří mezi jejich nejnovější aplikace. Injekční podávání roztoku polymeru tvořící gel při fyziologické teplotě nabízí řadu výhod. Tekutým roztokem polymeru lze vyplnit jakýkoliv tvar fraktury, což je velice výhodné při léčbě tříštivých zlomenin kostí. Hydrogely mohou obsahovat také různé terapeutické látky (např. antibiotikum, růstový hormon). Dalším pozitivem pro tyto hydrogely je to, že neobsahují zbytky rozpouštědel, které mohou být jinak přítomny v konstrukci jiných terapeutických pomůcek. Také pro psychiku pacientů je jejich použití výhodou, protože ti již nemusí podstupovat další chirurgický zákrok pro vyjmutí této terapeutické pomůcky, neboť tyto hydrogely se samy vstřebají. Mechanismy, které mohou být zapojeny do utváření *in situ* gelu jsou následující: gelace v závislosti na změně teploty nebo pH, stupeň ionizace, změna v procesech rozpouštění a krystalizace [40].

2.5.1 Hydrogely citlivé na pH

Polymery citlivé na změnu pH obsahují ve své struktuře ionizovatelné funkční skupiny. Mohou obsahovat kyselé karboxylové skupiny nebo bazické amino skupiny. Během vytváření postupného náboje podél řetězce polymeru způsobuje elektrostatické odpuzování těchto skupin zvýšení hydrodynamického objemu hydrogelu. Mezi zástupce hydrogelů citlivých na pH patří kyselina polyakrylová, kyselina polymethakrylová (PMAA) a poly(*N,N*-dimethylaminoethylmethakrylamid).

Největší potenciál využití mají hydrogely citlivé na pH jako nosiče léčiv, které dané léčivo uvolní až při specifickém pH, například v žaludku nebo naopak až ve střevech. Nedávno byly tyto polymery použity ve výzkumu genové terapie. Problém v této oblasti vždy činil transport samotné molekuly DNA do buňky. DNA se vyznačuje záporným nábojem a je značně velká, což neumožňuje transport molekuly do buňky za fyziologických podmínek. Obalení DNA hydrogelem, který má kladný náboj, dojde k vyrovnání nábojů a ke kondenzaci DNA. Takto upravená DNA má podobu nanočástice o velikosti 100 nm a je tak snadněji vpravena do buňky [5, 41].

Další aplikace hydrogelů citlivých na pH by mohly být biosensory. Bohužel je však již známo, že syntetické polymery citlivé na pH nejsou biodegradabilní, a proto nemohou být použity přímo v lidském těle; z tohoto důvodu se výzkum nyní zaměřuje na pH citlivé polymery, které jsou založené na bázi polysacharidů, polypeptidů a proteinů [5, 41].

2.5.2 Hydrogely citlivé na elektrické pole

Hydrogely citlivé na elektrický proud podstupují smršťování, botnání a ohýbání při aplikaci elektrického pole. Tyto hydrogely jsou vyrobeny z polyelektrolytů, podobně jako hydrogely citlivé na pH. Význam těchto hydrogelů spočívá v tom, že účinně dovedou převádět chemickou energii na energii mechanickou, jako to dovedou živé organismy. Proto hydrogely citlivé na elektrické pole mohou sloužit jako matrice pro růst umělých svalových tkání. Další uplatnění tohoto typu hydrogelu je při řízeném podávání léků. Výhoda takového systému je snadno ovladatelná rychlost uvolňování léčiva pomocí modulace elektrického signálu. Navíc hydrogely citlivé na elektrické pole fungují i v nepřítomnosti elektrolytů, což však může způsobovat problémy při aplikaci za běžných

fyziologických podmínek. Významnou výhodou hydrogelů citlivých na elektrické pole, v porovnání s jinými typy je to, že dovedou rychle reagovat na vnější signál enviromentálních podmínek [41].

2.5.3 Hydrogely citlivé na světlo

Hydrogely citlivé na světlo mohou být použity pro vývoj optických spínačů tzv. switchů, zobrazovacích jednotek u monitorů a jako systém řízeného uvolňování léčiv, zejména pro orgán oko. Byly vytvořeny hydrogely citlivé pouze na ultrafialové záření a rovněž hydrogely citlivé na oblast viditelného světla. Hydrogely citlivé na VIS oblast jsou mnohem bezpečnější a snadno ovladatelné pro možnou lékařskou aplikaci. Hlavní nevýhodou hydrogelů citlivých na světlo je pomalá reakce na stimul. Ve většině případů dochází k přeměně světla na tepelnou energii, kterou musí předcházet restrukturalizace polymerního řetězce. Kromě toho, pokud jsou chromofory, které hydrogely citlivé na světlo obsahují vázány kovalentně na hlavní kostru polymeru, mohou se během cyklu smršťování a botnání uvolňovat ze struktury. Během několika cyklů by se potom takový polymer mohl stát inaktivním [41].

2.5.4 Specificky citlivé hydrogely

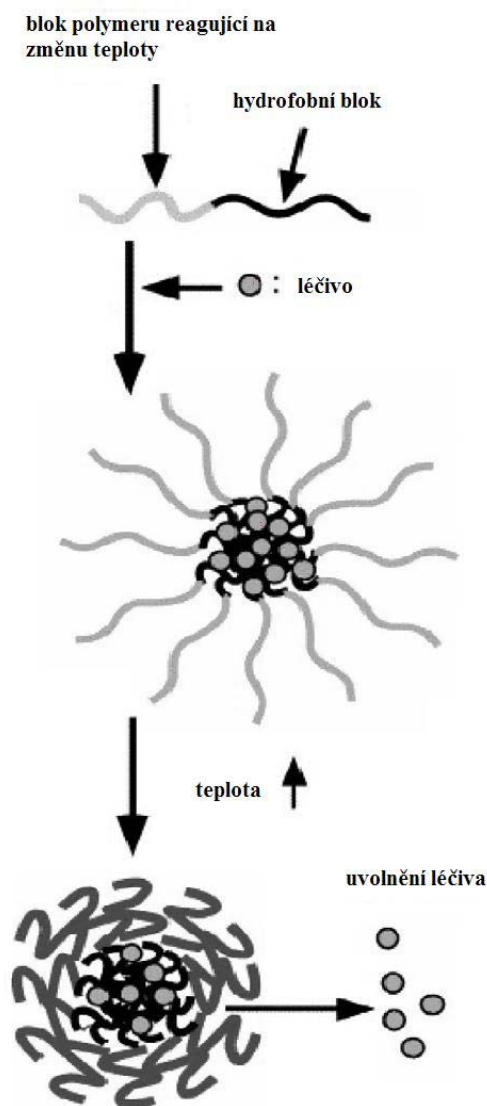
Mezi další specificky citlivé hydrogely jsou zařazovány hydrogely citlivé na tlak, hydrogely citlivé na ionty a hydrogely citlivé na molekuly, jako jsou antigeny [41].

2.5.5 Hydrogely citlivé na teplo

Teplotu lze pokládat za nejrozšířenější používaný enviromentální stimul pro tzv. „chytré“ polymery. Změna teploty je relativně snadno kontrolovatelná, ale rovněž snadno použitelná pro testy jak *in vitro*, tak *in vivo* [18, 41].

Společnou charakteristickou vlastností polymerů citlivých na teplo je přítomnost hydrofobní skupiny ve struktuře řetězce polymeru, jako je methyl-, ethyl- nebo propyl- skupina. Ve většině případů těchto polymerů se rozpustnost ve vodě zvyšuje se zvyšující se teplotou. Výjimku tvoří tzv. polymery s nízkou kritickou teplotou roztoku, jejichž rozpustnost ve vodě se snižuje se zvyšující se teplotou. Toto chování hydrogelů je popisováno v literatuře jako chování inverzní. Hydrogely s inverzním chováním mají hlavní řetězec polymeru vytvořený z mírně hydrofobních skupin, nebo obsahují směs hydrofilních a hydrofobních segmentů. Při nízké teplotě jsou vodíkové vazby mezi hydrofilními částmi řetězce a molekulami vody dominantní a vedou tak ke zlepšení rozpustnosti ve vodném prostředí. Během zahřívání vodného prostředí dochází k oslabení vodíkových vazeb a naopak k posílení vazeb mezi hydrofobními segmenty. Na základě tohoto chování hydrogelů citlivých na teplo potom dělíme hydrogely na tzv. negativně citlivé na teplo, pozitivně citlivé na teplo a na termoreverzibilní gely [41].

U těchto polymerů bylo pozorováno jejich chování ve vodném prostředí. Negativně citlivé hydrogely na teplo se smršťovaly se zvyšující se teplotou. Naopak pozitivně citlivé hydrogely, též označované jako hydrogely s horní kritickou teplotou roztoku, botnaly [42]. Toto chování hydrogelů je reverzibilní a odpovídá postupným změnám teploty okolního prostředí [41]. Díky takovým schopnostem hydrogelů botnat nebo se smršťovat v důsledku změny okolní teploty tekutiny získaly značnou pozornost ve farmaceutické oblasti. V rámci četných výzkumů byly studovány různé aplikace těchto hydrogelů, jako je regulace uvolňování látek a vývoj biosensorů [1, 43].



Obr. 8: Uvolňování léčiva z micely hydrogelu citlivého na změnu teploty [42].

2.5.5.1 Komerčně využívané hydrogely citlivé na teplo

Mezi komerčně využívané hydrogely citlivé na teplo se dnes řadí kopolymery s komerčním názvem Pluronic[®], Polaxamers[®] nebo Tetronics[®]. Jedná se o triblokové kopolymery následujícího složení: poly(ethylenoxid)-*b*-poly(propylenoxid)-*b*-poly(ethylenoxidu) zkráceně známé jako (PEO-PPO-PEO). V dnešní době je to zatím nejvýznamnější skupina syntetických polymerů s termoreverzibilním chováním ve vodném roztoku. Díky snadno modulovatelnému složení, molekulové hmotnosti a koncentraci, nastává reverzibilní gelace při fyziologické teplotě a pH. Tyto polymery se vyznačují amfifilní strukturou, a to díky hydrofilnímu polyethylenoxidu a hydrofobnímu polypropylenoxidu. Amfifilní bloky kopolymeru se mohou samy shlukovat a vytvářet micely ve vodném prostředí [41].

Dnes se tyto kopolymery využívají pro výrobu speciálních obvazů na popáleniny a testují se v aplikacích, jakými jsou řízené uvolňování léčiv a genová terapie [42]. Potenciální nevýhodou poloxamer gelů v dalším využívání je jejich slabá mechanická pevnost, rychlé narušení struktury a jejich biologická nerozložitelnost [18].

2.5.5.2 Triblokový kopolymer PEG-PLGA-PEG

Kopolymerizace hydrofilního, biokompatibilního polyethylenglykolu s biodegradabilními a zároveň biokompatibilními polyestery poskytuje velmi zajímavé systémy hydrogelů citlivých na teplo.

V roce 1997 byla poprvé zveřejněna syntéza nového injekčně aplikovatelného typu kopolymeru PEG-PLGA-PEG [42]. Tento kopolymer je biokompatibilní a podléhá biodegradaci. Za běžné laboratorní teploty zůstává vodný roztok kopolymeru tekutý. Díky kombinaci vysokomolekulární PLGA s nízkomolekulárním PEG byl výsledkem hydrogel s rychlou reverzibilní gelací při fyziologické teplotě. Průběh změny stavu je zaznamenán ve fázovém grafu, kde v závislosti na koncentraci polymeru a na dané teplotě jsou sledovány fázové přechody. Z grafu jsou určeny dvě důležité charakteristiky pro daný kopolymer, kterými jsou kritická gelační teplota (CGT) a kritická gelační koncentrace (CGC). Jedná se o společný bod těchto charakteristik, který označuje nejnižší teplotu a koncentraci, při které se z roztoku začne tvořit gel. Další výzkumy se zabývaly ovlivněním CGT a CGC v závislosti na velikosti molekulové hmotnosti hydrofobní části PLGA. Bylo prokázáno, že zvyšující se molekulová hmotnost PLGA (2 320 – 2 840) způsobila posun CGC na nižší hodnotu, přičemž CGT se nezměnila. Obecným poznatkem získaným na základě tohoto výzkumu je to, že se zvyšující se hydrofobností polymeru klesá kritická gelační koncentrace [2, 42, 44, 45].

Vzhledem k tomu, že předchozí studie již ukázaly, že triblokový kopolymer PEG-PLGA-PEG byl vhodný pro použití jako injekční systém, byla dále zkoumána formace gelu *in situ* u potkanů. Gel vykazoval dobrou mechanickou pevnost a integrita gelu trvala déle než 1 měsíc. Tato studie rozkladu gelu *in situ* ukázala, že přednostně docházelo ke snížení molekulové hmotnosti úseku bohatého na PEG [46].

2.5.6 Triblokový kopolymer PLGA-PEG-PLGA

Zenter a kol. [47] jako první syntetizovali hydrogel z triblokového kopolymeru PLGA-PEG-PLGA. Tento typ kopolymeru byl registrován pod značkou ReGel[®] a byl vyvinut jako biologicky odbouratelný systém pro řízené uvolňování léků. Stejně jako u PEG-PLGA-PEG je za běžné pokojové teploty roztok polymeru kapalinou. Pouze při vpravení do prostředí s fyziologickou teplotou se z něho postupně stává gel. Postupná degradace gelu umožnila řízené uvolňování léčiva v rozmezí 1 až 6 týdnů. Těmito vlastnosti je ReGel[®] vhodný pro lokální aplikaci nebo systematické podávání léků. Systém založený na PLGA-PEG-PLGA kopolymeru byl využit např. pro systematické uvolňování hormonu testosteronu. Testosteron je hormon ve vodě nerozpustný. Převážně je aplikován ve formě náplastí, krémů, gelů a injekčních implantátů. Pomalé uvolňování testosteronu *in vitro* bylo pozorováno u kopolymerů s dlouhým PLGA blokem. Stejněměrné uvolňování hormonu po dobu tří měsíců mělo za následek pravděpodobnou pomalou degradaci hydrofobních jednotek [42].

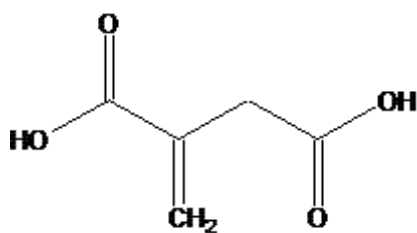
Kritický jev, který ovlivňuje reverzibilní fázový přechod ve vodném prostředí, je rovnováha mezi hydrofobní a hydrofilní délkou bloku [20]. Triblokový kopolymer se zakládá na centrálním PEG bloku ($M_n = 1\,000$) s dvěma PLGA koncovými bloky o molekulové hmotnosti nad 1 600. Tyto kopolymery jsou nerozpustné ve vodě. Naopak triblokový kopolymer s bloky PLGA a molekulovou hmotností pod 900 je rozpustný ve vodě. Proto pouze triblokové polymery bloku PLGA s molekulovou hmotností v rozmezí od 900 do 1 600 vykazují termoreverzibilní přechod solu na gel. Dále je třeba poznamenat, že CGC pro ABA (PLGA-PEG-PLGA) typ triblokového kopolymeru je nižší než u BAB (PEG-PLGA-PEG) typu [48].

2.5.7 Kopolymery s poly(itakonovou kyselinou)

Kyselina itakonová (ITA) je nenasycená dikarboxylová organická kyselina. Nejvíce se jí ročně vyrobí pomocí fermentace sacharidů, na které se podílejí plísně. Je vyráběna z obnovitelných zdrojů, jako je melasa a hydrolyzovaný škrob. ITA se běžně používá při výrobě syntetických pryskyřic a vláken. Zlepšuje jejich mechanické vlastnosti, kterými je pružnost a tažnost. Modifikovaná poly(itakonová kyselina) se uplatňuje ve výrobě detergentů, šampónů i herbicidů [49].

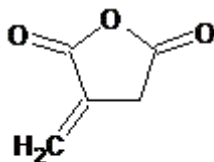
Dvojná vazba ve struktuře kyseliny itakonové umožňuje snadnou kopolymerizaci. Ionizovaná ITA se skládá ze dvou karboxylových skupin s odlišnými pKa hodnotami, které mohou tvořit vodíkové vazby. Zavedením kyseliny itakonové do struktury polymeru získáme řetězec upravený na koncích karboxylovými skupinami, které zvyšují hydrofilitu polymeru a jsou schopny vytvářet vodíkové vazby s odpovídajícími skupinami. Modifikace hydrogelu malým množstvím kyseliny itakonové zvyšuje stupeň botnění a citlivost na pH [50]. Cíleným zaváděním ITA jako monomeru do struktury polymeru přispíváme ke vzniku vodíkových vazeb, a tak můžeme zvyšovat mechanickou pevnost hydrogelu. Další pozitivní vlastností kyseliny itakonové je její biokompatibilita, která pramení z jejího procesu výroby a použitých surovin [51].

V posledních letech byla poly(itakonová kyselina) použita pro syntézu řady kopolymerních hydrogelů, jako je poly(N-isopropylakrylamiditakonová kyselina) (PNIPAM/ITA) [52], poly(N-vinyl-2-pyrrolidonitakonová kyselina) (PNVP/ITA) [50] a poly(2-hydroxyethylmethakrylitakonová kyselina) (PHEMA/ITA). Byly studovány jejich vlastnosti, botnění a reakce na teplotu [53].



Itakonová kyselina (ITA)

Obr. 9: Vzorec kyseliny itakonové



anhydrid kyseliny itakonové

Obr. 10: Vzorec anhydridu kyseliny itakonové

2.5.8 Vliv složení kopolymeru na sol - gel fázový přechod

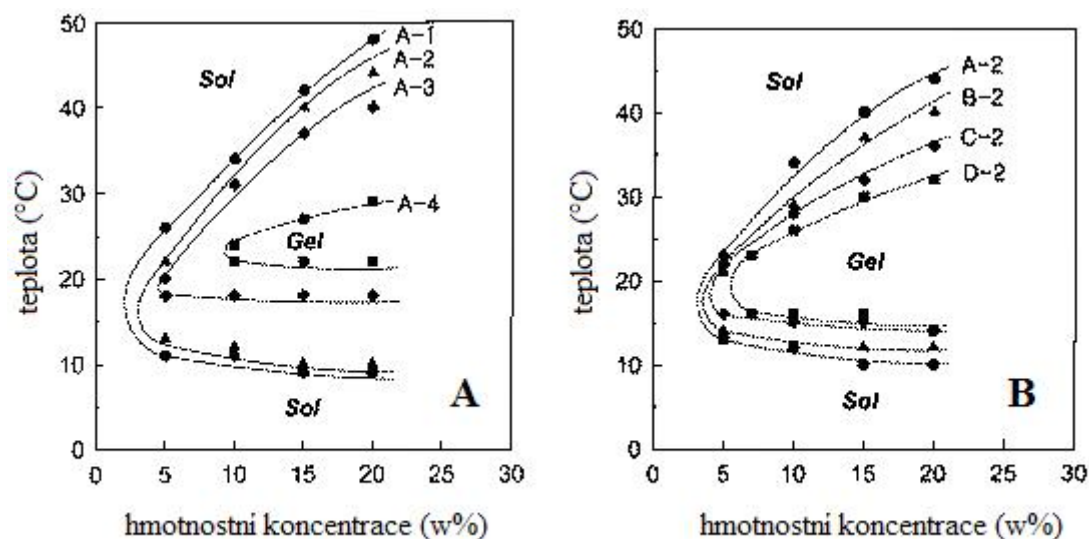
Triblokový kopolymer PLGA-PEG-PLGA vykazuje dvě fáze přechodu, a to solu na gel a gelu na sol [2]. Přechod solu na gel je charakterizován tzv. dolní teplotou přechodu a zpětný přechod z gelu na sol je charakterizován horní teplotou přechodu [45, 54]. Fázové diagramy zaznamenávají tyto přechody, které jsou závislé na teplotě a koncentraci polymeru. Z vytvořeného fázového diagramu pak lze určit kritickou gelační koncentraci (CGC) a kritickou gelační teplotu (CGT).

Složení triblokového kopolymeru, molární hmotnost základních bloků kopolymeru a celková struktura polymeru výrazně ovlivňuje gelační chování, což se projeví na tvaru a umístění křivky ve fázovém diagramu. Z fázového diagramu lze následně odečíst posun v hodnotách kritické gelační koncentrace a kritické gelační teploty [2, 20, 44, 45, 46, 55, 56, 57].

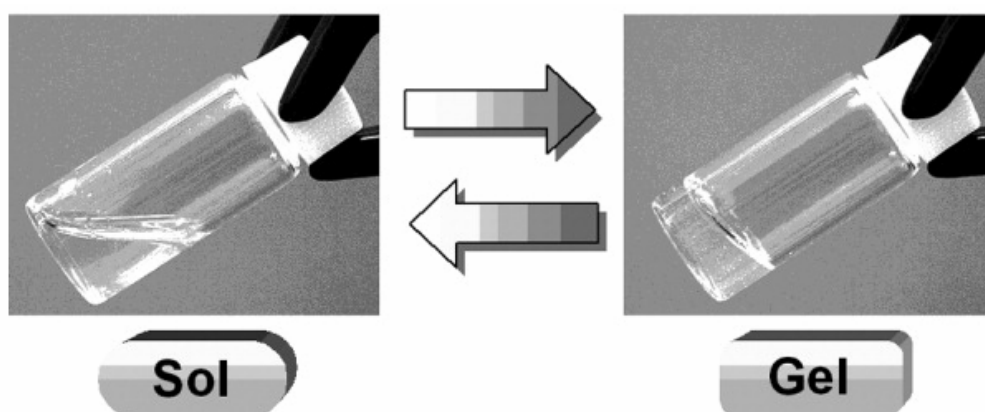
Pro reverzibilní fázový přechod ve vodném prostředí, tj. se solu na gel a z gelu na sol má zásadní význam rovnováha hydrofobní a hydrofilní délky bloku. Prostřednictvím mnoha experimentů bylo prokázáno, že termoreverzibilní přechod ze solu na gel vykazuje pouze triblokový kopolymer z PLGA bloky s molekulovou hmotností v rozmezí od 900 do 1 600. Hodnoty CGT a CGC jsou se snižujícím se poměrem PEG/PLGA vyšší, avšak oblast tvorby transparentního gelu je výrazně užší (tabulka 3, obr. 11 A). Při snížení poměru PLA/PGA nedochází k výraznému posunu CGT ani CGC, ale pouze k mírnému zúžení oblasti tvorby gelu (obr. 11 B) [20].

Tabulka 3: Charakteristika sledovaných kopolymerů (PLGA-PEG-PLGA) různého složení ve vodném prostředí (N - nerozpustný ve vodě, R - rozpustný ve vodě) [20]

D,L-LA/GA (mol/mol) PEG/PLGA (hmotnost/hmotnost)	3,4	3,0	2,5	2,0	1,5	1,3
1/3,2 (1 600 – 1 000 – 1 600)	N	N	N	N	N	N
1/3,0 (1 500 – 1 000 – 1 500)	N	A - 1	B - 1	C - 1	D - 1	—
1/2,7 (1 350 – 1 000 – 1 350)	—	A - 2	B - 2	C - 2	D - 2	—
1/2,5 (1 200 – 1 000 – 1 200)	—	A - 3	B - 3	C - 3	D - 3	—
1/2,0 (1 000 – 1 000 – 1 000)	—	A - 4	B - 4	C - 4	D - 4	R
1/1,8 (900 – 1 000 – 1 000)	R	R	R	R	R	R



Obr. 11: Fázový diagram triblokového kopolymeru PLGA-PEG-PLGA: (A) porovnání různých poměrů PEG/PLGA; (B) porovnání různých poměrů LA/GA [20].



Obr. 12: Ukázka termoreverzibilního přechodu solu na gel [85]

2.6 Voda v hydrogelech a její odstranění

Hydrogely jsou široce aplikovány v různých fyzikálních formách, např. v pevné lisované formě v podobě kontaktních čoček, nebo stlačených práškových matic ve formě kapslí a pilulek pro orální podávání, případně v podobě mikročastic pro léčbu popálenin. Vyrábí se také ve formě vláknitých povlaků na výrobu implantátů, nebo v podobě membrán s využitím jako transdermální náplasti s cíleným uvolňováním léčiv. Vzhledem k tomuto širokému využití bylo nutno charakterizovat vodu v hydrogelech, která může určovat celkovou permeaci účinných látek z gelu a naopak vstup látek z prostředí dovnitř hydrogelu.

První voda, kterou vysušený hydrogel začne absorbovat, se nazývá primárně vázaná voda. Molekuly primárně vázané vody vstupující do matrice vysušeného hydrogelu nejdříve hydratují nejvíce polární hydrofilní skupiny. Jakmile jsou polární skupiny plně hydratované, začne síť polymeru botnat a odhalovat tak hydrofobní skupiny. Tyto skupiny jsou nuceny interagovat s dalšími molekulami vody a dochází k jejich hydrataci. Tato voda vázaná na hydrofobních skupinách se nazývá sekundárně vázaná voda. Primárně a sekundárně vázané vodě se říká celkově

vázaná voda. Po těchto prvních dvou krocích začne síť polymeru vstřebávat další vodu. Toto dodatečné vstřebávání vody řetězce polymeru je řízeno osmotickými silami a vede k nekonečnému zředění. Díky dodatečnému bobtnání se nasatí vodou iontové, polární a hydrofobní skupiny; tato voda se nazývá volná nebo objemová voda. U této volně vázané vody se předpokládá, že vyplňuje místa mezi sítě řetězců polymeru nebo prázdné póry hydrogelu. Jakmile je hydrogel plně nabobtnán, dochází k jeho rozpadu a rozpouštění. Rychlost rozpouštění závisí na chemickém složení hydrogelu [43].

Pro odstranění vody z hydrogelů se ve farmaceutickém průmyslu nejvíce využívá sublimačního sušení, nazývaného také lyofilizace.

Sublimace, resp. desublimace patří mezi difúzní operace, které probíhají v oblasti relativně nízkých teplot a tlaků. Jejich průběh je ovlivňován přenosem hmoty a tepla na fázovém rozhraní tuhá fáze-plyn a v případě lyofilizace sdílením hmoty a tepla v porézní, dynamicky se měnící struktuře tuhé fáze. Lyofilizace v podstatě představuje proces odvodňování preparátu v zamrznutém stavu, kdy led, nacházející se uvnitř kapilár a pórů, sublimuje do parní fáze při teplotě a tlaku nižším, než jsou podmínky odpovídající trojnému bodu vody [58].

Vlhkost, zadržovaná sušeným materiálem, může mít následující formy:

- Chemicky vázaná voda (včetně krystalové vody),
- Adsorbovaná voda na povrchu porézního materiálu,
- Voda vázaná kapilárními silami v pórech materiálu,
- Osmoticky vázaná voda (voda v roztoku spolu s dalšími složkami).

Hlavní přednost lyofilizace spočívá v následujících směrech:

- Za podmínek nízkých teplot a tlaků jsou potlačeny chemické změny složek sušeného materiálu včetně jeho oxidace vzduchem;
- Při procesu jsou výrazně sníženy ztráty těkavých složek sušeného materiálu;
- Při sušení lze zachovat sterilitu produktu;
- Vysušený materiál je disperzní, nedochází ke koagulaci jeho složek a je vyloučena aglomerace jednotlivých částic materiálu.

První operací při sublimačním sušení je zmrazení výchozího materiálu. V závislosti na klesající teplotě dochází k jevům uvedeným v tabulce 4.

Tabulka 4: Etapy přecházející sublimačnímu sušení materiálu [58].

teplota [°C]	jev
-1 → -1,5	ochlazování materiálu
-1 → -3	zmrznutí strukturně volné vody
-2 → -20	zamrzání imobilizované nebo volné vlhkosti
-20	eutektické hranice pro roztoky soli v buňkách resp. tkáních
-20 → -65	vymrzání vázané vlhkosti
-65 a níže	sublimační sušení

2.7 Metody charakterizace rozkladu polymerních produktů

Pro sledování průběhu degradace polymeru na bázi PEG a PLGA se používá několik analytických metod. Je to především kapalinová chromatografie a elektroforéza. Kapalinová chromatografie ve spojení se selektivním detektorem je využívána jak pro kvalitativní tak také pro kvantitativní analýzu degradačních produktů polymeru.

2.7.1 Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při které dochází k dělení směsi látek na základě jejich rozdílných vlastností. Vzorek je vnesen mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, stacionární a mobilní. Pohybem mobilní fáze je vzorek touto soustavou unášen. Principem dělení složek směsi je opakované vytváření rovnovážných stavů mezi stacionární a mobilní fází. Tyto stavy se vytvářejí na základě fyzikálně-chemických interakcí mezi dělenou složkou a stacionární fází, případně složkou a mobilní fází. Složky vzorku se tak na základě těchto specifických interakcí separují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji [59].

2.7.1.1 Separace pomocí HPLC

Kapalinová chromatografie se využívá k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo špatně těkavé a termicky labilní. Kapalná mobilní fáze zde hraje důležitou roli, je hlavním faktorem ovlivňujícím retenci jednotlivých složek směsi, a tím také jejich vzájemné rozdělení. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která využívá kolony s vhodnou stacionární fází. Vlastnosti těchto fází umožňují dosáhnout rychlé separace složitých směsí s vysokým rozlišením zón. Kolony se stacionární fází obsahují velmi malé částice (3 – 10 μm), které tvoří homogenní náplň, a to díky úzké distribuci jejich velikosti. Účinnost takových kolon se pohybuje v rozsahu 30 – 90 000 teoretických pater na metr [59]. Proto je pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze zapotřebí protlačit ji kolonou pomocí vysokotlakého čerpadla [60].

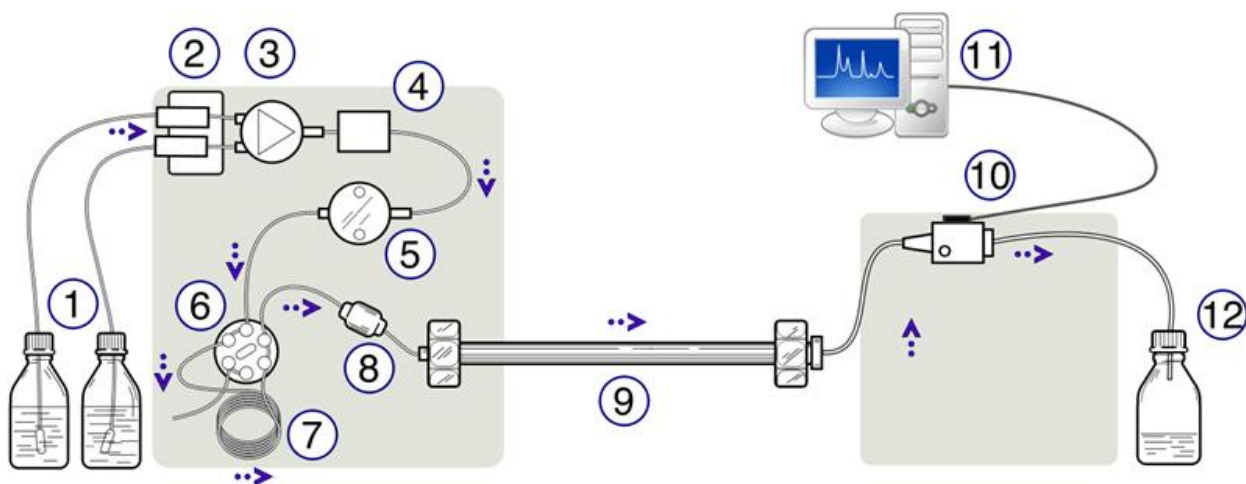
Při stanovení degradačních produktů PLGA-PEG-PLGA se využívá chromatografie na obrácených fázích. Stacionární fáze je nepolární (uhlovodíky nebo alkyly vázané na silikagelu) a mobilní fáze je polární (voda, acetonitril) [60]. Jedná se o rozdělovací kapalinovou chromatografii, při které se analyty rozdělují mezi dvě nemísitelné kapalné fáze, a to mobilní, která unáší analyty a stacionární fází, která je pevně zakotvena na pevném nosiči [59]. Růst polarit mobilní fáze vede k růstu retenčních časů analytů. Retence složek roste s jejich klesající polaritou a se zvětšující se nepolární částí molekul [60]. Separace na obrácených fázích je univerzální technikou pro separaci polárních, nepolárních i disociovaných analytů [61].

Kapalinový chromatograf je obecně tvořen zásobníky mobilní fáze, směšovacím zařízením, čerpadlem, dávkovacím zařízením, termostatem, kolonou a detektorem [62].

Pokud se během separace pomocí HPLC mění složení mobilní fáze, jedná se o tzv. gradientovou eluci, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem. Při izokratické eluci se složení mobilní fáze nemění [59, 60].

K dávkování vzorku se dnes ve většině případů používá automatický dávkovač. Podle zvoleného systému je možné nadávkovat velké rozmezí objemu vzorku (od jednotek μl po stovky μl).

Jako separační kolony se používají náplňové kolony lišící se délkou, vnitřním průměrem a náplní. Kolony jsou většinou nerezové. Jako ochrana hlavní kolony se hojně využívají předkolony, které zabraňují kontaminaci pocházející z různých nečistot [59, 60].

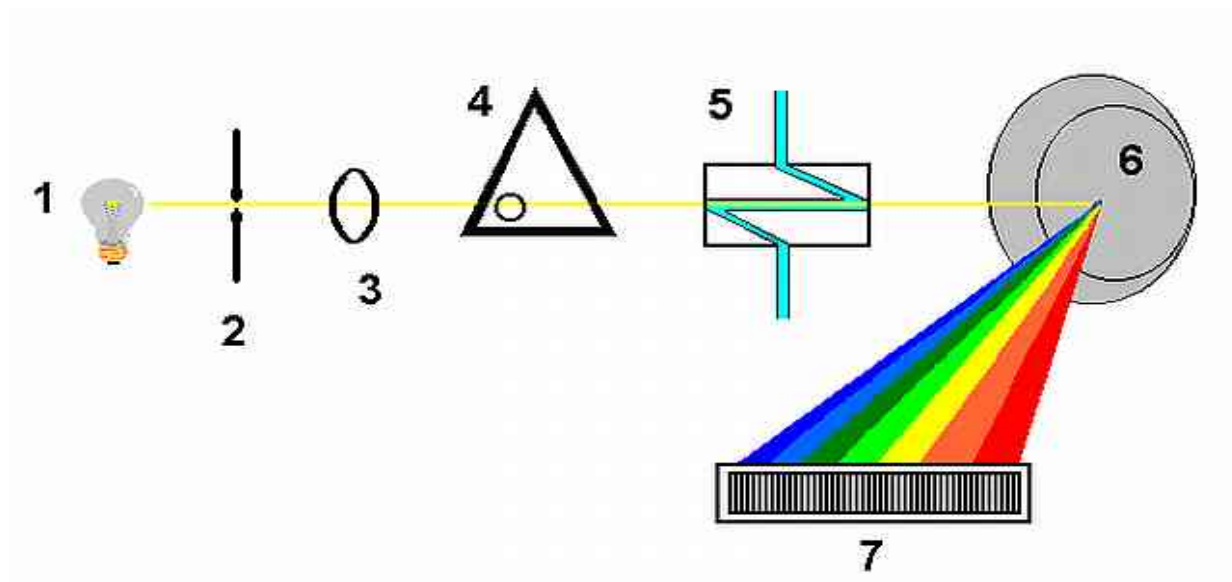


Obr. 13: Schéma kapalinového chromatografu: (1) zásobníky mobilní fáze, (2) odplyňovač mobilní fáze, (3) ventil pro řízení složení mobilní fáze, (4) směšovací zařízení, (5) vysokotlaká pumpa, (6) kohout, (7) dávkovací smyčka, (8) předkolona nebo ochranná kolona, (9) kolona, (10) detektor, (11) vyhodnocovací zařízení, (12) sběrná odpadní láhev [62].

2.7.1.2 Detektory pro HPLC

Detektory využívané pro HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. K dalším požadovaným vlastnostem patří rychlá a lineární odezva, vysoká citlivost, nízký šum a minimální vliv změny tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty. Nejčastěji používaným detektorem v HPLC je spektrofotometrický detektor s diodovým polem (*Diode Array Detector* – DAD), detektor fluorescenční (FLD) a hmotnostní (*Mass Spectrometry* – MS) [59].

Spektrofotometrický detektor patří dnes k nejběžnějším detektorům. Měří absorbance eluátu vycházejícího z kolony. Pro optimální citlivost detektoru by měla být zajištěna dostatečná absorpční dráha průtočné kyvety, kterou prochází paprsek. Lineární diodové pole je multikanálový detektor, jehož elementy měří najednou paprsek rozložený disperzním prvkem. Obsahuje mnoho malých fotodiod na jediném křemíkovém čipu. Nejběžněji užívaný počet je 1 024 fotodiod. Nejdokonalejší fotometrické detektory jsou schopny pomocí diodového pole proměřit absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek a uložit ho do paměti. Jeho detekční limit je až $10^{-10} \text{ g.ml}^{-1}$, citlivost a selektivita je pro různé látky různá a při zvolené vlnové délce závisí na velikosti molárního absorpčního koeficientu [59, 63]. DAD detektor je tvořen zdrojem záření, zdrojovou čočkou, průtočnou kyvetou, mřížkou a fotodiodovým polem [64].



Obr. 14: Schéma spektrofotometrického detektoru [64].

2.7.2 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií představuje velmi účinnou analytickou techniku, která pravděpodobně nejlépe uspokojuje požadavky kladené na identifikaci a stanovení složitých látek [61].

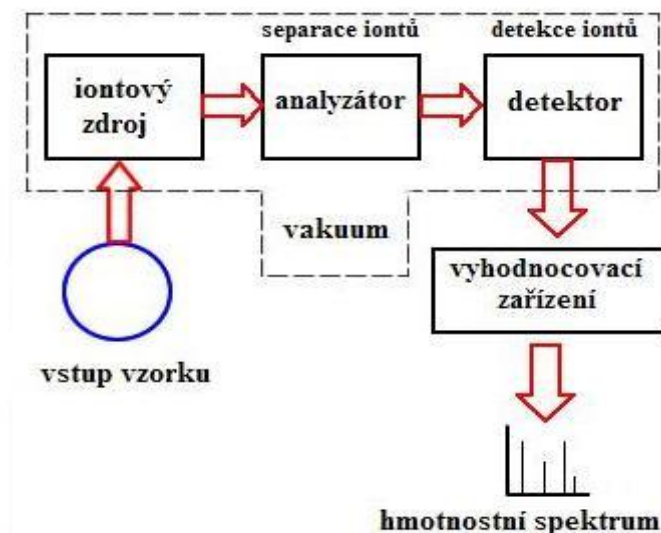
Výhody hmotnostního spektrometru, a to v porovnání s ostatními detektory používanými v kapalinové chromatografii, jsou dány nejen jeho citlivostí, selektivitou a univerzálností, ale také spolehlivou identifikací struktury analyzované látky [61].

Hlavní problémy spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie byly vyřešeny vývojem nových ionizačních technik jako je termosprej a elektrosprej. Tyto ionizační techniky vyřešily problém nekompatibility samotných analytů, které jsou často řazeny mezi látky termolabilní a polárního charakteru a se kterými si tradiční ionizační techniky nedokázaly poradit. Základním požadavkem vývoje nových ionizačních technik bylo i snížení signálu pozadí, tvořeného ionty složek mobilní fáze kapalinové chromatografie [59, 61].

2.7.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda založená na interakci iontů s elektrickým a magnetickým polem. U této metody je vzorek převáděn na ionizovanou plynnou fázi a následně jsou vzniklé ionty separovány podle hodnoty poměru jejich hmotnosti a náboje [65].

Základními součástmi běžného hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor [66].



Obr. 15: Obvyklé schéma hmotnostního spektrometru [66].

2.7.3.1 Ionizace vzorku

Typy ionizačních technik lze rozdělit podle vlastností vzorků, pro které jsou aplikovány. Pro těkavé a polotěkavé sloučeniny je používána elektronová ionizace, chemická ionizace a ionizace polem. Naopak pro látky stabilní, vyskytující se v kapalném stavu, je úspěšně používán elektrosprej nebo desorpčně-ionizační technika MALDI.

2.7.3.1.1 MALDI

Z anglického Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) je nejnovější a možná nejslibnější desorpčně-ionizační metoda pro syntetické makromolekuly [67]. Polymer je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle a smíchán s matricí tak, aby byl molární poměr analytu a matrice 1:100 – 1:50 000 [68]. Jako matrice se nejčastěji používají deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin, jako jsou kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, 5-chlorsalicylová a α -kyano-4-hydroxyskořicová. Tyto kyseliny právě velmi dobře absorbují energii v UV-VIS oblasti [67]. Ke směsi matrice a analytu se následně přidává velmi malé množství ($\leq 1 \mu\text{l}$) pomocného ionizačního roztoku, který je tvořen solí kovů. Takto upravená výsledná směs je nanášena na vodivou destičku označovanou jako terčík [68]. Terčík je za vakua bombardován laserovými paprsky, a tak dochází k odpařování matrice z povrchu terčíku. Energie je nejdříve absorbována matricí, která se tak ionizuje a disociuje. Tento proces narušuje krystalickou strukturu matrice, která se mění na superstlačený plyn, v němž dochází k přenosu náboje z matrice na molekuly analytu. Přenos se děje především vodíkovými ionty nebo ionty kovů. Při rozpínání stlačeného plynu jsou tak molekuly a ionty analytu přenášeny k okrajovým částím terčíku, kde probíhají další přenosy nábojů na neutrální molekuly analytu. Kolize analytu s rozpínajícím plynem tak rozptýlí většinu vnitřní energie a vytvoří se ionty analytu [65].

MALDI je velmi citlivá ionizačně/desorpční metoda. Celkové množství vzorku aplikovaného na terčík se pohybuje řádově v piko až femtomolech. Při vyšších koncentracích analytu v matrici by mohlo docházet k interakcím mezi analyty navzájem, které vedou ke vzniku tzv. klastrů. Klastry komplikují vyhodnocování molekulové hmotnosti, a proto je nutné vysoké zředění analytu v matrici. Polymery s „hmotností“ 10^6 Da mohou být úspěšně ionizovány touto metodou [69].

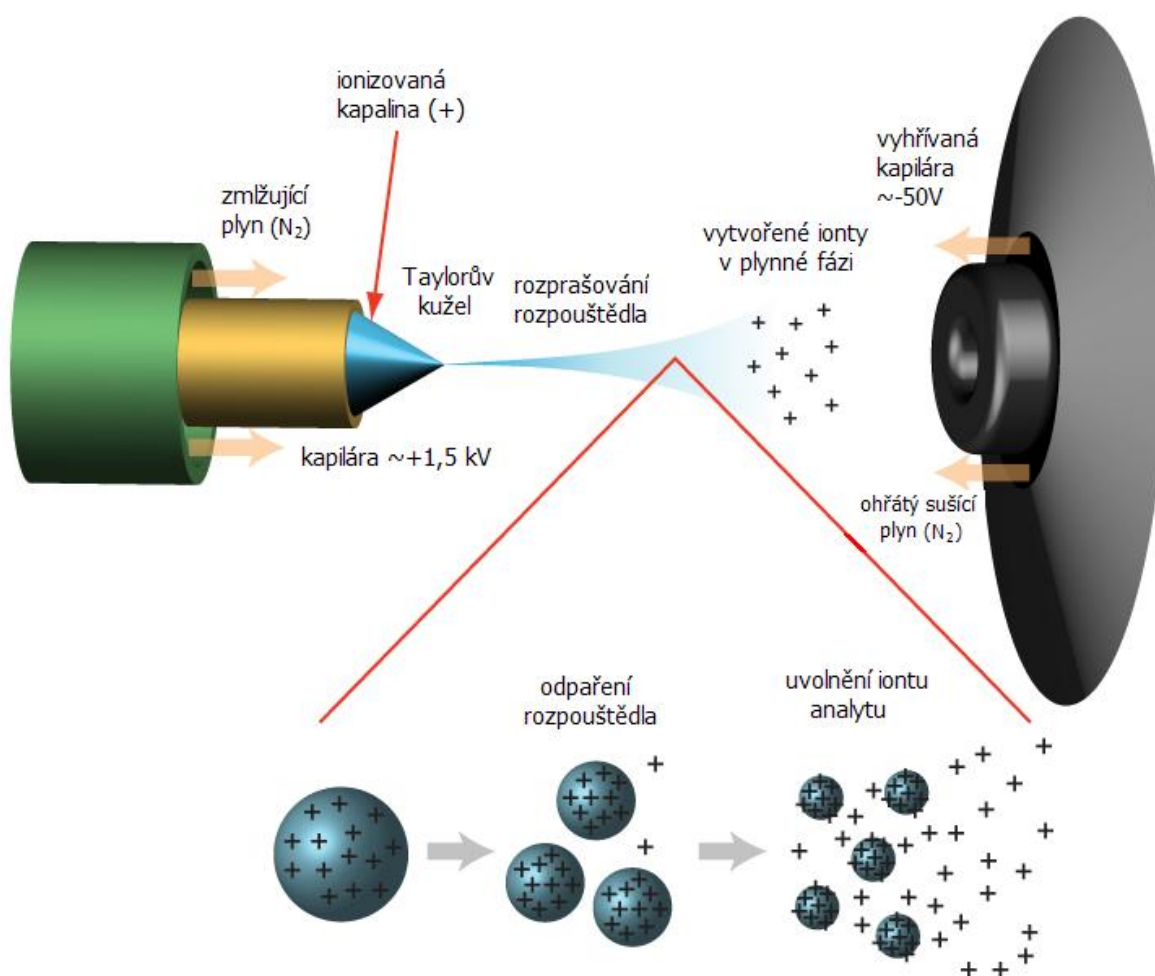
Makromolekuly s hmotností do 50 000 Da jsou nabíjeny převážně jednotlivě, zatímco u vyšších molekulových hmotností dochází k vícenásobnému nabíjení iontů [68].

Dnes se MALDI používá pro analýzu koncových skupin polymeru a také pro zjištění distribuce molekulové hmotnosti u syntetických polymerů [70].

2.7.3.1.2 Elektrosprej

Při ionizaci elektrosprejem prochází eluát po výstupu z kolony kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Rozdíl potenciálů mezi kapilárou a 0,3 – 2 cm vzdálenou protielektrodou je 3 – 6 kV. Elektrosprej tak za atmosférického tlaku produkuje vysoce nabitě kapičky, jejichž náboj závisí na polaritě pole, které je aplikováno na kapiláru. Vypařování vzniklých nabitých kapiček také napomáhá protiproud teplého dusíku. Dalším odpařováním rozpouštědla dochází ke zmenšování kapiček, což zvyšuje hustotu povrchového náboje a vede k rozpadu na menší kapičky. Nakonec se uvolní protonovaný molekulární iont nebo adukt molekuly [65]. Průtok kapilárou elektrospreje je v rozsahu 1 – 10 μ l za minutu, ať už se jedná o přímý nástřik pomocí injekční stříkačky nebo spojením s kapalinovým chromatografem [65].

Elektrosprej většinou produkuje vícenásobně nabitě přechodné ionty s výjimkou analytů, které mají menší molekulovou hmotnost jak 1 000 Da. Kyselé a bazické analyty jsou většinou ionizovány na $[M+nH]^{n+}$ kationty a $[M-nH]^{n-}$ anionty. Molekuly, které nejsou tak dobře disociovatelné, což platí pro většinu syntetických polymerů, tvoří adukty s kovy (jako je Na^+ , K^+) nebo s jinými ionty, jako je NH_4^+ [71]. Jak se kapičky vznikající pomocí elektrospreje přemění na ionty, které pozorujeme v hmotnostním spektru, není dosud dobře objasněno. Představa je taková, že neustále se vypařující rozpouštědlo zmenšuje povrch kapičky. Ionty se hromadí u povrchu kapky, aby se minimalizoval coulombický odpor mezi náboji. Vypařování rozpouštědla pokračuje až do tzv. Rayleighho limitu, kdy dochází ke coulombické explozi. Při této explozi dojde k utržení malé kapičky z té větší a tento proces pokračuje tak dlouho, dokud jedna kapička obsahuje jeden druh analytu. Další možností je, že mikrokapičky vznikající na rozhraní Rayleighho limitu mohou mít tolik nahromaděného náboje, že z nich vznikají odpařováním přímo quasimolekulární ionty z jejich povrchu [72].



Obr. 16: Schéma elektrospreje [73]

2.7.3.2 Analyzátory

Hmotnostní analyzátory rozptylují ionty v prostoru nebo v čase podle jejich poměru m/z . Některé analyzátory snímají hmotnostní spektra periodicky v čase, zatímco jiné snímají při dostatečném čase jeden druh iontu nebo úzký rozsah m/z , který je pak předáván do detektoru. Mezi důležité vlastnosti analyzátorů patří rozlišovací schopnost, horní hranice velikosti snímané hmoty, transmise, přesnost hmoty, dynamický rozsah a provozní tlak. Dnes jsou analyzátory rozdělovány na sektorové analyzátory, skenující hmotnostní analyzátory a neskenující hmotnostní analyzátory. Do sektorových analyzátorů jsou zařazovány magnetické analyzátory, elektrostatické analyzátory a jejich hybridy. Mezi skenující hmotnostní analyzátory patří zejména kvadrupól a iontová past. Mezi neskenující hmotnostní analyzátory je zařazována iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) a průletový analyzátor (TOF) [74].

2.7.3.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor se skládá ze čtyř rovnoběžných tyčových elektrod. Elektrody jsou uspořádány v podélné ose do čtverce. Vždy na dvě protilehlé elektrody je přiváděna stejnosměrná složka napětí a současně složka radiofrekvenčního pole. V hyperbolickém radiofrekvenčním poli působí na nabitou částici síla úměrná její výchylce od neutrální polohy. Nastavení hodnot, jako je stejnosměrné napětí, amplituda a frekvence radiofrekvenčního pole, tak předurčují trajektorii drah, po kterých se mezi tyčemi budou pohybovat ionty s určitým poměrem m/z . Při definovaném nastavení mají stabilní dráhu vedoucí k detektoru ionty právě určité hodnoty m/z . Ostatní ionty, které mají nevyhovující hmotnost m nebo náboj z , mají dráhu ve tvaru šroubovice, která se postupně

zvětšuje. Nevýhovující ionty tak skončí vybitím na tyčových elektrodách nebo vylétnutím z hyperbolického radiofrekvenčního pole. Kvadrupól tak funguje jako laditelný filtr, který je schopen dělit ionty bez ohledu na jejich počáteční energii.

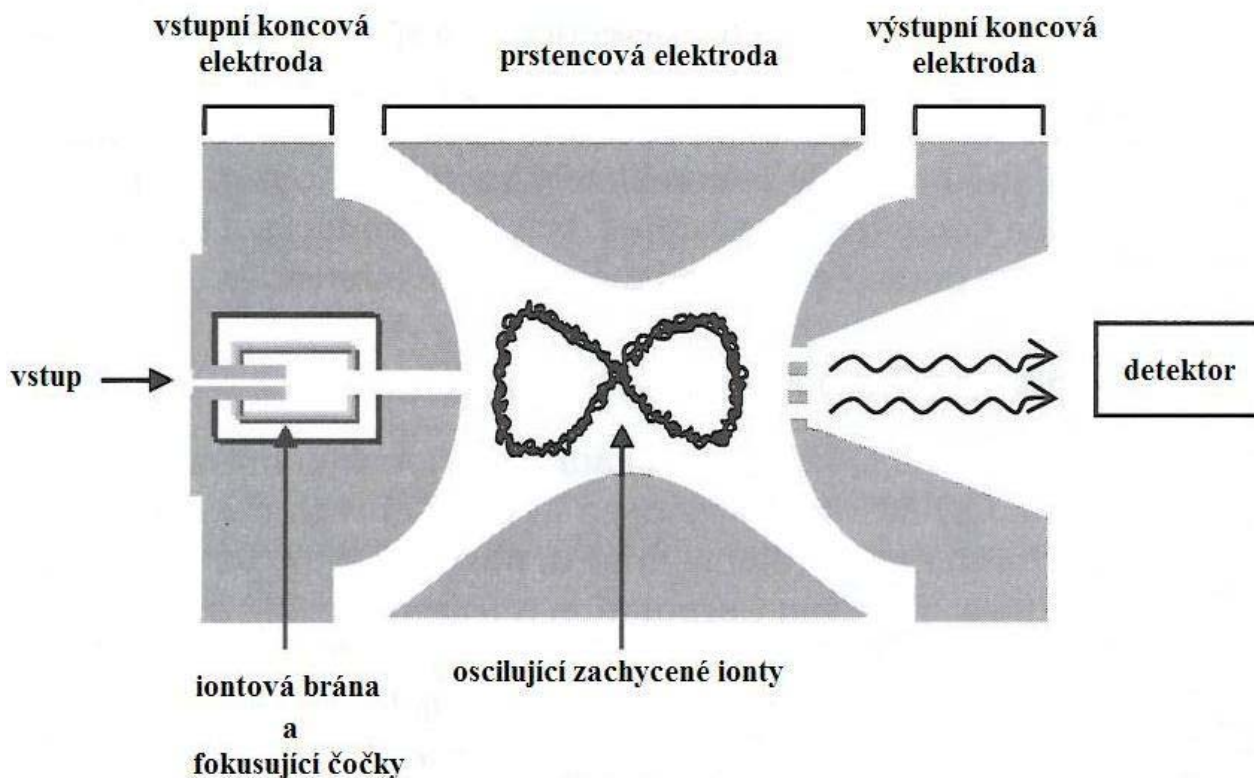
Nevýhodou kvadrupólu je menší rozsah měřených hmotností od 2 000 až 4 000. Další nevýhodu způsobuje samotný princip separace iontů, kdy převážná část iontů končí svou dráhu vybitím na tyčích, což způsobuje malou propustnost filtru [74].

2.7.3.2.2 Iontová past

Iontová past funguje na podobném principu jako třírozměrný kvadrupól. Je tvořena třemi elektrodami, z nichž je jedna kruhová a dvě jsou vyklenuté do prostoru kruhu. Ionty vzniklé během pulzní ionizace se shromažďují v okolí středu hyperboloidního prstence [74]. Ionty jsou udržovány uvnitř pasti řádově v milisekundách i déle, dokud se nezačne postupně zvyšovat radiofrekvenční napětí. U iontové pasti není vkládáno stejnosměrné napětí, neboť všechny ionty mají stabilní trajektorii, a to díky využívání vstupních a výstupních bran, které jsou tvořeny elektrodami. Změnou nastavení radiofrekvenčního napětí se trajektorie iontů postupně zvětšuje. Nejdříve vyletí z pasti ionty s nízkou hmotností a postupně opouští iontovou past další nežádoucí ionty [65]. Následuje tzv. kolizní ochlazení neboli stabilizace, která se provádí interakcí s heliem o nízkém tlaku a potom detekce. Iontová past pracuje v cyklickém režimu, který se skládá z napouštění iontů, uchovávání a skenu. Ve srovnání s kvadrupólem lze iontovou past využít i v tandemové hmotností spektrometrii jako je MS/MS v čase nebo MSⁿ v čase [65].

Mezi slabiny iontové pasti patří nízká účinnost zachytu iontů při napouštění pasti, která je zhruba 5 % z celkového množství iontů. Další slabinou je 50% efektivita ejekce iontů z pasti při skenování. Mezi negativní vlivy, ke kterým může u iontové pasti docházet, je vznik prostorového náboje [65].

Pro iontovou past platí pravidlo 30/70. Toto pravidlo říká, že pouze ionty se 70% hmotností prekursoru a menší mohou být stabilizovány v pasti. Pokud mají ionty 30 % hmotnosti prekursoru a menší, jsou ztraceny. To vede ke ztížené interpretaci spekter, neboť i malé fragmenty hmotnosti mohou nést důležitou informaci. Dalšími důsledky tohoto pravidla jsou zvýšené nároky na tandemovou hmotnostní spektrometrii MSⁿ, což zejména prodlužuje dobu analýzy [65].



Obr. 17: Schéma iontové pasti [75]

2.7.3.2.3 Analyzátor doby letu (Time of Flight - TOF)

Analyzátor doby letu je nejspíše konstrukčně nejjednodušší hmotnostní analyzátor; je tvořen 1 až 2 metry dlouhou evakuovanou trubicí. Tento analyzátor pracuje na principu stanovení m/z iontu z doby letu nabitě částice touto evakuovanou trubicí směrem k detektoru. Všem iontům je po ionizaci dodána stejná kinetická energie. Má-li iont s nižší hmotností stejnou kinetickou energii jako iont s vyšší hmotností, musí mít v evakuované trubicí vyšší rychlost. Na konci trubice se nachází detektor, na který tyto urychlené ionty dopadají od nejlehčího po nejtěžší. Vylepšený analyzátor doby letu je tzv. reflekttron. Konstrukčně je velice podobný TOF, pouze je vylepšen o elektrostatické zrcadlo, které se nalézá na konci trubice místo detektoru. Sekundární detektor je umístěn na začátku trubice. Když nabitá částice doletí do oblasti reflekttronu, je odražena elektrostatickým polem, což prodlouží její dobu letu a tím také zlepší rozlišení detektoru.

TOF je ideálním analyzátozem pro pulzní ionizace jako je MALDI nebo elektronová ionizace. Analyzátor doby letu vyniká velmi krátkou dobou záznamu spektra, což bylo v minulosti velmi obtížné pro zpracování signálu. Jeho význam nabývá až v dnešní době, kdy se velmi rychle vyvíjí rychlost přenosu signálu v elektronice [65].

2.7.3.3 Vakuový systém a detekce

Udržení vakua je pro MS systém důležitou podmínkou, neboť ionty vznikající při ionizaci nesmějí neřízeně měnit svou energii, zejména potom nechtěnými srážkami s dalšími částicemi. Vakuum je udržováno buď v celém systému hmotnostního spektrometru, nebo v oblasti, kde začíná analyzátor, až k detektoru.

Vakuový systém je udržován buď rotační olejovou vývěvou s rotujícími lamelami, která poskytuje vakuum v rozsahu $10^{-1} - 10^{-2}$ Pa. Dále může být využívána difúzní vývěva, která vytvoří vakuum 10^{-6} Pa anebo turbomolekulární vývěva, která dosahuje vakua 10^{-8} Pa.

Požadavky na kvalitu vakua se odvíjí od typu analyzátoru a od střední volné dráhy iontů, která musí být větší než dráha iontu fyzická, což je trajektorie od místa vzniku iontu až k místu detekce [74].

Detektory v hmotnostní spektrometrii obecně převádějí proud dopadajících iontů na proud elektronů. Typy používaných detektorů souvisí s celkovou konstrukcí zařízení. Nejčastěji je používána Faradayova klec, kterou tvoří konverzní elektroda miskovitého tvaru. Dopad iontů na povrch dynody způsobí vyražení elektronu, který dopadne na anodu. Vzniklý elektrický proud je zesílen zesilovačem a zpracován. Dále jsou používány elektronové násobiče. V podstatě se jedná o fotonásobič, který je konstruován jako zužující se trubice, do jejíž širší části dopadají ionty. Potenciál tohoto konce je negativní a postupně klesá k úzkému konci. Iont dopadající na první konverzní elektrodu vyrazí jeden až dva elektrony, které jsou urychleny k další dynodě. Signál se dalšími nárazy elektronů zvětšuje. Tento zesílený proud elektronů je veden do zesilovače a vyhodnocován [74].

2.8 Metody stanovení molekulové hmotnosti polymeru

Stanovení molekulové hmotnosti a její distribuce v řetězci polymeru bylo vždy nejobtížnějším problémem v chemii polymerů. Na počátku neexistovaly vhodné a zároveň jednoduché metody, neboť všechny do této doby používané metody byly komplikované a do určité míry nevyhovující, a to buď teoreticky nebo experimentálně. Osmometrie, rozptyl světla a ultracentrifugace nejsou vhodné pro běžnou laboratorní praxi, díky svojí náročnosti a složité obsluze. Proto byl výzkum zaměřen k vývoji nepřímých metod stanovení molekulové hmotnosti polymerů. Nepřímé metody se setkaly v praxi s obrovským úspěchem, i když vyžadují použití kalibračních standardů.

Metody proto rozdělujeme na přímé metody, které nevyžadují kalibraci a nepřímé metody, které naopak kalibraci vyžadují. Mezi přímé metody zařazujeme osmometrii, rozptyl světla a ultracentrifugaci. Mezi nepřímé metody patří viskozimetrie a gelová permeační chromatografie [68].

Volbou vhodné techniky můžeme exaktně určit rozložení molekulové hmotnosti ve vzorcích. Ve většině případů je syntéza makromolekulární sloučeniny výsledkem tvorby polymerních řetězců s různou délkou, jinými slovy, jsou vytvořeny polymerní řetězce lišící se molekulovou hmotností. Statistický charakter reakce, podle kterého jsou makromolekuly připraveny, je příčinou relativně široké distribuce molekulové hmotnosti konečného polymerního vzorku. Rozmezí molekulové hmotnosti a distribuce průměrné molekulové hmotnosti jsou důležité pro studii polymerních mechanismů i pro charakteristiku každého polymeru. Rozdíl mezi nízkomolekulární sloučeninou a polymerem spočívá v tom, že většina vlastností polymerů závisí na molekulové hmotnosti polymeru, případně na distribuci molekulové hmotnosti (polydisperzity). Průměrná molekulová hmotnost se vypočte podle rovnic (viz níže uvedených) a je charakterizována v různých místech svého vrcholu.

$$\text{Průměrná číselná molekulová hmotnost: } M_n = \frac{\sum h(M) \cdot M}{\sum h(M)} = \frac{\sum w(M)}{\sum w(M) / M} \quad (1)$$

$$\text{Průměrná hmotnostní molekulová hmotnost: } M_w = \frac{\sum h(M) \cdot M^2}{\sum h(M)} = \frac{\sum w(M) \cdot M}{\sum w(M)} \quad (2)$$

$$\text{Molekulová hmotnost z-průměru: } M_z = \frac{\sum h(M) \cdot M^3}{\sum h(M)^2} = \frac{\sum w(M) \cdot M^2}{\sum w(M) \cdot M} \quad (3)$$

Z výše uvedených vztahů vyplývá, že musí platit $M_z \geq M_w \geq M_n$.

Distribuce molekulové hmotnosti je obvykle popsána indexem polydisperzity: $P = \frac{M_w}{M_n}$ (4)

2.8.1 Přímé metody

2.8.1.1 Osmometrie

Membránová osmometrie je nejvhodnější metoda pro stanovení průměrné číselné molekulové hmotnosti M_n polymerů. Je založena na principu osmózy. Osmóza je definovaná jako samovolné pronikání molekul rozpouštědla do roztoku polymeru (v témže rozpouštědle) semipermeabilní membránou propouštějící pouze molekuly rozpouštědla. V roztoku (s přírůstkem molekul rozpouštědla) roste tlak až do hodnoty, při níž (za dané koncentrace roztoku) toto samovolné pronikání ustane – osmóza se zastaví. Tato hodnota tlaku je nazývána osmotický tlak (π) roztoku polymeru při jeho dané koncentraci [76].

Osmometrii lze úspěšně používat pro stanovení molární hmotnosti polymerů nižších jak 100 000. Pro hodnoty menší než 10 000 je obtížné najít vhodnou membránu, pro hodnoty větší než 500 000 jsou osmotické tlaky tak malé, že jsou prakticky neměřitelné. Rozhodujícím prvkem každé osmometrické aparatury je membrána. Nejvíce se používají membrány z celulózy a polyethylenu [76].

2.8.1.2 Rozptyl světla

Metoda rozptylu světla využívá monochromatického paprsku světla, který dopadá na roztok polymeru. Při průchodu světla látkovým prostředím, např. roztokem biopolymeru, dochází na molekulách rozpuštěné látky k rozptylu. Následně je měřena intenzita rozptýleného světla na molekulách polymeru pod různými úhly [76].

Metoda rozptylu světla je jedním z nejdůležitějších způsobů stanovení absolutní hodnoty M_w . Jednou z nevýhod rozptylu světla je, že vyžaduje pečlivě vyčištěné roztoky, neboť prachové částice značně přispívají k rozptylu světla a mohou tak způsobovat značnou chybu měření. Další nevýhodou je nízká citlivost pro řetězce polymerů s malou molekulovou hmotností, neboť Rayleighův rozptyl je lineárně závislý na rostoucí M_w [77].

2.8.2 Nepřímé metody

Mezi konvenční metody, které stanovují průměrnou molekulovou hmotnost a hmotnostní molekulovou distribuci, patří nepřímé metody, také nazývané relativní metody. Mezi tyto metody je například zařazována GPC a viskozimetrie. Jak už bylo zmíněno výše, nepřímé metody vyžadují kalibraci. Pro tento účel je používán soubor polymerů o známých M_w a M_n [68].

2.8.2.1 Viskozimetrie

Viskozimetrie je jednoduchá, často využívaná hydrodynamická metoda, umožňující stanovení molární hmotnosti a odhad velikosti i tvaru molekul.

Měření viskozity se provádí na roztocích polymerů o různém zředění. Makromolekuly polymerů s ohebnými řetězci tvoří v roztocích různě svinutá klubka, která ve větší nebo menší míře zadržují rozpouštědlo. Viskozita zde není nezávislá na stupni disperzity, nýbrž stoupá s rostoucí molární hmotností polymeru. U polymeru s méně ohebnými řetězci je makromolekula v roztoku volně svinuta do útvaru, kterým rozpouštědlo proudí bez mechanického zadržování. Množství

rozpouštědla zadržovaného makromolekulárním klubkem závisí také na afinitě polymeru k rozpouštědlu. U dobrých rozpouštědel je viskozita zředěných roztoků vysokomolekulárních látek vyšší než ve špatných rozpouštědlech. Příčinou tohoto poznatku je to, že v dobrém rozpouštědle se makromolekula snaží převést do styku s jeho molekulami co nejvíce funkčních skupin, a proto se více rozvine. Klubko tak s sebou unáší větší množství kapaliny a v důsledku toho stoupne viskozita roztoku. Ve špatném rozpouštědle se naopak řetězec svine do hustšího klubka; viskozita je nižší. V koncentrovaných roztocích dochází k asociacím molekul, a to tím více, čím menší je afinita makromolekul k rozpouštědlu. V tomto případě je vliv afinity polymeru k rozpouštědlu na viskozitu opačný [76].

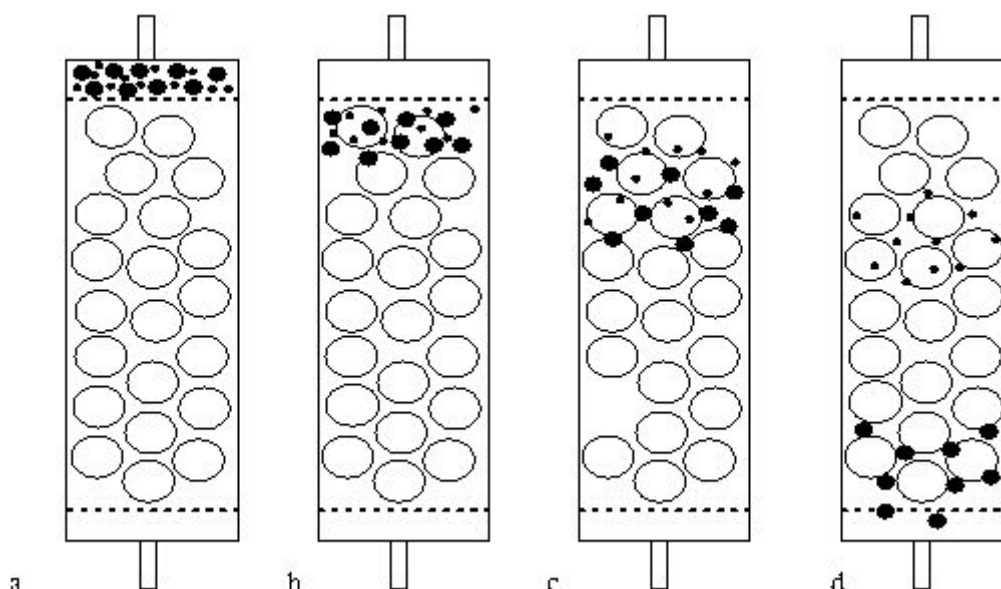
Pomocí viskozimetrie získáme jedinež průměrnou molekulární hmotnost M_v , ze které nelze vypočítat polydisperzitu. Proto touto metodou nelze stanovit ani molekulární distribuci polymeru. Při aplikaci viskozimetrie na blokové kopolymery se rovněž setkáme s problémem neznámých konstant rozpouštědel polymerů a jejich směsí, tolik potřebných k výpočtům Mark-Houwink-Sakuradovi rovnice [68].

2.8.2.2 Gelová permeační chromatografie

U gelové permeační chromatografie (*Gel Permeation Chromatography* – GPC neboli *Size Exclusion Chromatography* – SEC) se využívá separace látek podle velikosti molekul. Dochází k rozdělování látek mezi pohyblivou část mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrny gelu a nepohyblivou část mobilní fáze, nacházející se uvnitř póru gelu. Při průchodu kolonou jsou molekuly složek zdržovány v důsledku svého pronikání (permeace) do rozpouštědlem naplněných pórů. Malé molekuly pronikají hlouběji a mají proto vyšší hodnoty retenčních objemů než větší molekuly. Interakce molekul analytů se stacionární fází nenastává.

Požadavky na vlastnosti gelů jsou velmi náročné. Matrice gelu musí být inertní k analyzované látce i k mobilní fázi. Gel musí odolávat zvýšené pracovní teplotě a nesmí se během separace rozkládat a uvolňovat produkty rozkladu [77]. Výběr gelu se volí podle vlastností separovaných látek. Pro látky ve vodě rozpustné se používají hydrofilní gely, například *Sephadex* (dextrin zesíťovaný epichlorhydrinem). Mobilní fází je voda s případným přídavkem organického rozpouštědla. Pro látky nerozpustné ve vodě se používají hydrofobní gely. Mezi ně patří kopolymery styrenu a divinylbenzenu. Mobilními fázemi mohou být aromatické, chlorované a některé heterocyklické uhlovodíky. Univerzální gely na bázi silikagelu a porézních skel jsou vhodné pro separaci hydrofobních i hydrofilních látek [60, 77].

Zjednodušené ideální dělení směsi dvou velikostí makromolekul je prezentováno na obrázku 18. Na prvním obrázku je vzorek zobrazen ihned po nástřiku v čele kolony. Kapalná mobilní fáze prochází celým sloupцем kolony. Mobilní fáze má přesně definovaný průtok, který vytváří tlakový gradient v celé délce kolony. Na dalším snímku vzorek polymerních molekul prochází kolonou v důsledku tohoto tlakového gradientu. Částice stacionární fáze (náplň kolony) je porézní s přesně definovanou velikostí pórů. Malé makromolekuly jsou schopny proniknout do těchto pórů a takto projít kolonou; větší molekuly jsou příliš velké, aby pronikly do pórů gelu, a tak zůstávají v intersticiálním prostoru, jak je uvedeno na obrázku (18 c). Velké molekuly se tak pohybují mnohem rychleji, protože je nebrzdí pronikání přes póry gelu. Nakonec jsou obě molekulární velikosti rozděleny do dvou odlišných chromatografických pásem, jak je prezentováno na příslušném obrázku (18 d). Reálný GPC chromatogram obvykle vykazuje kontinuitu v molekulové hmotnosti složek obsažených ve vrcholu píku [77].



Obr. 18: Princip dělení pomocí GPC [77].

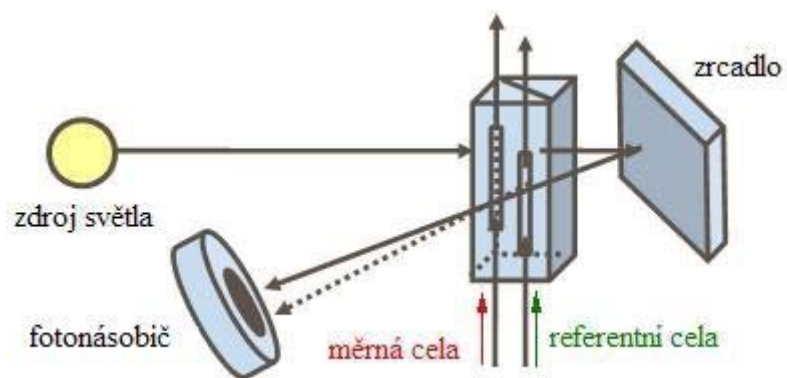
Nejjednodušší způsob, jak vytvořit kalibraci, z nichž lze získat molární hmotnost pro daný eluční objem, je metoda vnějších standardů. Tato metoda může být použita pouze v případě, že je k dispozici řada standardů s úzkou distribucí o známých molekulových hmotnostech (MMD). Vzhledem k tomu, že se příslušné standardy staly komerčně dostupnými pro mnoho polymerů, lze tuto kalibraci běžně využívat. Obvykle se používají standardy, jako jsou polystyren, poly(methylmethakrylát), polyisopren, polybutadien, poly(ethylenoxid), poly(methakrylová kyselina), atd. [78].

Proces degradace je charakterizován poklesem molekulové hmotnosti, což představuje nárůst polydisperzity ($P = M_w/M_n$) a ztrátu hmotnosti polymeru provázenou zvýšením koncentrace v okolním prostředí o krátké molekulové řetězce. GPC lze používat pro sledování degradace chování triblokového kopolymeru. Zbytek hydrogelu z rozkladu je podroben lyofilizaci a analýze pomocí GPC.

Pro stanovení molekulové hmotnosti a polydisperzity systému se nejčastěji používá GPC ve spojení s refraktometrickým detektorem. Pro polymery rozpustné v organických rozpouštědlech se jako mobilní fáze používá většinou tetrahydrofuran. Průměrné molekulové hmotnosti jsou vypočítány s využitím řady standardů polystyrenu [27, 30, 32, 45, 79, 80, 81].

2.8.2.3 Refraktometrický detektor

U gelové permeační chromatografie se nejčastěji používá refraktometrický detektor (*Refractive Index detector – RID*), který měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li eluát složku, objeví se odchylka. Citlivost je tím větší, čím je větší rozdíl v indexu lomu analytu a mobilní fáze. Měření je diferenční, tj. paprsek prochází měrnou celou a srovnávací celou, měří se rozdíl intenzity světla, které dopadá na detektor. Tento typ detektoru sice není příliš citlivý, ale je velmi univerzální. Je vhodný pro látky, které neabsorbují světlo a nefluoreskují, jako jsou cukry, lipidy a polymery. Při jeho použití je třeba přísně udržovat konstantní teplotu a je nevhodný pro gradientovou eluci [60, 63, 74].



Obr. 19: Schéma optického systému refraktometrického detektoru [82].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje, zařízení, software

3.1.1 Příprava vzorků

- analytické váhy KERN 770, Version 2.3, Německo
- pH metr pH 730, wtw series, inoLab, Německo
- inkubátor Nüve cooled incubator ES 110, Turecko
- magnetická míchačka s ohřevem a elektrickým kontaktním teploměrem IKA ETS-D5, Německo
- lyofilizátor Freezone 4.5 Freeze Dry System, Labconco, USA
- běžné analytické vybavení

3.1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

- kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, USA
 - gradientové čerpadlo
 - vakuový odplyňovač
 - automatický dávkovač
 - termostat kolon
 - UV-VIS detektor s diodovým polem – zdroj světla deuteriová (UV) a wolframová pro (VIS a blízké IČ) lampa, 1 024 fotodiod, vlnový rozsah 190 – 950 nm, programovatelná šířka štěrby 1 – 16 nm
- kolona Restek Aqueous C18, velikost 250×4,6 mm, velikost částic 5 µm, Restek, USA
- předkolona Restek Aqueous C18, velikost 4×2 mm, velikost částic 5 µm, Restek, USA
- hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series, Ion Trap LC-MS
- infuzní pumpa kdS 9100, kdScientific, USA

3.1.3 Gelová permeační chromatografie

- kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, USA
 - izokratická pumpa
 - vakuový odplyňovač
 - automatický dávkovač
 - termostat kolon
 - refraktometrický detektor
- kolona PLgel Mixed C, velikost 300×7,5 mm, velikost částic 5 µm, Polymer Laboratories, USA
- předkolona PLgel Mixed C, velikost 50×7,5 mm, velikost částic 5 µm, Polymer Laboratories, USA

3.1.4 Software pro zpracování a prezentaci dat

- Microsoft® Word 2003
- Microsoft® Excel 2003
- Chemstation Rev. A 02.01.
- Mn Agilent GPC – Addon Rev. A 02.02.

- Chemstation Rev. B 01.01.
- Agilent 6 300 Series Ion Trap LC/MS Systém Software, Version 6.2
- Data Analysis for 6 300 Series Ion Trap LC/MS Version 4.0

3.2 Používané chemikálie a standardy

3.2.1 Chemikálie

- kyselina mravenčí, čistota p.a., Riedel-de Haën, Německo
- tetrahydrofuran, čistota gradient grade for liquid chromatography, LiChrosolv, Merck KGaA, Německo
- 2,6-di-terc-butyl-4-methylfenol, Sigma-Aldrich, Německo
- acetonitril, čistota gradient grade for liquid chromatography, Lach:ner, Česká republika
- dihydrofosforečnan draselný, čistota p.a., Sigma-Aldrich, Německo
- hydrogenfosforečnan draselný, čistota p.a., Sigma-Aldrich, Německo
- deionizovaná voda upravená přístrojem Milli-Q Academic firmy Millipore o specifické vodivosti $0,055 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ při teplotě 24 °C

3.2.2 Standardy

- kyselina glykolová p.a., Merck KGaA, Německo
- D, L-kyselina mléčná 90%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- polystyrenové standardy EasyCal Mp = 580 – 377 400, Polymer Laboratories, USA

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Vlastnosti kopolymerů založených na poly(mléčné kyselině), poly(glykolové kyselině) a polyethylenglykolu PLGA-PEG-PLGA a tyto kopolymery modifikované kyselinou itakonovou

Tabulka 5: Přehled základních charakteristik zkoumaných kopolymerů

vzorek	typ vzorku	Mn PEG [g.mol ⁻¹]	teoretický poměr PEG/PLGA	teoretický poměr D,L-LA/GA	Mn reálná
1	PLA/PGA-PEG-PLA/PGA	1 500	2,50	3,00	7 198
2	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	1 500	2,00	3,00	5 563
3	PLA/PGA-PEG-PLA/PGA	1 500	2,00	3,00	5 845

3.3.2 Stanovované analyty a jejich vlastnosti

3.3.2.1 Kyselina mléčná

- (C₃H₆O₃)
- D,L-2-hydroxypropanová kyselina
- Mr = 90,08 g.mol⁻¹
- Teplota tání racemické směsi T_f = 16,8 °C.
- Teplota varu 122 °C

- Hustota 1,209 g.cm⁻³
- V pevném stavu bílý prášek. Vyskytuje se v kapalném stavu jako bezbarvá hydrokopická kapalina.

3.3.2.2 Kyselina glykolová

- (C₂H₄O₃)
- Hydroxyethanová kyselina
- Mr = 76,05 g.mol⁻¹
- Teplota tání 70 – 74 °C
- Hustota 1,27 g.cm⁻³
- Bílý prášek dobře rozpustný ve vodě.

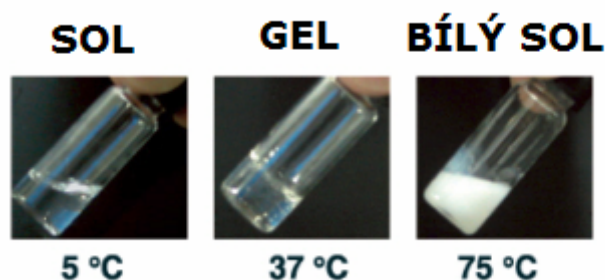
3.3.3 Příprava vzorků

Kopolymer PLGA-PEG-PLGA i kopolymer modifikovaný kyselinou itakonovou jsou vysoce viskózní. Pro přípravu vzorků bylo zapotřebí vždy navážít určité množství těchto kopolymerů pro danou hmotnostní koncentraci. K naváženému množství kopolymeru bylo přidáno vypočtené množství Milli-Q vody. Takto připravené vzorky se nechaly v chladicím boxu rozpouštět ve vialkách i několik dní.

3.3.4 Stanovení kritické koncentrace gelu a kritické teploty gelu

Pro sestavení sol-gel fázového digramu se nejčastěji používá jednoduchá metoda s tzv. obrácenými zkumavkami. Výhodou metody je možnost pozorovat i barevné přechody sledovaných roztoků, popř. jeho zakalení [54]. Nevýhodou metody je vysoce subjektivní přístup daného pozorovatele.

Vzorky o různých koncentracích byly připraveny do 4ml vialek. Rozpouštění probíhalo v chladicím boxu. Po rozpouštění byly vialky vytemperovány na laboratorní teplotu a následně upevněny do stojanu, a pak ponořeny do vodní lázně. Zahřívání vodní lázně začalo při laboratorní teplotě (23 °C) a zvyšovalo se postupně po 1 °C do 59 °C. Vialky byly při každé teplotě 5 minut temperovány. Po uplynutí tohoto intervalu byly lahvičky vyjmuty a obrácením vialek byla pozorována změna viskozity a zbarvení každého vzorku. Z měření pak byla určena hodnota kritické gelační koncentrace (CGC) a kritická gelační teplota (CGT) [83].



Obr. 20: Ukázka gelačního chování během zahřívání ve vodní lázni [84]

3.3.5 Degradace vzorků

Byly připraveny zásobní vzorky PLGA-PEG-PLGA a ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA kopolymerů o různých koncentracích. Do vialek bylo pipetováno 300 µl od každého vzorku. Takto byly vialky ponechány v inkubátoru, dokud se z roztoku nestal gel. Následně bylo přidáno 700 µl

temperovaného fosfátového roztoku. Degradace byla prováděna v mírně kyselém prostředí při pH 4,2, dále v neutrálním prostředí při pH 7,4 a v mírně zásaditém prostředí o pH 9,2. Připravené vzorky byly ponechány v inkubátoru, který byl nastaven na teplotu 37 °C. Od prvního dne počátku inkubace bylo odebíráno 400 µl fosfátového roztoku, který tvořil fázové rozhraní hydrogelu a samotného fosfátového roztoku. Tento odebraný roztok byl následně podroben analýze na kapalinovém chromatografu s DAD a MS detekcí. Zbytek hydrogelu byl lyofilizován.

3.3.6 Identifikace a kvantifikace degradačních produktů na HPLC

Odebraný fosfátový roztok, který obsahoval degradační produkty, byl analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s DAD detektorem na přístroji Agilent 1100 Series. Analýza byla prováděna na koloně Restek Aqueous C18, která byla opatřena předkolonou.

3.3.6.1 Nastavení HPLC

- mobilní fáze: 0,01 mol.l⁻¹ roztok kyseliny mravenčí, acetonitril
- průtok mobilní fáze: 0,2 ml.min⁻¹
- nástřik: 5 µl
- teplota kolony: 30 °C
- vlnová délka: 210 nm
- gradientová eluce

Tabulka 6: Poměr mobilních fází během gradientové eluce

doba analýzy [min]	poměr mobilních fází	
	ACN	0,01 mol.l ⁻¹ HCOOH
0	1	99
10	1	99
12	50	50
30	50	50
30,01	1	99
40	1	99

3.3.6.2 Nastavení iontové pasti

- tlak zmlžovače: 25 psi
- průtok zmlžujícího plynu: 10 l.min⁻¹
- teplota sušícího plynu: 350 °C
- napětí na kapiláře: 4 500 V
- rozsah skenovaných hmot:
 - 50 – 200 m/z: cílová hmota 80 m/z
 - 100 – 1 500 m/z: cílová hmota 800 m/z
- ionizační mód: negativní
- scan mode: ultra scan

3.3.7 Příprava vzorků na GPC analýzu

Po odebrání 400 μ l fosfátového roztoku byla inkubace vzorku ukončena. Po ukončení inkubace byl každý vzorek podroben lyofilizaci. Před lyofilizací byl vzorek zmražen v mrazničce na teplotu mínus 30 °C. Samotná lyofilizace probíhala při teplotě -80 °C a tlaku 15 Pa po dobu 24 hodin. Následně bylo z každého lyofilizovaného vzorku odebráno zhruba 5 mg degradovaného kopolymeru, který byl rozpuštěn v 1 ml tetrahydrofuranu. Po rozpuštění byl vzorek podroben analýze pomocí gelové permeační chromatografie.

3.3.8 Kvantifikace poklesu molekulové hmotnosti degradovaných vzorků na GPC

Lyofilizované a rozpuštěné vzorky v tetrahydrofuranu byly analyzovány pomocí gelové permeační chromatografie s refraktometrickým detektorem na přístroji Agilent 1100 Series.

Analýza byla prováděna na koloně PLgel MixedC, před níž byla zařazena předkolona. Jako standardy byly použity polystyrenové standardy EasyCal.

3.3.8.1 Nastavení GPC

- mobilní fáze: tetrahydrofuran
- průtok mobilní fáze: 1 ml.min⁻¹
- nástřik: 50 μ l
- teplota termostatu kolony: 30 °C
- teplota detektoru: 30 °C
- izokratická eluce

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Každý kopolymer byl nejdříve testován metodou s obrácenými vialkami za účelem zjištění, zda vykazuje sol-gel fázový přechod. Na základě tohoto měření byl vytvořen graf sol-gel fázového přechodu, ze kterého byla určena kritická gelační teplota a kritická gelační koncentrace. Pokud byl kopolymer rozpustný ve vodě a tvořil gel v rozmezí teplot 36 – 42 °C, splňoval tak zvolené podmínky a mohl být dále používán pro degradaci.

Následně byly připraveny různé koncentrace těchto kopolymerů, které byly podrobeny degradaci ve fosfátových roztocích o pH 4,2; 7,4 a 9,2. Každý den v průběhu degradace byl odebírán přesně definovaný objem směsi fosfátového roztoku a uvolněných degradačních produktů. Po ukončení degradace byly vzorky zmrazeny a následně lyofilizovány. Změna molekulové hmotnosti degradovaných kopolymerů byla zjišťována na GPC. Množství uvolněné kyseliny glykolové a mléčné bylo stanoveno pomocí HPLC s DAD detektorem. Kvalitativní stanovení dalších produktů degradace bylo stanoveno pomocí HPLC s hmotnostním detektorem.

Výsledky měření byly zpracovány do následujících tabulek a grafů.

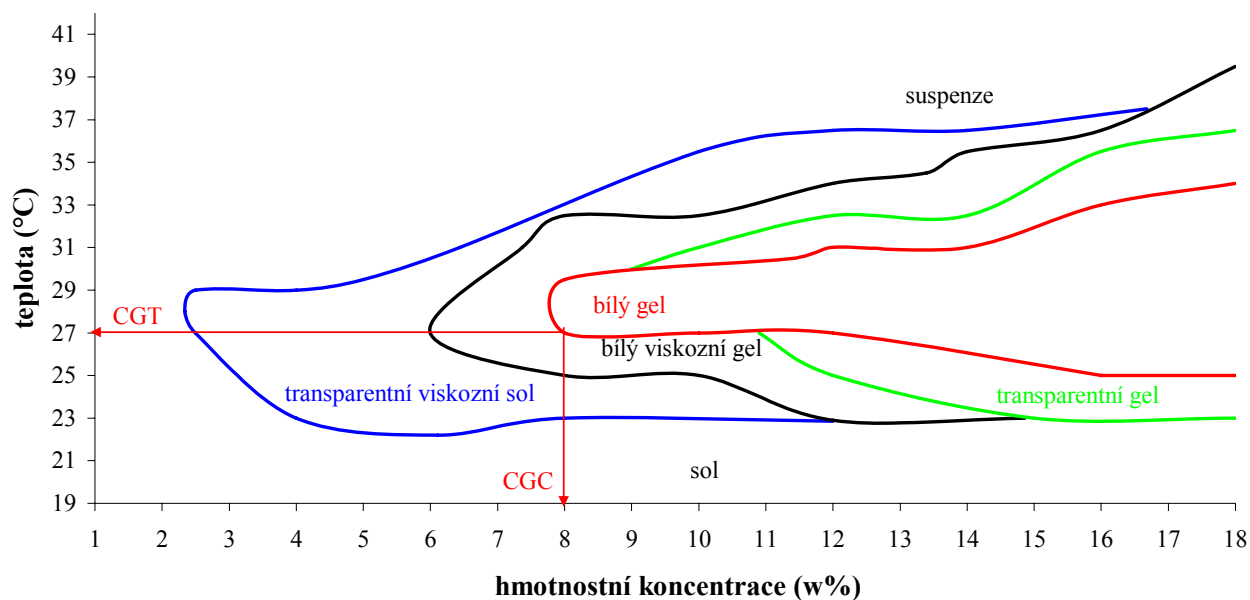
4.1 Přehled testovaných kopolymerů

Tabulka 7: Přehled testovaných kopolymerů a jejich základních charakteristik.

vzorek	typ	Mn PEG [g/mol]	poměr PLGA/PEG	poměr PLA/PGA	Mn [g/mol]
1	PLA/PGA-PEG-PLA/PGA	1 500	2,50	3,00	7 198
2	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	1 500	2,00	3,00	5 563
3	PLA/PGA-PEG-PLA/PGA	1 500	2,00	3,00	5 845
4	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	1 500	2,50	3,00	6 546
5	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	1 500	2,50	3,00	4 920
6	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	1 500	2,50	3,00	6 572
7	PLA/PGA-PEG-PLA/PGA	1 500	2,50	3,00	7 934
8	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	1 500	2,50	3,00	8 025
9	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	1 500	2,00	2,42	4 656
10	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	1 500	2,50	3,00	6 399

4.2 Sol-gel fázové diagramy

Sol-gel fázový diagram vzorku 1, typ kopolymeru PLGA-PEG-PLGA

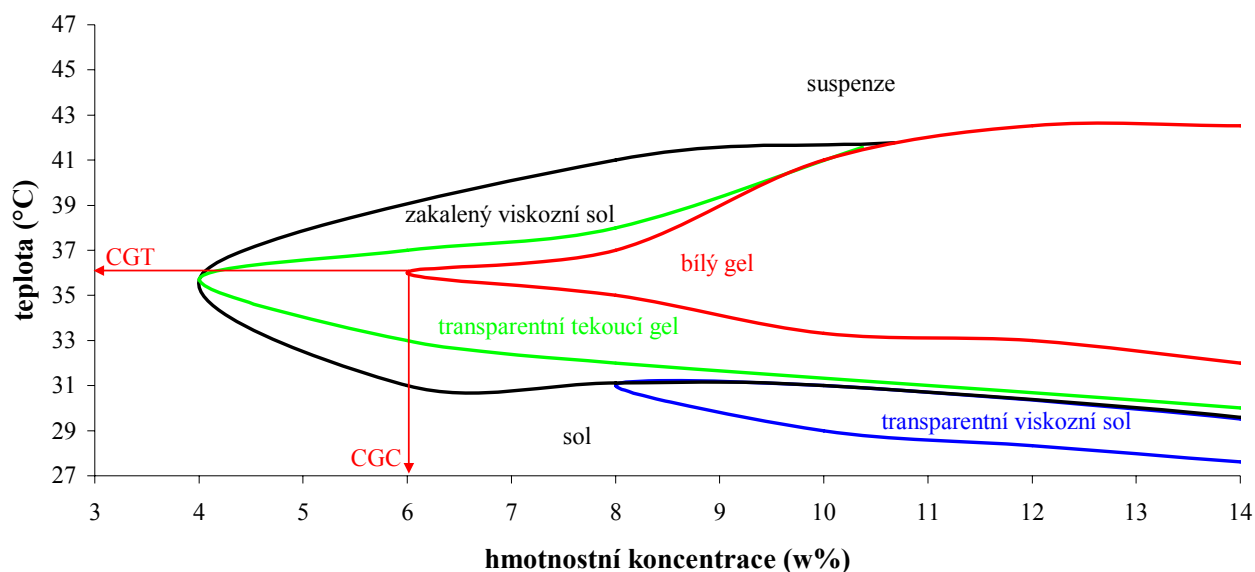


Obr. 21: Sol-gel fázový diagram vzorku č. 1

Během sledování průběhu gelace roztoků kopolymeru bylo pozorováno několik přechodů fázových i barevných. Pro další aplikace je u tohoto typu vzorku důležitá forma gelu bílé barvy. V této fázi byl ponecháván vzorek na degradaci.

Ze sol-gel fázového diagramu pro kopolymer PLGA-PEG-PLGA vzorku 1 vyplývá, že kritická gelační koncentrace se pohybuje okolo 8 % a kritická gelační teplota je 27 °C.

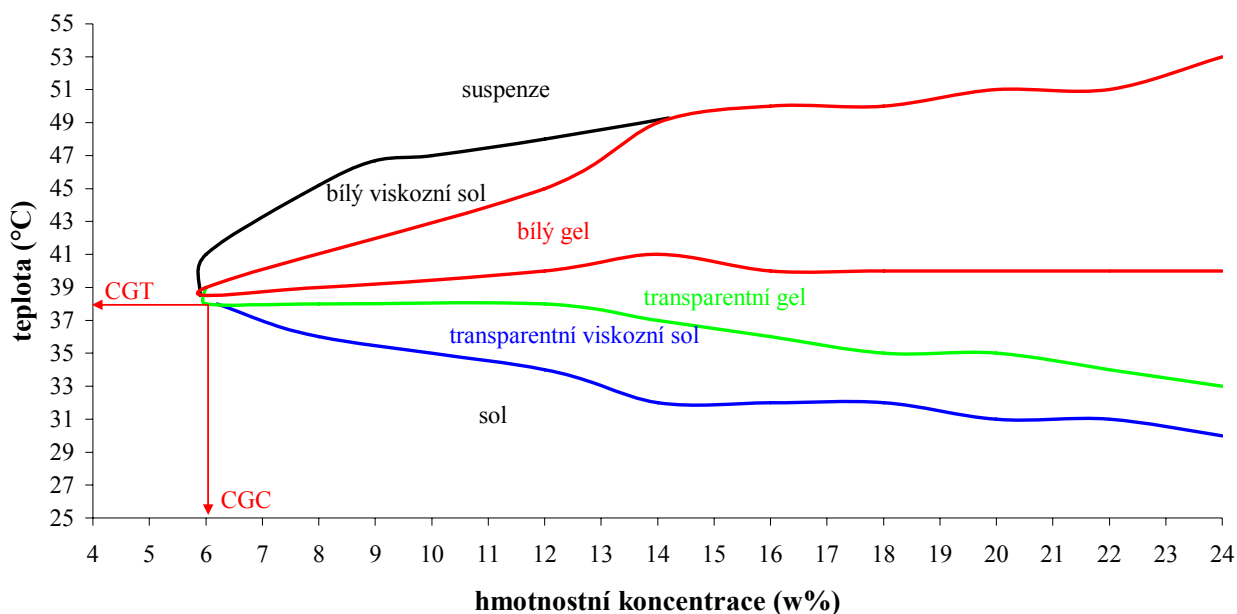
**Sol-gel fázový diagram vzorku 2,
typ kopolymeru ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA**



Obr. 22: Sol-gel fázový diagram vzorku č. 2

Na sol-gel fázovém diagramu kopolymeru ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA vzorku 2 je vyznačena kritická gelační koncentrace, která je 6 %. Kritická gelační teplota odpovídá 36 °C. Při zahřívání nad 38 °C se koncentrace 12 % a vyšší rozkládaly na dvě fáze, na bílou pevnou fázi, tvořenou polymerem, a na kapalnou fázi tvořenou vodným roztokem. Jako nejstabilnější se ukázaly být koncentrace 8 % a 10 %, které při zahřívání nad 40 °C postupně přecházely z bílého gelu na zakalený viskózní sol, až se nakonec při 48 °C rozdělily na dvě fáze.

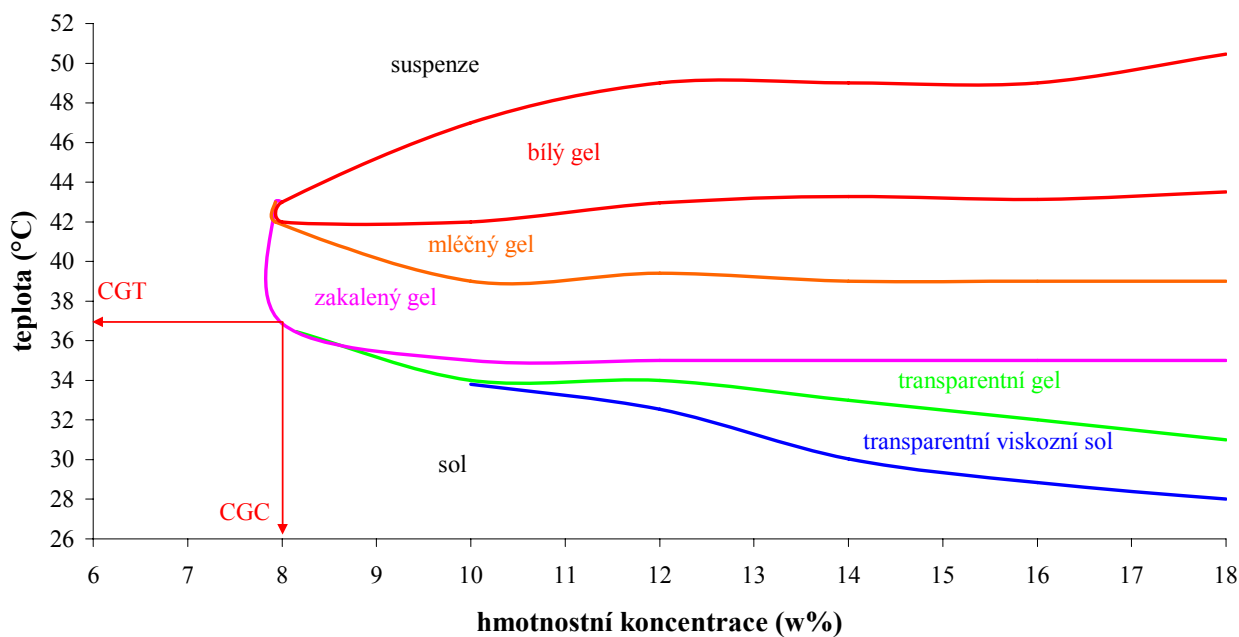
Sol-gel fázový diagram vzorku 3, typ kopolymeru PLGA-PEG-PLGA



Obr. 23: Sol-gel fázový diagram vzorku č. 3

Kritická gelační teplota u vzorku 3 byla stanovena na 38 °C, kritická gelační koncentrace je stejná jako u vzorku 2. Při zahřívání nad 41 °C tvořil tento kopolymer velmi stabilní gel bílé barvy. Zahřívání bylo ukončeno až při 53 °C, kdy postupně všechny koncentrace přešly na dvě fáze.

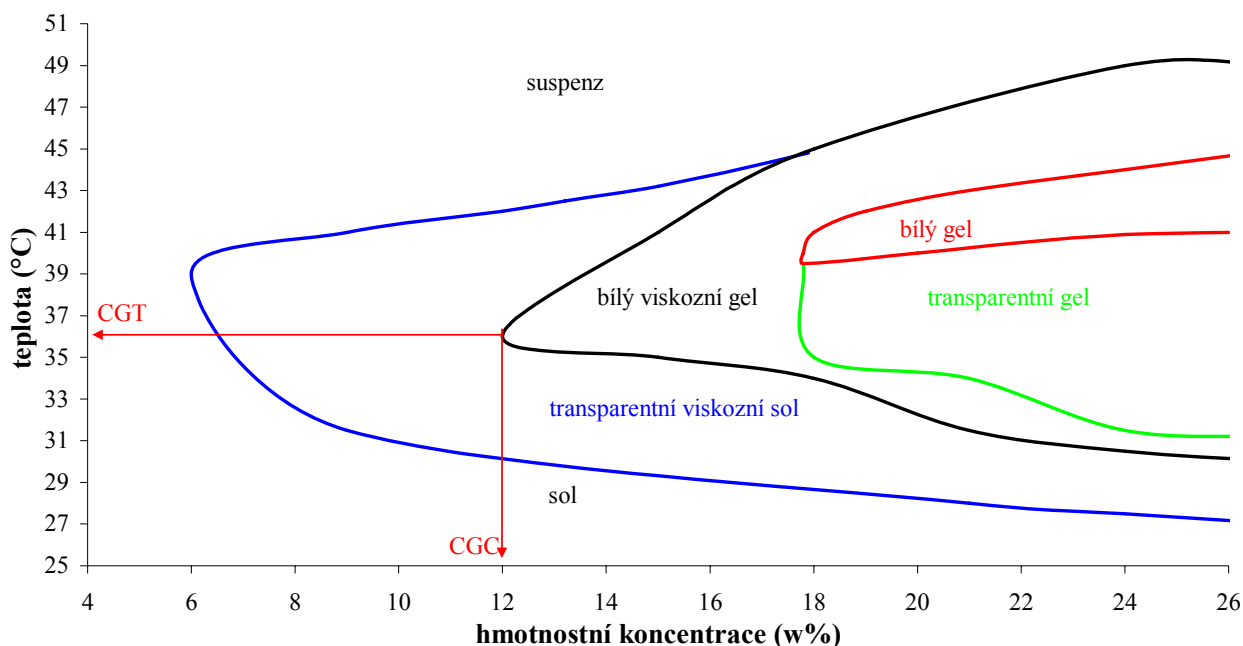
Sol-gel fázový diagram vzorku 4, typ kopolymeru ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA



Obr. 24: Sol-gel fázový diagram vzorku 4

Vzorek 4 modifikován kyselinou itakonovou se při přípravě roztoků pro měření sol-gel fázového diagramu velmi dobře rozpouštěl, do roztoku přešel během 6 dnů. Po zahřívání vytvořil tento kopolymer stabilní transparentní gel, který se dalším zahříváním zakaloval až přešel přes mléčně zabarvený gel na zcela bílý gel. Kritická gelační koncentrace byla stanovena na 8 %, kritická gelační teplota na 37 °C. Nejstabilnější koncentrace se ukázaly 12 % a 14 %, které zůstaly do konce zahřívání ve formě bílého gelu. Nejnížší koncentrace (4 a 6 %) vytvořily dvě fáze už při 35 °C, naopak koncentrace 8; 10; 16; 18 % vytvořily dvě fáze až při 46 °C.

**Sol-gel fázový diagram vzorku 9,
typ kopolymeru ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA**



Obr. 25: Sol-gel fázový diagram vzorku č. 9

Vzorek 9 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA, jak je zřejmé z grafu, má nejvyšší kritickou gelační koncentraci zkoušených vzorků, a to 12 %. Kritická gelační teplota je u tohoto typu vzorku 37 °C. Z fázového diagramu lze pozorovat širokou oblast, kterou tvoří bílý viskózní gel, který přechází na transparentní gel a bílý gel, a to výhradně pouze u koncentrací vyšších jak 18 %.

Tabulka 8: Přehled stanovených kritických gelačních teplot a koncentrací

vzorek	typ	Mn [g/mol]	sol-gel přechod	CGC (w%)	CGT (°C)
1	PLA/PGA-PEG-PLA/PGA	7 198	ano	8	27
2	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	5 563	ano	6	36
3	PLA/PGA-PEG-PLA/PGA	5 845	ano	6	38
4	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	6 546	ano	8	37
5	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	4 920	ne	—	—
6	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	6 572	ne	—	—
7	PLA/PGA-PEG-PLA/PGA	7 934	ne	—	—
8	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	8 025	ne	—	—
9	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	4 656	ano	12	36
10	ITA-PLA/PGA-PEG-PLA/PGA-ITA	6 399	ne	—	—

Při přípravě vzorku č. 1 bylo pozorováno velmi rychlé nabotnutí polymeru za laboratorní teploty. Avšak další rozpouštění muselo probíhat v chladícím boxu, neboť docházelo ke gelování roztoku, což velmi ztěžovalo samotné pipetování. U vzorku č. 1 o M_n 7 198 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a s poměrem PLGA/PEG = 2,5 byla stanovena kritická gelační teplota na 27 °C a kritická gelační koncentrace na 8 %.

Rozpouštění vzorku č. 2 bylo znatelně kratší dobu, ve srovnání se vzorkem č. 3, který není modifikován kyselinou itakonovou. U vzorku č. 2 o M_n 5 563 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a s poměrem PLGA/PEG = 2 byla stanovena kritická gelační teplota na 36 °C a kritická gelační koncentrace činí 6 %. U vzorku č. 3 s M_n 5 845 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a se stejným poměrem PLGA/PEG jako vzorek č. 2 byla stanovena stejná kritická gelační koncentrace, avšak vyšší kritická gelační teplota, a to 38 °C. Porovnáním těchto dvou kopolymerů bylo zjištěno, že kopolymer modifikován kyselinou itakonovou se rychleji rozpouští proto, že jeho řetězec obsahoval hydrofilní karboxylové skupiny.

U vzorku č. 4 o M_n 6 546 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a s poměrem PLGA/PEG = 2,5 byla stanovena kritická gelační koncentrace na 8 % a kritická gelační teplota na 37 °C.

Vzorky č. 5 a 6 se rozpouštěly 1 až 2 týdny. Rozpouštění vyšších a nižších koncentrací bylo velmi nestejněměrné. Nízké koncentrace se po prvním týdnu zakalily. U vzorku č. 5 a 6 nebyl pozorován sol-gel fázový přechod.

Vzorek č. 7 o M_n 7 934 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ jevil podobné nestejněměrné rozpouštění nižších a vyšších koncentrací jako vzorky 5 a 6 a rovněž u tohoto vzorku nebyl pozorován sol-gel fázový přechod.

Vzorek č. 8 o M_n 8 025 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a poměru PLGA/PEG = 2,5 naopak vůbec nevytvořil roztok, pouze nabotnal a zůstal tak stabilní.

U vzorku č. 9 s M_n 4 656 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a poměru PLGA/PEG = 2 byla stanovena kritická gelační koncentrace 12 % a kritická gelační teplota na 36 °C.

Vzorek č. 10 se velmi rychle nestejněměrně rozpouštěl a zakaloval. Nebyl u něho pozorován sol-gel fázový přechod.

Z měření sol-gel fázových diagramů je zřejmé, že se snižujícím se poměrem PLGA/PEG se zvyšovala kritická gelační teplota (CGC). Dále z tohoto měření vyplývá, že kopolymery s vyšší M_n jak 8 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ nepřecházejí do roztoku za běžné laboratorní teploty. Kopolymery modifikované kyselinou itakonovou se mnohem rychleji rozpouštějí jak nemodifikované kopolymery.

4.3 Sledování degradace PLGA-PEG-PLGA a ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA kopolymerů

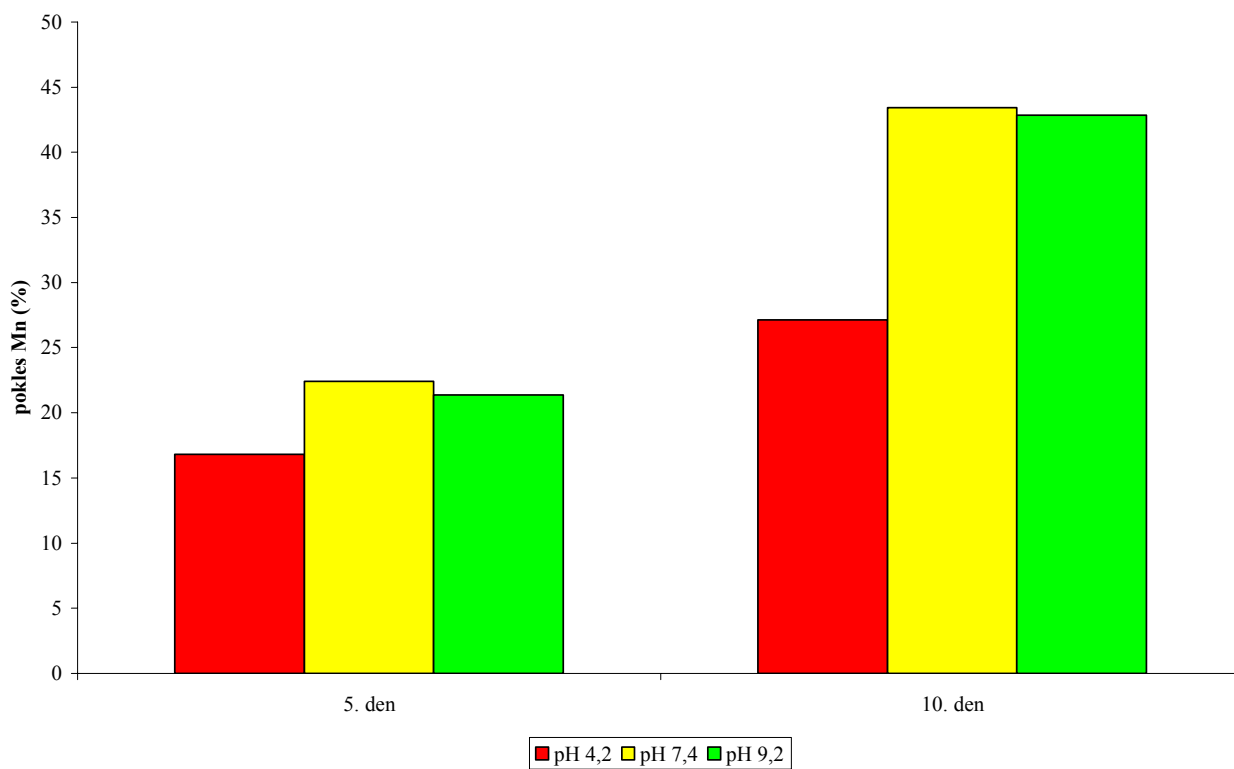
Pro samotnou degradaci byly vybrány vzorky č. 1 PLGA-PEG-PLGA, č. 2 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA a vzorek č. 3 PLGA-PEG-PLGA, další vzorky, které splňovaly požadavky sol-gel fázového přechodu v rozmezí teplot 36 – 42 °C, nemohly být dále použity z důvodu nedostatku surového kopolymeru.

Ze vzorku č. 1 byly připraveny roztoky s hmotnostní koncentrací 12, 16 a 20 %, přičemž od 20% roztoku bylo později ustoupeno, neboť se dlouho rozpouštěl. Ze vzorku č. 2 a 3 byly připraveny roztoky s hmotnostní koncentrací 16, 20 a 24 %. Degradace pro každou koncentraci probíhala v roztocích o pH 4,2; 7,4 a 9,2 při teplotě 37 °C.

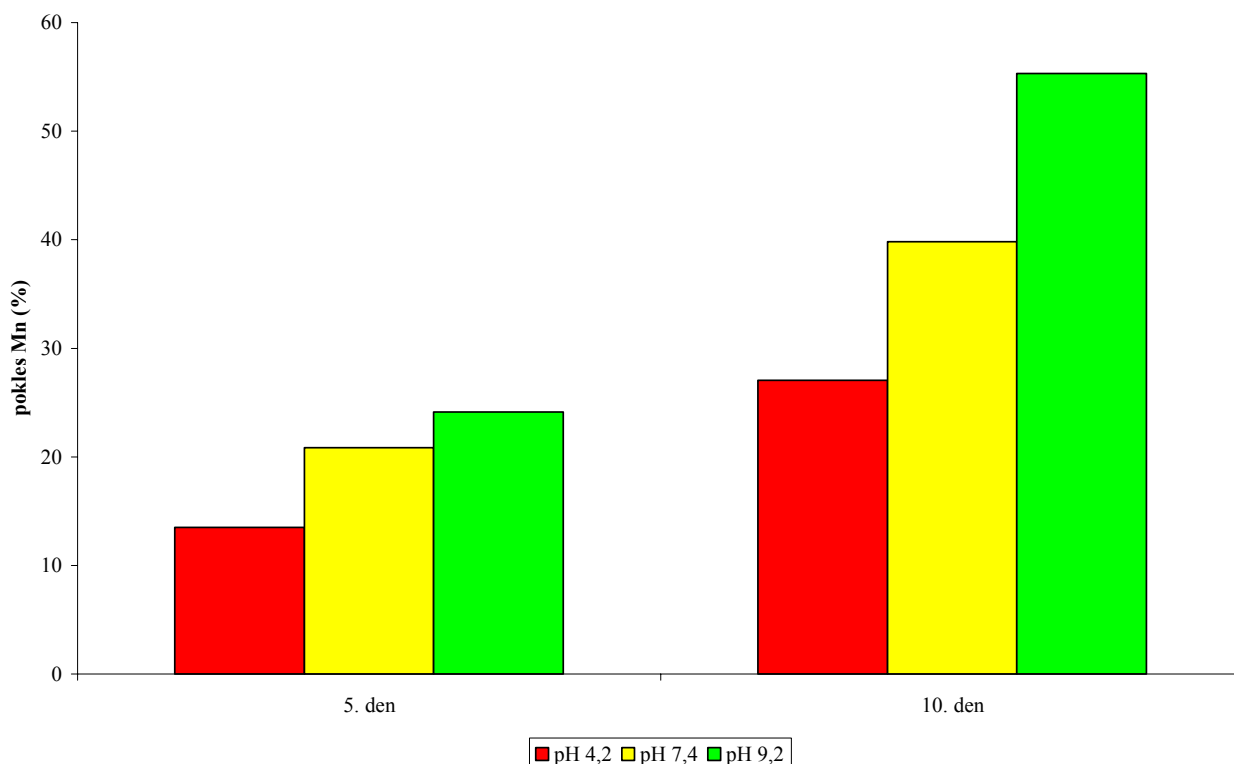
Vliv pH roztoku na průběh degradace byl sledován poklesem molekulové hmotnosti kopolymeru. Za účelem objektivního posouzení celkového průběhu degradace bylo nejvhodnější spočítat procentuální pokles molekulové hmotnosti, protože počáteční molekulová hmotnost kopolymeru nebyla nikdy stejná. Doba degradace byla zvolena pro všechny vzorky stejná, a to 5 a 10 dní. Procentuální pokles molekulové hmotnosti v závislosti na době degradace byl proložen přímkou lineární regrese a procentuální pokles pro zvolené doby degradace byl vypočten z rovnice regrese.

Tabulka 9: Pokles molekulové hmotnosti Mn (%) po 5 a 10 dnech degradace pro vzorek č. 1

pokles molekulové hmotnosti Mn (%)				
koncentrace	12 %		16 %	
dobu degradace	5. den	10. den	5. den	10. den
pH=4,2	16,8	27,1	13,5	27,1
pH=7,4	22,4	43,4	20,8	39,8
pH=9,2	21,4	42,8	24,1	55,3



Obr. 26: Vzorek č. 1; koncentrace 12 %; vliv pH na pokles molekulové hmotnosti Mn (%) pro dobu degradace 5 a 10 dní

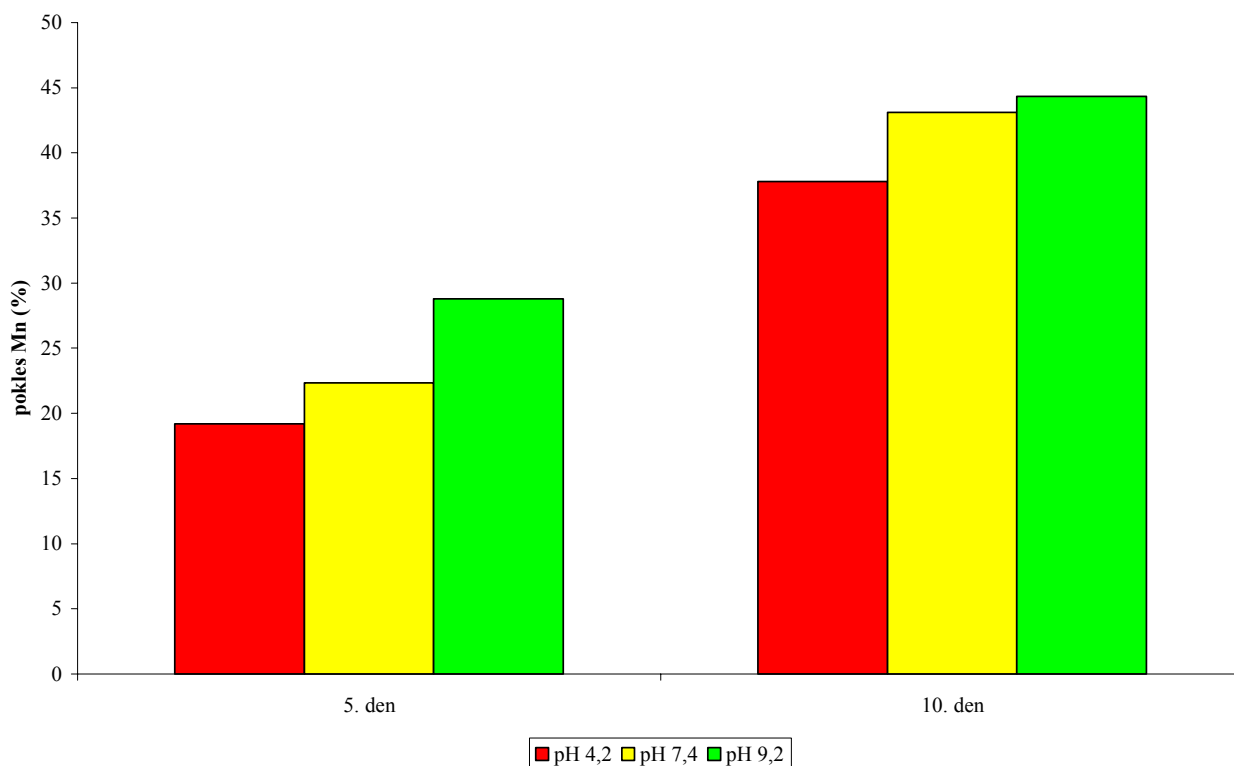


Obr. 27: Vzorek č. 1; koncentrace 16 %; vliv pH na pokles molekulové hmotnosti Mn (%) pro dobu degradace 5 a 10 dní

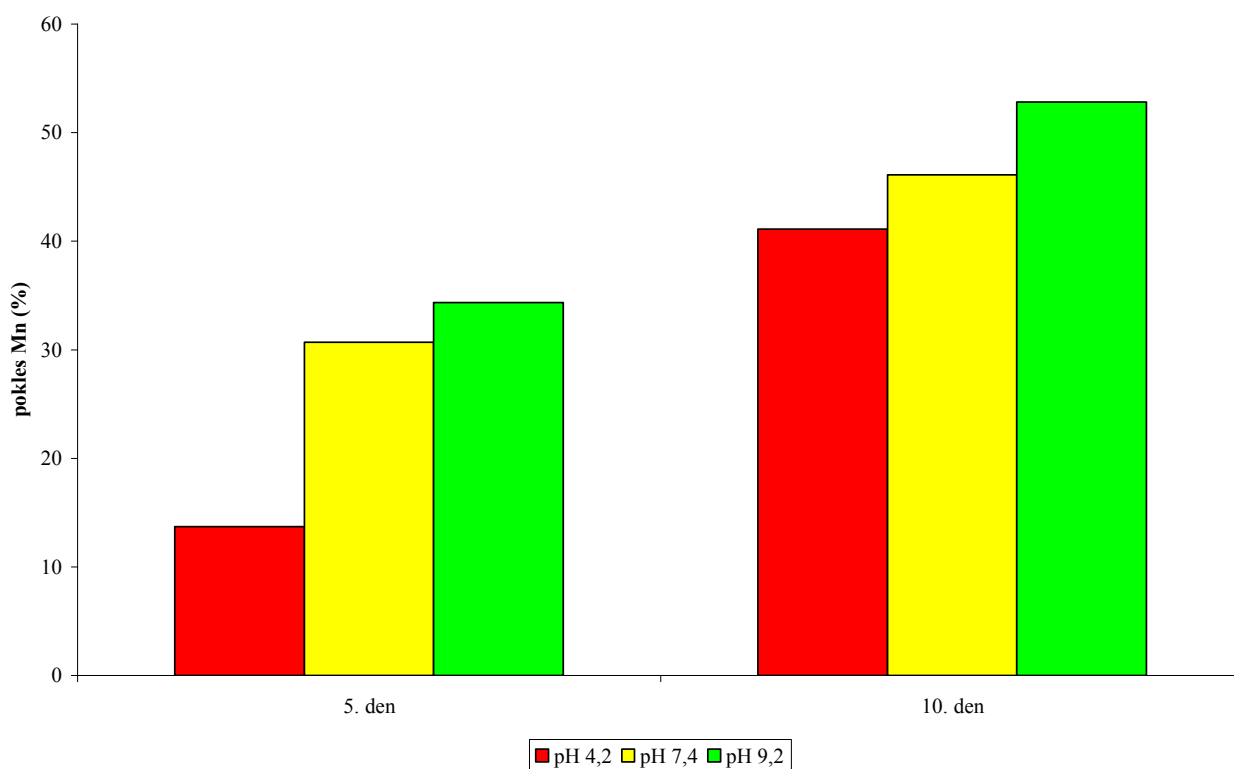
Z tabulky č. 9 vyplývá, že nejnižší pokles molekulové hmotnosti pro všechny koncentrace byl při degradaci v roztoku při pH 4,2, což bylo znatelné i vizuálně. Po prvním dnu degradace došlo k poklesu hladiny hydrogelu a vytvoření kompaktnější struktury. Právě vytvoření této kompaktnější struktury mělo za následek ztížené pronikání roztoku k vazbám kopolymeru a tím také zpomalení štěpení. Pro koncentraci 12 % není tak velký rozdíl mezi degradací v pufru při pH 7,4 a v roztoku při pH 9,2. Pro koncentraci 16 % nejrychleji probíhala degradace v roztoku při pH 9,2; i při těchto podmínkách byla zaznamenána vizuální změna po prvních dnech degradace. Hydrogel se mnohem rychleji rozpouštěl a vrstva tvořící rozhraní mezi gelem a samotným roztokem byla mnohem vyšší, než při degradaci při pH 7,4.

Tabulka 10: Pokles molekulové hmotnosti Mn (%) vzorku č. 2 po 5 a 10 dnech degradace

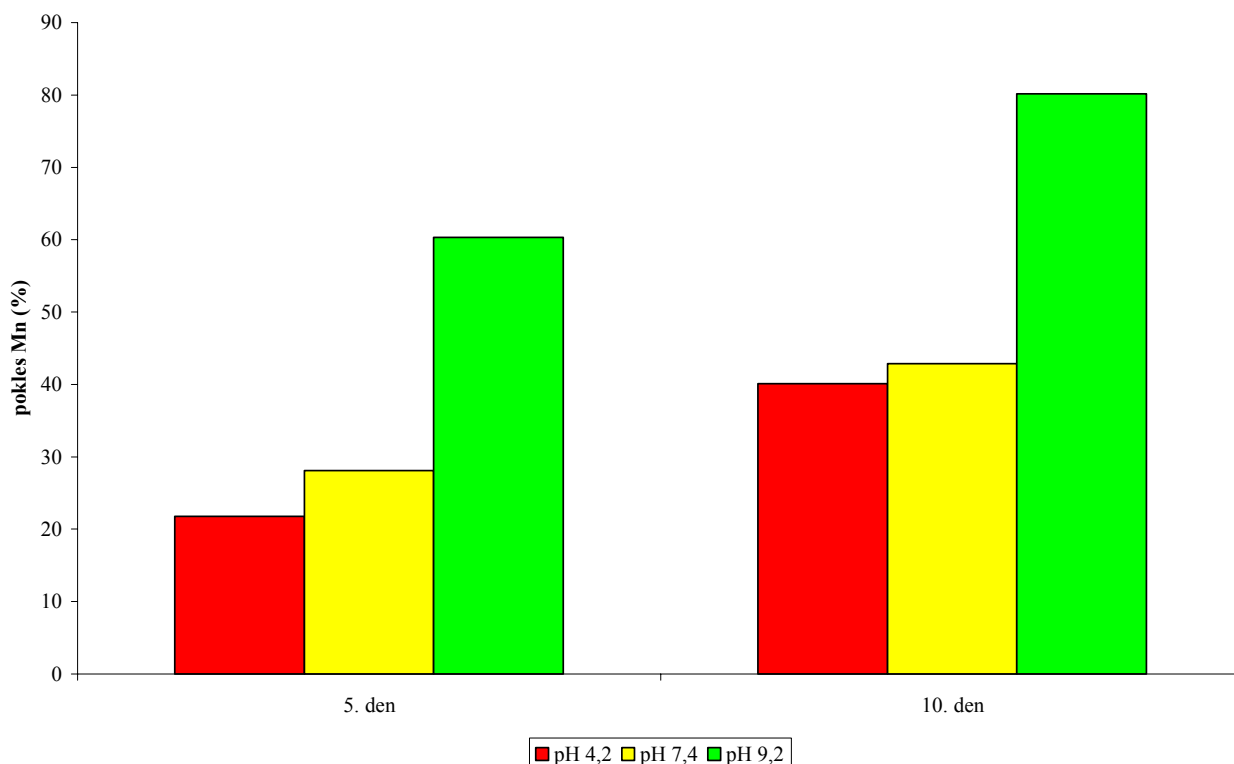
pokles molekulové hmotnosti Mn (%)						
koncentrace	16 %		20 %		24 %	
doba degradace	5. den	10. den	5. den	10. den	5. den	10. den
pH=4,2	19,2	37,8	13,7	41,1	21,8	40,1
pH=7,4	22,3	43,1	30,7	46,1	28,1	42,9
pH=9,2	28,8	44,3	34,4	52,8	60,3	80,2



Obr. 28: Vzorek č. 2, koncentrace 16 %: vliv pH na pokles molekulové hmotnosti Mn (%) pro dobu degradace 5 a 10 dní



Obr. 29: Vzorek č. 2, koncentrace 20 %: vliv pH na pokles molekulové hmotnosti Mn (%) pro dobu degradace 5 a 10 dní



Obr. 30: Vzorek č. 2, koncentrace 24 %: vliv pH na pokles molekulové hmotnosti Mn (%) pro dobu degradace 5 a 10 dní

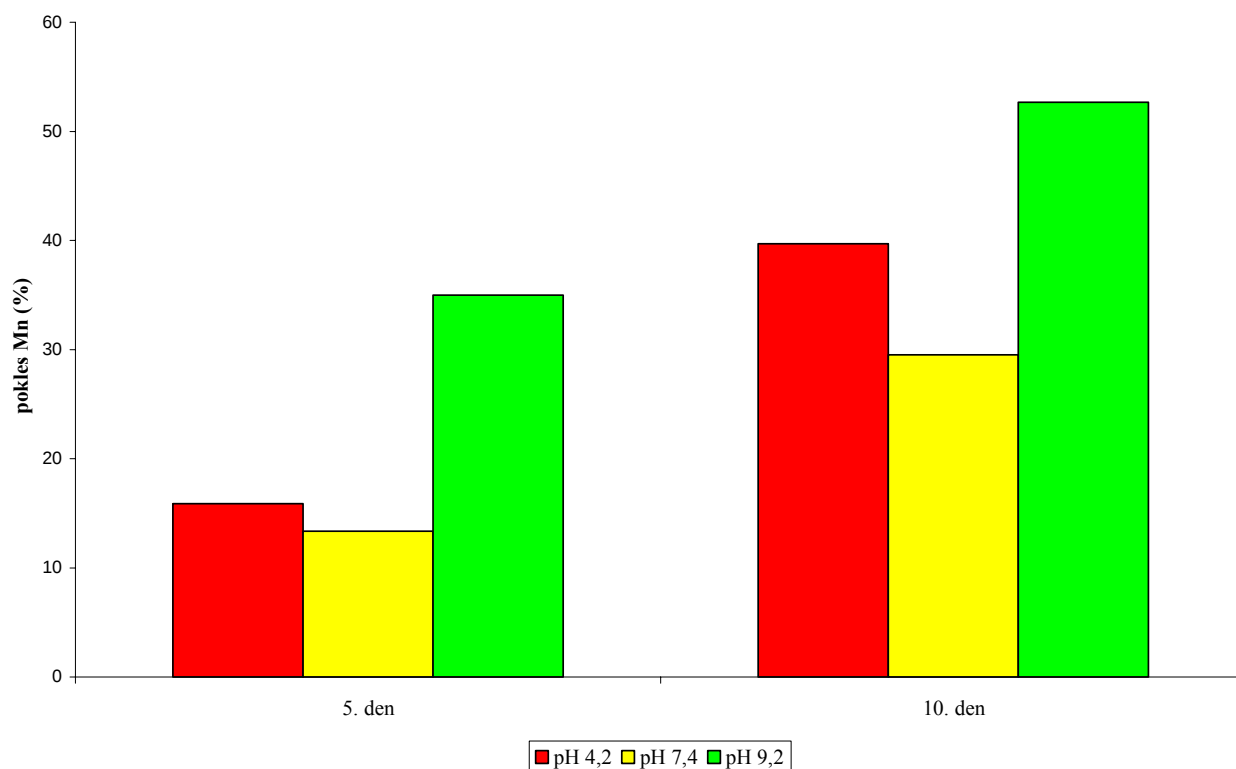
U vzorku č. 2 s hmotnostní koncentrací 16 % lze pozorovat jen malý rozdíl v procentickém poklesu molekulové hmotnosti po 5 dnech degradace při pH 4,2 a 7,4. Strmější průběh degradace je viditelný až při 10. dnu u pH 7,4. Největší procentický pokles molekulové hmotnosti byl zaznamenán pro 5. den degradace při pH 9,2, avšak další procentický pokles Mn již není tak výrazný.

20% vzorek č. 2 měl největší procentický pokles molekulové hmotnosti jak po pěti, tak i po deseti dnech degradace při pH 9,4. Nejnižší procentický pokles byl opět zaznamenán při pH 4,2.

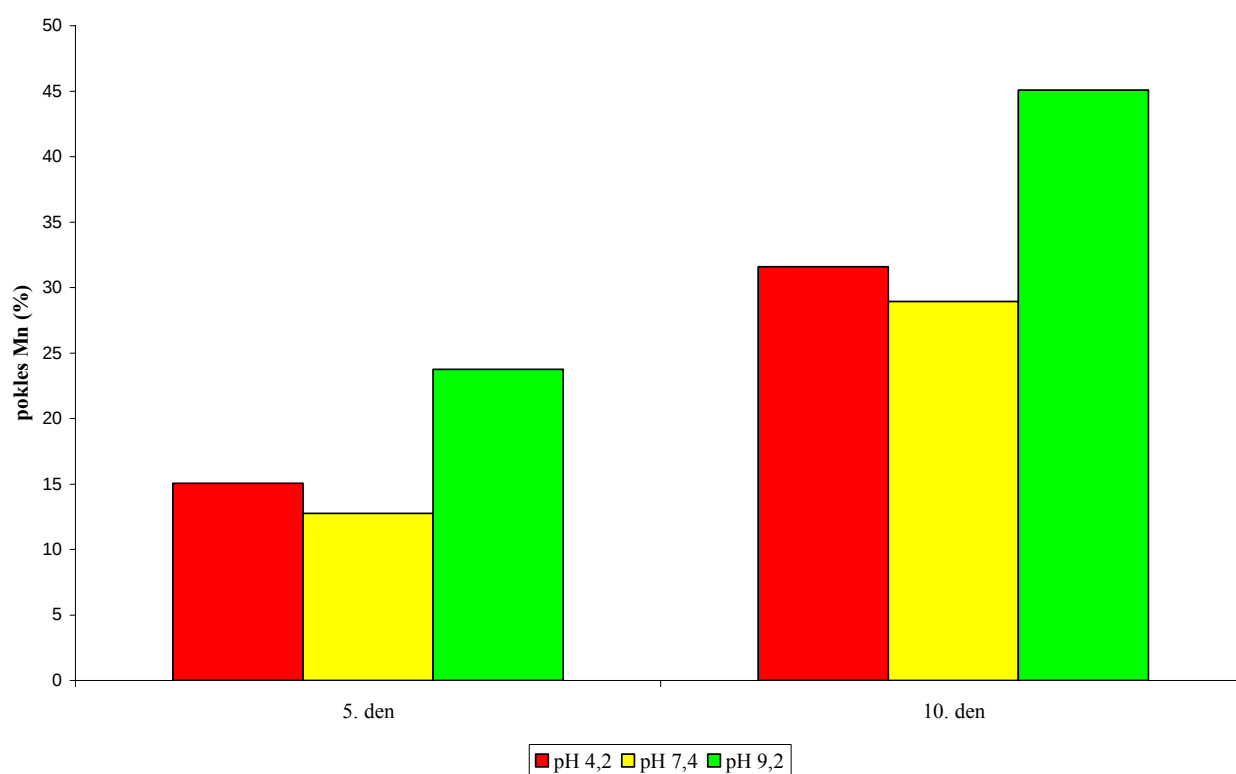
Rozdíl mezi 5. dnem degradace při pH 4,2 a 7,4 u 24% vzorku je 6,3 %, se zvyšující se dobou degradace tento rozdíl klesá. Procentický pokles molekulové hmotnosti při degradaci v roztoku při pH 9,2 byl vypočten z rovnice regrese, která vycházela z procentického poklesu Mn měřeného po dobu 4 dnů, kdy byl odběr prováděn dvakrát za den.

Tabulka 11: Pokles molekulové hmotnosti Mn (%) vzorku č. 3 po 5 a 10 dnech degradace

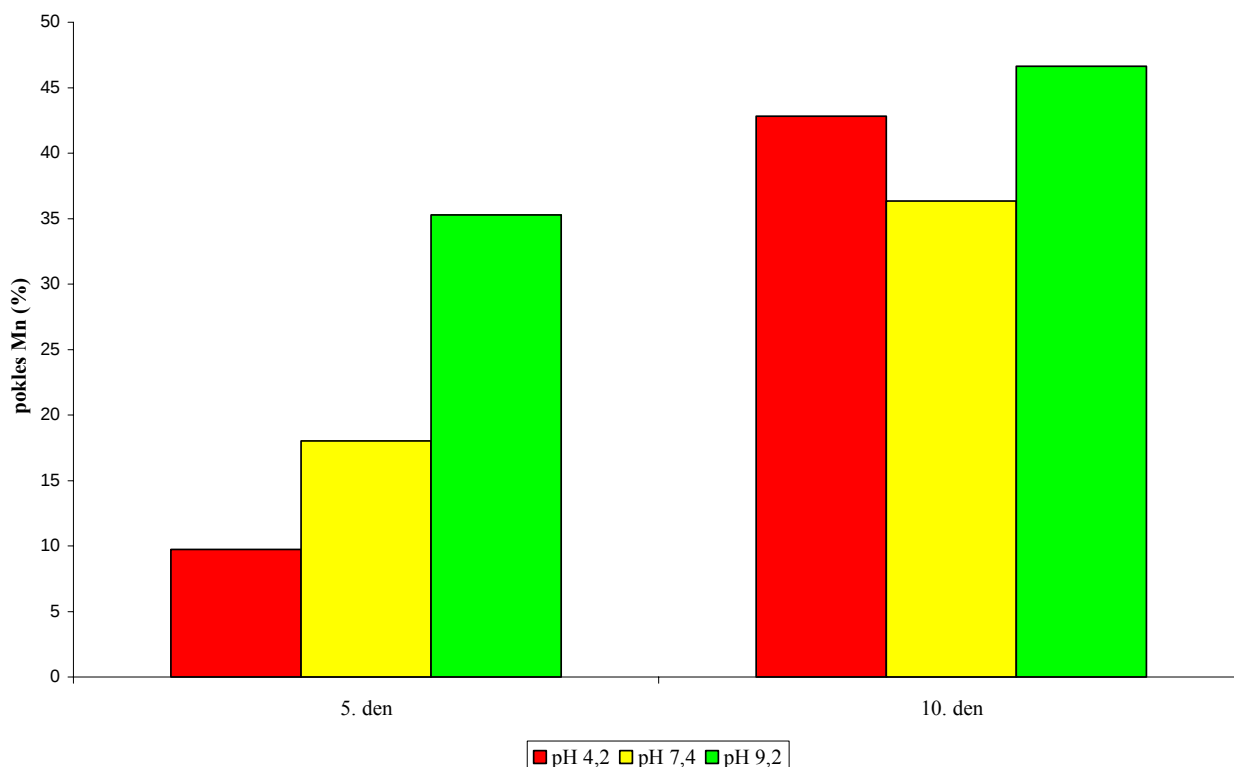
pokles molekulové hmotnosti Mn (%)						
koncentrace	16 %		20 %		24 %	
doba degradace	5. den	10. den	5. den	10. den	5. den	10. den
pH=4,2	15,9	39,7	15,1	31,6	9,7	42,8
pH=7,4	13,3	29,5	12,7	28,9	18,0	36,3
pH=9,2	35,0	52,7	23,8	45,1	35,3	46,6



Obr. 31: Vzorek č. 3, koncentrace 16 %: vliv pH na pokles molekulové hmotnosti Mn (%) pro dobu degradace 5 a 10 dní

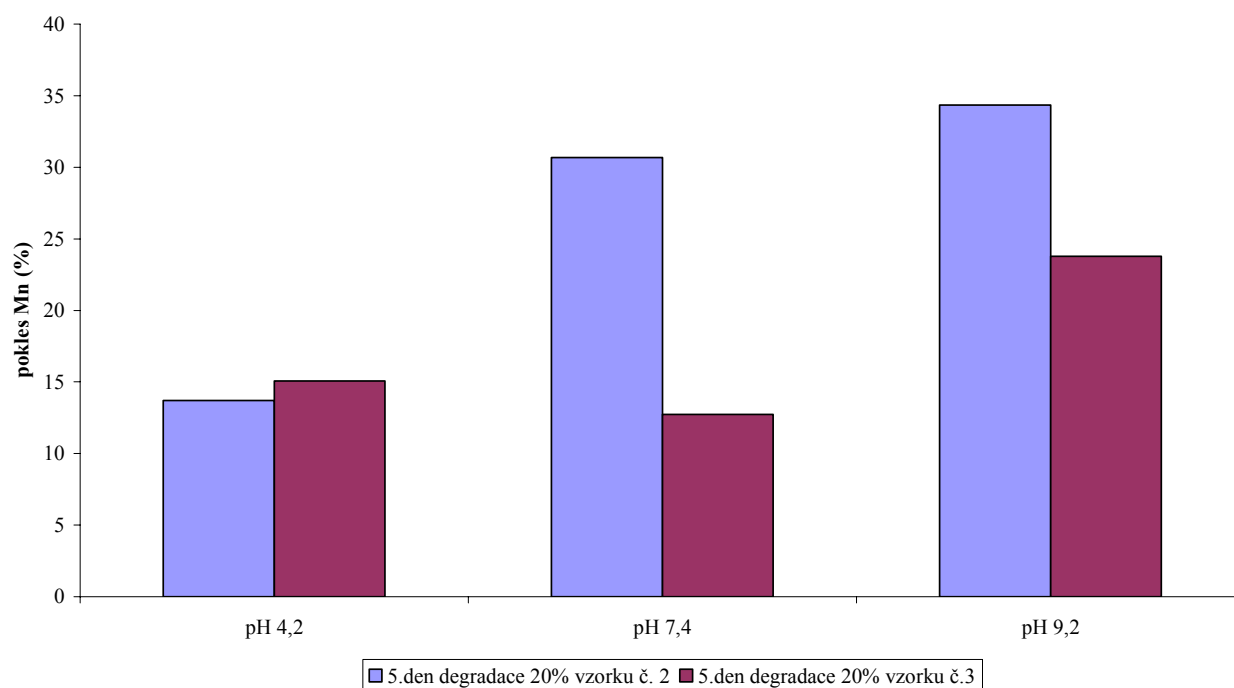


Obr. 32: Vzorek č. 3, koncentrace 20 %: vliv pH na pokles molekulové hmotnosti Mn (%) pro dobu degradace 5 a 10 dní

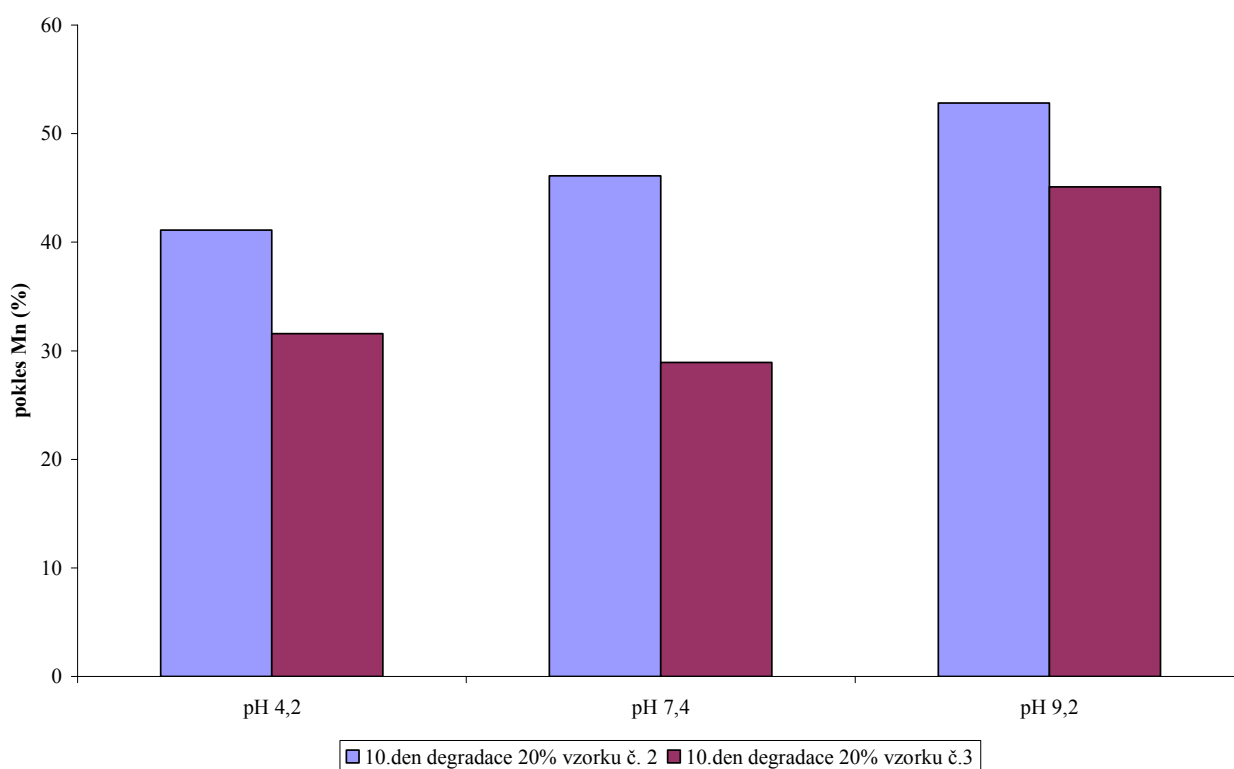


Obr. 33: Vzorek č. 3, koncentrace 24 %: vliv pH na pokles molekulové hmotnosti Mn (%) pro dobu degradace 5 a 10 dní

U koncentrací 16 a 20 % vzorku č. 3 lze vypočítat nižší procentický pokles molekulové hmotnosti při degradaci v pufru o pH 7,4, než při pH 4,2, jak tomu bylo v předchozích případech. Degradace ve fosfátovém pufru byla provedena z čerstvě vyrobeného kopolymeru, zatímco degradace ve zbylých roztocích byla provedena téměř až po roce. I když byl kopolymer uchovávan v chladicím boxu, docházelo k jeho degradaci. Tím může být vysvětlena větší náchylnost ke štěpení, a proto i vyšší procentický pokles Mn při degradaci v roztoku o pH 4,2.



Obr. 34: Porovnání 20% vzorků č. 2 a č. 3 po pěti dnech degradace

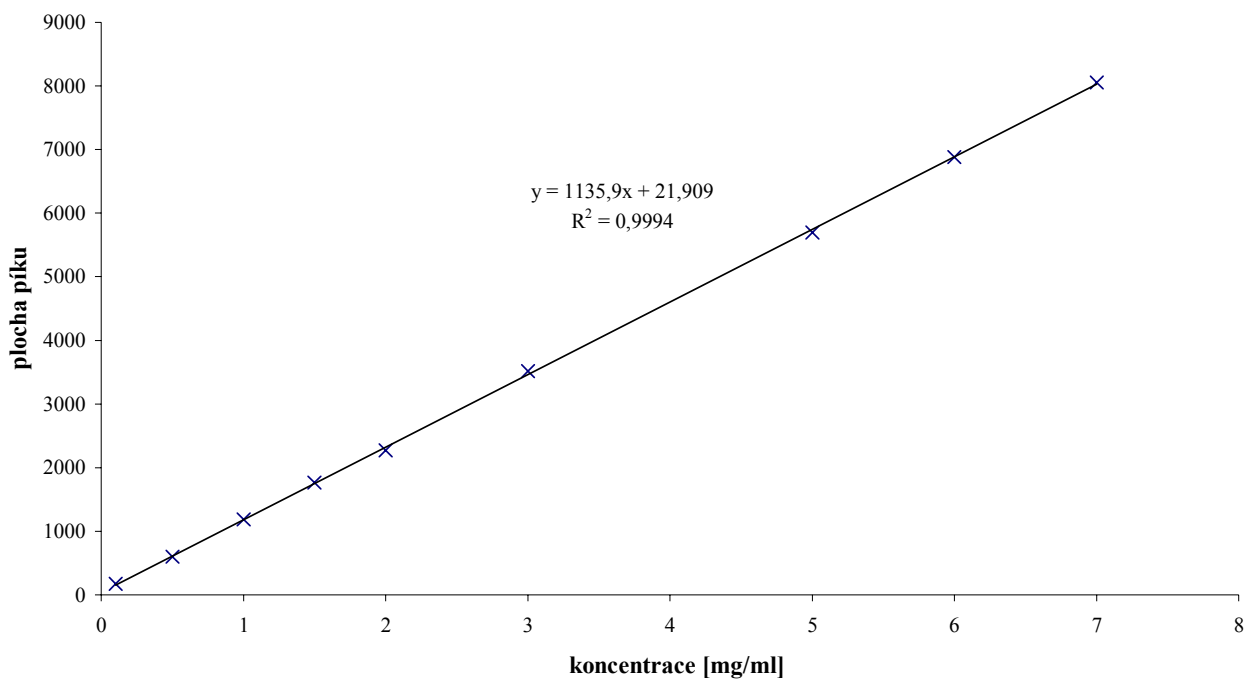


Obr. 35: Porovnání 20% vzorků č. 2 a č. 3 po deseti dnech degradace

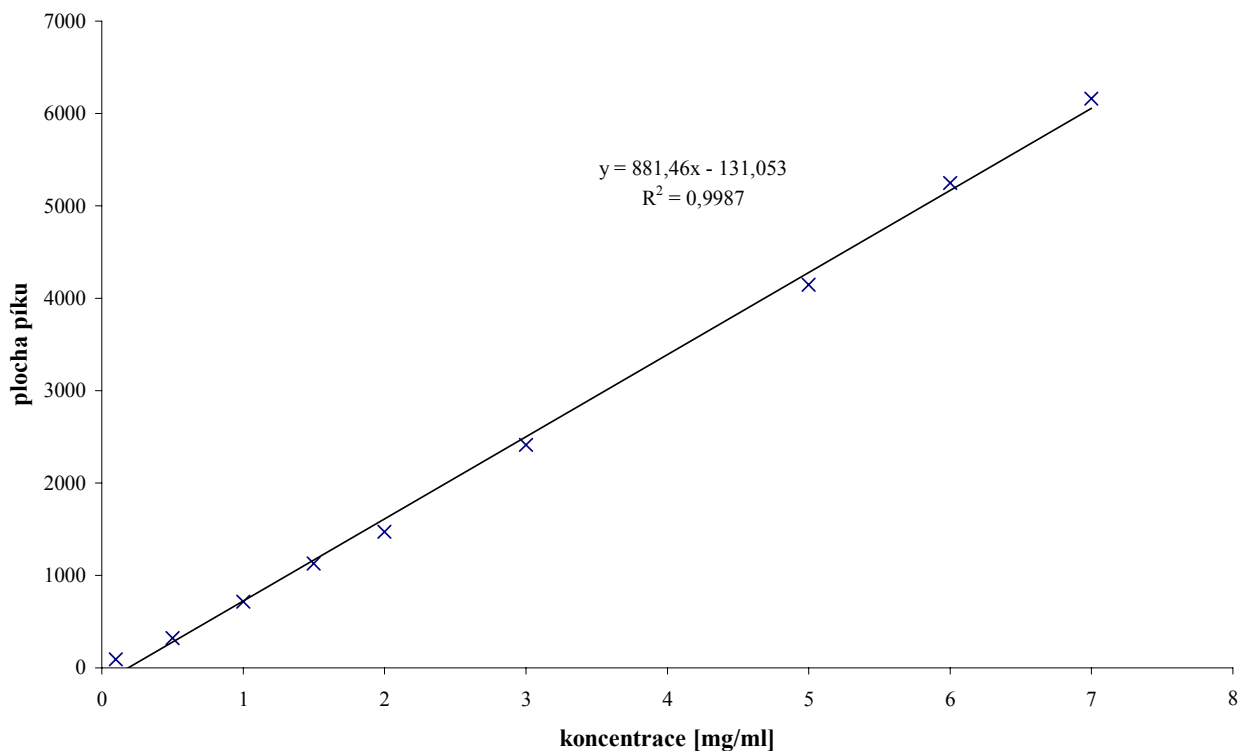
Vzorek č. 2 a 3 mají stejné poměry PLGA/PEG i poměr PLA/PGA. Vzorek č. 2 je navíc modifikován kyselinou itakonovou. Z výše uvedených grafů je znatelné, že lépe podléhal degradaci vzorek upravený kyselinou itakonovou.

4.4 Identifikace a kvantifikace uvolněných kyselin pomocí HPLC

Při degradaci byla sledována zvyšující se koncentrace kyseliny mléčné a glykolové v roztoku. Jednotlivé analyty byly vyhodnoceny pomocí kalibrační závislosti plochy píků na koncentracích jednotlivých kyselin. Kalibrační roztoky byly připraveny jako směsný standard kyseliny glykolové a mléčné.



Obr. 36: Kalibrační křivka kyseliny mléčné



Obr. 37: Kalibrační křivka kyseliny glykolové

Byla vypočtena mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) ze šumu základní linie. Nejdříve byla odečtena výška píků kyseliny glykolové a mléčné z nejnižšího bodu kalibrace a následně bylo vybráno 15 píků zastupujících šum po celé linii v reálném vzorku. Mez detekce představuje koncentraci, jejíž odezva na detektoru bude mít poměr signálu k šumu větší než 3. Mez stanovitelnosti je koncentrace, jejíž odezva na detektoru bude mít poměr signálu k šumu větší než 10. S ve vzorci představuje výšku signálu analytu, N ve vzorci představuje výšku signálu šumu.

$$LOD \left(mg.ml^{-1} \right) = 3 \cdot \left(\frac{c \left(mg.ml^{-1} \right)}{S/N} \right) \quad (5)$$

$$LOQ \left(mg.ml^{-1} \right) = 10 \cdot \left(\frac{c \left(mg.ml^{-1} \right)}{S/N} \right) \quad (6)$$

Tabulka 12: Mez detekce a mez stanovitelnosti v přehledu

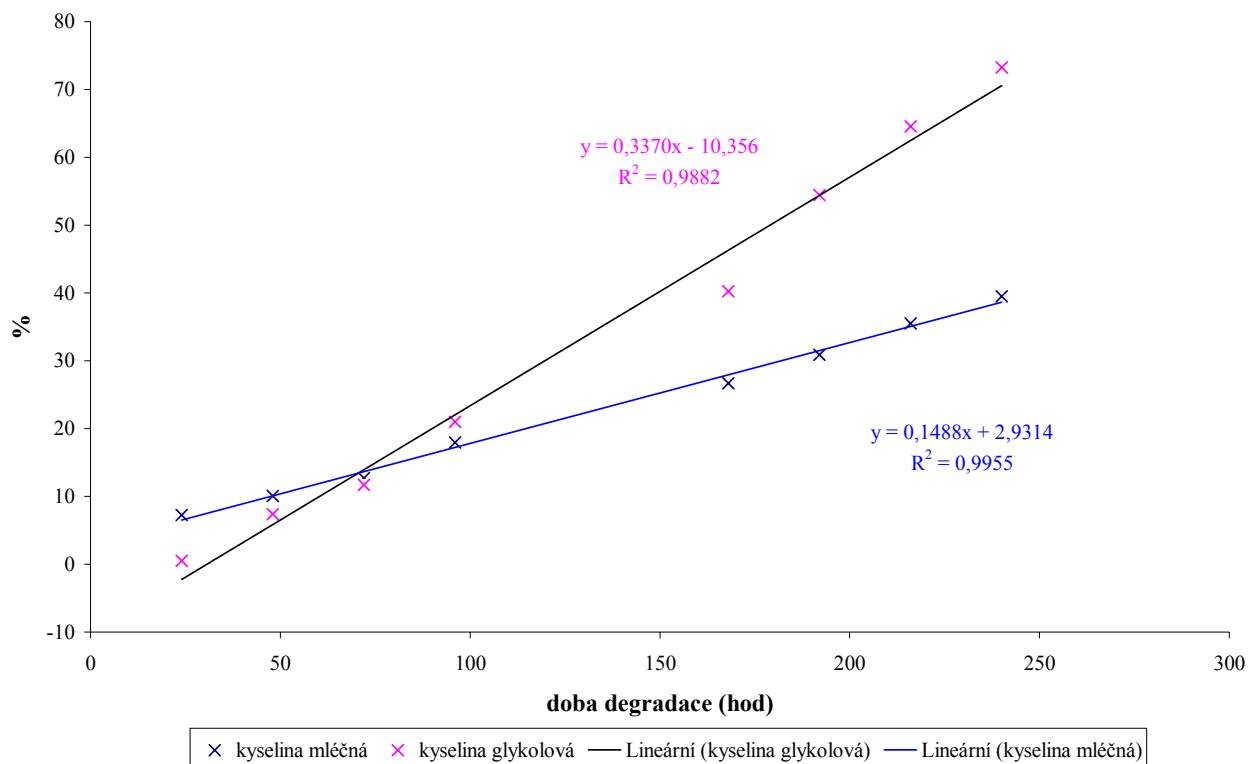
	mez detekce LOD (mg.ml ⁻¹)	mez stanovitelnosti LOQ (mg.ml ⁻¹)
kyselina glykolová	0,0044	0,0146
kyselina mléčná	0,0048	0,0162

Během prvních dnů degradace nebyla detekována kyselina glykolová, a to zejména u vzorků s nízkou hmotnostní koncentrací. To je dáno samotným poměrem kyseliny glykolové a mléčné v kopolymeru. U všech použitých vzorků byl poměr PLA/PGA = 3. Na rozdíl od kyseliny glykolové byla kyselina mléčná téměř vždy detekována po prvním dnu degradace. To je nejspíš způsobeno počínající degradací kopolymeru již při rozpouštění xerogelu v deionizované vodě, a to na požadovanou hmotnostní koncentraci vzorku. Pravděpodobně se takto uvolňuje i kyselina glykolová, ale vzhledem k jejímu nízkému poměru v kopolymeru byla její koncentrace pod mezí detekce.

Aby mohlo být porovnání uvolňování obou kyselin, musely být přepočítány na procento uvolněných kyselin z teoretického množství kyseliny mléčné a glykolové, které bylo dáno hmotnostní koncentrací roztoku, hmotností polymeru v pipetovaném objemu 300 µl a poměrem PLGA/PEG. Pro kyselinu mléčnou i glykolovou byla vypočtena doba, za kterou dosáhne uvolnění kyselin 5 %.

V tabulce č. 13, 14 a 15 je uveden počet hodin potřebných k uvolnění 5 % kyseliny mléčné a glykolové z teoretického množství kyselin obsažených v kopolymeru. Závislost koncentrace na době degradace byla vyjádřena pomocí lineární regrese a následně z ní byla vypočtena doba potřebná pro degradaci 5 % kyseliny mléčné a glykolové.

Na obrázku 38 je zobrazena závislost procentického uvolnění kyselin na době degradace. Body byly proloženy lineární regresí, aby byl znatelný strmější průběh uvolňování kyseliny glykolové. Dále je z rovnice lineární regrese kyseliny mléčné zřejmé, že se ve vzorku nějaké množství uvolněné kyseliny mléčné nacházelo ještě před začátkem degradace v inkubátoru.

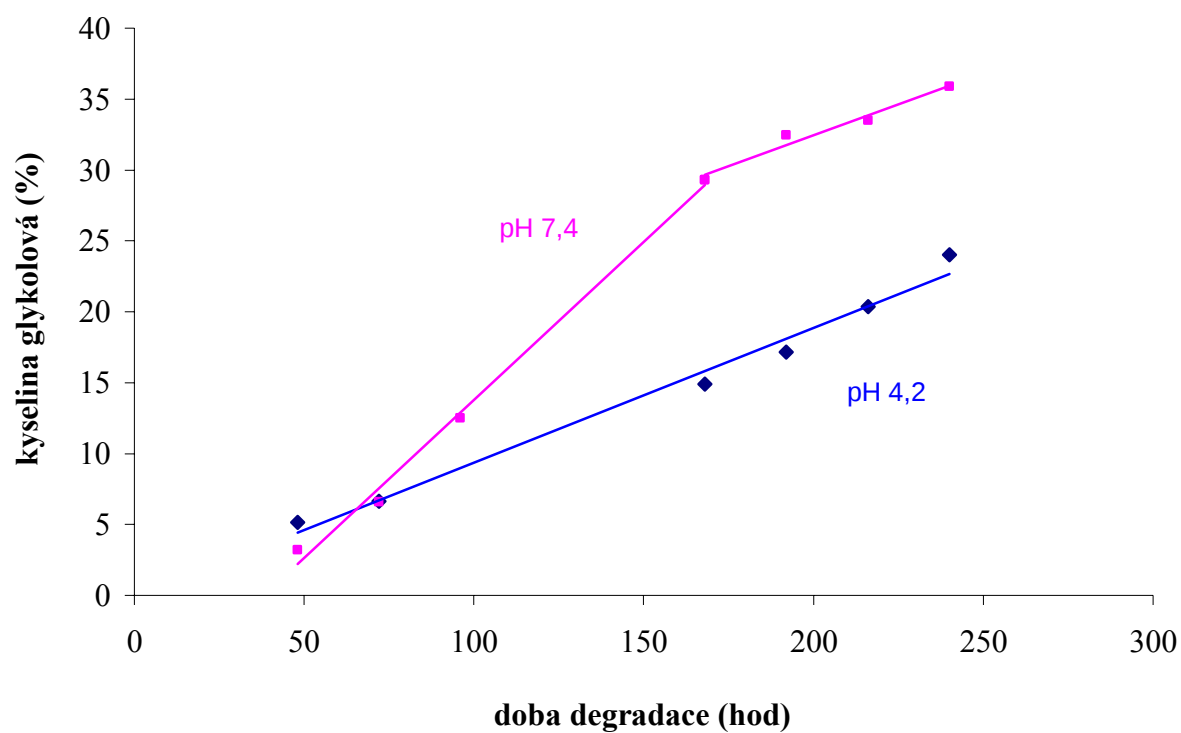


Obr. 38: 16% vzorek č. 2, závislost uvolněných kyselin v procentech na době degradace ve fosfátovém pufru o pH=7,4

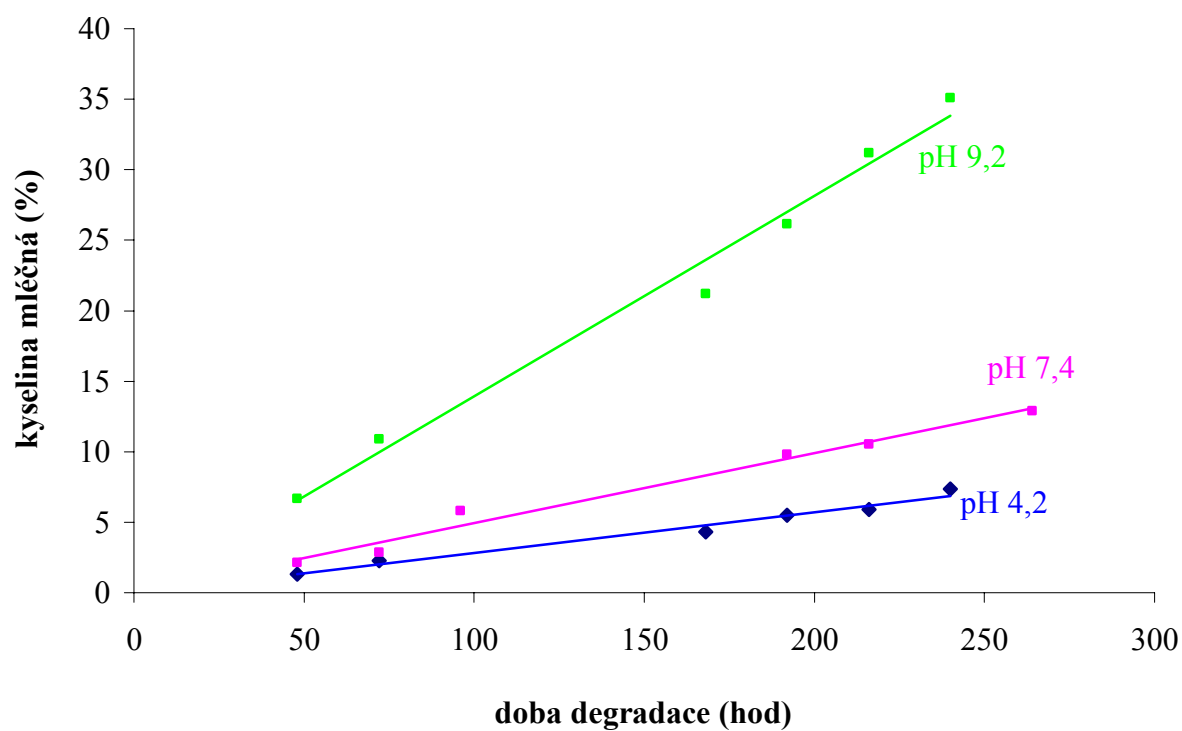
Tabulka 13: Vzorek č. 1: počet hodin potřebných k uvolnění 5 % kyseliny mléčné a glykolové

Počet hodin potřebných k uvolnění 5 % kyselin				
koncentrace	12 %		16 %	
	kyselina glykolová	kyselina mléčná	kyselina glykolová	kyselina mléčná
pH=4,2	52 hod	185 hod	31 hod	95 hod
pH=7,4	56 hod	101 hod	58 hod	76 hod
pH=9,2	—	35 hod	—	53 hod

Z tabulky č. 13 je patrné, že se zvyšující se hmotnostní koncentrací roztoku se rychlost degradace zvyšuje. To může být způsobeno například tím, že vzorek s vyšší koncentrací mohl být před začátkem cílené degradace více rozložen a uvolněné kyseliny mohly urychlit autokatalýzu degradace. Nejrychleji se opět uvolňovaly pravděpodobně obě kyseliny při degradaci v roztoku o pH 9,2. Kyselina glykolová při pH 9,2 nebyla vyhodnocována, protože zásadité pH změnilo podmínky separace při analýze na HPLC.



Obr. 39: Vliv pH na průběh uvolňování kyseliny glykolové z 12% vzorku č. 1

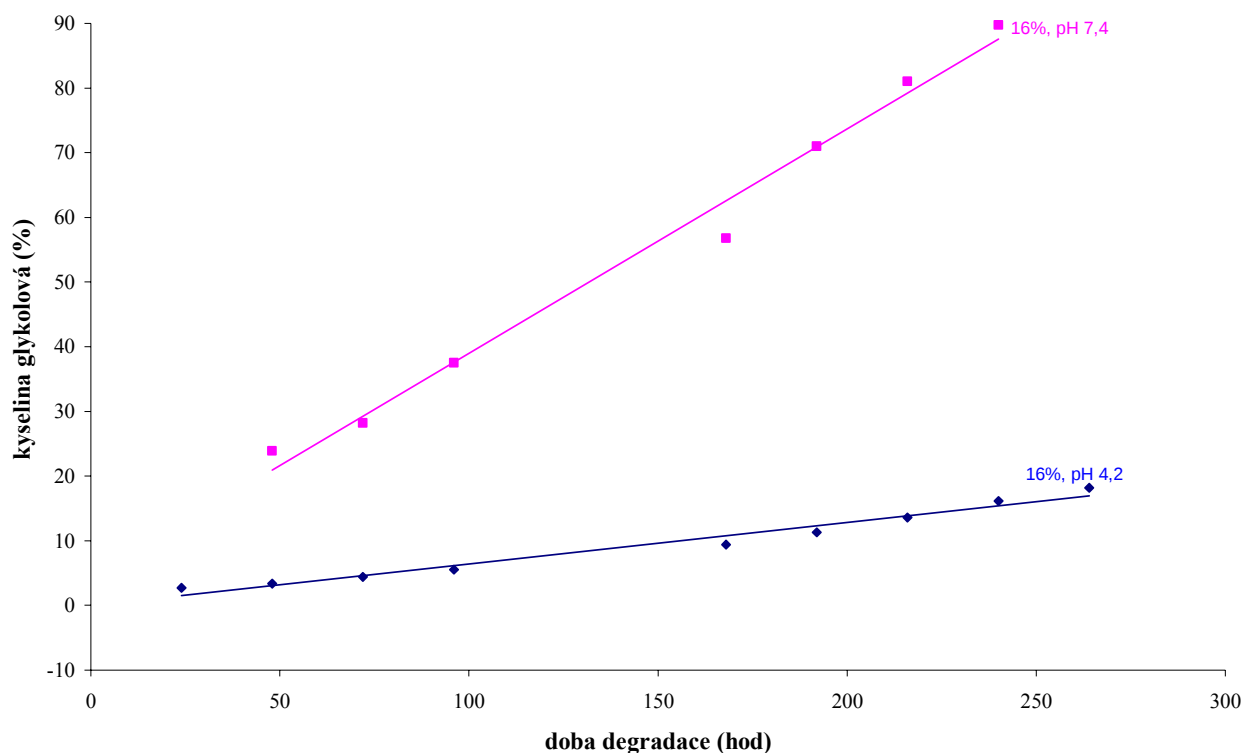


Obr. 40: Vliv pH na průběh uvolňování kyseliny mléčné z 12% vzorku č. 1

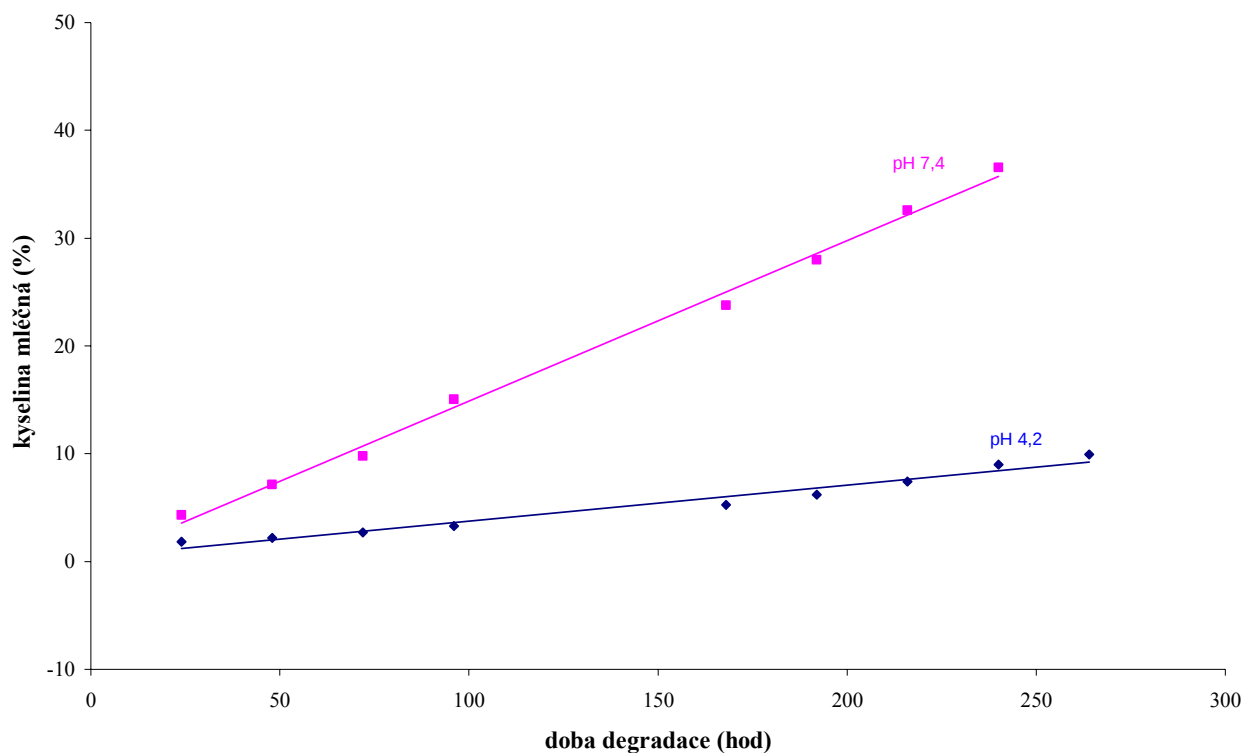
Tabulka 14: Vzorek č. 2: počet hodin potřebných k uvolnění 5 % kyseliny mléčné a glykolové

Počet hodin k uvolnění 5 % kyselin						
koncentrace	16 %		20 %		24 %	
	kyselina glykolová	kyselina mléčná	kyselina glykolová	kyselina mléčná	kyselina glykolová	kyselina mléčná
pH=4,2	78	141	94	127	94	221
pH=7,4	13	34	36	56	18	25

Z tabulky č. 14 je patrné, že nejrychleji degradoval vzorek č. 2 při degradaci ve fosfátovém pufru. Ve srovnání s degradací v roztoku o pH 4,2 je rychlost uvolňování pro kyselinu glykolovou téměř 6 krát vyšší (koncentrace 16 %). Se zvyšující se hmotnostní koncentrací se rozdíly v rychlosti uvolňování kyseliny glykolové snižují; to platí i pro kyselinu mléčnou. Opět i v tomto případě rychlost uvolňování kyseliny mléčné není tak rychlá ve srovnání s kyselinou glykolovou. To je způsobeno tím, že ve srovnání s PGA je blok PLA mnohem hydrofobnější a vazby jsou méně náchylné k hydrolytickému štěpení.



Obr. 41: Vliv pH na průběh uvolňování kyseliny glykolové z 16% vzorku č. 2

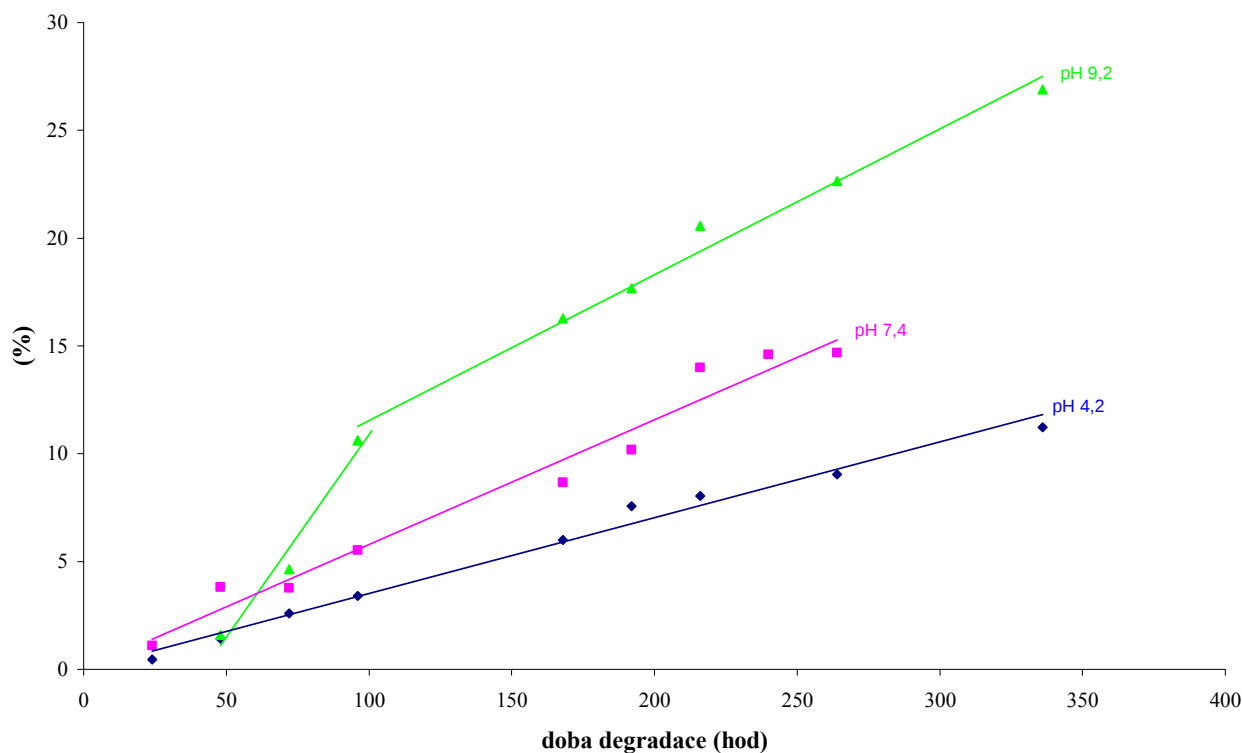


Obr. 42: Vliv pH na průběh uvolňování kyseliny mléčné z 16% vzorku č. 2

Tabulka 15: Vzorek č. 3: počet hodin potřebných k uvolnění 5 % kyseliny mléčné a glykolové

koncentrace	Počet hodin k uvolnění 5 % kyselin					
	16 %		20 %		24 %	
	kyselina glykolová	kyselina mléčná	kyselina glykolová	kyselina mléčná	kyselina glykolová	kyselina mléčná
pH=4,2	64 hod	106 hod	58 hod	126 hod	58 hod	134 hod
pH=7,4	29 hod	86 hod	32 hod	79 hod	31 hod	85 hod
pH=9,2	—	58 hod	—	—	—	84 hod

U vzorku č. 3 opět probíhala degradace nejrychleji při zásaditém pH. Rozdíly mezi degradací v neutrálním prostředí a v prostředí mírně kyselém nejsou tak výrazné jako u vzorku č. 2, který je upravený kyselinou itakonovou. Nejrychleji probíhalo uvolňování kyselin u 16% vzorku.



Obr. 43: Vliv pH na průběh uvolňování kyseliny mléčné z 16% vzorku č. 3

4.5 Identifikace degradačních produktů pomocí HPLC/MS

V této části práce byla pomocí přímé infuze měřena hmotnostní spektra vzorku pufru o pH 7,4 po degradaci polymeru. Pozornost byla zaměřena především na pochopení průběhu fragmentace delších polymerních řetězců uvolněných během degradace a určení, který fragment přísluší dané struktuře. Toto je nutné pro výpočet molekulových hmotností z MS spekter, další sledování průběhu degradace (LC/MS) a porovnání jednotlivých typů polymerů, bude prováděno v dalších navazujících studiích v rámci dizertační práce.

Nejprve byly připraveny zvlášť roztoky standardů kyseliny mléčné a glykolové o koncentracích 1 mg.ml^{-1} , přičemž ředění probíhalo směsí rozpouštědel methanol – voda v poměru 20:80. Potom byly provedeny přímé infuze kyseliny mléčné a glykolové do iontové pasti a sken spekter v negativním módu. U standardu kyseliny mléčné byl izolován iont 161 m/z , který měl vysokou intenzitu. U tohoto iontu byla provedena analýza MS^2 .

Pro měření byl vybrán 24% vzorek č. 3 po 8 dnech degradace ve fosfátovém pufru o pH 7,4. Ke $100 \mu\text{l}$ této směsi degradačních produktů a fosfátového pufru bylo přidáno $800 \mu\text{l}$ Milli-Q vody a $100 \mu\text{l}$ methanolu. Znovu byl proveden přímý nástřik a záznam spekter. Rozsahy a cílové hmoty jsou uvedeny v tabulce č. 16. Tyto parametry výrazně ovlivňují podobu výsledného MS spektra. Níže uvedená spektra byla naměřena při těchto parametrech: $50 - 1000 \text{ m/z}$. Za účelem zjištění principu fragmentace degradačních produktů kopolymeru byly izolovány fragmenty s vysokou intenzitou a podrobeny analýze MS^2 a popřípadě i MS^3 .

4.5.1 Vysvětlení principu fragmentace degradačních produktů PLGA-PEG-PLGA kopolymerů

V této kapitole jsou uvedeny a vysvětleny možné průběhy fragmentace jednotlivých iontů pozorovaných v celkovém MS spektru (obr. 44). Při prvním pohledu se ve spektru objevují dvě fragmentační řady píků označených na obrázku písmeny A, B, C a čísla 1, 2. Tyto skupiny píků se pravidelně opakují. Píky ze skupiny označené 1 a 2 mají vždy nižší intenzitu. Za účelem zjištění principu fragmentace degradačních produktů kopolymeru byly izolovány prekursory s vysokou intenzitou a podrobeny další analýze MS² a popřípadě i MS³.

Prekursor 291 m/z se může fragmentovat dvěma způsoby. První způsob: nejprve se z prekursoru 291 m/z odštěpí neutrální ztráta 131 a vznikne iont 161 m/z (aniont dimeru kyseliny mléčné), ze kterého se poté odštěpí neutrální ztráta 72 a vznikne iont kyseliny mléčné. Druhým způsobem se iont fragmentuje následovně: z prekursoru 219 se odštěpí neutrální ztráta 144, vznikne iont 147 m/z. Fragmentací hmoty 147 m/z je odštěpena neutrální ztráta 58 a vzniká iont kyseliny mléčné 89 m/z.

Podobná fragmentace probíhala také u izolovaného prekursoru 305 m/z, který byl podroben MS². Produktové spektrum prekursoru 305 m/z je prezentováno na obr. 49. Nejprve byla odštěpena neutrální ztráta 144, ze které byla opět odštěpena neutrální ztráta o hodnotě 72. Takto byl získán iont kyseliny mléčné 89 m/z.

Fragmentace prekursoru 363 m/z probíhala z obou konců polymerního řetězce; viz obr. 50. Nejprve byla odštěpena neutrální ztráta 72, a tak vznikl iont 291 m/z. Jeho fragmentací byla opět odštěpena neutrální ztráta o hodnotě 58 z druhého konce řetězce za vzniku iontu 161 m/z.

Z prekursoru 377 (viz. obr. 51) byla nejprve v prvním kroku odštěpena neutrální ztráta 144 za vzniku iontu 233 m/z. Další fragmentací prekursoru 233 m/z byla dále odštěpena neutrální ztráta 72. Byl získán konečný iont 161 m/z. Druhým způsob fragmentace prekursoru 377 m/z, ale méně pravděpodobným, bylo postupné odštěpování neutrální ztráty 72.

Další způsoby fragmentace jsou schématicky uvedeny v obrázcích 52, 53 a 54. Obecně se tedy z píků označených jako A, B, C viz. obr. 50 eliminovaly neutrální ztráty 72, 144, 58 a 131, které představují zbytek z molekuly kyseliny mléčné a glykolové a jejich kombinaci a dále dimer kyseliny mléčné.

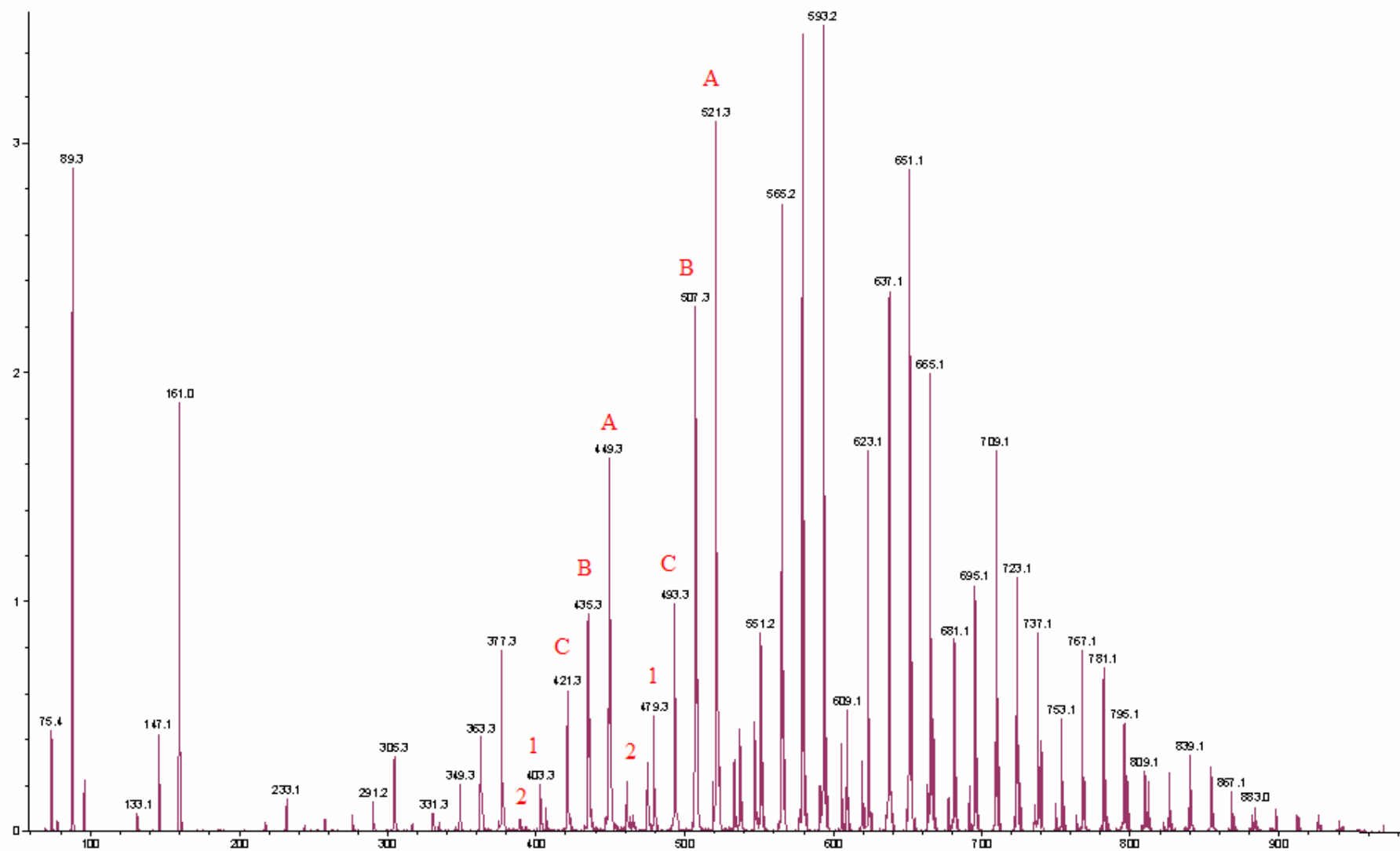
U souboru píků s nízkou intenzitou označených na obr. 50 čísla 1 a 2 probíhá fragmentace docela jinak. Na obrázku 55 je produktové spektrum prekursoru 389 m/z, ze kterého je patrné, že se v prvním kroku odštěpí neutrální ztráta o hodnotě 98. Odštěpením této neutrální ztráty získáme iont 291 m/z. Další fragmentace iontu 291 m/z probíhá dvěma způsoby. Prvním způsobem se odštěpí neutrální ztráta o hodnotě 131 a získáme tak iont 161 m/z. Druhý způsob představuje odštěpení neutrální ztráty 144 za vzniku iontu 147 m/z. Prozatím nebylo přesně objasněno, co představuje neutrální ztráta o hodnotě 98.

Tabulka 16: Přehled sledovaných rozsahů hmot pro přímý nástřik

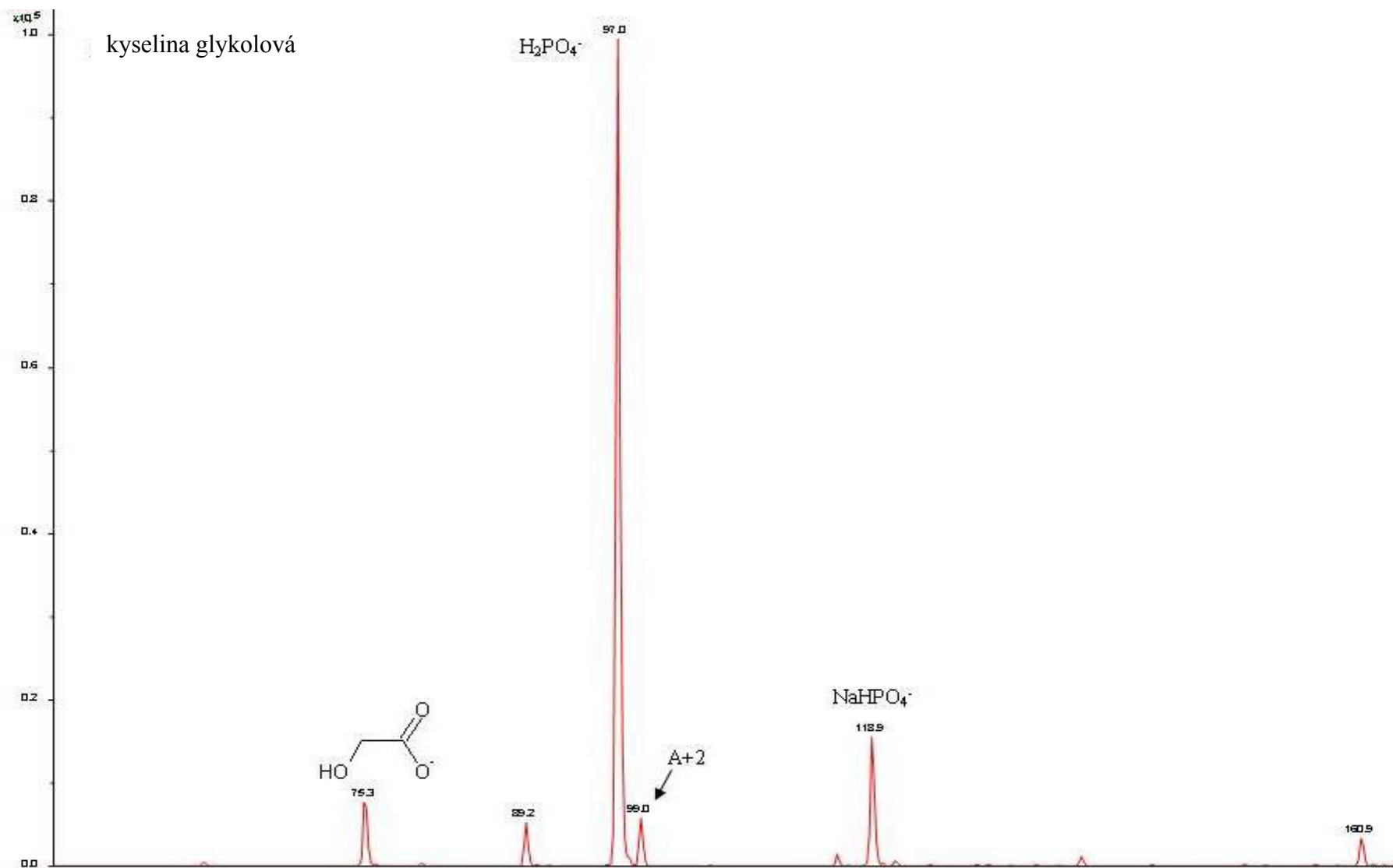
rozsah hmot (m/z)	cílová hmota (m/z)
50 – 200	80
80 – 500	200
50 – 1 000	500
50 – 1 000	800
50 – 1 500	1 000
50 – 1 500	1 200
50 – 2 000	1 500
50 – 2 000	1 800
50 – 2 200	2 000
50 – 2 200	1 000

Tabulka 17: Přehled fragmentů a neutrálních ztrát

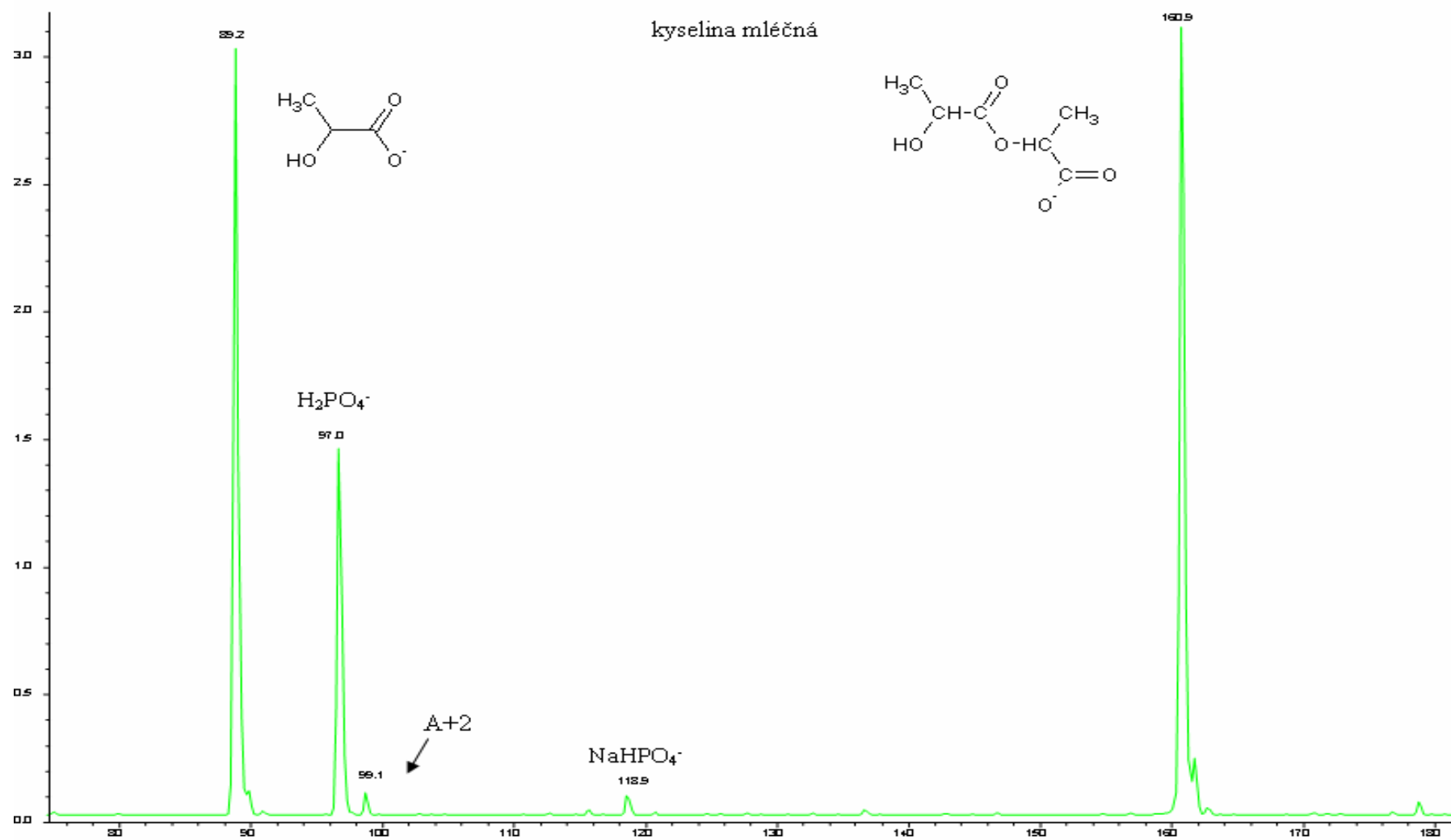
m/z	struktura	neutrální ztráty	struktura
75		72	
89		144	
161		131	
147		58	



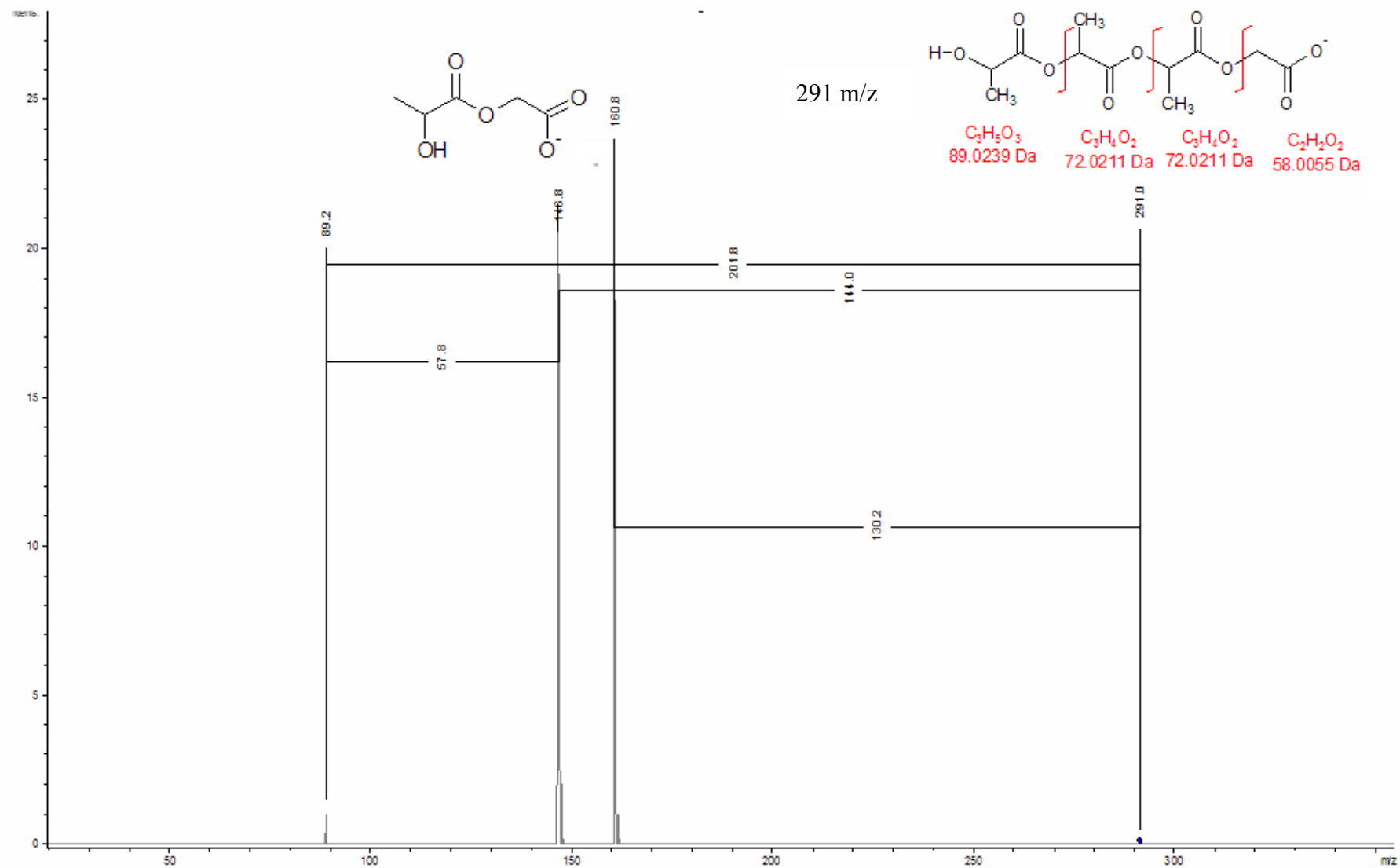
Obr. 44: Hmotnostní spektrum 24% vzorku č. 3; soubor píků s vysokou intenzitou označený písmeny A, B, C představuje hlavní fragmentační řadu; soubor píků s nízkou intenzitou označenou čísly 1 a 2 představuje vedlejší fragmentační řadu



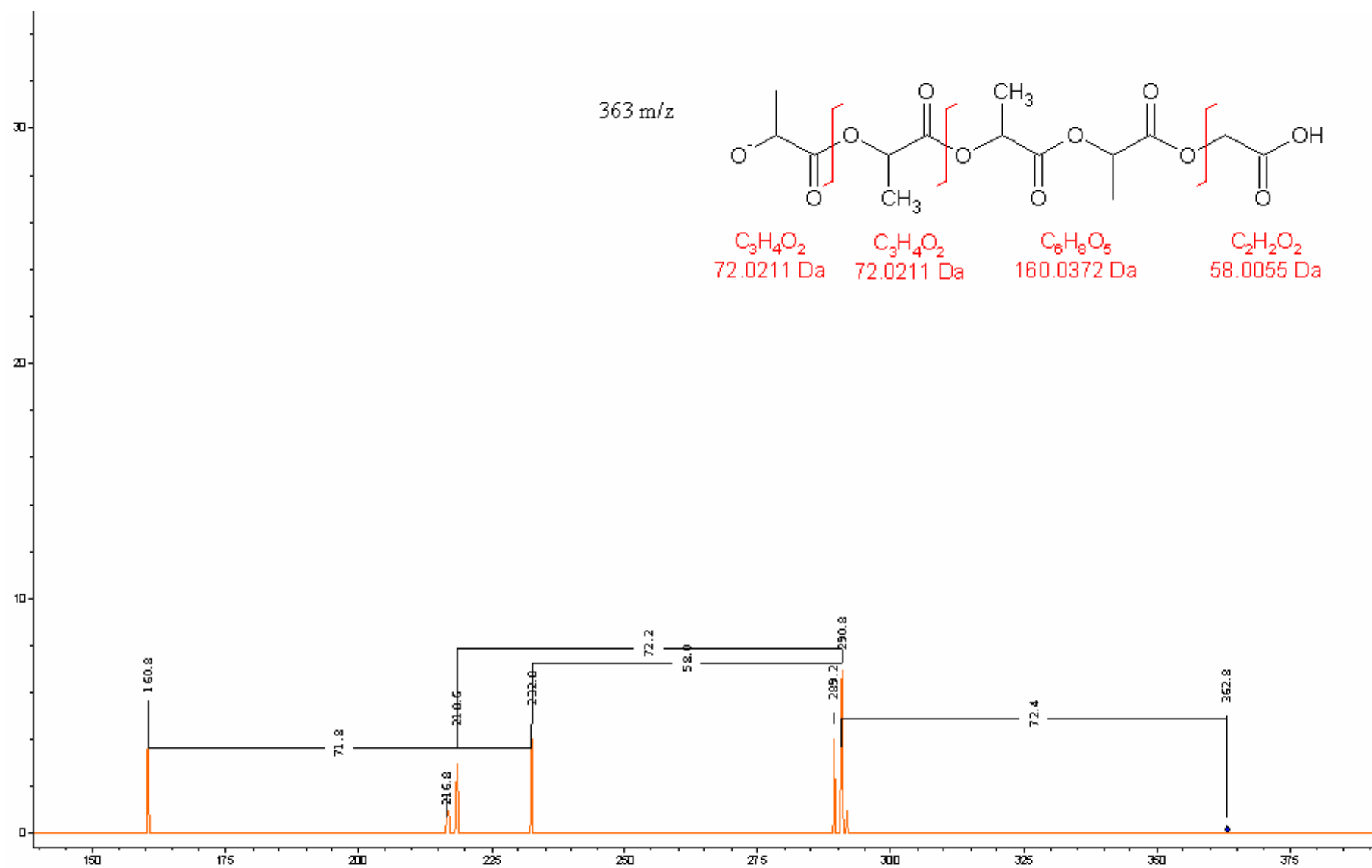
Obr. 46: Hmotnostní spektrum kyseliny glykolové



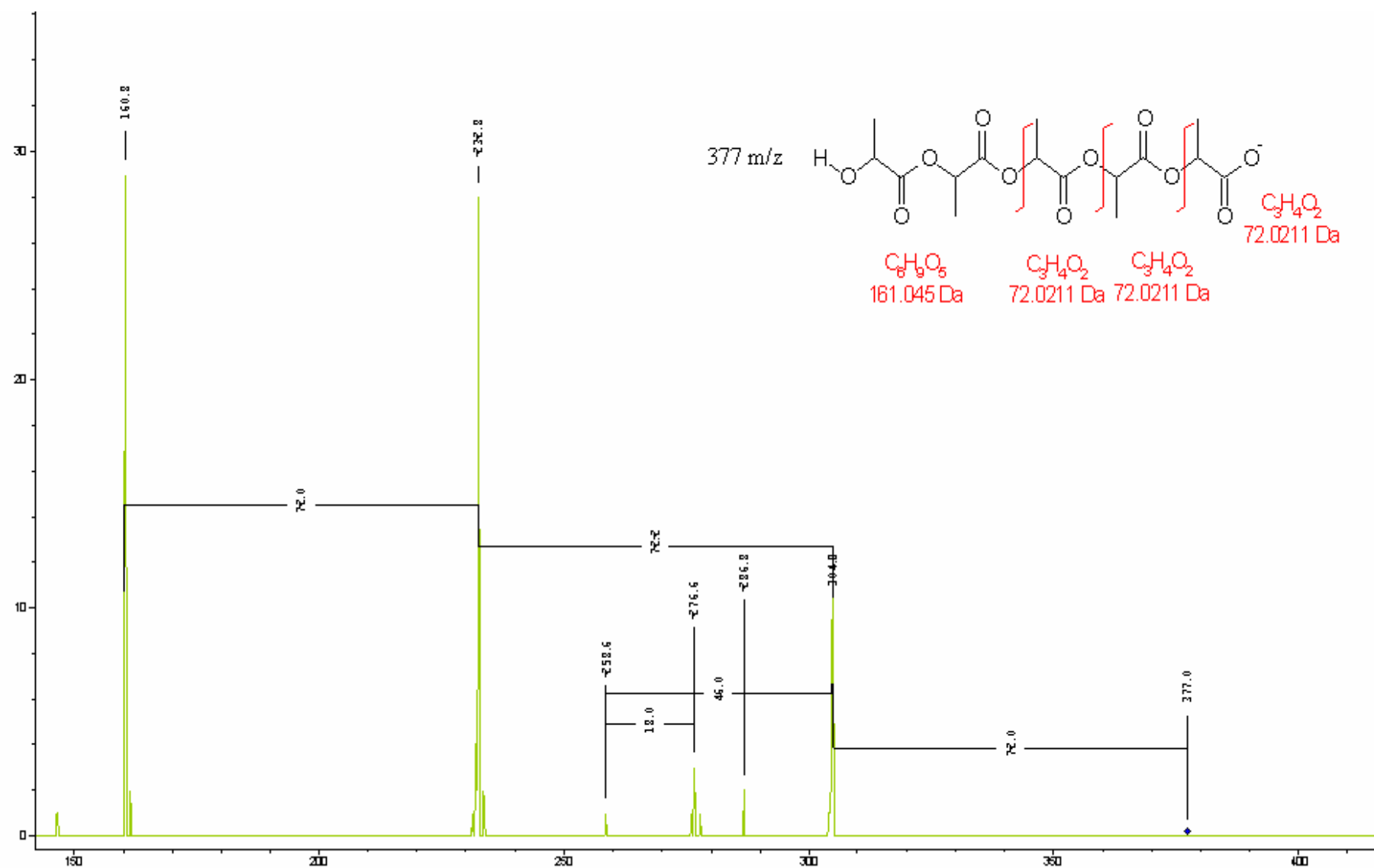
Obr. 47: Hmotnostní spektrum kyseliny mléčné



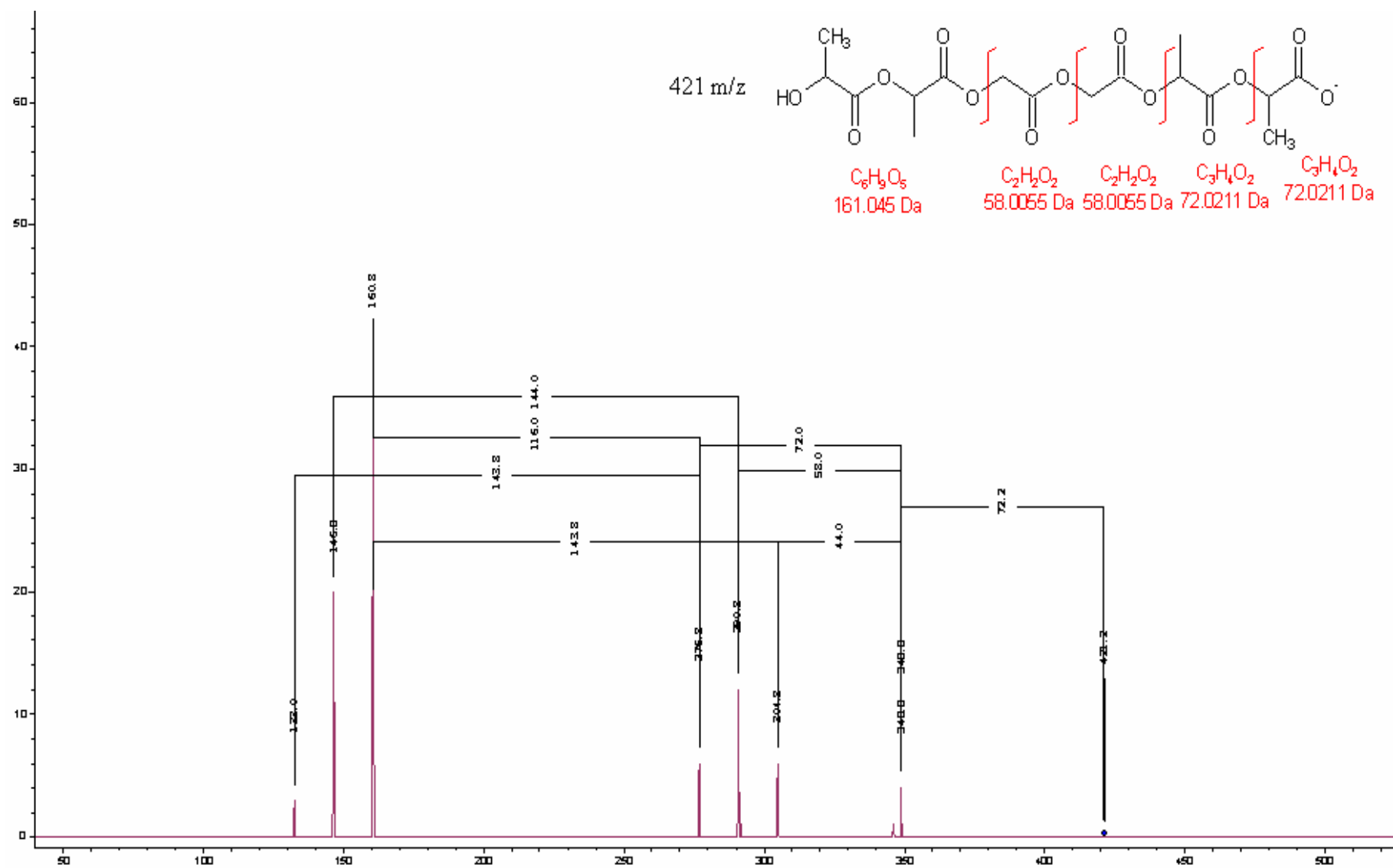
Obr. 48: Produktové spektrum prekursoru 291 m/z



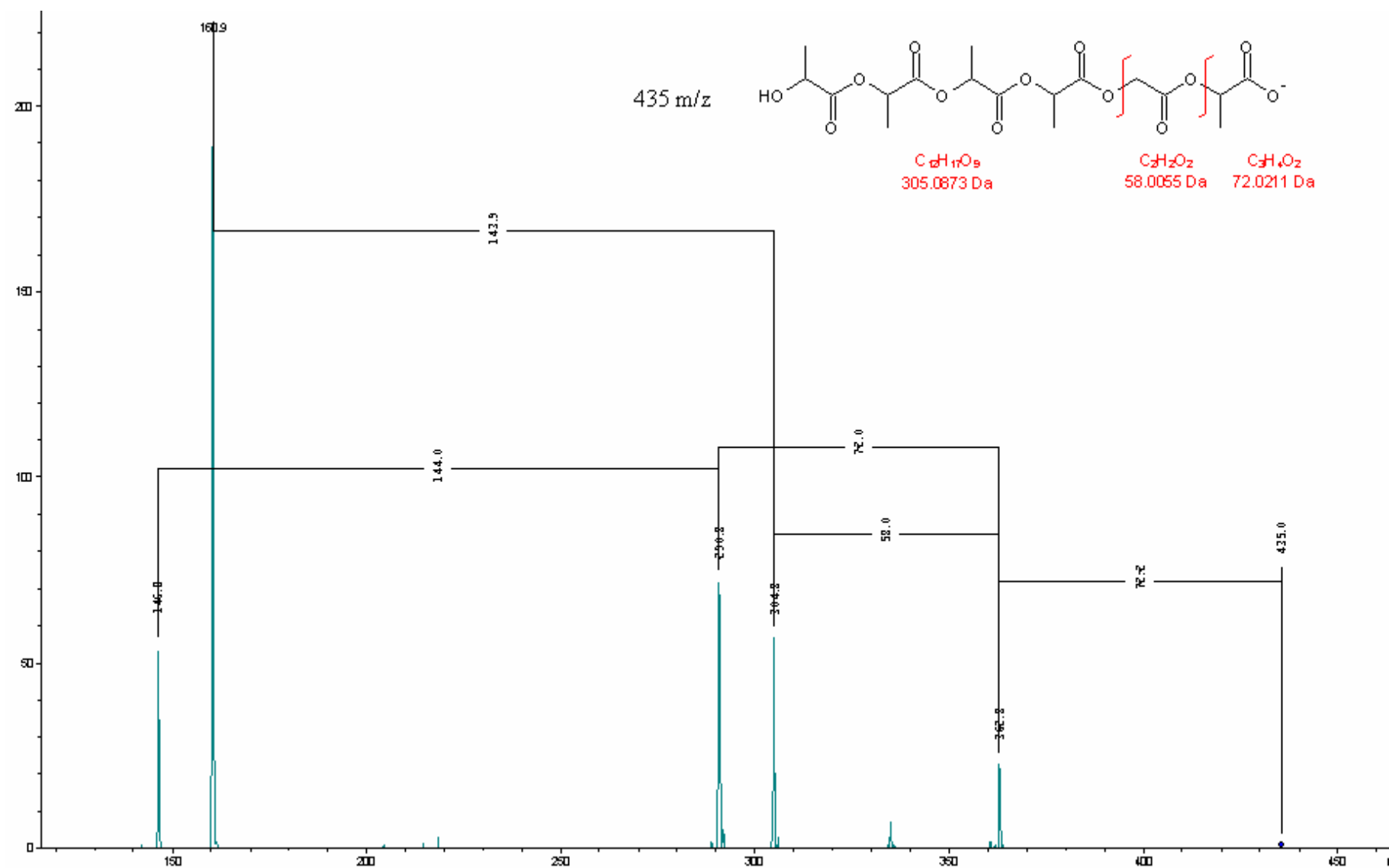
Obr. 50: Produktové spektrum prekursoru 363 m/z



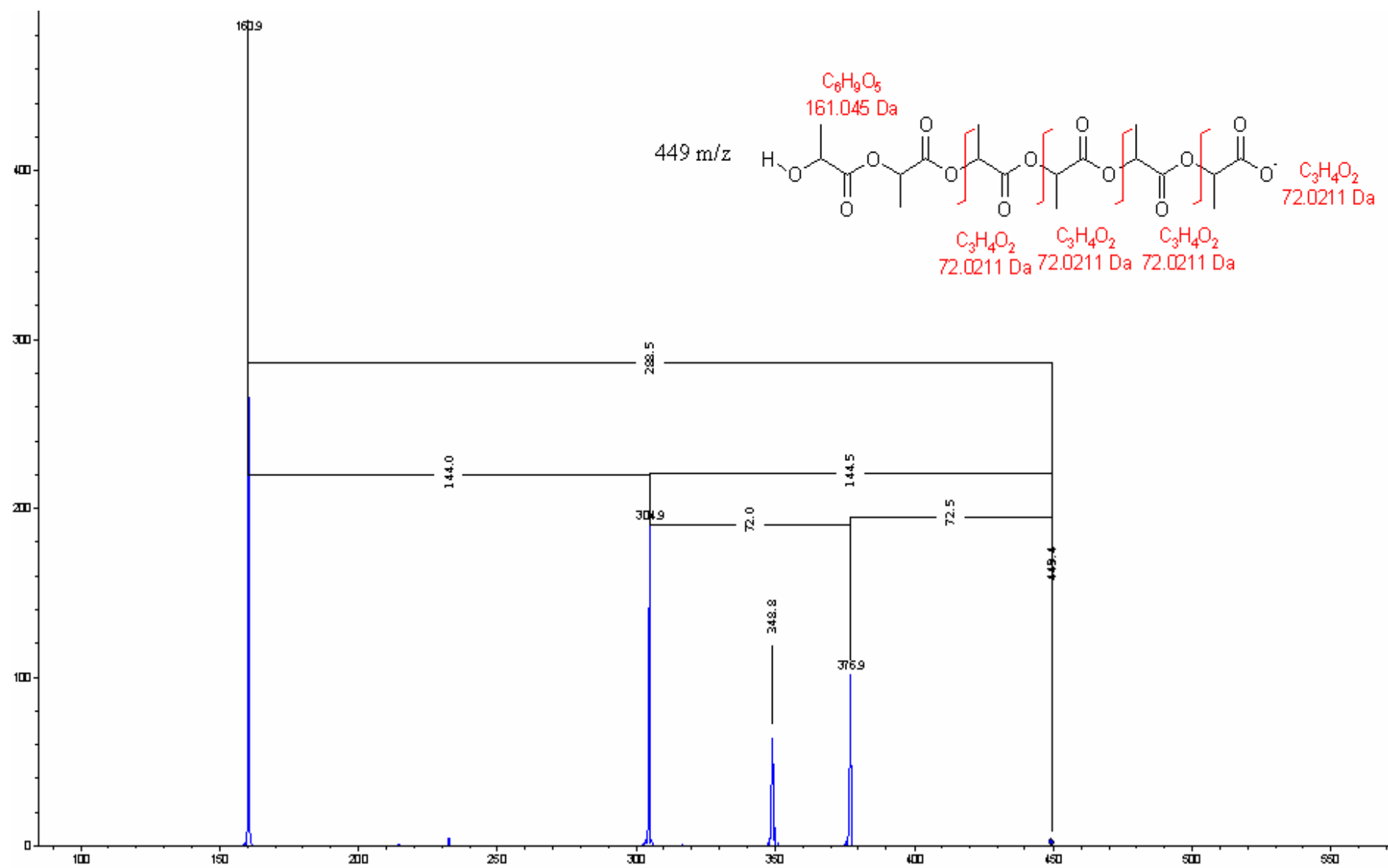
Obr. 51: Produktové spektrum prekursoru 377 m/z



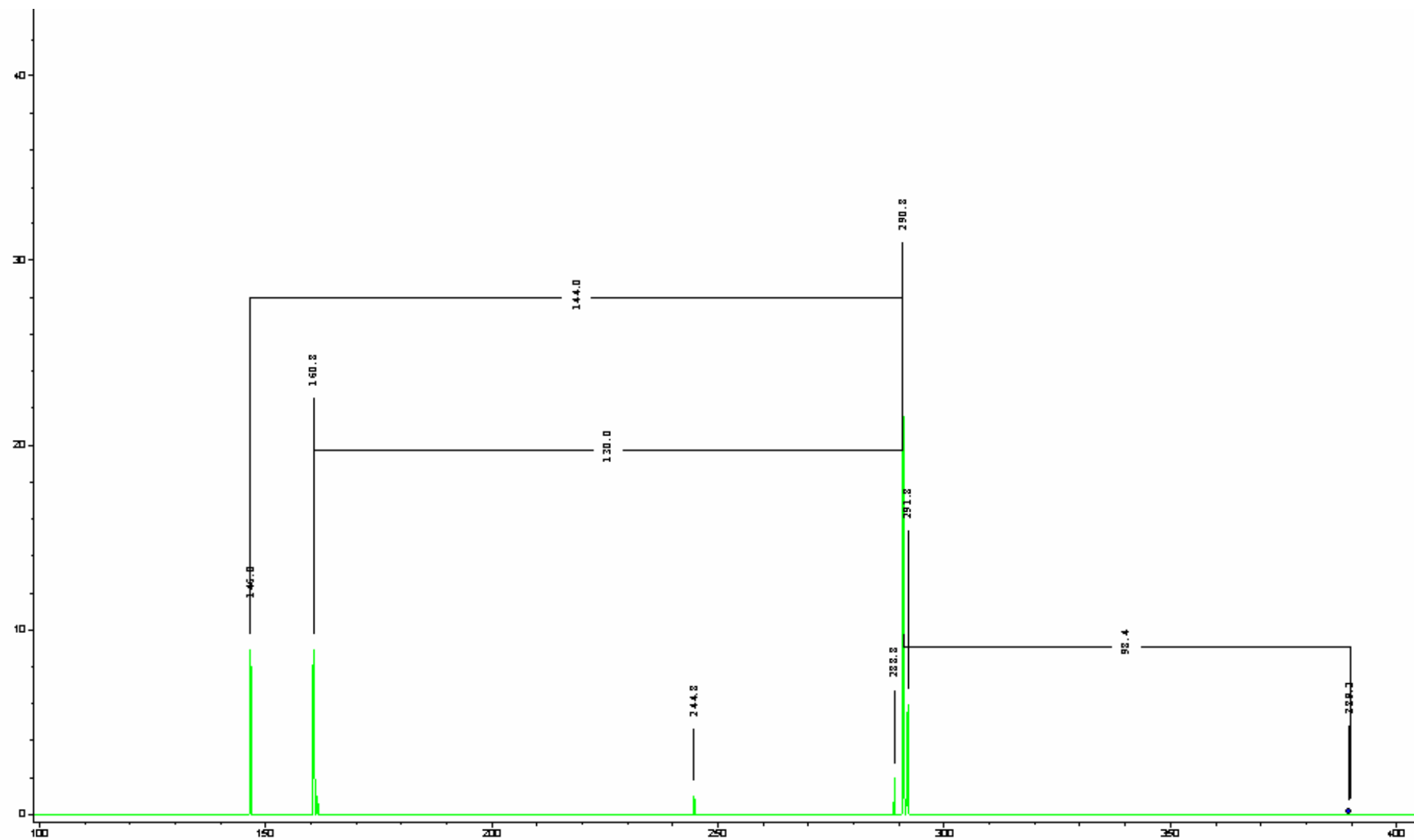
Obr. 52: Produktové spektrum prekursoru 421 m/z



Obr. 53: Produktové spektrum prekursoru 435 m/z



Obr. 54: Produktové spektrum prekurzoru 449 m/z



Obr. 55: Produktové spektrum prekursoru 389 m/z

5 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium degradace blokových kopolymerů založených na bázi poly(mléčné) kyseliny, poly(glykolové) kyseliny a polyethylenglykolu PLGA-PEG-PLGA a jejich funkcionalizaci kyselinou itakonovou ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA.

Cílem práce bylo vybrat, a to na základě sestavení sol-gel fázových diagramů, vhodné vzorky pro studium degradace. Vhodnost vzorku k degradaci byla posuzována na základě tvorby gelu při teplotě 37 °C. Pomocí metody s obrácenými zkumavkami byl potvrzen reverzibilní přechod ze solu na gel a zpět, a to jak u vzorků PLGA-PEG-PLGA, tak i u vzorků modifikovaných kyselinou itakonovou.

Na základě sestavení sol-gel fázových diagramů byly vybrány vhodné koncentrace vzorků tak, aby se neplýtvalo materiálem a rozpouštění netrvalo příliš dlouho, neboť se zvyšovalo riziko degradace kopolymeru už při samotném rozpouštění. V případě vysoké hydrolýzy vzorek ztrácel schopnost reverzibilního přechodu ze solu na gel.

Samotná degradace vzorků byla prováděna v inkubátoru, který byl nastaven na teplotu 37 °C v prostředí fosfátových roztoků o pH 4,2; 7,4 a 9,2. Doba degradace byla maximálně 12 dní, po uplynutí tohoto časového úseku byl gel již zcela rozpuštěn a proto by delší doba degradace neměla význam. Porovnání průběhů degradace při různém pH prostředí bylo hodnoceno na základě sledování poklesu molekulové hmotnosti kopolymeru pomocí GPC. V odebíraném fosfátovém roztoku byl zároveň sledován nárůst koncentrace kyseliny glykolové a mléčné pomocí HPLC/DAD. Za účelem identifikace degradačních produktů bylo využito hmotnostního spektrometru (ionizace elektrosprejem, iontová past). Na základě analýzy MS a MS² byl objasněn princip fragmentace degradačních produktů (oligomerů).

Nejdůležitější výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- Pro každý typ kopolymeru byla stanovena kritická gelační koncentrace a kritická gelační teplota, která je důležitá při výběru pro použití na degradaci.
- Metodou GPC bylo zjištěno, že dochází k poklesu střední číselné molekulové hmotnosti kopolymerů a tudíž k samotné degradaci. Nejvíce vzorky degradovaly při pH 9,2. Nejnižší pokles střední molekulové hmotnosti byl zaznamenán při degradaci ve fosfátovém roztoku při pH 4,2. Degradace kopolymeru s itakonovou kyselinou probíhala až o 15 % rychleji, zejména při pH 7,4, ve srovnání s nemodifikovaným kopolymerem.
- Metodou HPLC byly identifikovány v odebíraném fosfátovém roztoku především kyselina mléčná a glykolová. Rychlost uvolňování obou kyselin rostla se zvyšujícím se pH fosfátového roztoku. Kyselina glykolová se uvolňovala do roztoku mnohem rychleji ve srovnání s kyselinou mléčnou.
- Byly částečně objasněny fragmentační principy degradačních produktů studovaných kopolymerů. Dochází ke dvěma způsobům fragmentace. V prvním dochází výhradně k odštěpování neutrálních ztrát o hodnotách 72 a 144, které vznikají z kyseliny mléčné a dále dochází k odštěpování neutrálních ztrát o hodnotách 58 a 131, které vznikají z kyseliny glykolové. V druhém principu fragmentace dochází v prvním kroku k odštěpení neutrální ztráty o hodnotě 98 z prekursoru. V dalších krocích již opět dochází k odštěpení neutrálních ztrát 144 a 131 jako u prvního způsobu fragmentace.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VADGAMA, P. *Surface and Interfaces for Biomaterials*. 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2005, ISBN 1-85573-930-5.
- [2] JEONG, B., BAE, Y.H., KIM, S.W. Thermoreversible Gelation of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer Aqueous Solutions. *Macromolecules*, 1999, vol. 32, no. 21., s. 7064-7069.
- [3] KIM, S.W., BAE, Y.H., OKANO, T. Hydrogels: Swelling, Drug Loading and Release. *Pharmaceutical Research*, 1992, vol. 9, no. 3., s. 283 – 290, ISSN 0724-8741.
- [4] GALAEV, I.Y., MATTIASSON, B. ‘Smart’ Polymers and what they could do in Biotechnology and Medicine. *Trends in Biotechnology*, 1999, vol. 17, no. 8., s. 335-340, ISSN 0167-7799.
- [5] JEONG, B., GUTOWSKA, A. Lessons from Nature: Stimuli-Responsive Polymers and their Biomedical Applications. *Trends in Biotechnology*, 2002, vol. 20, no. 7. s. 305-311, ISSN 0167-7799.
- [6] STILE, A.R., BURGHARDT, W.R., HEALY, K.E. Synthesis and Characterization of Injectable Poly(*N*-Isopropylacrylamide)-Based Hydrogels that Support Tissue Formation in Vitro. *Macromolecules*, 1999, vol. 32, no. 22., s. 7370-7379.
- [7] JEONG, B., et al. New Biodegradable Polymers for Injectable Drug Delivery Systems. *Journal of Controlled Release*, 1999, vol. 62, no. 1-2., s. 109-114, ISSN 0168-3659.
- [8] JEONG, B., KIM, S.W., BAE, Y.H. Thermosensitive sol–gel Reversible Hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, no. 1., s. 37-51, ISSN 0169-409X.
- [9] LANGER, R. Biomaterials and Biomedical Engineering. *Chemical Engineering Science*, 1995, vol. 50, no. 24., s. 4109-4121, ISSN 0009-2509.
- [10] GUNATILLAKE, P.A., ADHIKARI, R. Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. *European Cells and Materials*, 2003, vol. 5., s. 1-16, ISSN 1473-2262.
- [11] UNGARO, P. Bioactivated Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. *Topics in Tissue Engineering*, 2005, vol. 2.
- [12] SATO, T. and et. al. Evaluation of PLLA-Collagen Hybrid Sponge as a Scaffold for Cartilage Tissue Engineering. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 2004, vol. 24, no. 3., s. 365-372.
- [13] DOENICKE, A., GROTE, B., LORENZ, W. Blood and Blood Substitutes in Management of the Injured Patient. *British Journal of Anaesthesia*, 1977, vol. 49., s. 681-688.
- [14] CHANDRA, R., RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. *Progress in Polymer Science*, 11, 1998, vol. 23, no. 7., s. 1273-1335, ISSN 0079-6700.

- [15] KIZLINK, J., Technologie chemických látek, 3.přepracované a doplněné vydání. Brno: Vysoké učení technické, 2005, *Biodegradabilní Polymery*, s. 231, ISBN 80-214-2913-5.
- [16] GILDING, D.K., REED, A.M. Biodegradable Polymers for use in Surgery - Poly(Glycolic)-Poly(Lactic Acid) Homopolymers and Copolymers. *Polymer*, 1979, vol. 20, no. 12., s. 1459-1464, ISSN 0032-3861.
- [17] GRIFFITH, L.G. Polymeric Biomaterials. *Acta Materialia*, 2000, vol. 48, no. 1., s. 263-277, ISSN 1359-6454.
- [18] CHITKARA, D., SHIKANOV, A., KUMAR, N., DOMB, A.J. Biodegradable Injectable in Situ Depot-Forming Drug Delivery Systems. *Macromolecular Bioscience*, 2006, vol. 6., s. 977-990.
- [19] FRUIJTIER-PÖLLOTH, C. Safety Assessment on Polyethylene Glycols (PEGs) and their Derivatives as used in Cosmetic Products. *Toxicology*, 2005, vol. 214, no. 1-2., s. 1-38, ISSN 0300-483X.
- [20] SHIM, M.S., et al. Poly(D,L-Lactic Acid-Co-Glycolic Acid)-b-Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly (D,L-Lactic Acid-Co-Glycolic Acid) Triblock Copolymer and Thermoreversible Phase Transition in Water. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, vol. 61, no. 2., s. 188-196, ISSN 0021-9304.
- [21] FOX, S.A., A New Type of Surgical Peg. *American Journal of Ophthalmology*, 1946, vol. 29, no. 5., s. 586-587, ISSN 0002-9394.
- [22] KINAHAN, I.M., SMYTH, M.R. High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Peg-600 in Human Urine. *American Journal of Ophthalmology*, 1991, vol. 565, no. 1-2., s. 297-307, ISSN 0378-4347.
- [23] DE JONG, S.J., et al. New Insights into the Hydrolytic Degradation of Poly(Lactic Acid): Participation of the Alcohol Terminus. *Polymer*, 3, 2001, vol. 42, no. 7., s. 2795-2802, ISSN 0032-3861.
- [24] VAN NOSTRUM, C.F., VELDHUIS, T.F.J., BOS, G.W., HENNINK, W.E. Hydrolytic Degradation of Oligo(Lactic Acid): A Kinetic and Mechanistic Study. *Polymer*, 2004, vol. 45, no. 20., s. 6779-6787, ISSN 0032-3861.
- [25] SHIH, C. Chain-End Scission in Acid Catalyzed Hydrolysis of Poly (-Lactide) in Solution. *Journal of Controlled Release*, 1995, vol. 34, no. 1., s. 9-15, ISSN 0168-3659.
- [26] FORCINO, G.R., JONNALAGADDA, S. The Effect of Fabrication Methods on the Mechanical and Thermal Properties of Poly(Lactide-Co-Glycolide) Scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, vol. 104., s. 944-949.
- [27] PARK, T.G. Degradation of Poly(D,L-Lactic Acid) Microspheres - Effect of Molecular-Weight. *Journal of Contrlled Release*, 1994, vol. 30, no. 2., s. 161-173, ISSN 0168-3659.

- [28] SANABRIA-DELONG, N., AGRAWAL, S.K., BHATIA, S.R., TEW, G.N. Controlling Hydrogel Properties by Crystallization of Hydrophobic Domains. *Macromolecules*, 2006, vol. 39, no. 4., s. 1308-1310.
- [29] BALA, I., HARIHARAM, S., KUMAR, M. PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2004, vol. 21, no. 5., s. 387-422, ISSN 0743-4863.
- [30] GRAYSON, A.C.R., CIMA, M.J., LANGER, R. Size and Temperature Effects on Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Degradation and Microreservoir Device Performance. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 14., s. 2137-2145, ISSN 0142-9612.
- [31] GRIZZI, I., GARREAU, H., LI, S., VERT, M. Hydrolytic Degradation of Devices Based on Poly(DL-Lactic Acid) Size-Dependence. *Biomaterials*, 1995, vol. 16, no. 4., s. 305-311.
- [32] PARK, T.G. Degradation of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microspheres: Effect of Copolymer Composition. *Biomaterials*, 1995, vol. 16, no. 15., s. 1123-1130.
- [33] GILDING, D.K., REED, A.M. Biodegradable Polymers for use in Surgery - Poly(Ethylene Oxide) Poly(Ethylene - Terephthalate) (Peo-Pet) Copolymers. *Polymer*, 1979, vol. 20, no. 12., s. 1451 – 1458, ISSN 0032-3861.
- [34] ATHANASIOU, K.A., NIEDERAUER, G.G., AGRAWAL, C.M. Sterilization, Toxicity, Biocompatibility and Clinical Applications of Polylactic Acid/ Polyglycolic Acid Copolymers. *Biomaterials*, 1996, vol. 17, no. 2., s. 93-102, ISSN 0142-9612.
- [35] WEXLER, P. *Encyclopedia of Toxicology*. 2nd ed. Oxford: Elsevier, 2005, ISBN 0-12-745352-0.
- [36] PEPPAS, N.A., BURES, P., LEOBANDUNG, W., ICHIKAWA, H. Hydrogels in Pharmaceutical Formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, vol. 50, no. 1., s. 27-46, ISSN 0939-6411.
- [37] SUMMER, K. *Toxicological Evaluation of the Incorporation of Polymers and Copolymers Based on L- and D-Lactide and Glycolide*. Boehringer Ingelheim KG: in Boehringer Ingelheim KG, 1993.
- [38] CORLEY, R.A., et al. Extension of a PBPK Model for Ethylene Glycol and Glycolic Acid to Include the Competitive Formation and Clearance of Metabolites Associated with Kidney Toxicity in Rats and Humans. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2011, vol. 250, no. 3., s. 229-244, ISSN 0041-008X.
- [39] DING, A.G., SCHWENDEN, S.P. Determination of Water-Soluble Acid Distribution in Poly(Lactide-Co-Glycolide). *Journal of Pharmaceutical Science*, 2004, vol. 93, no. 2., s. 322-331.
- [40] GUTOWSKA, A., JEONG, B., JASIONOWSKI, M. Injectable Gels for Tissue Engineering. *Anatomical Record*, 2001, vol. 263, no. 4., s. 342-349, ISSN 0003-276X.
- [41] QIU, Y., PARK, K. Environment-Sensitive Hydrogels for Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, vol. 53, no. 3. s. 321-339, ISSN 0169-409X.

- [42] KLOUDA, L., MIKOS, A.G. Thermoresponsive Hydrogels in Biomedical Applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, vol. 68, no. 1. s. 34-45, ISSN 0939-6411.
- [43] HOFFMAN, A.S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, no. 1., s. 3-12, ISSN 0169-409X.
- [44] JEONG, B., et al. Thermogelling Biodegradable Polymers with Hydrophilic Backbones: PEG-g-PLGA. *Macromolecules*, 2000, vol. 33, no. 22., pp. 8317-8322.
- [45] JEONG, B., HAN BAE, Y., WAN KIM, S. Biodegradable Thermosensitive Micelles of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1999, vol. 16, no. 1-4., s. 185-193, ISSN 0927-7765.
- [46] JEONG, B., BAE, Y.H., KIM, S.W. In Situ Gelation of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer Aqueous and Degradation Thereof. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, vol. 50, no. 2., s. 171-177, ISSN 0021-9304.
- [47] ZENTNER, G.M., et al. Biodegradable Block Copolymers for Delivery of Proteins and Water-Insoluble Drugs. *Journal of Controlled Release*, 2001, vol. 72, no. 1-3. s. 203-215, ISSN 0168-3659.
- [48] JEONG, J.H., LIM, D.W., HAN, D.K., PARK, T.G. Synthesis, Characterization and Protein Adsorption Behaviors of PLGA/PEG Di-Block Co-Polymer Blend Films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2000, vol. 18, no. 3-4., s. 371-379, ISSN 0927-7765.
- [49] WILLKE, T., VORLOP, K.D. Biotechnological Production of Itaconic Acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, vol. 56., s. 289-295.
- [50] CHEN, K., et al. Preparation and Characterization of pH Sensitive Poly(N-Vinyl-2-pyrrolidone/itaconic Acid) Copolymer Hydrogels. *Materials Chemistry and Physics*, 2005, vol. 91, no. 2-3., s. 484-489, ISSN 0254-0584.
- [51] TOMIC, S.L., SULJOVRUJIC, E.H., FILIPOVIC, J.M. Biocompatible and Bioadhesive Hydrogels Based on 2-Hydroxyethyl Methacrylate, Monofunctional Poly(Alkylene glycols) and Itaconic Acid. *Polymer Bulletin*, 2006, vol. 57. s. 691-702.
- [52] KRUŠIĆ, M.K., FILIPOVIĆ, J. Copolymer Hydrogels Based on N-Isopropylacrylamide and Itaconic Acid. *Polymer*, 2006, vol. 47, no. 1., s. 148-155, ISSN 0032-3861.
- [53] CAYKARA, T., OZYUREK, C., KANTOGLU, O. Investigation of Thermal Behaviour of Poly(2-Hydroxyethylmethacrylate-Co-Itaconic Acid) Networks. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, vol. 103., s. 1602-1607.
- [54] HUYNH, D.P., SHIM, W.S., KIM, J.H., LEE, D.S. pH/temperature Sensitive Poly(Ethylene Glycol)-Based Biodegradable Polyester Block Copolymer Hydrogels. *Polymer*, 2006, vol. 47, no. 23., s. 7918-7926, ISSN 0032-3861.

- [55] JEONG, B., GUTOWSKA, A. Biodegradable Thermoreversible Hydrogels and their Biomedical Applications. *Abstract of Papers of the American Chemical Society*, 2001, vol. 222., s. U315-U315, ISSN 0065-7727.
- [56] JEONG, B., WANG, L.Q., GUTOWSKA, A. Biodegradable Thermoreversible Gelling PLGA-g-PEG Copolymers. *Chemical Communications*, 2001, no. 16. s. 1516-1517, ISSN 1359-7345.
- [57] JEONG, B., et al. Phase Transition of the PLGA-g-PEG Copolymer Aqueous Solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, vol. 107, no. 37., s. 10032-10039.
- [58] HANIKA, J. *Speciální Separační Procesy*. 1 vyd.. Praha: Vysoká škola chemicko technologická v Praze, 1995, ISBN 80-7080-242-1.
- [59] SOMMER, L. and et al. Základy analytické chemie II, 1. vyd. Brno: VUTUM, 2000, *Vybrané Chromatografické Postupy*, s. 185-220, ISBN 80-214-1742-0.
- [60] MEYER, V.R. *Practical High -Performance Liquid Chromatography*. 3rd ed. Chichester: John Wiley and Sons, 1999, ISBN 0-471-98373-X.
- [61] CHURÁČEK, J. a kol. Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, 1. vyd., Praha: Akademie věd České republiky ACADEMIA, 1993 *Spojení Kapalinové Chromatografie a Hmotnostní Spektrometrie*, s. 325, ISBN 80-200-0010-0.
- [62] *High Performance Liquid Chromatography*. University of California: , 2010
Dostupné z:
http://chemwiki.ucdavis.edu/Wikitexts/UCD_Chem_115_Lab_Manual/Lab_2%3A_High_Performance_Liquid_Chromatography.
- [63] SWADESH, J.K. *HPLC: Practical and Industrial Applications*. 2. vyd., CRC Press LLC, 2001, ISBN 0-8493-0003-7.
- [64] *UV/VIS HPLC Detektory: Detektory Diodového Pole.* , 2000 Dostupné z:
http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html.
- [65] HOFFMANN, E., STROOBANT, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, 1999, ISBN 0-471-48566-7.
- [66] *Mass Spectrometry Principles and Interpretation*. Dostupné z:
<http://www.hull.ac.uk/chemistry/masspec3/principles%20of%20ms.html>.
- [67] RÄDER, H., SCHREPP, W. MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Analysis of Synthetic Polymers. *Acta Polymerica*, 1998, vol. 49, no. 6., s. 272-293, ISSN 1521-4044.
- [68] MONTAUDO, G., MONTAUDO, M.S., CRC Press, 2002, *Polymer Characterization Methods*, s. 50, ISBN 0-8493-3127-7.
- [69] SCHRIEMER, D.C., LI, L. Detection of High Molecular Weight Narrow Polydisperse Polymers Up to 1.5 Million Daltons by MALDI Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1996, vol. 68, no. 17., s. 2721-2725.

- [70] WHITTAL, R.M., SCHRIEMER, D.C., LI, L. Time-Lag Focusing MALDI Time-of-Flight Mass Spectrometry for Polymer Characterization: Oligomer Resolution, Mass Accuracy, and Average Weight Information. *Analytical Chemistry*, 1997, vol. 69, no. 14. s. 2734 - 2741.
- [71] WHITEHOUSE, C.M., DREYER, R.N., YAMASHITA, M., FENN, J.B. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Analytical Chemistry*, 1985, vol. 57, no. 3., s. 675-679.
- [72] McEWEN, C.N., et al. The Fundamentals of Applying Electrospray Ionization Mass Spectrometry to Low Mass Poly(Methyl Methacrylate) Polymers. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10, 1995, vol. 6, no. 10. s. 906-911, ISSN 1044-0305.
- [73] *Electrospray Ionisation*. February 2011 Dostupné z: <http://lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php>.
- [74] SOMMER, L. *Základy Analytické Chemie II*. 1. vyd., Brno: VUTIUM, 2000, ISBN 80-214-1742-0.
- [75] *Quadruple Ion Trap MS*, 2011 Dostupné z: <http://drugtestingbook.com/confirmation-via-contemporary-and-latest-techniques/quadruple-ion-trap-ms/>.
- [76] NOVÁK, J.P. *Fyzikální Chemie II*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, ISBN 80-7080-436-X.
- [77] WU, C. *Handbook of Size Exclusive Chromatography*. 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1995, ISBN 0-8247-4710-0.
- [78] PASH, H., TRATHNIGG, B. *HPLC of Polymers*. Glöckner ed. Berlin: Heidelberg: Springer-Verlag, 1998, ISBN 3-540-61689-6.
- [79] JEONG, B., BAE, Y.H., 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., s. 155-163, ISSN 0168-3659.
- [80] LI, X., et al. 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., s. 140-148.
- [81] GIUNCHEDI, P., CONTI, B., SCALIA, S., 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., s. 53-62, ISSN 0168-3659.
- [82] Hitachi High-Technologies Corporation. *HPLC/Amino Acids Analyzer*, 2011 Dostupné z: www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/lc_basic_8.html.
- [83] OBORNÁ, J. *Studium degradace biokompatibilních polymerů*, Brno, 2009. s. 64. Bakalářská práce. Vysoké učení technické.

[84] *Novel Thermogelling Biodegradable Copolymers with very Low Gelation Concentrations*. National University of Singapore. 26. duben 2011, Dostupné z: <http://ilo.technologypublisher.com/technology/4629>.

[85] TAKEUCHI, Y., et al. Injectable thermoreversible hydrogels based on amphiphilic poly(amino acid)s. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2006, vol. 44, s. 671–675.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Zkratka	Význam
PEG	polyethylenglykol
PLA	poly(mléčná kyselina)
PGA	poly(glykolová kyselina)
ITA	itakonová kyselina
PCL	polycaprolaktan
PBL	poly(β -butyrolactony)
PdMMLA	poly([R,S] -3,3- dimethy-2-hydroxybutandiová kyselina)
PLGA	polymer na bázi poly(mléčné) a poly(glykolové) kyseliny
PA	polyanhydridy
PU	polyurethany
SP	stupeň polymerace
GA	kyselina glykolová
LA	kyselina mléčná
MW	molekulová hmotnost
PNIPAAM	poly(N-isopropylakrylamid)
PEO	poly(ethylenoxid)
PPO	poly(propylenoxid)
CGT	kritická gelační teplota
CGC	kritická gelační koncentrace
(PNIPAM/ITA)	poly(N-isopropylakrylamiditakonová kyselina)
(PNVP/ITA)	poly(N-vinyl-2-pyrrolidonitakonová kyselina)
(PHEMA/ITA)	poly(2-hydroxyethylmethakrylitakonová kyselina)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
LD ₅₀	označení pro množství substance, které je po podání určité látky smrtelnou dávkou pro daného živočicha v 50 % případů
n. d.	nedetekováno
DAD	detektor diodového pole
FLD	detektor fluorescenční
MALDI	desorpce-ionizace laserem pomocí matrice
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
TOF	analyzátor doby letu
RID	refraktometrický detektor
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Metoda s obrácenými zkumavkami; určování změny viskozity v průběhu zahřívání ve vodní lázni

Příloha č. 2: Zahřívání vzorků ve vodní lázni při určování sol-gel fázového přechodu

Příloha č. 3: Chromatogram z GPC analýzy standardu III

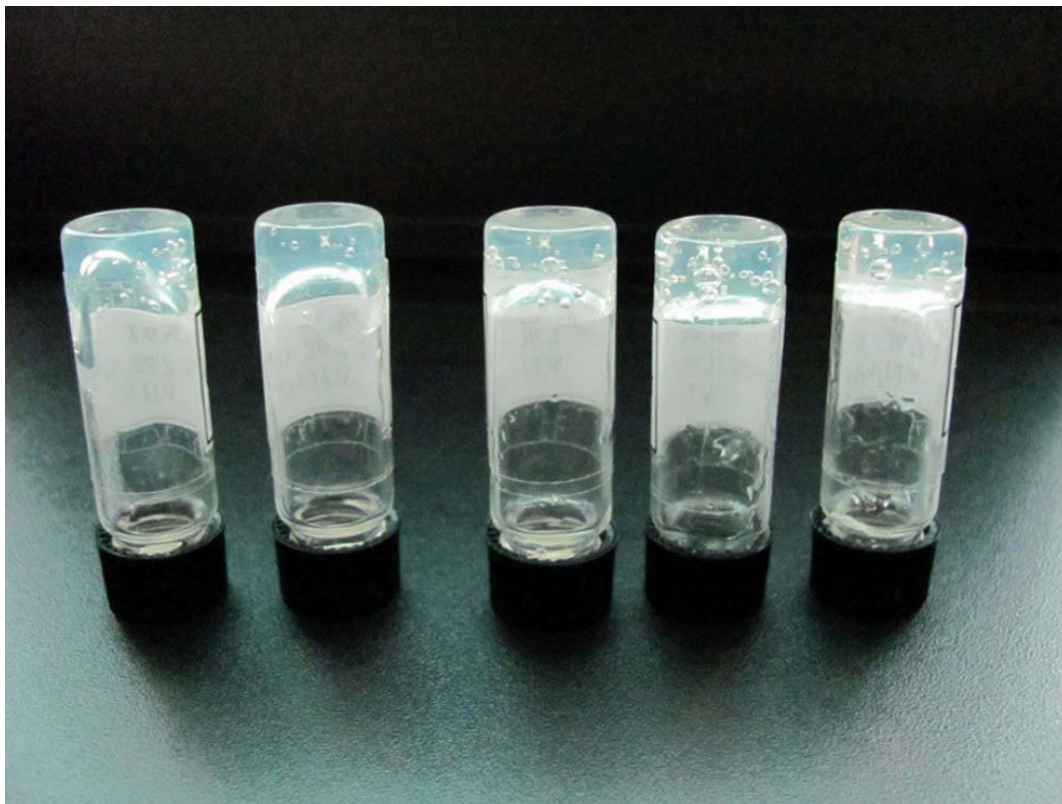
Příloha č. 4: Pokles molekulové hmotnosti v závislosti na době degradace vzorku č. 3

Příloha č. 5: Chromatogram z HPLC analýzy pro 24% vzorek č. 3 PLGA-PEG-PLGA po 11 dnech degradace ve fosfátovém pufru o pH 7,4

Příloha č. 6: Chromatogram z HPLC analýzy pro 24% vzorek č. 2 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA po 11 dnech degradace v roztoku o pH 4,2

9 PŘÍLOHY

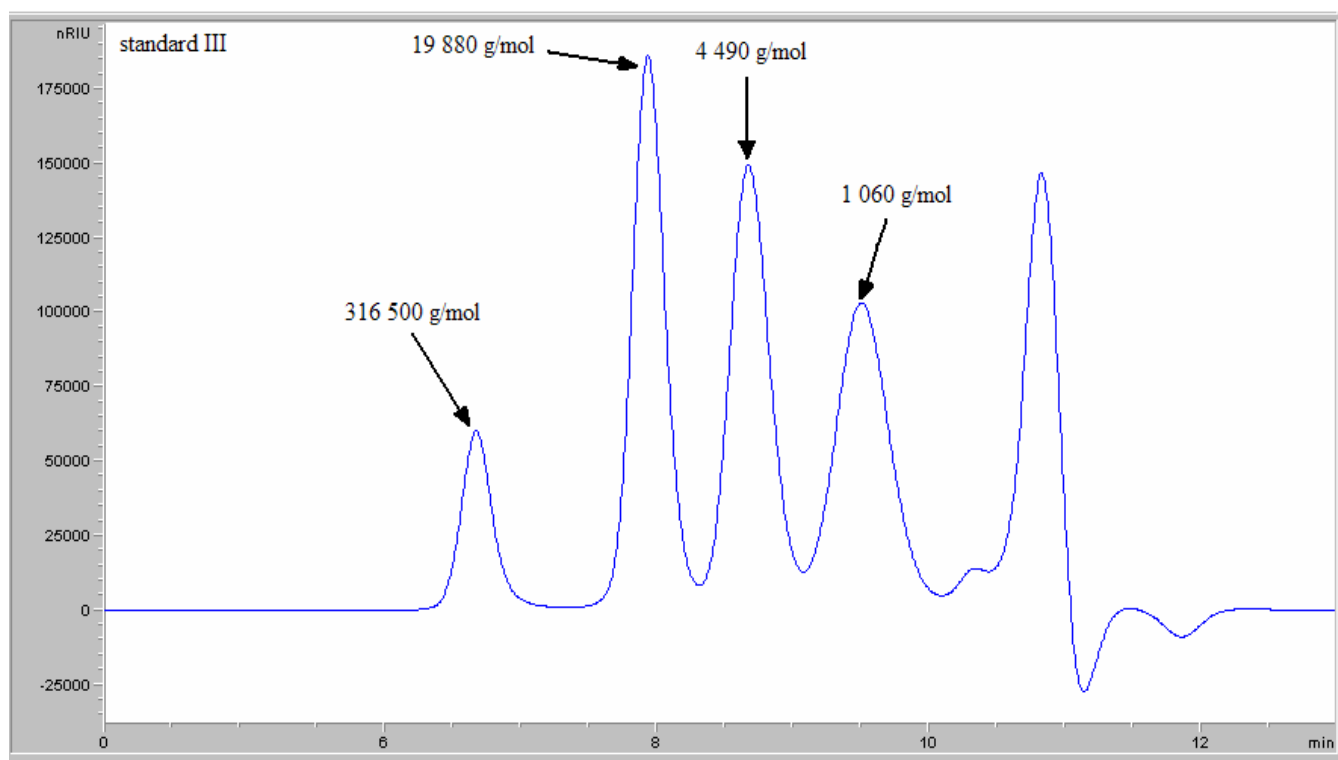
Příloha č. 1: *Metoda s obrácenými zkumavkami; určování změny viskozity v průběhu zahřívání ve vodní lázni*



Příloha č. 2: *Zahřívání vzorků ve vodní lázni při určování sol-gel fázového přechodu*

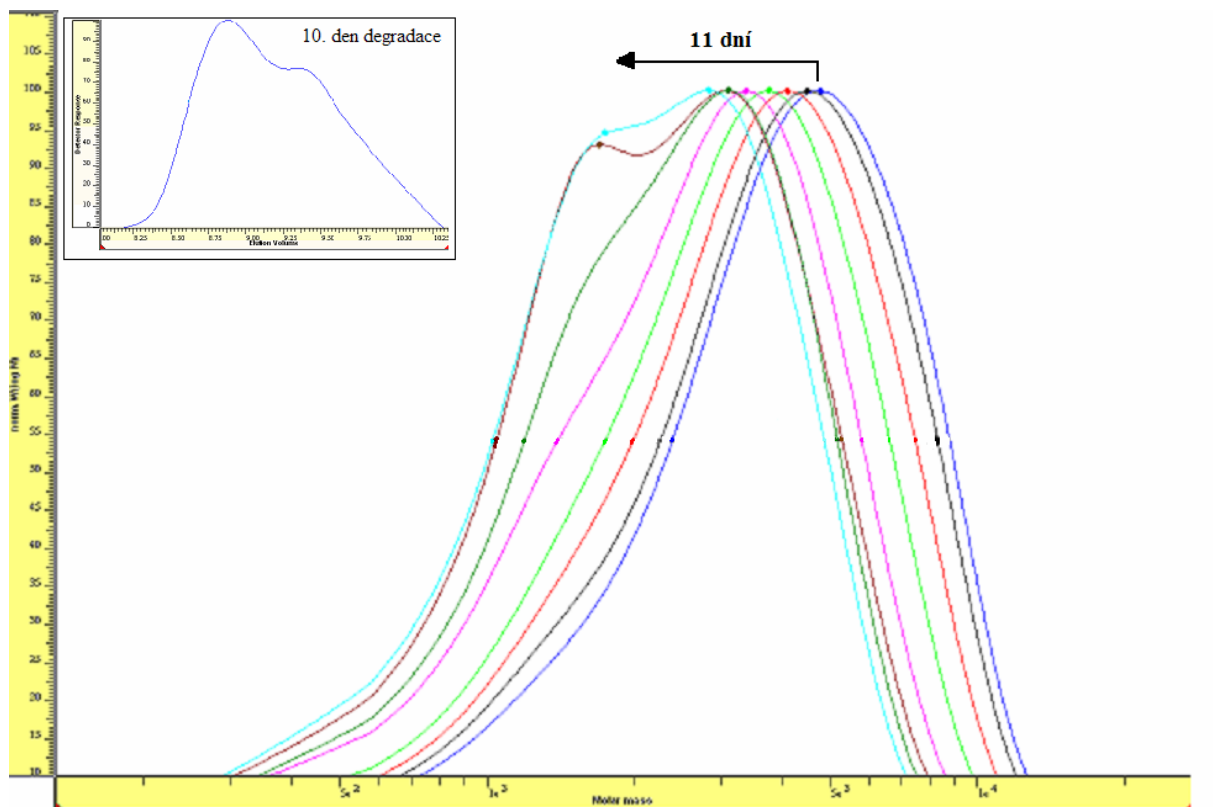


Příloha č. 3: *Chromatogram z GPC analýzy standardu III*



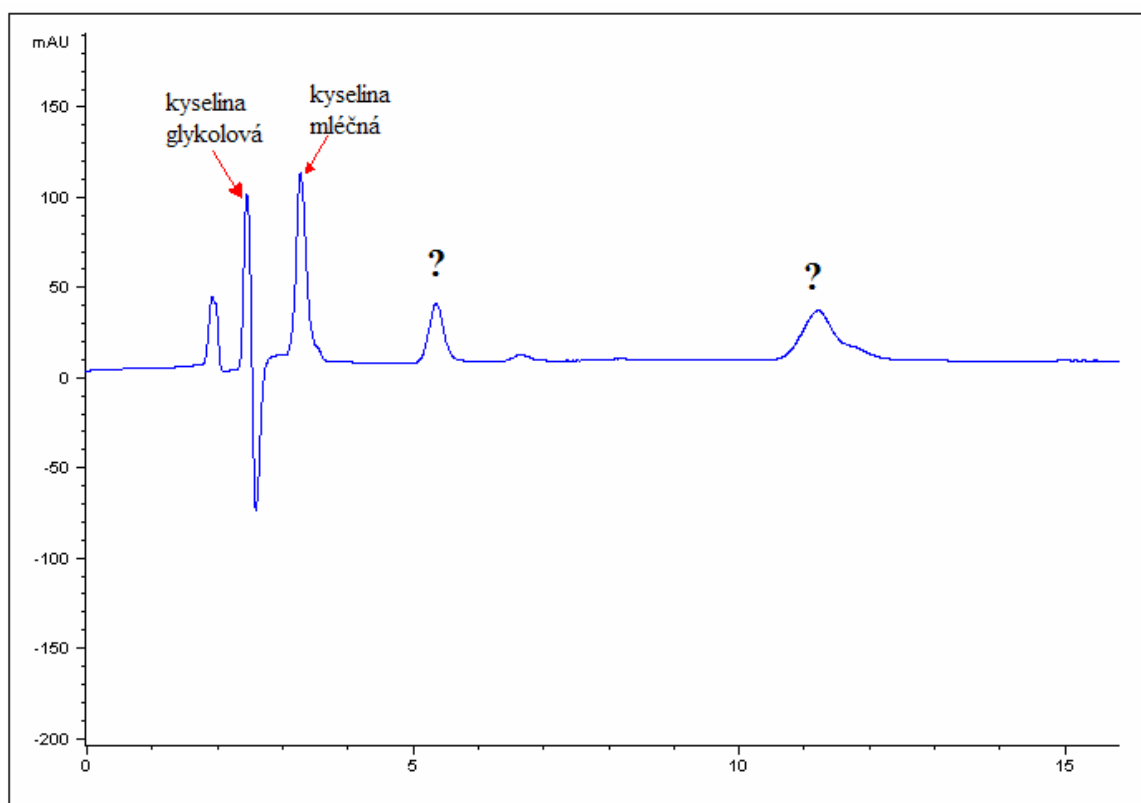
Obr. 56: Ukázka chromatogramu z GPC analýzy standardu III s úzkou molekulovou distribucí a známých molekulových hmotnostech

Příloha č. 4: Pokles molekulové hmotnosti v závislosti na době degradace vzorku č. 3



Obr. 57: Zobrazení závislosti distribuční funkce na molekulové hmotnosti 24% vzorku č. 3 po 11 dnech degradace v roztoku o pH 9,2; s rostoucí dobou degradace dochází k posunu vrcholu píku k nižším molekulovým hmotnostem ve směru šipky a ke změně tvaru píku viz. výřez vlevo nahoře pro 10. den degradace

Příloha č. 6: : Chromatogram z HPLC analýzy pro 24% vzorek č. 3 PLGA-PEG-PLGA po 11 dnech degradace ve fosfátovém pufru o pH 7,4



Příloha č. 7: Chromatogram z HPLC analýzy pro 24% vzorek č. 2 ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA po 11 dnech degradace v roztoku o pH 4,2

