

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE

**PŘÍSPĚVEK KE STUDIU MECHANISMU BOTNÁNÍ
ALIFATICKÝCH OLIGOESTERŮ**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Mgr. Antonín Faulkner

Hradec Králové, 2008

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci zpracoval samostatně pod vedením školitele a použil jen literaturu a prameny uvedené v seznamu literatury.

Hradec Králové, 17. 9. 2008

Mgr. Antonín Faulkner

Děkuji vedoucímu práce Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za odborné vedení při zpracování rigorózní práce a za poskytování cenných rad.

Souhrn

V práci se pojednává o interakci oligoesterových nosičů, založených na kopolymeru kyseliny DL-mléčné a glykolové, s hydrofilním médiem. Výsledkem interakce jsou jevy degradace, eroze a botnutí nosiče. Cílem práce bylo stanovit ve vodě rozpustné, výrazně osmoticky aktivní degradační produkty vzniklé hydrolyzou v matricích a nalézt souvislost mezi jejich koncentrací a změnami botnutí v závislosti na čase. Experimenty proběhly se dvěma druhy větvených polymerů, které se lišily koncentrací tripentaerythritolu použitého jako větvicí monomer a přítomností 20 % triethylcitrátu ve funkci plastifikátoru. Testované matrice se lišily též hmotností. Metoda zahrnovala gravimetrické sledování eroze a botnutí matric a alkalimetrické stanovení kyselých degradačních produktů, které byly získány rozdělením hydrofilních a lipofilních frakcí matrice mezi organickou a vodnou fází. Byla prokázána těsná korelace mezi botnutím matric a koncentrací v nich obsažených hydrofilních oligoesterů.

Summary

This work deals with interaction of oligoester carriers based on DL-lactic-co-glycolic acid, with hydrophilic medium. The interaction results with phenomena of degradation, erosion and swelling of delivery system. The purpose of this work was to quantify water soluble, high osmotically active degradation products generated via hydrolysis in the matrices, and to find a connection between concentration of degradation products and changes of swelling in time. Experiments with two types of branched polymers were realized. The main difference between the both had origin in the concentration of tripterythritol used as branching monomer and in the blending of this polymer with 20% triethylcitrate used as plasticizer. Matrices differ in size too. The method used included parallel gravimetric monitoring of erosion and swelling of matrices and alkalimetric quantifying of degradation acid hydrolysis products. The last mentioned parameter was obtained by the separation of hydrophilic and lipophilic fractions of matrices between organic and aqueous phase. Narrow correlation between matrices swelling rate and simultaneously proven concentration of hydrophilic oligoesters generated in matrices was established.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Příprava PLGA polymerů	9
2.2	Mechanismy degradace	9
2.2.1	Vliv velikosti, tvaru a porozity	12
2.2.2	Vliv přítomnosti iontových léčiv	12
2.2.3	Vliv přítomnosti iniciátorů polymerace	12
2.3	PLGA implantáty jako nosiče s řízeným uvolňováním léčiv.....	13
2.3.1	Vlákna	13
2.3.2	Tablety	14
2.3.3	Implantáty připravené extruzí	14
2.3.4	Filmy	14
2.4	Mikročasticové nosiče léčiv	15
2.4.1	Příprava částicových systémů	15
2.4.2	Analýza degradace částic	15
2.5	Kopolymery PLA, PLGA a dalších sloučenin	16
2.5.1	Kopolymery s polyethylenglykolem a polyethylenoxidem	16
2.5.2	Kopolymery s ϵ -kaprolaktonem.....	16
2.5.3	Ostatní kopolymery.....	16
2.6	Uvolňování léčiv z lékových forem založených na botnání	17
2.6.1	Dynamika průniku vody, botnání matric a tvorby gelové vrstvy v botnacích matricových tabletách	17
2.6.2	Hranice gelové vrstvy a související rozhraní	18
2.6.3	Botnání, pohyby rozhraní a uvolňování léčiva	20
2.6.4	Omezeně botnající matricové tablety	21
2.7	Seznam použitých zkratk.....	23
3	CÍL PRÁCE	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1	Použité přístroje a chemikálie	25
4.1.1	Chemikálie	25
4.1.2	Přístroje	25
4.1.3	Charakteristika použitých oligoesterových nosičů	26
4.2	Stanovení stupně botnání a stupně eroze testovaného nosiče	27
4.2.1	Příprava tělísek	27
4.2.2	Příprava plastifikovaných tělísek	28
4.2.3	Příprava vzorků	28
4.2.4	Měření	28
4.2.5	Stupeň botnání	29
4.2.6	Stupeň eroze.....	29
4.3	Stanovení karboxylového čísla	29
4.3.1	Příprava odměrného roztoku	29
4.3.2	Příprava indikátoru	29
4.3.3	Měření – tělíška o hmotnosti 150 mg	29

4.3.4	Karboxylové číslo – tělíska o hmotnosti 150 mg	30
4.3.5	Měření – tělíska o hmotnostech 620 a 1000 mg	31
4.3.6	Karboxylové číslo - tělíska o hmotnostech 620 a 1000 mg.....	31
5	VÝSLEDKY – TABULKY A GRAFY	32
5.1	Vysvětlivky	49
6	DISKUZE	50
6.1	K zaměření rigorózní práce.....	50
6.2	K degradaci nosiče 1T.....	50
6.3	K degradaci nosiče 3T.....	52
6.3.1	Tělíska o hmotnosti 150 mg.....	52
6.3.2	Tělíska o hmotnosti 1000 mg.....	53
6.3.3	Tělíska o hmotnosti 620 mg plastifikovaná 20 % triethylcitrátem.....	53
	ZÁVĚR.....	55
7	LITERATURA	56

1 ÚVOD

Prvními resorbovatelnými syntetickými polymery, které byly navrženy k tělnímu použití, byly polyglykolidy, též známé jako polyglykolové kyseliny (PGA) (1). V roce 1970 našly využití jako šicí materiál Dexon. Vedle toho začal výzkum alifatických polyesterů odvozených od kyseliny mléčné, který vedl k prvním kopolymerům mléčné a glykolové kyseliny (PLGA), využitý v šicím materiálu Vicryl (2). Stehy založené na PLGA, nevyžadující chirurgické odstranění po vyléčení, vydláždily cestu mnoha dalším užitím, jež jsou známé jako dočasné terapeutické aplikace, např. protetické pomůcky na časově ohraničenou dobu, zejména po čas léčby.

Rozsáhlý výzkum polymerů, kopolymerů a stereokopolymerů PLGA zavedl mnoho postupů přípravy a výroby implantátových a injekčních nosičů léčiv. Výzkumníkům netrvalo dlouho uvědomit si užitečnost biodegradabilních stehů, jako materiálu pro podání léčiv. Patent z roku 1974 popisuje pryskyřice obsahující jednotky kyseliny polyglykolové pro vodou degradující obalování a pomalé uvolňování látek (3). Koncem osmdesátých let významně vzrostl počet patentů na implantáty a další přípravky založených na kyselině polymléčné a polyglykolové. Implantátové a injekční nosičové systémy léčiv v současné době velkou měrou závisí na degradaci a na minimu nepříznivých biologických reakcí.

Věda se zaměřila na pochopení mechanismu biodegradace, přípravu, zpracování a sterilizaci těchto polymerů (4, 5). Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové měly velký úspěch ve výrobě nosičů léčiv, protože degradace může být v rozsahu 3 týdnů až více než rok, což závisí na složení kopolymeru a na postupu přípravy a výroby (4, 6). Degradace probíhá rychleji u kopolymerů s poměrem 50:50 mléčné ke glykolové a s nižší molekulovou hmotností. Také snížení stupně krystalinity zrychlí degradaci vzniklého polymeru.

Schopnost PLGA polymerů rozpouštět se v různých organických rozpouštědlech a možnost tvarování do velkého počtu tvarů, napomohlo k jejich použití od šicích materiálů přes implantáty, mikročástice, nanočástice a vlákna, ke stále rostoucímu počtu přípravků s kontrolovaným uvolňováním. PLGA je nepochybně polymer volby v nové oblasti tkáňového inženýrství, může sloužit jako kostra pro růst nových orgánů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Příprava PLGA polymerů

PLGA polymery nelze zakoupit jako jednoduché sloučeniny, situace je složitější, protože rodina alifatických PLGA polyesterů zahrnuje téměř nekonečný počet sloučenin. Ty se liší zejména konstitucí, rozložením chirálních a achirálních opakujících se jednotek a molekulovou hmotností. Mezi těmito sloučeninami můžeme nalézt amorfní, semikrystalické či voskovité polymery s rozličnou životností (7). Bylo zkoumáno mnoho těchto forem polymerů, jen málo z nich se však ukázalo vhodných pro využití na biodegradabilní systémy s léčivy.

Syntézu lze provést polykondenzací enantiomerů kyseliny mléčné s kyselinou glykolovou. Tato syntéza se většinou provádí za přítomnosti katalyzátorů a vede ke sloučeninám o nižší molekulové hmotnosti. Sloučeniny o vyšší molekulové hmotnosti lze získat syntézou z oligomerů připravených polykondenzací a následnou kondenzací pomocí činidla připojujícího molekuly k hlavnímu řetězci. Nejvyužívanější cestou přípravy se stala polymerace za otevření kruhu z 1,4-dioxan-2,5-dionů, což jsou heterocyklické monomery složené ze dvou jednotek kyseliny mléčné nebo dvou jednotek kyseliny glykolové. Tento typ polymerace vyžaduje přítomnost iniciátorů.

Univerzální metoda syntézy PLGA polymerů neexistuje. Je třeba brát v úvahu, že použitá metoda syntézy (modifikace konců řetězce, přítomnost iniciátorů a další nečistoty) ovlivní vlastnosti připraveného polymeru.

2.2 Mechanismy degradace

Předmětem mnoha diskuzí byla otázka, zda degradace PLGA polymerů ve vodném prostředí (in vivo nebo v médiu) závisí na enzymech, nebo jestli se jedná o děj čistě chemický. V současné době se většina kloní k názoru, že degradace alifatických polyesterů ve styku s živými tkáněmi či tělními tekutinami, které obsahují enzymy, probíhá chemickou hydrolýzou esterových vazeb. Že se jedná o enzymatickou degradaci bychom neměli tvrdit, dokud přesvědčivě nedokážeme úbytek hmoty a změny velikosti bez poklesu molárního množství, protože enzymy jen stěží proniknou hluboko do husté polymerní matrice. Může však nastat případ, kdy je rychlost povrchové

degradace vyšší než rychlost difuze vody do hmoty polymeru, nastává povrchová eroze a je možnost záměny mezi povrchovou, enzymatickou degradací a povrchovou, chemickou, hydrolytickou degradací. To je však nepravděpodobné pro PLGA polymery, kde je příjem vody vždy rychlejší než rychlost degradace.

Absence útoků enzymů na polymerní systémy však neznamená, že hydrolýza je jednoduchý proces. Z makroskopického pohledu se degradace alifatických polyesterů jeví jako homogenní (objemová eroze) (8), avšak v několika málo případech předpokládáme povrchovou erozi (5), a to zejména z toho důvodu, že viskozimetricky byla změřena změna molekulové hmotnosti. V posledních deseti letech významně pokročilo pochopení hydrolytické degradace PLGA díky použití velikostně vylučovací chromatografie (SEC), která odhalila přítomnost dvou populací částečně degradovaných PLGA systémů poměrně větších rozměrů. Tento objev vedl k úvodu do konceptu heterogenní degradace vztažené k jevu difuze-reakce-rozpouštění (9, 10).

Stručně vyjádřeno, pokud se systém PLGA umístí do vodného média, voda začne pronikat do vzorku a započne hydrolytické štěpení esterových vazeb. Každé rozštěpení esterové vazby dává vznik nové koncové karboxylové skupině, která má schopnost katalyzovat další hydrolýzu esterových vazeb, jak se předpokládá v případě mechanismu homogenní degradace (8). Částečně degradované makromolekuly zůstávají po určitou dobu, bez ohledu na jejich vlastnosti, nerozpustné v okolním vodném médiu a degradace probíhá homogenně. Jakmile molekulová hmotnost částečně degradovaných makromolekul poklesne natolik, že se rozpustí ve vodném médiu, započne difuze v celém objemu, rozpustné sloučeniny putují k povrchu a pryč, přičemž pokračují v degradaci. Tento proces, který je kombinací jevů difuze, chemické reakce a rozpouštění, má za následek rozdíly mezi rychlostí degradace na povrchu a uvnitř matrice. Oligomery, které se nacházejí na povrchu, je mohou opustit před konečnou degradací, což je v kontrastu s těmi, které jsou hluboko uvnitř. Výsledkem je nižší autokatalytický účinek na povrchu, kde je nedostatek COOH skupin ve srovnání s celým objemem. Neutralizace koncových karboxylů v pufovaném prostředí může také přispívat ke snížení rychlosti degradace na povrchu. Tento mechanismus byl dobře prozkoumán díky vytváření dvou populací částečně degradovaných makromolekul s rozdílnou molekulovou hmotností, a tudíž byly vyzorovány bimodální distribuce na SEC. Byly zkoumány i duté struktury, zejména z amorfních polymerů (11, 12).

Krystalizující polymery totiž neumožňují vytvořit duté struktury kvůli krystalizaci degradačních produktů (13).

Objev tohoto jevu pomohl pochopit účinky mnoha faktorů, zejména se jedná o stavbu matrice, chemické složení a konfiguraci, molární hmotnost, velikost a tvar, rozložení chemicky reaktivních sloučenin uvnitř matrice a vlastnosti degradačního média (14). Přispěl též při vysvětlování vlivu vymezeného léčiva na charakteristiky degradace a uvolňování, které závisí na hydrofilně-lipofilní rovnováze. Když uvážíme vzájemnou souvislost degradace a uvolňování léčiva z nosičových systémů léčiv, všechny tyto faktory pak také ovlivňují charakteristiky uvolňování.

Následující faktory tedy mají vliv na chování PLGA polymerů ve vodném médiu a na uvolňování léčiva: chemická stavba, molekulová hmotnost, rozložení molekulové hmotnosti, rozložení komonomerních jednotek, rozložení chirálních jednotek, řetězcové poruchy, přítomnost sloučenin o nízké molekulové hmotnosti (monomery, oligomery, rozpouštědla, iniciátory, léčiva), průběh zpracování, morfologie (popouštění, zmražení, mikrostruktury, zbytkové napětí, porozita), historie uchovávání, tvar a velikost, podmínky stárnutí (teplota, iontová síla, iontová výměna, pH), absorpce a adsorpce sloučenin (voda, lipidy, ionty), změny fyzikálních vlastností (tvar, velikost, difuzní koeficient, napínání, praskliny) a přítomnost enzymů (7).

V souvislosti s obecným mechanismem degradace PLGA polymerů existují 4 hlavní faktory, které podmiňují jev difuze-reakce-rozpouštění: 1) rychlostní konstanta hydrolýzy esterové vazby, 2) difuzní koeficient vody uvnitř matrice, 3) difuzní koeficient řetězcových fragmentů uvnitř matrice, 4) rozpustnost degradačních produktů, zvláště oligomerů, v médiu obklopujícím polymer. Dalšími faktory jsou teplota, přísady v polymerní matici a okolním médiu, pH, pufrovací kapacita, velikost a průběh zpracování, zmražení nebo popouštění, sterické bránění, porozita a další proměnné, které ovlivňují hlavní faktory uvedené výše (10).

Účinky chemického složení, molekulové hmotnosti, rozložení molekulové hmotnosti a opakujících se jednotek, krystalinity, jsou v literatuře dobře popsány. Mezi nově studované vlivy se řadí tyto sekundární faktory: velikost, tvar a porozita, iontový charakter vymezeného léčiva, použitý iniciátor při syntéze polymeru.

2.2.1 Vliv velikosti, tvaru a porozity

Velikost polymerních vzorků je v literatuře občas zmíněna (15). V nedávné době Grizzi et al. vysvětlil, na základě heterogenního mechanismu degradace, rozdíly v rychlostech degradace. Srovnáním degradačních charakteristik filmů, prášků a mikrosfér, zhotovených ze stejné šarže polymeru PLA₅₀ (racemát kyseliny polymlečné) přesvědčivě dokázal, že čím je menší velikost tělísek z polymeru, tím je pomalejší rychlost degradace (16). Z toho lze též odvodit, že porézní systémy budou degradovat pomaleji než neporézní, zejména pokud rozměry zamýšleného zařízení budou v řádu milimetrů.

2.2.2 Vliv přítomnosti iontových léčiv

V souladu s heterogenním mechanismem degradace, jakákoliv elektrostatická interakce mezi PLGA matricí a kyselou, zásaditou či amfoterní molekulou léčiva, významně ovlivňuje degradační charakteristiky změnou acidobazické rovnováhy v matrici, díky přítomnosti koncových karboxylových skupin. V případě kyselých léčiv lze očekávat rychlejší hydrolýzu esterových vazeb. Co se týče bazických léčiv, byly objeveny dva účinky: když je léčivo v nadbytku oproti kyselým koncům řetězců, probíhá zásaditá katalýza štěpení esterových vazeb, v opačném případě je rychlost degradace snížena (17).

2.2.3 Vliv přítomnosti iniciátorů polymerace

Poslední dobou se pozornost zaměřuje na možnost ovlivnění degradačních charakteristik některých PLGA polymerů iniciátory polymerace. Významné rozdíly v rozložení opakujících se jednotek byly pozorovány u stereokopolymerů jako PLA₅₀ (18). Na druhou stranu se předpokládalo, že oktoát cínatý (stannum-[bis(2-ethylhexanoát)]) způsobuje změny koncových alkoholických skupin prostřednictvím jejich esterifikace kyselinou oktanovou, což produkuje hydrofobní rezidua, která znemožňují čištění PLGA pomocí precipitace z organického rozpouštědla s ethanolem či vodou (19). V případě použití kovového zinku nebo mléčnanu zinečnatého se takové změny neobjevují. Jestli se podobné jevy mohou objevit i v případech malých částic, jako mikro a nanočástice nebo při použití alkoholů jako iniciátorů, není ještě jasné.

Jednotlivé články obvykle neposkytují přesné informace o struktuře a historii přípravků založených na PLGA polymerech. Proto je dost obtížné poznat, které z výše uvedených faktorů mají vliv na charakteristiky degradace a uvolňování. Je důležité, aby výzkumníci měli na paměti, že charakteristiky degradace a uvolňování pro PLGA polymery závisí na podmínkách experimentu a historii vzorku daleko více než u jiných polymerních matic.

Pro modelování za podmínek *in vivo* je doporučováno brát v úvahu fyziologické pH, iontovou sílu, osmolaritu a teplotu, jak je to jen možné. Vhodnou volbou je použít 0,13 M isoosmolární fosfátový pufr o pH 7,4 a teplotě 37 °C. Pokud hrozí riziko interakce mezi léčivem a fosfátovými ionty, nabízí se použít jiný pufr o pH 7,4. Pokud mohou fosfátové ionty narušit systém, potom je možné použití jiného isoosmolárního pufru o pH 7,4, včetně média buněčných kultur. Při použití takového média je třeba mít na paměti, že v něm mohou být přítomny látky, které mohou difundovat, změnit fyzikální podmínky matrice a chemii koncových skupin a takto ovlivnit celé chování díky souvisejícím faktorům, které byly uvedeny výše.

2.3 PLGA implantáty jako nosiče s řízeným uvolňováním léčiv

Implantáty využívané jako nosiče pro řízené uvolňování léčiv se liší od přípravků, jejichž funkce je primárně strukturální. Strukturální implantáty mohou nacházet užití jako ortopedické přípravky (20), v neuronální transplantaci (21), jako intravaskulární stenty (22) a na opravy kloubní chrupavky (23). Implantáty připravované z PLGA polymerů jsou většinou ve tvaru vláken, lisovaných tablet, tělísek vyrobených extruzí a filmů. Méně typické formy PLGA implantátů zahrnují tobolky, které prasknou a uvolní léčivo v předem určeném čase, a implantáty, které se tvoří *in situ* (24, 25).

2.3.1 Vlákna

Biodegradabilní vlákna jsou obvykle připravována z kyseliny poly-L-mléčné (PLA₁₀₀) zvlákněním a lze připravit celistvá (26) i dutá vlákna (27). Tyto implantáty mohou být podkožně podány menšími jehlami, než těmi, které se používají pro podání ostatních implantátů. Pomocí metody fázového přechodu v kombinaci se zvlákněním lze připravit systémy dutých vláken o široké škále porozit.

Nosiče léčiv se zhotovují napuštěním roztoku léčiva do dutiny vláken a utěsněním jejich konců. Uvolňování léčiva silně závisí na struktuře membrány ve stěně dutého vlákna.

Přestože jsou tato vlákna zajímavá z hlediska snadnosti podání a jejich schopnosti řízeného uvolňování, každý rezervoárový systém založený na vodném roztoku léčiva s sebou nese riziko poškození membrány a uvolnění celé dávky léčiva najednou.

2.3.2 Tablety

Docela běžnou metodou přípravy implantátů ve formě tablet či pelet z PLGA polymerů je přímé lisování, a to buď za normální, nebo zvýšené teploty a s rozpouštědlem či bez něj. Mnoho z těchto lisovacích metod je založeno na klasických farmaceutických tabletovacích postupech. Metoda bez přidání rozpouštědla je vhodná jen pro polymery s nižší molekulovou hmotností, které mají nižší teploty skelného přechodu a umožní tak splynutí jednotlivých částic polymeru a léčiva tlakem (28).

Další variantou tohoto postupu je zhotovení dvouvrstvého implantátu. Ten sestává z jedné vrstvy samotného polymeru a druhá vrstva je kombinací polymeru a léčiva (29).

2.3.3 Implantáty připravené extruzí

Nosičové systémy založené na vytlačování jsou obvykle připravovány z koncentrovaného roztoku polymeru. Rozpouštědlem je např. aceton, ve kterém je léčivo rozpuštěno či dispergováno (30). Pevné materiály se zase zpracovávají za vyšších teplot (31). Tyto přípravky jsou obvykle ve tvaru válečků a mohou být použity jako monolitické matrice nebo se potahují vrstvou PLA, která omezí degradaci a následné uvolňování léčiva. Nepotahované válečky, zvláště s vyšší dávkou léčiva kolem 30-40 %, uvolňují léčivo hlavně difuzí. Potahované válečky s obsahem léčiva 15 % a méně, vykazují osmoticky řízené uvolňování.

2.3.4 filmy

Filmy s obsahem PLA se mohou připravit jednoduchým rozpuštěním polymeru ve vhodném rozpouštědle; přidáním požadovaného léčiva vznikne společný roztok či suspenze, která se odlije do požadovaného tvaru a rozpouštědlo se nechá odpařit.

Pro přípravu takovýchto filmů se používá aceton, chloroform, dichlormethan, ethylacetát a další (32, 33).

2.4 Mikročásticové nosiče léčiv

Zdaleka největší snahou je využít PLGA polymery jako nosiče léčiv v mikročásticových systémech. Obrovskou výhodou těchto přípravků je uvolňování souvislé dávky léčiva po dlouhou dobu. Ta se obvykle pohybuje v řádu týdnů až měsíců. Jakmile je dávka podána, je již téměř nemožné léčbu přerušit (34).

2.4.1 Příprava částicových systémů

Většina postupů je založena na odpařování rozpouštědla. Dále se uplatňují enkapsulace, metody založené na fázové separaci a koacervaci, sprejové sušení. Výběr postupu přípravy závisí zejména na vlastnostech léčiva, hlavně jeho rozpustnosti v organické či vodné fázi (34).

2.4.2 Analýza degradace částic

Uvolňování léčiva z mikročástic je úzce spojeno s degradací PLGA polymeru. Existuje celá řada testovacích metod, oficiální metoda disoluce musí být teprve zavedena (35).

Protože uvolňování léčiva přímo závisí na degradaci polymeru, je nutné zjistit změny molekulové hmotnosti polymeru během jeho degradace. To se provádí vyjmutím mikročástic z média ve stanovených intervalech a jejich rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle, např. dichlormethanu či chloroformu. Přestože se průměrná molekulová hmotnost během degradace dá zjistit měřením viskozity, většinou se používá SEC nebo gelová permeační chromatografie, která poskytne nejen průměrnou molekulovou hmotnost, ale celé rozložení molekulové hmotnosti (36).

Vzhledem k tomu, že degradační produkty PLGA, kyselina mléčná a glykolová, jsou kyselé, s časem klesá pH v nosičovém systému a v prostředí, které jej obklopuje. Studie prokázaly značný pokles pH degradačního média (2 ml fosfátového pufru) ze 7,4 na 3 ve 28 dnech v systému obsahujícím 20 mg částic, které byly připraveny z nízkomolekulárního PLGA polymeru. Kyselejší prostředí pak přispívá k rychlejší

degradaci částic a může představovat i stabilitní riziko pro inkorporované léčivo, zejména proteiny (37).

2.5 Kopolymery PLA, PLGA a dalších sloučenin

2.5.1 Kopolymery s polyethylenglykolem a polyethylenoxidem

Současný výzkum se zaměřil na spojení polyethylenglykolu (PEG) nebo polyethylenoxidu (PEO) s PLA nebo PLGA. Struktura PEG a PEO je shodná, jako PEG se většinou označují polymery s molekulovou hmotností do 20 000, monomerem je ethylenglykol, PEO se týká polymerů o větší molekulové hmotnosti, monomerem je ethylenoxid. Zájem o tyto kopolymery je dán touhou zkombinovat hydrofilní a biokompatibilní vlastnosti PEG s degradabilitou PLGA. V závislosti na složení výsledného kopolymeru lze získat materiál s vlastnostmi hydrofobními až hydrofilními a nedegradabilní až degradabilní.

V zájmu pozornosti stojí zejména triblokové ABA kopolymery s centrálním PEG nebo PEO a dvěma koncovými řetězci PLA nebo PLGA (38).

2.5.2 Kopolymery s ϵ -kaprolaktonem

Byla zkoumána řada kopolymerů s různým zastoupením PGA, PLA a ϵ -kaprolaktonu. Rychlost degradace a další vlastnosti lze ovlivnit podílem jednotlivých složek v terpolymeru. Tyto polymery degradují v celém objemu a během degradace lze pozorovat krystalickou fázi složenou zejména z poly-L-mléčné kyseliny a amorfní, která sestává zejména z ϵ -kaprolaktonu (39).

2.5.3 Ostatní kopolymery

Dalšími zkoumanými kopolymery jsou kopolymery s glycinem, kyselinou p-hydroxybenzoovou, p-hydroxyskořicovou a aspartovou. Tyto materiály si zachovávají biodegradabilní vlastnosti, ale liší se od samotných PLA či PGA v degradaci a uvolňování (40).

2.6 Uvolňování léčiv z lékových forem založených na botnání

Botnání matric je významné v oblasti nosičů léčiv. V literatuře je tento jev popsán odlišně. Například Peppas používá termín uvolňování řízené botnáním, Lee jej nazývá hydrogelovými nebo polymerními matricemi, které se vyznačují pohyblivými hranicemi, Ford navrhuje termín hydrofilní matricové tablety. Tyto systémy lze také nazývat botnací matricové tablety, což zohledňuje i postup výroby (41).

2.6.1 Dynamika průniku vody, botnání matric a tvorby gelové vrstvy v botnacích matricových tabletách

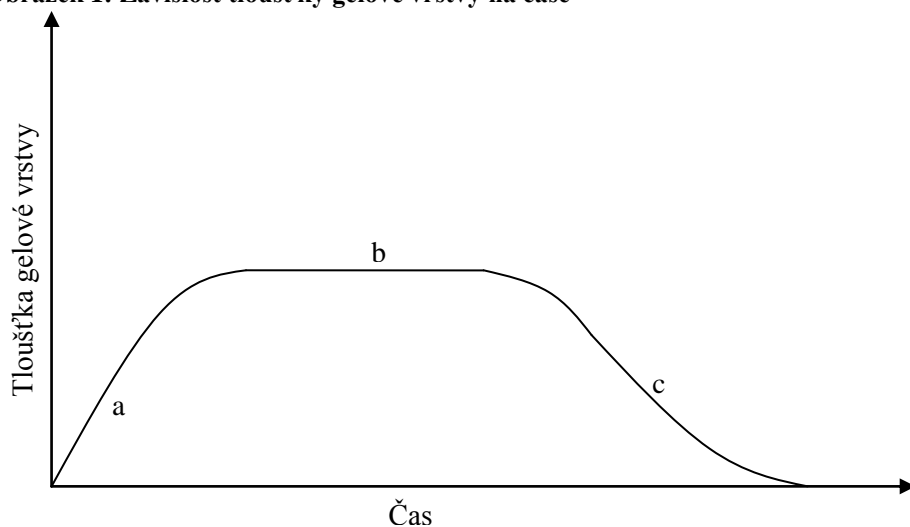
Botnací matricové tablety jsou aktivovány vodou, řízené uvolňování léčiva závisí na interakcích vody, polymeru a léčiva. Prvním krokem, který vede k botnání matrice a disoluce léčiva, je průnik vody do matrice. Přítomnost vody snižuje teplotu skelného přechodu polymeru (např. pro hydroxypropylmethylcelulózu, HPMC, ze 184 °C na méně než 37 °C) a přetváří skelnou fázi polymeru v plastickou fázi (gelovou vrstvu). Vyšší hybnost řetězců polymeru umožňuje transport rozpuštěného léčiva. Jevy dané relaxací molekul polymeru určuje botnání či zvětšení objemu matrice. Později může ovlivnit mechanismus uvolňování léčiva z nosiče.

V závislosti na charakteristikách polymeru, část polymeru v plastické fázi, na povrchu matrice, může dosáhnout koncentrace rozpletení řetězců. Proto se liší tloušťka gelové vrstvy a matrice se rozpouští, nebo eroduje. Koncentrace, při které se dá předpokládat rozpletení řetězců, byla demonstrována v souvislosti s náhlou změnou reologických vlastností gelu (42). Tato hodnota byla měřena pro HPMC a významně se neliší od dat získaných z modelové rovnice, která popisuje gelovou vrstvu a uvolňování léčiva (43). Bonferoni et al. nověji ukázal spolehlivou souvislost mezi reologickým chováním HPMC gelů a jejich rychlostí eroze, což potvrzuje, že interakce polymer-polymer a polymer-voda jsou zodpovědné za strukturu gelu a jeho vnímavost k erozi. V případě hůře rozpustných léčiv ovlivňují i rychlost uvolňování (44).

Tloušťka gelové vrstvy závisí na průniku vody, rozplétání řetězců a transferu hmoty (polymeru a léčiva) ve vodě. Na počátku je pronikání vody rychlejší než rozplétání řetězců a dochází k rychlé tvorbě gelové vrstvy. Protože naroste difuzní vzdálenost, voda začne pronikat pomaleji, tloušťka gelové vrstvy příliš nemění. V této

fázi je pronikání vody a rozplétání řetězců v rovnováze (45). Tloušťka gelové vrstvy v botnacích matricových tabletách má tedy tři fáze: roste tehdy, když je pronikání vody nejrychlejším jevem (obrázek 1, a); zůstává konstantní, když je rychlost rozplétání řetězců shodná s penetrací (obrázek 1, b); a začne klesat, jakmile je celý objem polymeru v plastické fázi (obrázek 1, c) (43).

Obrázek 1: Závislost tloušťky gelové vrstvy na čase



Kinetika uvolňování léčiva je úzce spojena s dynamikou gelové vrstvy. Na začátku probíhá difuze dle Ficka až anomální, pokračuje od kvazi-konstantní až ke konstantní, končí kinetikou prvního řádu.

Gelová vrstva, která se utváří kolem matrice, určuje mechanismus uvolňování, hlavním zkoumaným jevem je tedy penetrace vody. Gel musí být schopen zabránit dezintegraci matrice a řídit dodatečný průnik vody. Tvorbu gelové vrstvy a následnou rychlost uvolňování léčiva řídí průnik vody, botnání polymeru, rozpustnost a difuze léčiva a eroze matrice. Řízeného uvolňování léčiva je dosaženo difuzí molekul skrz gelovou vrstvou, která se může rozpustit či erodovat. Dalším příspěvkem k transportu léčiva v gelové vrstvě je relaxace molekul polymeru (46).

2.6.2 Hranice gelové vrstvy a související rozhraní

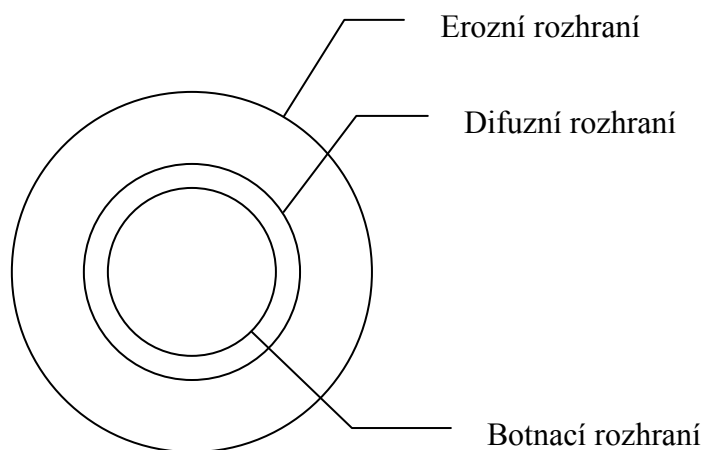
Vzhledem k hlavní roli gelové vrstvy je důležité definovat její hranice. Ty souvisejí s jednotlivými rozhraními, které oddělují rozdílné fáze matrice. Dynamika

tvorby gelové vrstvy je pak určena jejich pohyby. Tloušťka gelové vrstvy je definována rozhraním mezi maticí a disolučním médiem (erozní rozhraní), a rozhraním mezi skelnou a plastickou fází polymeru (botnací rozhraní). Chování gelové vrstvy je tedy ovlivňováno pohyby erozního a botnacího rozhraní.

Lee popsal třetí rozhraní v gelové vrstvě botnacími maticemi, které obsahovaly diklofenak (47). Toto špatně rozpustné léčivo, které bylo dispergováno ve skelné fázi matrice, precipitovalo v gelové vrstvě. Tak vzniká rozhraní, nazvané difuzní, které souvisí s hranicí mezi rozpuštěným a nerozpuštěným léčivem. Jeho přítomnost je závislá na rozpustnosti a dávce léčiva. V botnacími maticemi tabletách tedy předpokládáme tři rozhraní (obrázek 2):

- a) *botnací rozhraní*, hranice mezi dosud skelným polymerem a jeho plastickou fází
- b) *difuzní rozhraní*, hranice mezi pevným, dosud nerozpuštěným léčivem a rozpuštěným v gelové vrstvě
- c) *erozní rozhraní*, hranice mezi maticí a disolučním médiem.

Obrázek 2: Botnací maticová tableta a jednotlivá rozhraní



Pohyb botnacího rozhraní souvisí s rychlostí příjmu vody, pohyb difuzního rozhraní s rychlostí disoluce a pohyb erozního rozhraní s rychlostí eroze matrice (48).

Rychlost a kinetika uvolňování léčiva z maticových HPMC tablet jsou řízeny dynamikou tloušťky gelové vrstvy, která je určena pohyby jednotlivých rozhraní. V některých případech, při použití dostatečně rozpustných polymerů, zůstává tloušťka

gelové vrstvy konstantní, v tomto případě jsou pohyby rozhraní společně synchronizovány. Při zachování konstantních podmínek vede tato situace k uvolňování nultým řádem. Vzhledem k tomu, že matrice je trojrozměrný systém, musí se brát v úvahu též zvětšování plochy uvolňování během botnání.

2.6.3 Botnání, pohyby rozhraní a uvolňování léčiva

Analýza uvolňování léčiva z botnacíh matricových tablet obvykle zahrnuje úpravu získaných dat mocninnou funkcí. Tato operace může poskytnout informace o kinetice a mechanismu uvolňování léčiva. Abychom získali kompletní představu o chování matrice během uvolňování, je zapotřebí studovat botnání. Vzhledem k tomu, že tloušťka gelové vrstvy závisí na pohybech botnacího, difuzního a erozního rozhraní, pak analýza těchto pohybů umožní vysvětlení uvolňování léčiva ve vztahu k botnání.

Přítomnost difuzního rozhraní nás nutí k přehodnocení významu poloh botnacího a erozního rozhraní pro řízení uvolňování. Nedávná měření na HPMC matricích ukázala vliv pohybů rozhraní, zejména difuzního, na kinetiku uvolňování. Bylo zjištěno, že s rostoucí tloušťkou gelové vrstvy klesá rychlost uvolňování. Vzhledem k tomu, že je obtížné zajistit synchronizaci pohybů rozhraní, kinetika uvolňování závisí na vzájemných polohách erozního, botnacího a difuzního rozhraní.

Pro kinetiku uvolňování je rozhodující vzdálenost mezi difuzním a erozním rozhraním. Tloušťka gelové vrstvy s rozpuštěným léčivem (vrstva mezi difuzním a erozním rozhraním) je pak rozhodující pro uvolňování léčiva, namísto celé tloušťky gelové vrstvy (mezi botnacím a erozním rozhraním).

Taktéž se ukázalo, že rychlost uvolňování závisí na rychlosti pohybu difuzního rozhraní. Když začalo narůstat botnací rozhraní (díky rychlejšímu pronikání vody a zvýšení porozity matrice) a difuzní rozhraní zůstalo beze změn, tok léčiva se také nezměnil (49). Když se však zvýšila rozpustnost léčiva a začalo narůstat difuzní rozhraní, aniž by se měnilo erozní rozhraní, rychlost uvolňování se zvýšila. Zatímco pohyb difuzního rozhraní je téměř lineární, gelová vrstva je ovlivňována pohybem erozního rozhraní. Výsledkem tohoto jevu je fakt, že v botnacíh matricových tabletách je kinetika uvolňování určena pohybem erozního rozhraní a rychlost uvolňování pohybem difuzního rozhraní.

Uvolňování léčiva z botnacích matricové tablety tedy zahrnuje difuzi léčiva přes gelovou vrstvu a transport léčiva díky relaxaci molekul polymeru. Rychlost difuze přes gelovou vrstvu závisí na rozpustnosti léčiva a na erozi matrice, což jsou faktory ovlivňující koncentrační gradient léčiva v gelové vrstvě. Uvolňování léčiva z botnacích matricové tablety je úzce spojen s dynamikou gelové vrstvy, a to i v těch případech, kdy je rozpustnost léčiva tak nízká, že se dá předpokládat uvolňování pevných částic léčiva z rozpouštějící se vrstvy gelu (50, 51).

2.6.4 Omezeně botnající matricové tablety

O využití botnacích matricových tablet v řízeném uvolňování je velký zájem díky jejich snadnosti přípravy a nízké ceně. Byla učiněna řada pokusů modifikovat uvolňování tak, aby vyhovovalo terapeutickým potřebám. Řada prací se zaměřila na změnu rychlosti uvolňování z matrice pomocí zásahů na její povrch (52).

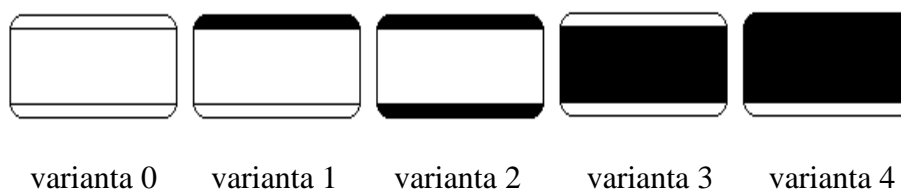
Částečným obalením botnacích matricových tablet z rozpustného polymeru nepropustným filmem se vytvořily podmínky pro dosažení uvolňování nultého řádu. Obalením základny a boční stěny válcovité matrice byla získána konstantní plocha pro botnání matrice a uvolňování léčiva. Čas potřebný k dosažení konstantního uvolňování závisí na rozpustnosti polymeru, ta určuje synchronizaci pohybů rozhraní. Pokud se použijí méně rozpustné polymery, jako je např. HPMC, synchronizace nemůže být dosaženo během času uvolňování. V tomto případě převažuje botnání matrice nad její erozí a jevem rozpouštění (53). Náznaky synchronizace rozhraní (na základě pozorování hodnot tloušťky gelové vrstvy) se objevily jen v případě, když se k vytvoření matrice použilo nízké procento HPMC.

Shenouda et al. publikoval data, která ukazují možnost dosáhnout lineárního uvolňování difylinu z hydroxypropylmethylcelulózové matrice potažené na boční stěně a základně ve vodě rozpustným polyethyloxazolinem. V tomto případě bohužel nebyla získána data týkající se pohybů rozhraní (54).

Byla též studována možnost měnit kinetiku uvolňování léčiva z botnacích matricových tablet z HPMC pomocí úpravy botnání matrice. Colombo et al. jako první popsal novou metodu přípravy omezeně botnající matricových tablet z HPMC: Aby se dosáhlo změny uvolňování z botnající matrice, byly částečně potaženy rozdílné části povrchu matrice nepropustným filmem. Úmyslem bylo změnit rychlost botnání matrice

pomocí redukce povrchu, kterým matrice přijímá vodu, aniž by se výrazně měnily difúzní charakteristiky léčiva. Na válcovité matricové tablety z HPMC, které obsahovaly hydrochlorid diltiazemu, byl nanesen roztok acetátu-propionátu celulózy v acetonu, po odpaření rozpouštědla tak vznikl nepropustný film. Byly připraveny tyto vzorky (obrázek 3): nepotahovaná, referenční matrice (varianta 0), matrice potahovaná na jedné základně (varianta 1), matrice potahovaná na obou základnách (varianta 2), matrice potahovaná na boční stěně (varianta 3) a matrice potahovaná na jedné základně a boční stěně (varianta 4).

Obrázek 3: Varianty potahovaných matic



Analýza botnání matic během uvolňování léčiva ukázala, že přítomnost částečného obalu silně ovlivňuje změny morfologie matrice. Chování pěti variant při botnání bylo kvantifikováno měřením plochy uvolňování (nepotahovaný povrch) za časovou jednotku. Bylo zřejmé, že čím je větší potahovaná plocha matrice, tím je menší plocha pro uvolňování léčiva a tedy i rychlost uvolňování léčiva, což souvisí se zpomalenou kinetikou botnání. V důsledku toho se kinetika uvolňování v jednotlivých případech liší. Křivky uvolňování se především u variant 2 a 4 blížily linearitě krátkou dobu po začátku uvolňování. Byl učiněn závěr, že přítomnost obalu změní vztah mezi botnáním a transportem léčiva, vzhledem k nepotahované matici.

2.7 Seznam použitých zkratk

HPMC	hydroxypropylmethylcelulóza
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLA ₁₀₀	kyselina poly-L-mléčná
PLA ₅₀	racemát kyseliny polymléčné
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
SEC	velikostně vylučovací chromatografie

3 CÍL PRÁCE

V rámci rigorózní práce byl zadán úkol navázat na diplomovou práci a přispět tak k řešení mechanismu nerovnovážného botnání biodegradabilních oligoesterů a polyesterů alifatických hydroxykyselin. Bylo doporučeno využít stejnou metodu separace vodorozpustných nízkomolekulárních produktů degradace jejich extrakcí z chloroformových roztoků. Při zadání tématu se očekávalo, že v případě dostatečně shodného nebo obdobného průběhu změn koncentrace karboxylových skupin v matricích s časovým průběhem stupně botnání by bylo možno rozšířit konkrétní poznatky o vlivu osmotického působení degradačních nízkomolekulárních oligoesterů na atypický průběh botnání. Faktorem, který byl zvolen k rozšíření informací o studovaných systémech byla velikost matric a přítomnost 20 % triethylcitrátu ve funkci plastifikátoru.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a chemikálie

4.1.1 Chemikálie

Oligoesterové nosiče (viz tabulka 1), Katedra farmaceutické technologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Chloroform p.a., Penta Chrudim

Chlorid sodný p.a., Lachema a.s.

Hydroxid draselný p.a., Lachema a.s.

Ethanol 96%, Penta Chrudim

Methanol p.a., Lachema a.s.

Phenolphthaleinum, Zdravotnické zásobování, Říčany u Prahy

Destilovaná voda, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Triethylcitrát, Merck

4.1.2 Přístroje

Digitální váhy, KERN 440-35N (max. 400 g, d = 0,01 g)

Analytické digitální váhy, KERN ABS (max. 220 g, d = 0,1 mg)

Vakuová sušárna, HSPT200, Memmert

Horkovzdušná sušárna MEMMERT ULE 400

Biologický termostat, BT 120, Laboratorní přístroje Praha

Magnetická míchačka HEIDOLPH MR 3001

Vakuová sušárna, BINDER VD23

4.1.3 Charakteristika použitých oligoesterových nosičů

Použité polymery byly syntetizovány na katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Syntéza: stupňová kopolymerace ternární směsi složené z ekvimolárního podílu kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové doplněné větvicím monomermem tripentaerythritolem v hmotnostní koncentraci 1 % nebo 3 %.

Molekulární hmotnosti byly stanoveny metodou GPC-MALLS, hodnota T_g metodou DSC.

Tabulka 1: Charakteristiky testovaných oligoesterových nosičů

nosič	M_n	M_w	M_w/M_n	MP	M_z	M_{z+1}	ΔC_p	g'	T_g
1T	2877	12035	4,18	16849	26284	41062	0,656	0,42	25,3
3T	3355	13334	3,97	9074	27152	43224	0,508	0,31	21,7

Použité symboly:

1, 3	koncentrace větvicího monomeru v procentech
T	tripentaerythritol
M_n	číselně střední relativní molekulová hmotnost
M_w	hmotnostně střední relativní molekulová hmotnost
M_w/M_n	stupeň polydisperzity
MP	pík relativní molekulové hmotnosti
M_z	charakteristika frakce velkých molekul ve vzorku
M_{z+1}	charakteristika úzké frakce extrémně velkých molekul ve vzorku
ΔC_p	tepelná kapacita v $J.K^{-1}.g^{-1}$
g'	index větvení molekul
T_g	teplota skelného přechodu ve $^{\circ}C$

4.2 Stanovení stupně botnání a stupně eroze testovaného nosiče

4.2.1 Příprava tělísek

K přípravě tělísek ze zkoušeného polymeru byly použity hadičky ze silikonové pryže o vnitřním průměru 4 nebo 8 mm. Hadičky byly nejprve umyty pomocí injekční stříkačky naplněné vodou s detergentem a vypláchnuty čištěnou vodou. Poté byly hadičky umístěny do horkovzdušné sušárny vyhřáté na 80 °C.

Mezitím bylo naváženo potřebné množství polymeru navýšené o předpokládané ztráty, cca 20 %. Kádinka s naváženým polymerem se umístila do silikonové lázně na magnetickou míchačku. Teplota lázně byla udržována na hodnotě o cca 20 °C více, než je teplota skelného přechodu daného polymeru. Postupně měknoucí polymer nebyl míchán z důvodu vyvarování se vzniku vzduchových bublin.

Po dostatečném zahřátí polymeru a jeho přechodu do plastického stavu byla horká hadička připojena jedním koncem k vodní vývěvě a druhým koncem ponořena do roztaveného polymeru. Poté, co přestala tavenina v hadičce stoupat (chladnutí polymeru), byla hadička ustřižena a konce uzavřeny pryžovými zátkami. Tento celek se nechal chladnout v rovné poloze s ohledem na jeho další snadnější zpracování a byl umístěn přes noc do exsikátoru.

Po ztuhnutí byla silikonová hadička rozříznuta podél pomocí žiletky a sklovitý polymer byl vyjmut. Vzhledem k hygroskopičnosti materiálu se pracovalo v rukavicích.

Vzniklé válce o průměru 4 mm byly poté nařezány na délku cca 1 cm pomocí speciálně upravené žiletky. Na upravené žiletce se nastavila vzdálenost břitu od dorazu tak, aby výsledná tělíska měla hmotnost $150 \text{ mg} \pm 5 \%$, tzn. v intervalu 142,5 až 157,5 mg včetně. Každé tělísko bylo jednotlivě zváženo, pokud bylo tělísko těžší než 157,5 mg, byla jeho hmotnost upravena pomocí jemného smirkového papíru. Tělíska s hmotností pod 142,5 mg byla vyřazena. Vyhovující tělíska byla umístěna do exsikátoru.

Válce o průměru 8 mm byly nařezány na délku cca 1,8 cm. Hmotnost tělíska byla $1000 \text{ mg} \pm 5 \%$, tzn. v intervalu 950 až 1050 mg.

4.2.2 Příprava plastifikovaných tělísek

Bylo naváženo potřebné množství polymeru navýšené o předpokládané ztráty. Polymer byl roztaven na silikonové lázni a bylo k němu přidáno vypočítané množství plastifikátoru. Hmotnost triethylcitrátu v polymeru činila 20 % celkové hmotnosti plastifikovaného polymeru.

Tělíska byla tvarována z roztaveného plastifikovaného polymeru kopistkou tak, aby hmotnost tělíska byla $620 \text{ mg} \pm 5 \%$, tzn. v intervalu 589 až 651 mg.

4.2.3 Příprava vzorků

Čistá a prázdná lahvička označená jednoznačným kódem byla zvážena na analytických vahách. Hodnota se zapsala jako m_x . Poté bylo pomocí pinzety do této lahvičky vloženo tělísko a zvážila se celková hmotnost lahvičky a tělíska (m_x+m_0). Plastifikovaná tělíska byla tvarována kopistkou přímo v lahvičce.

Do lahvičky s tělískem bylo nalito 15, 50 nebo 100 ml čištěné vody (dle hmotnosti tělíska), pak se uzavřela a umístila do biologického termostatu vytemperovaného na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Analogicky se postupovalo při přípravě dalších vzorků.

Vodné médium bylo vyměňováno každé 3 dny.

4.2.4 Měření

Měření probíhalo v intervalech 1, 3, 7, 14, 21 a případně 28 dnů od přidání vodného média k tělísku. Pro každý interval byly použity 2 vzorky.

Vzorky s příslušným kódem, který označoval interval měření, byly vyjmuty z termostatu a vodné médium se opatrně slilo. Pomocí vatové tyčinky byly odstraněny kapky vody. Dосуšení lahvičky se provedlo pomocí vysoušeče vlasů tak, aby nedošlo ke ztrátám vody ze zbotnalého tělíska.

Lahvičky se zbotnalým tělískem byly zváženy, naměřené hodnoty zapsány (m_x+m_b). Lahvičky byly umístěny na den do vakuové sušárny, kde se sušily při teplotě $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Po vysušení do konstantní hmotnosti byly lahvičky opět zváženy a hodnoty zapsány (m_x+m_s).

Z naměřených hodnot se vypočítal stupeň botnání a stupeň eroze.

4.2.5 Stupeň botnání

$$B = \frac{m_b - m_s}{m_s} \cdot 100$$

B stupeň botnání [%]

m_b hmotnost zbotnalého tělíska [g]

m_s hmotnost vysušeného tělíska [g]

4.2.6 Stupeň eroze

$$E = \left(1 - \frac{m_0 - m_s}{m_0} \right) \cdot 100$$

E stupeň eroze [%]

m_0 počáteční hmotnost tělíska [g]

m_s hmotnost vysušeného tělíska [g]

4.3 Stanovení karboxylového čísla

4.3.1 Příprava odměrného roztoku

Odměrný roztok hydroxidu draselného byl připraven rozpuštěním 1,1222 g KOH v methanolu ve 2000,00 ml odměrné baňce. Koncentrace byla stanovena jako 0,01 mol/l.

4.3.2 Příprava indikátoru

Roztok fenolftaleinu byl připraven rozpuštěním 1,00 g fenolftaleinu v 80 ml 96% ethanolu a doplněním do objemu 100,00 ml destilovanou vodou.

4.3.3 Měření – tělíska o hmotnosti 150 mg

Pro toto stanovení byla použita řada vzorků, které se připravily analogicky k vzorkům pro stanovení stupňů botnání a degradace.

Po uplynutí daného intervalu byly vyjmuty vzorky z termostatu, slilo se vodné médium a stěny lahvičky se osušily vatovou tyčinkou. Ke zbotnalému polymeru v lahvičce bylo přilito 5,00 ml chloroformu. Po rozpuštění bylo do lahvičky přidáno 5,00 ml destilované vody a obsah se několikrát intenzivně protřepal. Pokud byla

po oddělení vrstev vodná vrstva zakalená, k soustavě se přidalo 0,1 g chloridu sodného a postup se opakoval. Po oddělení fází bylo injekční stříkačkou odebráno 3 ml horní vodné fáze a přeneseno do vytárované kádinky na analytických vahách, hmotnost se zapsala (h). Do kádinky bylo vloženo magnetické míchadlo a přikápnut indikátor. Kádinka se umístila na magnetickou míchačku a ponořilo se do ní ústí byrety s odměrným roztokem hydroxidu draselného. Titrovalo se do prvního růžového zbarvení roztoku, které setrvalo po dobu minimálně 5 sekund. Spotřeba odměrného roztoku se zaznamenala.

Vzorek pro slepou titraci byl připraven třepáním 5,00 ml chloroformu s 5,00 ml destilované vody a 0,1 g chloridu sodného. Spotřeba slepé titrace (V_0), která činila 0,05 ml, se zjistila titrací vodné vrstvy.

Karboxylové číslo bylo vypočítáno dle následujícího vztahu.

4.3.4 Karboxylové číslo – tělíška o hmotnosti 150 mg

$$k = c_{KOH} \cdot (V_{KOH} - V_0) \cdot \frac{5 + (m_b - m_s)}{h} \cdot \frac{1}{m_s}$$

k	karboxylové číslo [mol/g]
c_{KOH}	koncentrace odměrného roztoku KOH [mol/l]
V_{KOH}	spotřeba odměrného roztoku KOH [l]
V_0	spotřeba slepé titrace [l]
m_b	hmotnost zbotnalého tělíška [g]
m_s	hmotnost vysušeného tělíška [g]
h	hmotnost odebrané vodné fáze [g]

4.3.5 Měření – tělíška o hmotnostech 620 a 1000 mg

Karboxylové číslo těchto tělísek bylo stanovováno analogicky jako u tělísek o hmotnosti 150 mg. Po slítí média se ke zbotnalému tělísku přidalo pipetou 25,00 ml chloroformu, po rozpuštění se přidalo 25,00 ml destilované vody. Po protřepání a oddělení fází se pipetou odebralo 20,00 ml horní vodné vrstvy, která byla titrována odměrným roztokem KOH na fenolftalein.

Spotřeba slepé titrace činila 0,26 ml.

4.3.6 Karboxylové číslo - tělíška o hmotnostech 620 a 1000 mg

$$k = c_{\text{KOH}} \cdot (V_{\text{KOH}} - V_0) \cdot \frac{25 + (m_b - m_s)}{20} \cdot \frac{1}{m_s}$$

k	karboxylové číslo [mol/g]
c_{KOH}	koncentrace odměrného roztoku KOH [mol/l]
V_{KOH}	spotřeba odměrného roztoku KOH [l]
V_0	spotřeba slepé titrace [l]
m_b	hmotnost zbotnalého tělíška [g]
m_s	hmotnost vysušeného tělíška [g]

5 VÝSLEDKY – TABULKY A GRAFY

Tabulka 2: Naměřené hodnoty nosiče 1T, 150 mg	33
Tabulka 3: Časový průběh stupně eroze nosiče 1T, 150 mg v procentech.....	33
Tabulka 4: Časový průběh stupně botnání nosiče 1T, 150 mg v procentech	33
Tabulka 5: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 1T, 150 mg v mol/g.....	33
Tabulka 6: Naměřené hodnoty nosiče 3T, 150 mg	34
Tabulka 7: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T, 150 mg v procentech.....	34
Tabulka 8: Časový průběh stupně botnání nosiče 3T, 150 mg v procentech	34
Tabulka 9: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T, 150 mg v mol/g.....	34
Tabulka 10: Naměřené hodnoty nosiče 3T, 1000 mg	35
Tabulka 11: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T, 1000 mg v procentech.....	35
Tabulka 12: Časový průběh stupně botnání nosiče 3T, 1000 mg v procentech	35
Tabulka 13: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T, 1000 mg v mol/g.....	35
Tabulka 14: Naměřené hodnoty nosiče 3T, TEC, 620 mg	36
Tabulka 15: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T, TEC, 620 mg v procentech	36
Tabulka 16: Časový průběh stupně botnání nosiče 3T, TEC, 620 mg v procentech.....	36
Tabulka 17: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T, TEC, 620 mg v mol/g	36
Graf 1: Eroze nosiče 1T, 150 mg	37
Graf 2: Botnání nosiče 1T, 150 mg	38
Graf 3: Karboxylové číslo nosiče 1T, 150 mg	39
Graf 4: Eroze nosiče 3T, 150 mg	40
Graf 5: Botnání nosiče 3T, 150 mg	41
Graf 6: Karboxylové číslo nosiče 3T, 150 mg	42
Graf 7: Eroze nosiče 3T, 1000 mg	43
Graf 8: Botnání nosiče 3T, 1000 mg	44
Graf 9: Karboxylové číslo nosiče 3T, 1000 mg	45
Graf 10: Eroze nosiče 3T, TEC, 620 mg	46
Graf 11: Botnání nosiče 3T, TEC, 620 mg	47
Graf 12: Karboxylové číslo nosiče 3T, TEC, 620 mg	48

Tabulka 2: Naměřené hodnoty nosiče 1T, 150 mg

Veličina	vzorek	Čas [dny]				
		1	3	7	14	21
m_0 [g]	A	0,1534	0,1549	0,1539	0,1484	0,1505
m_0 [g]	B	0,1531	0,1546	0,1531	0,1568	0,1527
m_b [g]	A	0,1644	0,2096	0,2071	0,0608	0,0178
m_b [g]	B	0,1767	0,2025	0,2098	0,0691	0,0161
m_s [g]	A	0,1508	0,1525	0,1369	0,0522	0,0157
m_s [g]	B	0,1499	0,1521	0,1337	0,0574	0,0160
h [g]	A	2,9300	2,8926	2,9415	2,9205	3,0423
h [g]	B	2,9503	2,8816	2,9681	2,9334	3,0422
V_{KOH} [ml]	A	2,90	3,40	5,10	0,94	0,19
V_{KOH} [ml]	B	2,94	3,42	5,40	1,51	0,21

Tabulka 3: Časový průběh stupně eroze nosiče 1T, 150 mg v procentech

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	98,31	98,45	88,95	35,18	10,43
B	97,91	98,38	87,33	36,61	10,48
Průměr	98,11	98,42	88,14	35,89	10,45

Tabulka 4: Časový průběh stupně botnění nosiče 1T, 150 mg v procentech

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	9,02	37,44	51,28	16,48	13,38
B	17,88	33,14	56,92	20,38	0,62
Průměr	13,45	35,29	54,10	18,43	7,00

Tabulka 5: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 1T, 150 mg v mol/g

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	$9,396 \cdot 10^{-4}$	$1,093 \cdot 10^{-3}$	$1,857 \cdot 10^{-3}$	$8,045 \cdot 10^{-4}$	$4,373 \cdot 10^{-4}$
B	$9,528 \cdot 10^{-4}$	$1,099 \cdot 10^{-3}$	$1,967 \cdot 10^{-3}$	$1,320 \cdot 10^{-3}$	$4,997 \cdot 10^{-4}$
Průměr	$9,462 \cdot 10^{-4}$	$1,096 \cdot 10^{-3}$	$1,912 \cdot 10^{-3}$	$1,062 \cdot 10^{-3}$	$4,685 \cdot 10^{-4}$

Tabulka 6: Naměřené hodnoty nosiče 3T, 150 mg

Veličina	vzorek	Čas [dny]				
		1	3	7	14	21
m_0 [g]	A	0,1488	0,1549	0,1500	0,1526	0,1534
m_0 [g]	B	0,1487	0,1581	0,1531	0,1516	0,1573
m_b [g]	A	0,1630	0,1845	0,1788	0,0974	0,0456
m_b [g]	B	0,1646	0,1866	0,1892	0,0860	0,0451
m_s [g]	A	0,1499	0,1533	0,1218	0,0728	0,0361
m_s [g]	B	0,1498	0,1561	0,1249	0,0625	0,0383
h [g]	A	2,9129	2,9988	2,9533	3,0494	2,9940
h [g]	B	2,9796	3,0465	2,9699	2,9761	3,0040
V_{KOH} [ml]	A	2,53	4,40	3,17	0,54	0,16
V_{KOH} [ml]	B	2,33	4,32	3,27	0,53	0,21

Tabulka 7: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T, 150 mg v procentech

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	100,74	98,97	81,20	47,71	23,53
B	100,74	98,73	81,58	41,23	24,35
Průměr	100,74	98,85	81,39	44,47	23,94

Tabulka 8: Časový průběh stupně botnění nosiče 3T, 150 mg v procentech

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	8,74	20,35	46,80	33,79	26,32
B	9,88	19,54	51,48	37,60	17,75
Průměr	9,31	19,95	49,14	35,70	22,04

Tabulka 9: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T, 150 mg v mol/g

vzorek	Čas [dny]				
	1	3	7	14	21
A	$8,200 \cdot 10^{-4}$	$1,395 \cdot 10^{-3}$	$1,257 \cdot 10^{-3}$	$3,591 \cdot 10^{-4}$	$1,465 \cdot 10^{-4}$
B	$7,539 \cdot 10^{-4}$	$1,369 \cdot 10^{-3}$	$1,297 \cdot 10^{-3}$	$3,518 \cdot 10^{-4}$	$2,130 \cdot 10^{-4}$
Průměr	$7,869 \cdot 10^{-4}$	$1,382 \cdot 10^{-3}$	$1,277 \cdot 10^{-3}$	$3,554 \cdot 10^{-4}$	$1,797 \cdot 10^{-4}$

Tabulka 10: Naměřené hodnoty nosiče 3T, 1000 mg

Veličina	vzorek	Čas [dny]					
		1	3	7	14	21	28
m_0 [g]	A	1,0315	1,0052	1,0365	1,0372	1,0454	0,9993
m_0 [g]	B	1,0180	1,0206	0,9675	1,0014	1,0302	1,0081
m_b [g]	A	1,1180	1,0928	1,4649	0,9330	0,4330	0,2977
m_b [g]	B	1,1321	1,1139	1,2679	0,8606	0,4771	0,5198
m_s [g]	A	1,0246	0,9980	0,9699	0,6973	0,3322	0,1653
m_s [g]	B	1,0108	1,0150	0,8874	0,6285	0,3282	0,1685
V_{KOH} [ml]	A	18,90	23,00	47,60	19,80	4,75	3,10
V_{KOH} [ml]	B	18,50	24,90	62,60	20,70	5,90	4,97

Tabulka 11: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T, 1000 mg v procentech

vzorek	Čas [dny]					
	1	3	7	14	21	28
A	99,33	99,28	93,57	67,23	31,78	16,54
B	99,29	99,45	91,72	62,76	31,86	16,71
Průměr	99,31	99,37	92,65	65,00	31,82	16,63

Tabulka 12: Časový průběh stupně botnění nosiče 3T, 1000 mg v procentech

vzorek	Čas [dny]					
	1	3	7	14	21	28
A	9,12	9,50	51,04	33,80	30,34	80,10
B	12,00	9,74	42,88	36,93	45,37	208,49
Průměr	10,56	9,62	46,96	35,37	37,86	144,29

Tabulka 13: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T, 1000 mg v mol/g

vzorek	Čas [dny]					
	1	3	7	14	21	28
A	$2,284 \cdot 10^{-4}$	$2,859 \cdot 10^{-4}$	$6,208 \cdot 10^{-4}$	$3,536 \cdot 10^{-4}$	$1,698 \cdot 10^{-4}$	$2,168 \cdot 10^{-4}$
B	$2,265 \cdot 10^{-4}$	$3,046 \cdot 10^{-4}$	$8,935 \cdot 10^{-4}$	$4,103 \cdot 10^{-4}$	$2,159 \cdot 10^{-4}$	$3,528 \cdot 10^{-4}$
Průměr	$2,275 \cdot 10^{-4}$	$2,953 \cdot 10^{-4}$	$7,572 \cdot 10^{-4}$	$3,819 \cdot 10^{-4}$	$1,928 \cdot 10^{-4}$	$2,848 \cdot 10^{-4}$

Tabulka 14: Naměřené hodnoty nosiče 3T, TEC, 620 mg

Veličina	vzorek	Čas [dny]					
		1	3	7	14	21	28
m_0 [g]	A	0,6264	0,6246	0,6313	0,6523	0,6049	0,6342
m_0 [g]	B	0,5964	0,6179	0,6462	0,6177	0,6331	0,6125
m_b [g]	A	0,7799	0,7212	0,6715	0,4333	0,2197	0,1972
m_b [g]	B	0,6116	0,6676	0,6615	0,3870	0,2228	0,1727
m_s [g]	A	0,5972	0,5753	0,4670	0,2874	0,1373	0,0822
m_s [g]	B	0,5729	0,5817	0,4763	0,2643	0,1518	0,0772
V_{KOH} [ml]	A	8,80	11,40	14,20	5,20	2,70	1,30
V_{KOH} [ml]	B	8,80	12,50	14,80	5,15	2,40	1,31

Tabulka 15: Časový průběh stupně eroze nosiče 3T, TEC, 620 mg v procentech

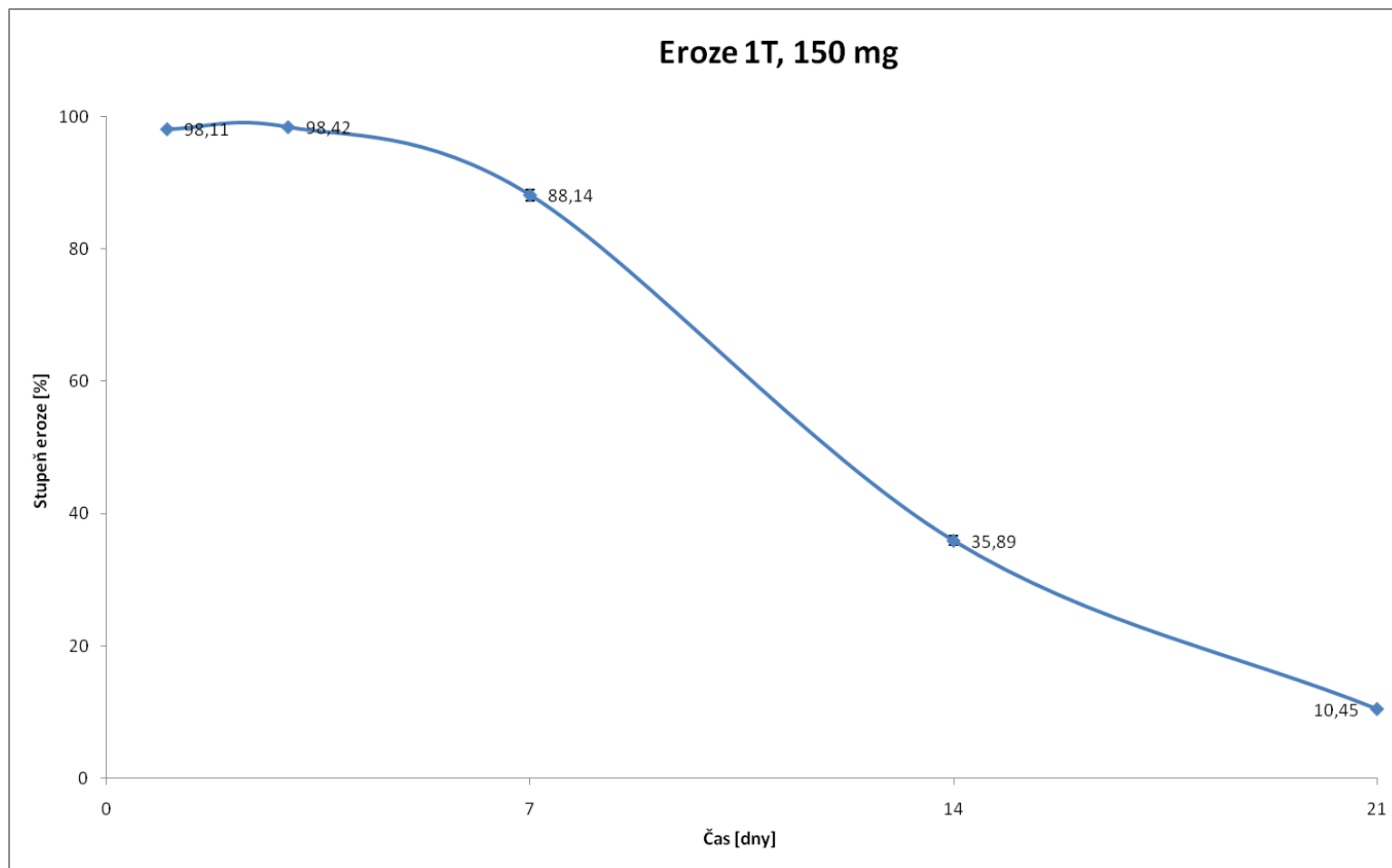
vzorek	Čas [dny]					
	1	3	7	14	21	28
A	95,34	92,11	73,97	44,06	22,70	12,96
B	96,06	94,14	73,71	42,79	23,98	12,60
Průměr	95,70	93,12	73,84	43,42	23,34	12,78

Tabulka 16: Časový průběh stupně botnění nosiče 3T, TEC, 620 mg v procentech

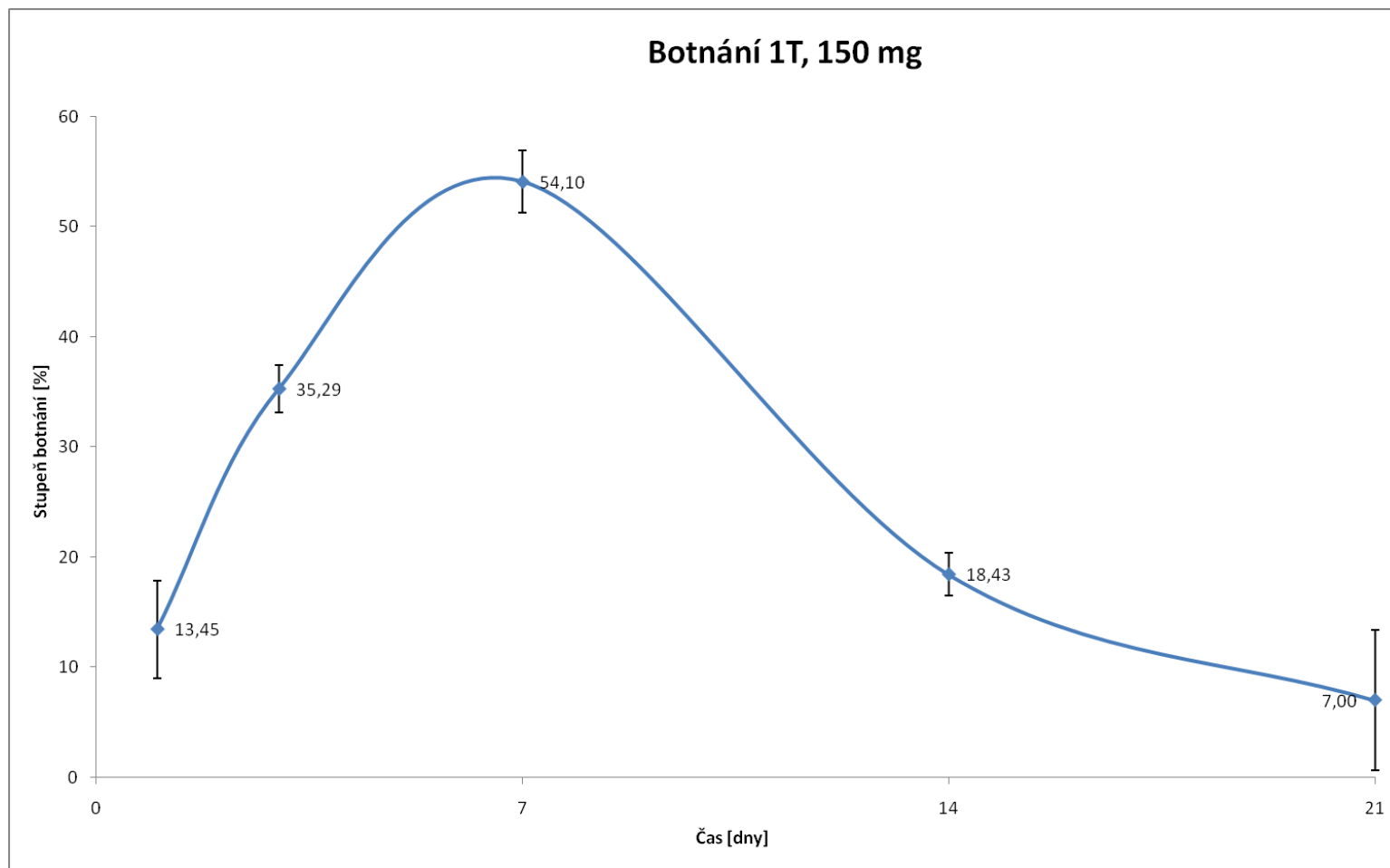
vzorek	Čas [dny]					
	1	3	7	14	21	28
A	30,59	25,36	43,79	50,77	60,01	139,90
B	6,76	14,77	38,88	46,42	46,77	123,70
Průměr	18,67	20,06	41,34	48,60	53,39	131,80

Tabulka 17: Časový průběh karboxylového čísla nosiče 3T, TEC, 620 mg v mol/g

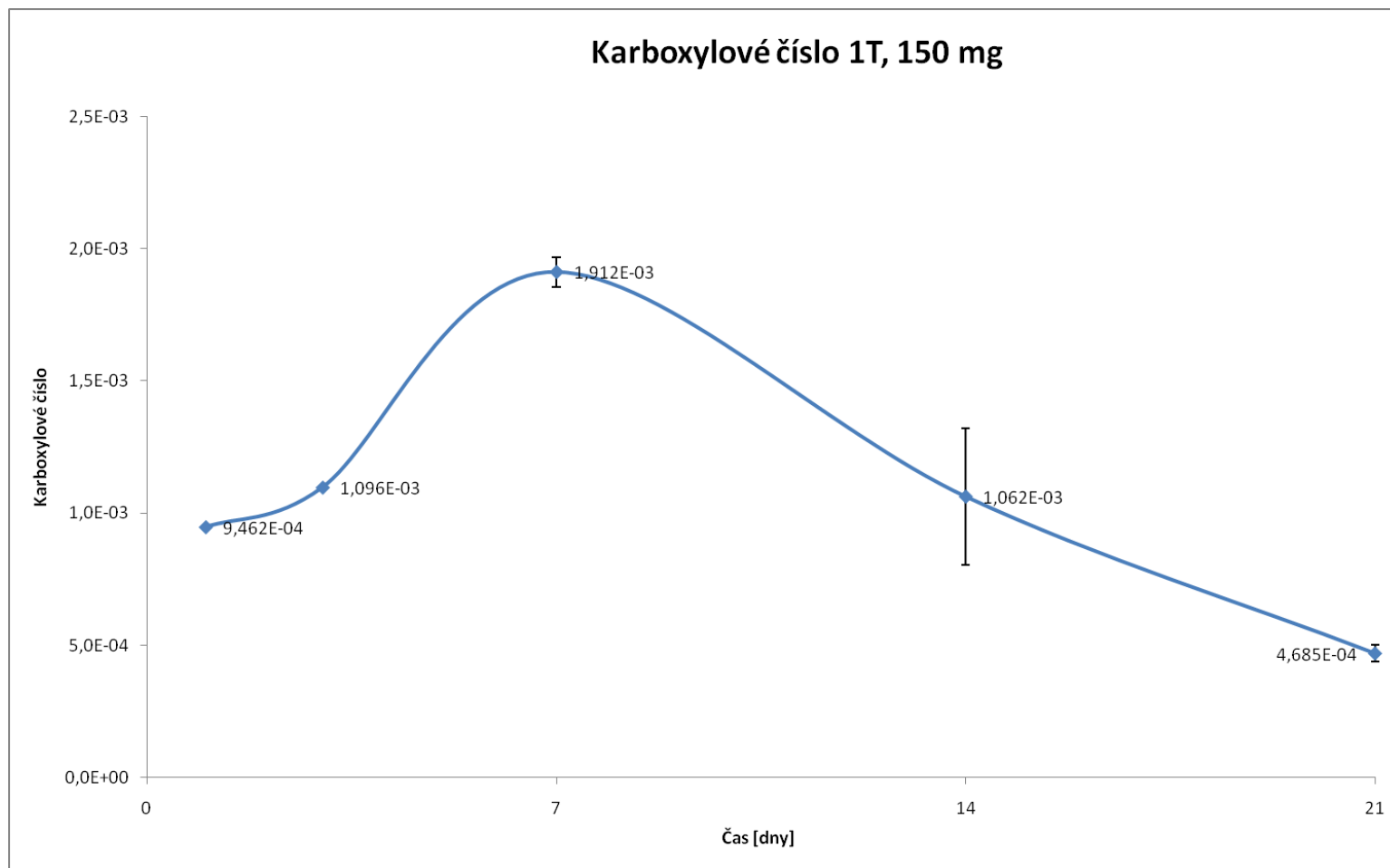
vzorek	Čas [dny]					
	1	3	7	14	21	28
A	$1,833 \cdot 10^{-4}$	$2,418 \cdot 10^{-4}$	$3,723 \cdot 10^{-4}$	$2,251 \cdot 10^{-4}$	$2,116 \cdot 10^{-4}$	$1,638 \cdot 10^{-4}$
B	$1,833 \cdot 10^{-4}$	$2,657 \cdot 10^{-4}$	$3,884 \cdot 10^{-4}$	$2,228 \cdot 10^{-4}$	$1,856 \cdot 10^{-4}$	$1,654 \cdot 10^{-4}$
Průměr	$1,833 \cdot 10^{-4}$	$2,538 \cdot 10^{-4}$	$3,803 \cdot 10^{-4}$	$2,239 \cdot 10^{-4}$	$1,986 \cdot 10^{-4}$	$1,646 \cdot 10^{-4}$



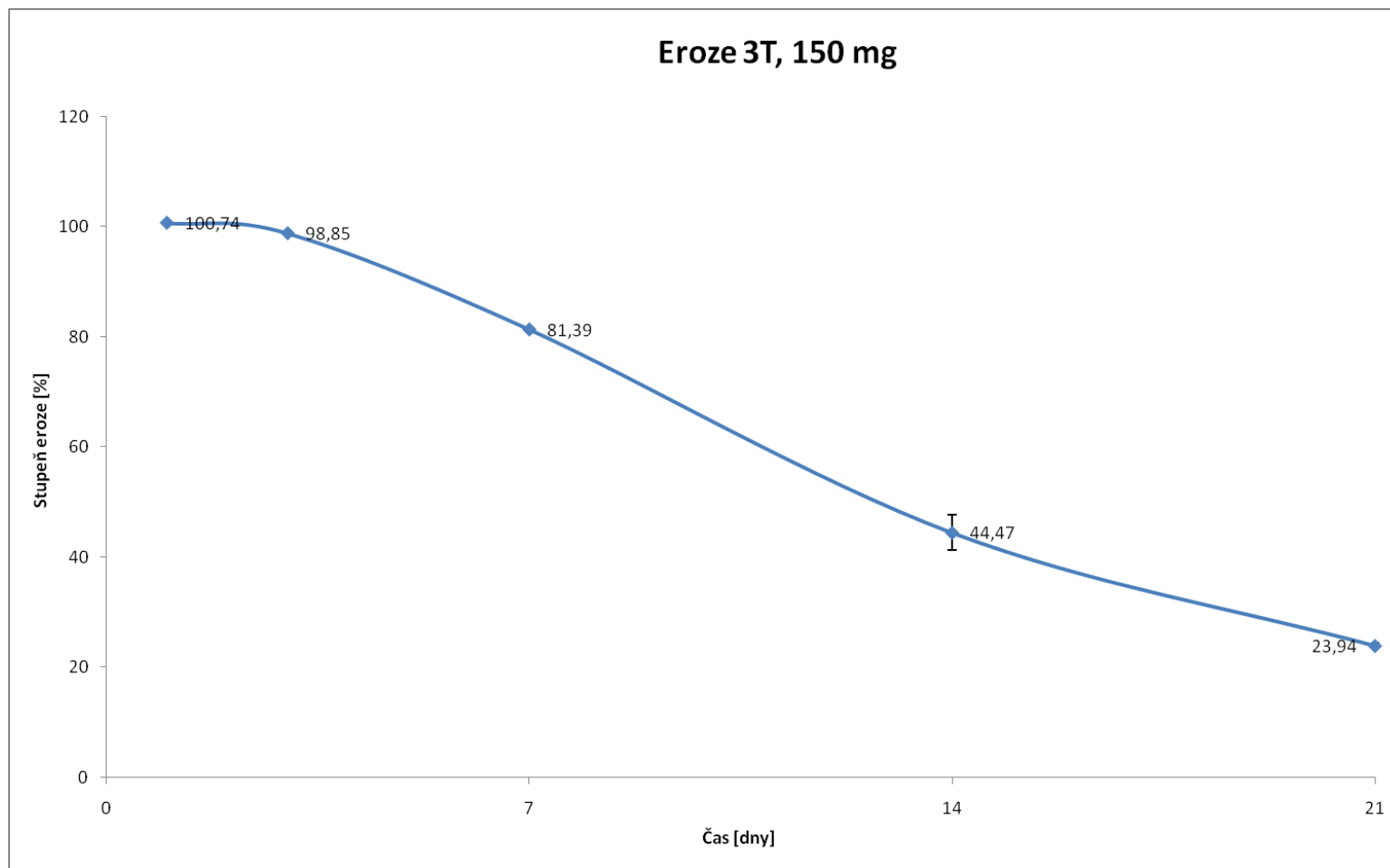
Graf 1: Eroze nosiče 1T, 150 mg



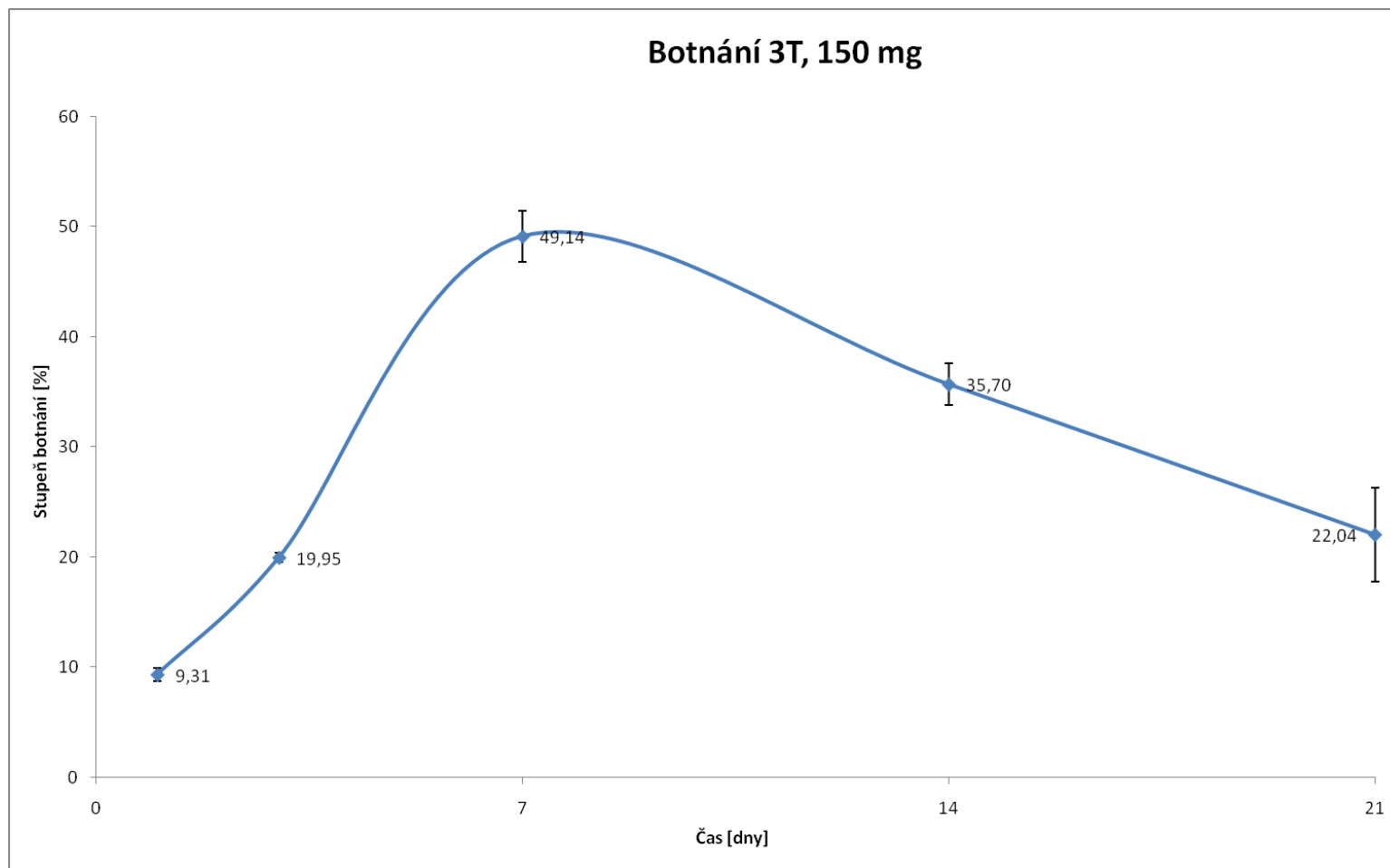
Graf 2: Botnání nosiče 1T, 150 mg



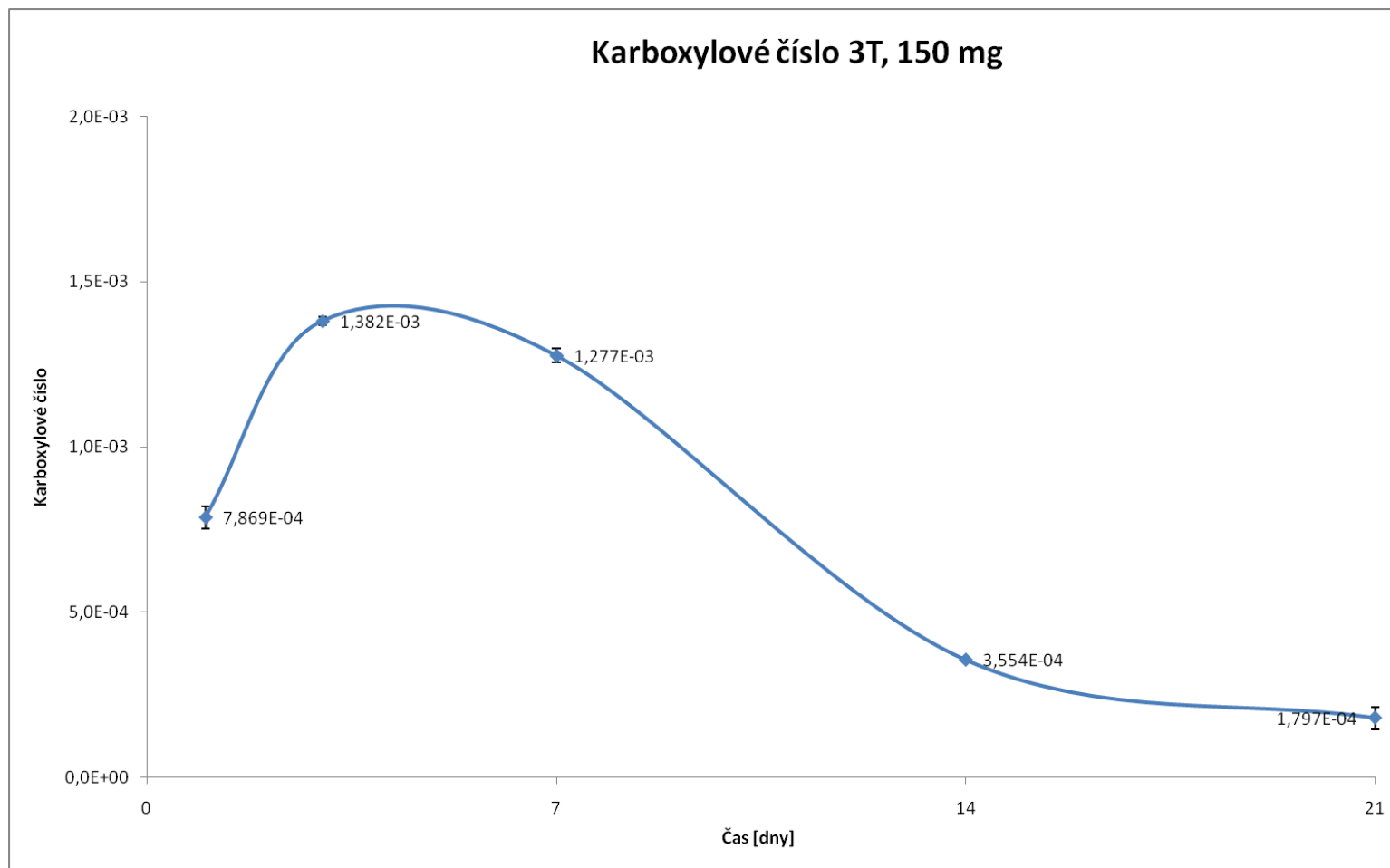
Graf 3: Karboxylové číslo nosiče 1T, 150 mg



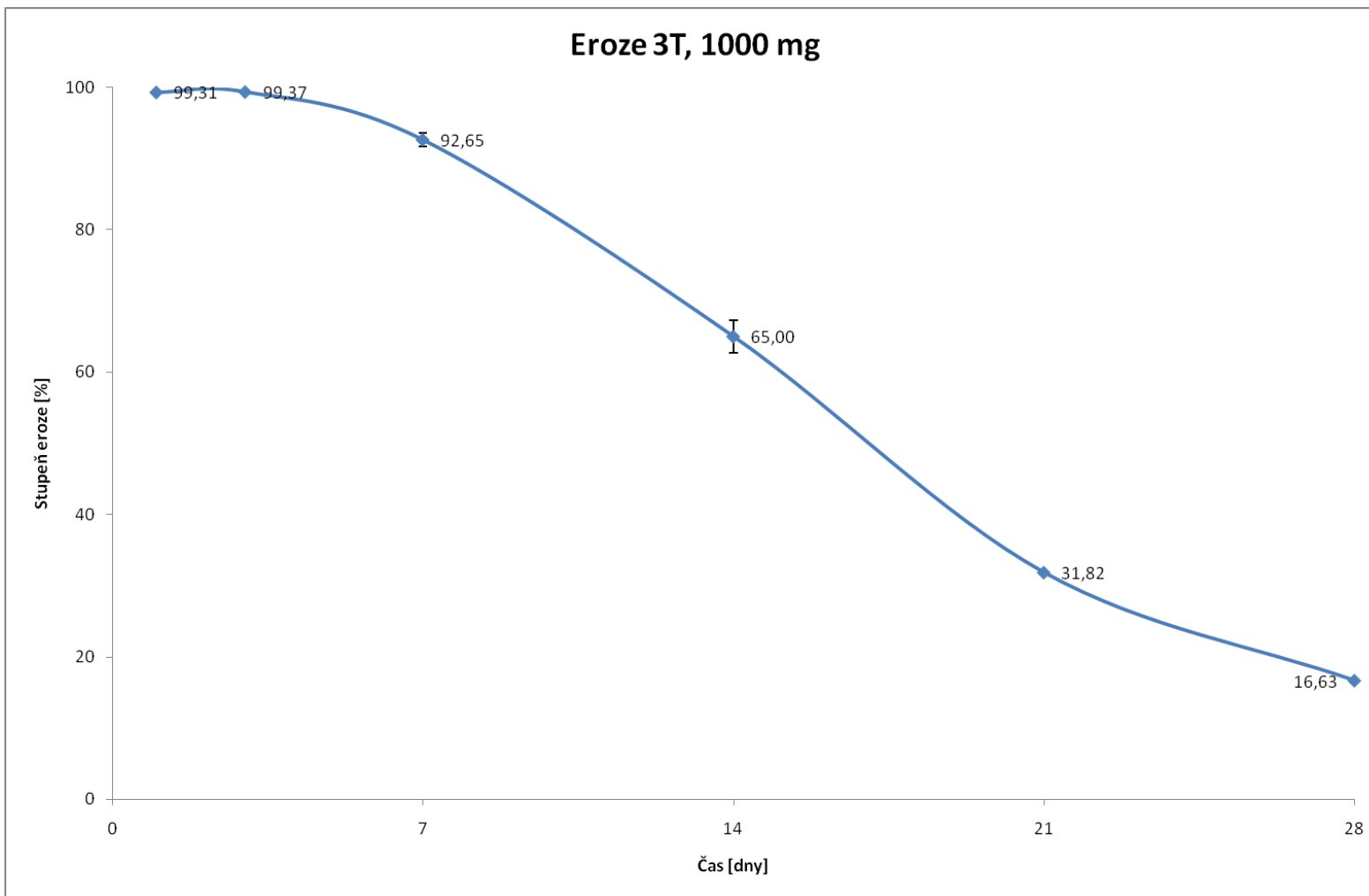
Graf 4: Eroze nosiče 3T, 150 mg



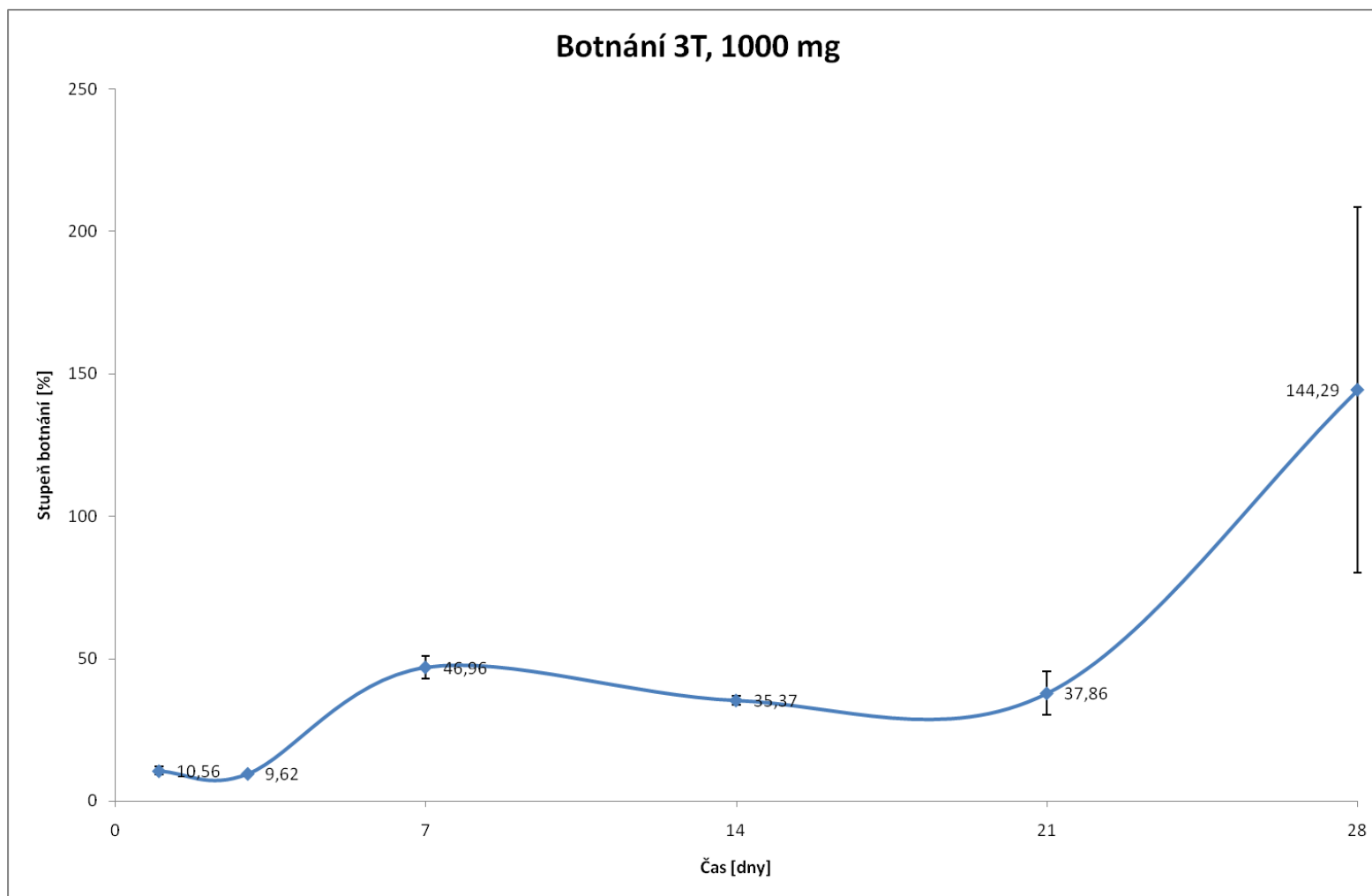
Graf 5: Botnání nosiče 3T, 150 mg



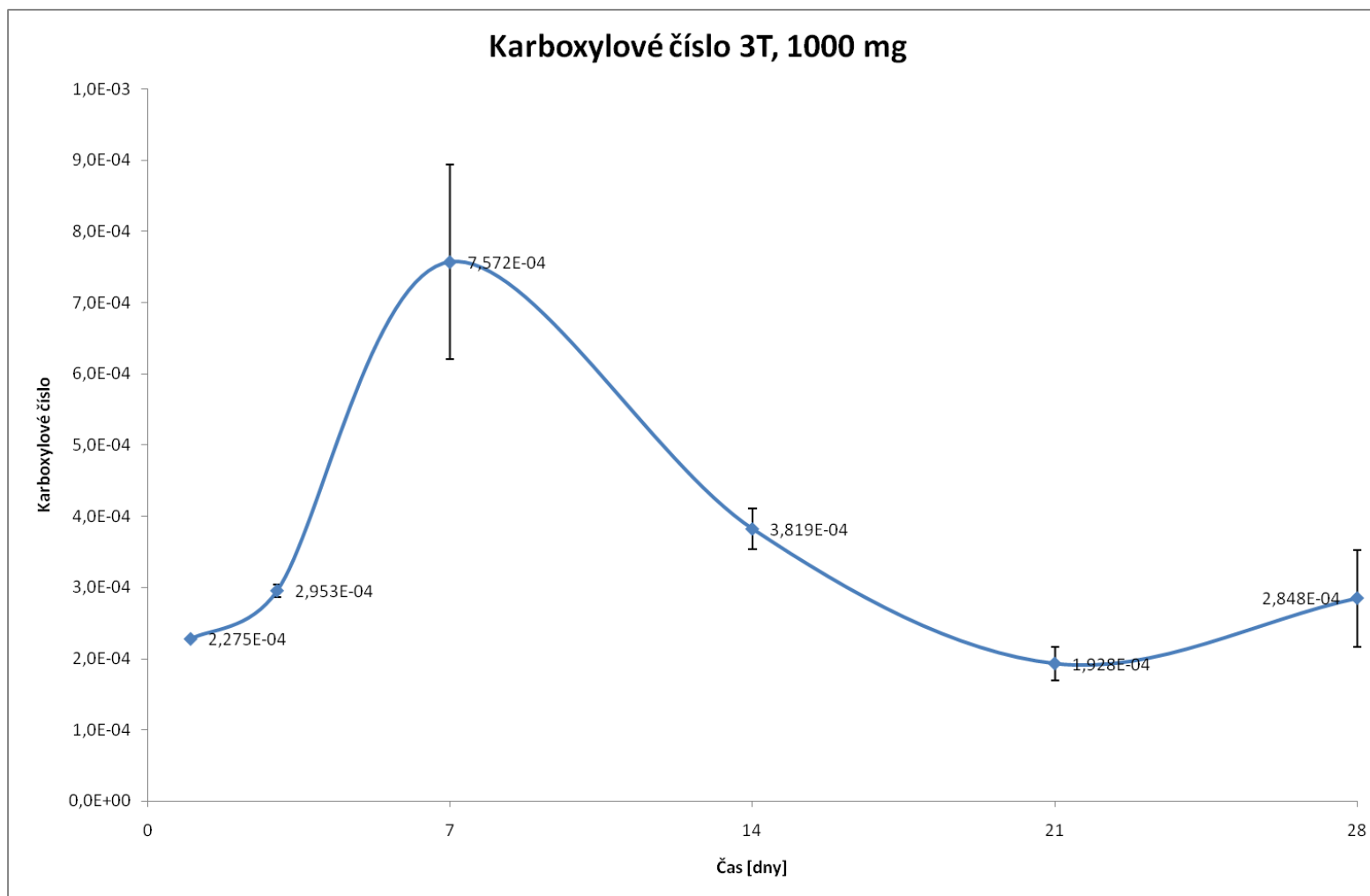
Graf 6: Karboxylové číslo nosiče 3T, 150 mg



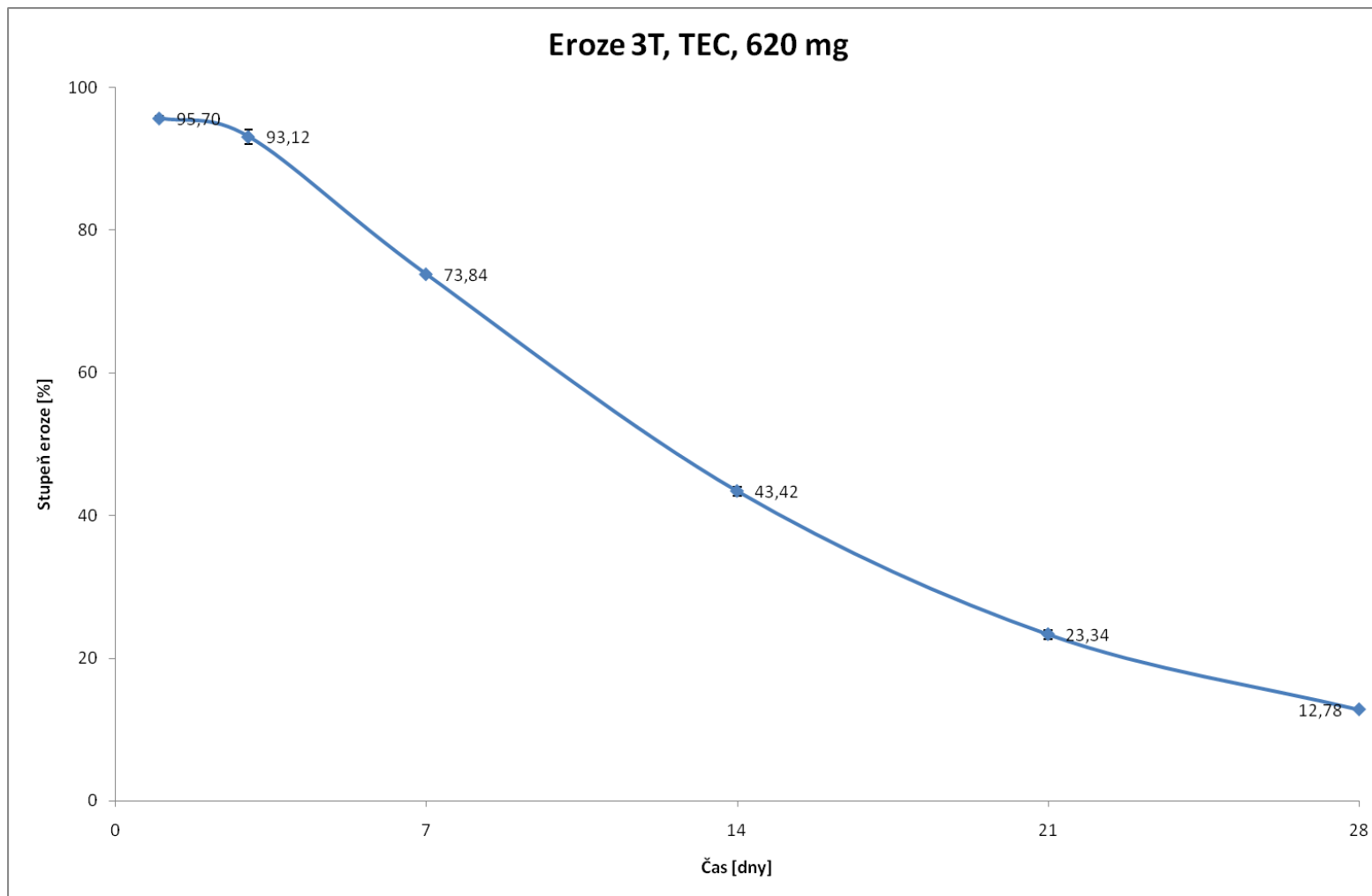
Graf 7: Eroze nosiče 3T, 1000 mg



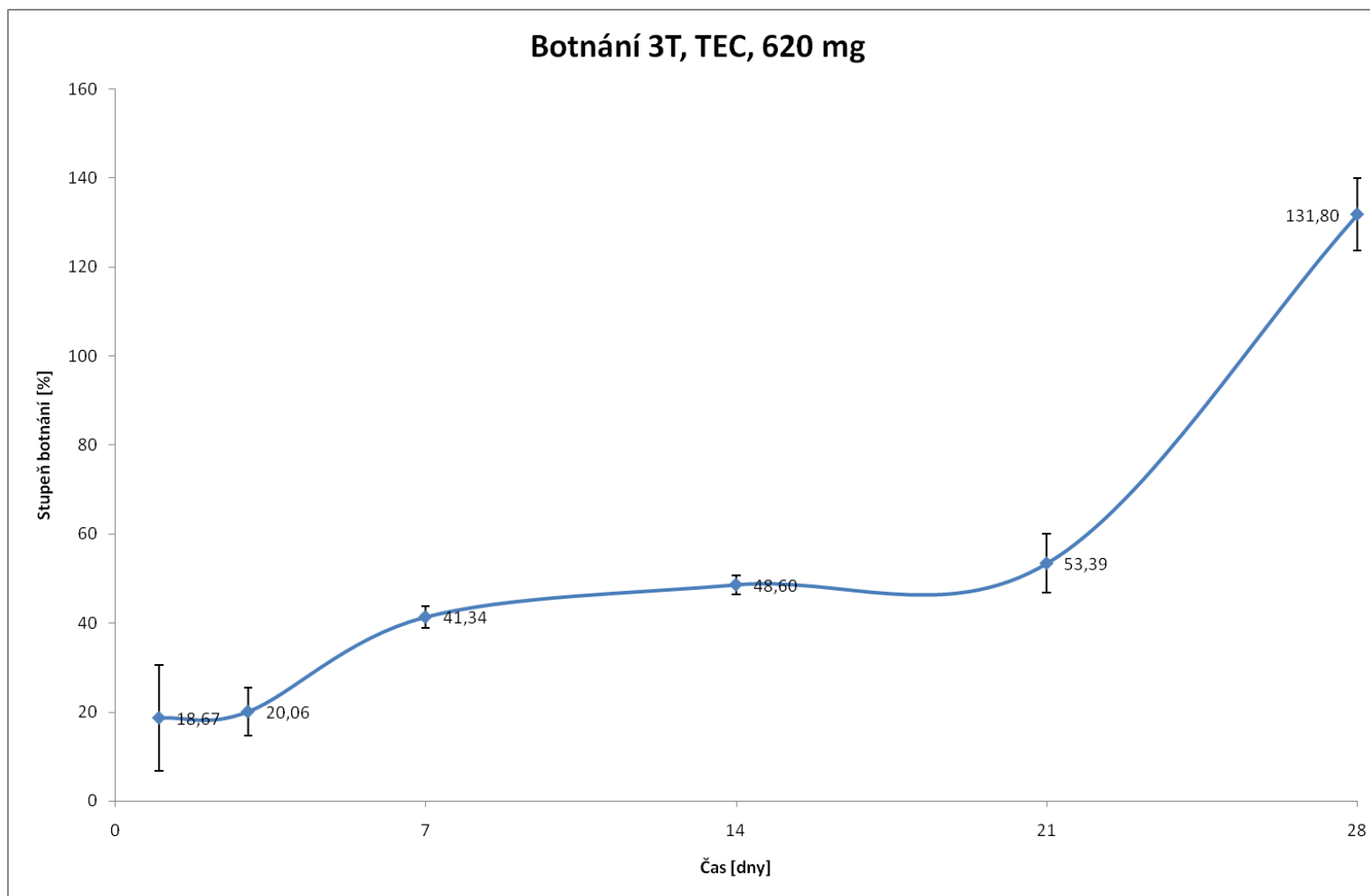
Graf 8: Botnání nosiče 3T, 1000 mg



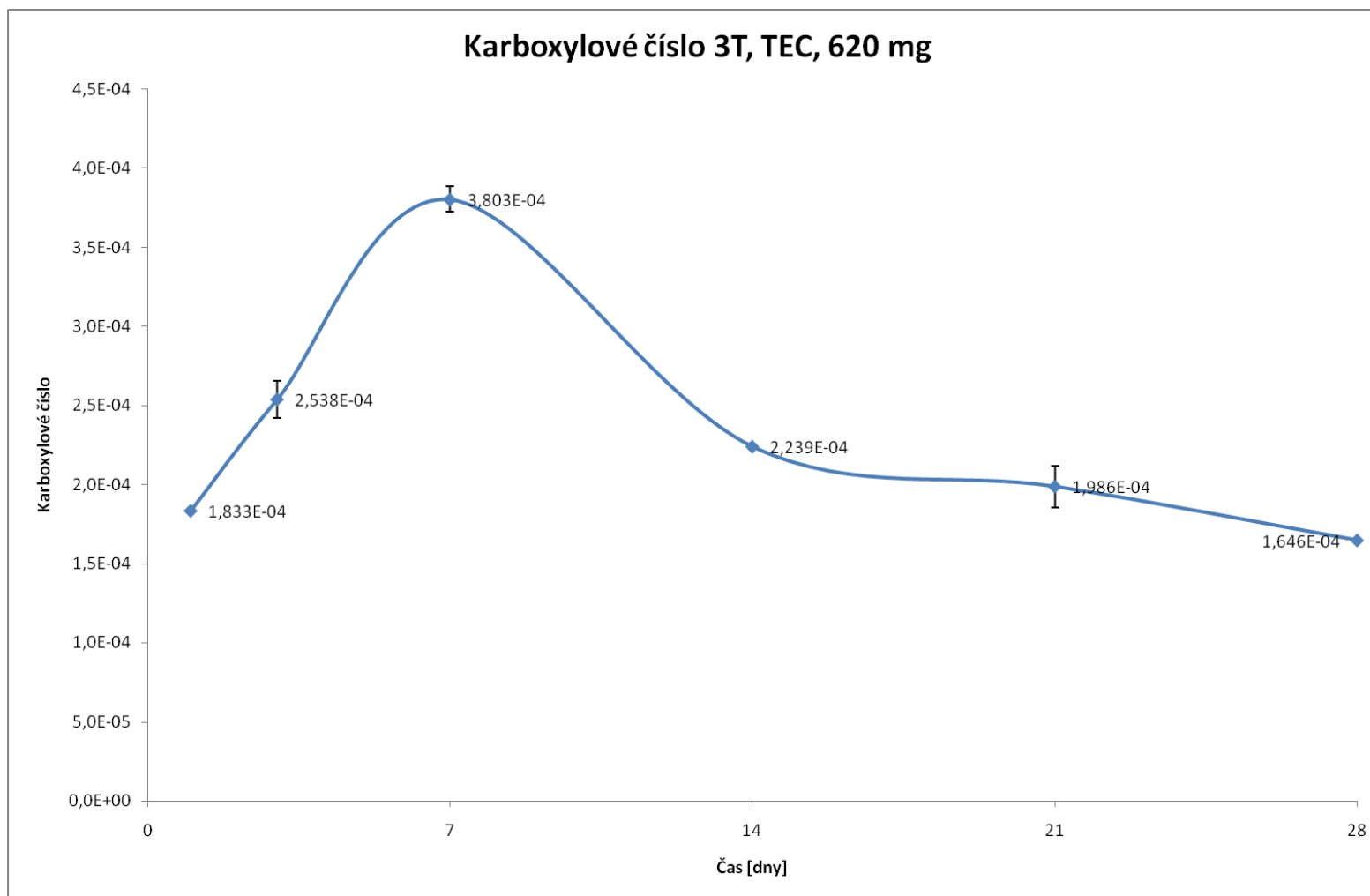
Graf 9: Karboxylové číslo nosiče 3T, 1000 mg



Graf 10: Eroze nosiče 3T, TEC, 620 mg



Graf 11: Botnání nosiče 3T, TEC, 620 mg



Graf 12: Karboxylové číslo nosiče 3T, TEC, 620 mg

5.1 Vysvětlivky

m_0	počáteční hmotnost tělíska
m_b	hmotnost zbotnalého tělíska
m_s	hmotnost vysušeného tělíska
h	hmotnost odebrané vodné fáze
V_{KOH}	spotřeba odměrného roztoku KOH
A, B	opakování vzorku
TEC	triethylcitrát

6 DISKUZE

6.1 *K zaměření rigorózní práce*

Problém řešený v rigorózní práci je součástí systematické studie interakcí biodegradabilních alifatických oligoesterů a polyesterů s lineární nebo větvenou konstitucí molekuly s hydrofilním prostředím. Oligoestery a polyestery alifatických hydroxykyselin, především kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové, byly syntetizovány na pracovišti školitele.

Při studiu botnání bylo u všech nosičů typu alifatických oligoesterů prokázáno nerovnovážné botnání. V mnoha případech, především v prostředí pufrů neutrálního nebo slabě alkalického pH, bylo také zjištěno, že stupeň botnání, jako charakteristika procesu, nabývá extrémní hodnoty, tj. maximum, případně maximum následované minimem.

Byla hledána příčina oscilačního průběhu botnání matric. Alkalimetrickou titrací degradační frakce hydrofilních molekul přítomných v matricích. Proto bylo přikročeno ke studiu chování matric v samotné vodě. Nevýhodou metody byl již dříve prokázaný nízký stupeň botnání matric daný malým stupněm ionizace koncových karboxylů. K testování byly vybrány takové nosiče, které se vyznačovaly dostatečnými maximy i v prostředí čištěné vody. Při degradaci nosičů se uplatnil mechanismus kyselé hydrolyzy esterových vazeb. Při rozštěpení každé esterové vazby vznikla další karboxylová skupina. Vzhledem k tomu, že štěpení řetězce je náhodné, je možno předpokládat, že při degradaci vznikají i nízkomolekulární ve vodě rozpustné oligoestery. Tyto degradační produkty mohou difundovat z matric. Rychlost jejich difúze může být regulována stupněm botnání a naopak stupeň botnání může být rozhodujícím činitelem pro difúzi degradačních ve vodě rozpustných fragmentů.

6.2 *K degradaci nosiče 1T*

Nosič 1T byl syntetizován z ekvimolární směsi kyseliny glykolové a kyseliny DL-mléčné s přísadou 1% tripentaerythritolu. Tripentaerythritol má osm hydroxylových skupin s rovnocennou reaktivitou. Při polykondenzační reakci je dosahována limitní délka řetězce. Podle podmínek reakce bývá maximálně dosažitelná délka řetězce

v rozmezí mezi 5 000 a 10 000. Je nutno uvážit, že při pokročilém stádiu reakce dochází nejen k růstu řetězce, ale probíhá také jeho náhodné štěpení. Z toho plyne nestejná délka jednotlivých řetězců. Je také pravděpodobné, že kromě větvených struktur se v produktech budou nacházet i různě dlouhé lineární řetězce. Tomu nasvědčují hodnoty jednotlivých parametrů molekulové hmotnosti uvedené v tabulce 1. Hodnota M_w je 12 000, stupeň polydisperzity má vysokou hodnotu 4,2, hodnota M_z je 26 300, hodnota M_{z+1} je 41 100.

Průběh eroze je na grafu 1. Materiál začne erodovat až těsně po třídním intervalu. Potom se rychlost eroze zvyšuje a dosahuje maxima kolem 10. dne. Po třech týdnech působení vody jako média, jak je vidět na grafu 1, zbývá asi 10 % neerodovaného materiálu.

Při první fázi degradace nosiče bez jeho eroze dochází k postupnému zvyšování stupně botnání. Maximum hodnoty bylo 54 %, bylo nalezeno v intervalu 7 dní. Potom stupeň botnání postupně klesá k velmi nízkým hodnotám. Zajímavé je porovnání hodnot charakteristiky botnání z jednotlivých dvakrát opakovaných měření. V intervalu prvního dne byly nalezeny dvojnásobné hodnoty. Příčinou je s vysokou pravděpodobností různý tvar tělísek a jejich různé umístění v nádobkách. Po dosažení maxima v 7. dni došlo k procesu odbotnání. Rychlost tohoto procesu smršťování struktury byla stejná, stejně tak jako eroze materiálu.

Na grafu 3 jsou hodnoty karboxylového čísla stejných vzorků. Vyjadřují koncentraci ve vodě rozpustných fragmentů molekul oligoesteru 1T vzniklých jejich hydrolyzou. Již v jednodenním intervalu byla v matricích nalezena poměrně vysoká koncentrace hydrofilních oligoesterů. Do 3. dne tato koncentrace mírně stoupala, k výraznému vzestupu došlo mezi 3. dnem a 7. dnem. V další fázi byl zjištěn monotónní pokles hodnot. Z celkového zhodnocení průběhu hodnot stupně botnání a průběhu hodnot koncentrace hydrofilních nízkomolekulárních degradačních produktů je možno vyvodit závěr o pozoruhodně shodných rysech obou procesů. Znamená to tedy, že rozsah botnání polyesteru větveného tripentaerythritolem je ovlivněn koncentrací osmoticky aktivních molekul v matricích. Nízkomolekulární oligoestery se v matricích při nízkém stupni botnání hromadí a zvyšují tak osmotický tlak, který vede k vyššímu stupni botnání. Po dosažení vyššího botnání se otevřou difúzní cesty pro únik molekul

z matrice, což vede ke snížení osmotického tlaku v matricích a ke kolapsu zbotnalé struktury. Uvedené procesy jsou relativně pomalé, v daném případě trvají několik dní.

6.3 K degradaci nosiče 3T

6.3.1 Tělíska o hmotnosti 150 mg

Polyester označený jako 3T byl syntetizován za stejných podmínek jako 1T. Rozdíl je ve vyšší, 3% koncentraci tripentaerythritolu použitého při syntéze jako větvící složky. Má vyšší hodnoty parametrů molekulové hmotnosti. Polydisperzita je také vysoká. O vyšším podílu větvených struktur v materiálu svědčí o 3,5 °C nižší hodnota teploty skelného přechodu.

Eroze nosiče 3T probíhala v počáteční fázi rychleji, než tomu bylo u 1T (graf 4). Přibližně od 3. dne byl její průběh poměrně plynulý a s nižší rychlostí než u nosiče 1T. I tato skutečnost je v souladu s předpokladem o vyšším stupni větvení. Po 21. dni působení vody jako degradačního prostředí byl stanoven asi čtvrtinový neerodovaný zbytek.

Botnání nosiče 3T mělo velmi podobný průběh jako u nosiče 1T (graf 5 vs. graf 2). V intervalu prvního dne byl stupeň botnání ještě nižší než u 1T, do 3. dne se zdvojnásobil. Těsně po 7. dni bylo dosaženo maximum stupně botnání. Mělo hodnotu velmi blízkou hodnotě, která byla prokázána u nosiče 1T. Potom následovalo pomalé odbotnání. Příčina pomalejšího kolapsu méně relaxované struktury není v tomto stádiu experimentů známa.

Na grafu 6 je historie hodnot koncentrace hydrofilních fragmentů v matricích. Byla prokázána vysoká reprodukovatelnost hodnot, stejně tak jako v případě botnání a eroze. Maximum koncentrace se prokázalo dříve, než bylo maximum botnání. To je možno vysvětlit hysterezí procesu botnání jako důsledku postupného zvyšování koncentrace osmoticky aktivních látek. Koncentrace fragmentů v matricích je příčinou, rozsah botnání následkem, který má časovou prodlevu. Koncentrace ve vodě rozpustných molekul v matricích byla na konci pokusu (21. den) přibližně desetkrát nižší než v maximu hodnot prokázaném v intervalu 3. dne.

6.3.2 Tělíska o hmotnosti 1000 mg

Chování výše popsaných tělísek hmotnosti 150 mg bylo srovnání s tělísky, která měla hmotnost přibližně sedminásobnou. Srovnáním průběhu eroze je možno dojít k poznatku o mírně pomalejším průběhu u větších tělísek v počáteční fázi (graf 7). Je to vysvětlitelné delší difúzní dráhou degradačních produktů. Za necelý měsíc zbyla přibližně sedmina neerodovaného materiálu.

Na grafu 9 je průběh hodnot karboxylového čísla. Výrazné maximum se projevilo okolo sedmidenního intervalu, u menších 150 mg tělísek bylo maximum hodnot dosaženo přibližně o tři dny dříve (graf 6). Rozdíl je způsoben rozdílem difúzní dráhy. Zajímavá je téměř dvojnásobná koncentrace karboxylů v hydrofilní frakci u menších matric. Tato vyšší koncentrace je doprovázena vyšším stupněm botnání. Nevýrazné minimum bylo v intervalu těsně po jedenadvacetidenním odběrovém intervalu. Fáze odbotnání, která proběhla mezi 7. dnem a 21. dnem představovala přibližně čtyřnásobné smrštění gelové struktury.

Na grafu 8 je průběh botnání tělísek. Zajímavý je velmi malý stupeň botnání, který souvisí se zpožděným začátkem eroze. Maximum hodnot stupně botnání kopíruje maximum hodnot koncentrace hydrofilních ve vodě rozpustných molekul. Také minimum hodnot stupně botnání se příliš neliší od minima v koncentraci osmoticky aktivních molekul degradačního produktu. Prudký vzrůst hodnot může souviset s malým rozměrem tělísek obsahujících rostoucí podíl menších molekul se zvýšenou osmotickou aktivitou, které jsou ještě nad horní hranicí jejich rozpustnosti ve vodě.

6.3.3 Tělíska o hmotnosti 620 mg plastifikovaná 20 % triethylcitrátem

Na grafu 10 je průběh eroze nosiče 3T, do kterého byl přimísen plastifikátor. V počáteční fázi do 7. dne je patrný úbytek tělísek způsoben dvěma jevy, erozí polyesterového materiálu a rozpouštěním plastifikátoru. Z průběhu je možno předpokládat, že triethylcitrát se uvolňuje z matric pomalu a zároveň snižuje rychlost eroze svým hydrofobizačním efektem. Je možno předpokládat, že mezi 7. a 14. dnem pokusu se uvolní veškerý plastifikátor. Za 28 dní bylo prokázáno asi 13 % zbývajícího podílu matrice. Eroze byla přibližně stejně rychlá v případě nosiče plastifikovaného a samotného.

Rozdíl mezi plastifikovanými matricemi a neplastifikovanými (graf 12 a graf 9) nebyl v poloze maxima hodnot karboxylového čísla, které bylo v sedmidenním intervalu. V plastifikovaných matricích byla prokázána nižší koncentrace ve vodě rozpustných fragmentů vzniklých hydrolyzou původního polyesteru. Nepředpokládáme metodickou chybu způsobenou silným vlivem triethylcitrátu na rozdělování těchto hydrofilních molekul mezi vodnou a chloroformovou fází. Markantní změnou ovlivněnou plastifikací matrice je eliminace fáze růstu hodnot karboxylového čísla. Příčinou může být buď odlišná nadmolekulární struktura matric projevující se vyšším stupněm botnání v předešlé fázi (graf 11) nebo jiný stupeň větvení molekul.

Průběh hodnot stupně botnání je na grafu 11. Odlišuje se hysterezí procesu jako důsledku změn koncentrace osmoticky aktivních molekul. Zatímco koncentrace hydrofilních molekul v matricích od 7. dne působené vodného média trvale klesá, stupeň botnání stále roste. Pro tento překvapivě opačný trend hodnot je možno formulovat pracovní hypotézu o vlivu plastifikátoru na konformaci molekul polyesteru a na nadmolekulární strukturu matric s důsledkem ve vyšším stupni botnání ve 14 denním a 21 denním intervalu. Při degradaci vzniká vyšší počet molekul, které jsou nad limitem rozpustnosti ve vodě, mají však poměrně vysokou účinnost z hlediska osmotické aktivity.

ZÁVĚR

Biodegradabilní sloučeniny typu větvených alifatických polyesterů hydrolyzují ve vodě. Bylo prokázáno, že celková doba degradace je mezi jedním a dvěma měsíci. Degradace je provázena kontinuální erozí tělísek. Botnání na rozdíl od eroze probíhá oscilačně s maximem, případně i minimem hodnot charakteristiky. Atypický průběh botnání souvisí velmi těsně s koncentrací osmoticky aktivních molekul, které jsou generovány náhodným štěpením molekul sloučenin při jejich hydrolýze. Separací těchto molekul ve vodné fázi a jejich alkalimetrickým stanovením byla prokázána těsná souvislost mezi koncentrací těchto hydrofilních molekul a stupněm botnání. Koncentrace karboxylů a stupeň botnání jsou charakteristiky, které jsou ovlivněny hmotností matric. Se zvyšující se hmotností se prodlužují difúzní dráhy pro eliminaci degradačních produktů a posouvají se časové intervaly maximálních hodnot karboxylového čísla a stupně botnání. Triethylcitrát použitý v 20% koncentraci jako plastifikátor ovlivní pouze v malé míře proces eroze matric. Triethylcitrát ovlivní koncentraci a polydisperzitu molekulových hmotností degradačních produktů, jak z hlediska frakce molekul rozpustných ve vodě, tak z hlediska molekul, které nejsou extrahovatelné do vodné fáze a jsou těsně nad limitem rozpustnosti ve vodě. Rozdíly v charakteristice degradačních produktů se výrazně projeví v průběhu botnání matric.

7 LITERATURA

- (1) Frazza, E. J. and Schmitt, E. E., 1971. A new absorbable suture. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, 1: 43-58.
- (2) Wasserman, D., 1971. US Patent 1,375,008.
- (3) Schmitt, E. E., Suen, T. J. and Updegraff, I. H., 1974. Water-degradable resins containing recurring, contiguous, polymerized glycolide units and process for preparing same, US Patent 3,784,585, Jan. 8, 1974, American Cyanamid.
- (4) Dunn, R. L., English, J. P., Strobel, J. D., Crowsar, D. R., and Tice, T. R., 1988. Preparation and Evaluation of lactide/glycolide copolymers for drug delivery, In: C. Migliaresi (Ed.), *Polymers in Medicine*, Vol. 3, Amsterdam, Elsevier.
- (5) Vert, M., Li, S. M., Spenlehauer, G., and Guerin, P., 1992. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 3: 432-446.
- (6) Vert, M., Chabot, F., Leray, J., and Christel, P., 1981. Bioresorbable polyesters for bone surgery. *Makromol. Chem. Suppl.*, 5: 30.
- (7) Brekke, J. H., 1989. Biodegradable, osteogenic, bone graft substitute, UK Patent 2215209A, Sept. 20, 1989, Osmed Inc.
- (8) Pitt, C. G., Gratzel, M. M., Kimmel, G. L., Surles, J., and Schindler, A., 1981. Aliphatic polyesters. 2. The degradation of poly(DL-lactide), poly (ϵ -caprolactone) and their complexes in vivo. *Biomaterials*, 2: 215-220.
- (9) Li, S. M., Garreau, H., and Vert, M., 1990. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media: Part 1: Poly (DL-lactic acid). *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1: 123-130
- (10) Vert, M., 1998. Bioresorbable synthetic polymers and their operation field, In: G. Walenkamp (Ed.), *Biomaterials in Surgery*, Stuttgart, Georg Thieme, pp. 97-101.
- (11) Li, S. M., Garreau, H., and Vert, M., 1990. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media: Part 1: Poly (DL-lactic acid). *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1: 123-130.
- (12) Li, S., Garreau, H., and Vert, M., 1990. Structure-property relationships in the case of degradation of solid aliphatic poly (α -hydroxy acids) in aqueous media: 2. PLA37.5GA25 and PLA75GA25 copolymers. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1: 131-139.

- (13) Li, S., Garreau, H., and Vert, M., 1990. Structure-property relationships in the case of degradation of solid aliphatic poly (α -hydroxy acids) in aqueous media: 3. Amorphous and semi-crystalline PLA 100. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1: 198.
- (14) Vert, M., 1990. Degradation of polymeric biomaterials with respect to temporary applications, In: *Degradable Materials*, Boca Raton, CRC Press, pp. 11-37.
- (15) Visscher, E. G., Pearson, J. E., and Fong, J. W., 1988. Effects of particle size on the in vitro and in vivo degradation rates of poly (DL-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.*, 22: 736-746.
- (16) Grizzi, I., Garreau, H., Li, S., and Vert, M., 1995. Biodegradation of devices based on poly(DL-lactic acid): Size dependence. *Biomaterials*, 16: 305-311.
- (17) Li, S. M., Girod-Holland, S., and Vert, M., 1996. Hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid) in the presence of caffeine base. *J. Controlled Release*, 40: 41-53.
- (18) Schwach, G., Engel, R., Coudane, J., and Vert, M., 1994. Stannous octoate versus zinc-initiated polymerization of racemic lactide: effect of configurational structures. *Polym. Bull.*, 32: 617-623.
- (19) Schwach, G., Coudane, J., Engel, R., and Vert, M., 1997. More about the initiation mechanic of lactide polymerization in the presence of stannous octoate. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 35: 3431-3440.
- (20) Tunc, D. C., 1995. Orientruded polylactide based body-absorbable osteosynthesis devices: A short review. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 7: 375-380.
- (21) Schugens, C., Grandfils, C., Jerome, R., Teyssie, P., Delree, P., Martin, D., Malgrange, B., and Moonen, G., 1995. Preparation of macroporous biodegradable polylactide implant for neuronal transplantation. *J. Biomed. Mater. Res.*, 29: 1349-1362.
- (22) Agrawal, C. M., Haas, K. F., Leopold, D. A., and Clark, H. G., 1992. Evaluation of poly(L-lactic acid) as a material for intravascular polymeric stents. *Biomaterials*, 13: 176-182.
- (23) Athanasiou, K. A., Schmitz, J. P., and Agrawal, C. M., 1998. The effects of porosity on in vitro degradation of polylactic acid-polyglycolic acid implants used in repair of articular cartilage. *Tissue Eng.*, 4: 53-63.
- (24) Jimoh, A. G., Wise, D. L., Gresser, J. D., and Trantolo, D. J., 1995. Pulsed FSH release from an implantable capsule system. *J. Controlled Release*, 34: 87-95.

- (25) Shively, M. L., Coonts, B. A., Renner W. D., Southard, J. L., and Bennett, A. T., 1995. Physicochemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system. *J. Controlled Release*, 33: 237-243.
- (26) Pegoretti, A., Fambri, L., and Migliaresi, C., 1997. In vitro degradation of poly(L-lactic acid) fibers produced by melt spinning. *J. Appl. Polym. Sci.*, 64: 213-233.
- (27) Eenink, M. J. D., Feijen, J., Olijslager, J., Albers, J. H. M., Rieke, J. C., and Greidanus, P. J., 1987. Biodegradable hollow fibers for the controlled release of hormones. *J. Controlled Release*, 6: 225-247.
- (28) Bodmeier, R. and Chen, H., 1989. Evaluation of biodegradable poly(lactide) pellets prepared by direct compression. *J. Pharm. Sci.*, 78: 819-822.
- (29) Yamakawa, I., Kawahara, M., Watanabe, S., and Miyake, Y., 1990. Sustained release of insulin by double-layered implant using poly(DL-lactic acid). *J. Pharm. Sci.*, 79(6): 505-509.
- (30) Zhang, X., Wyss, U. P., Pichora, D., Amsden. B., and Goosen, M. F. A., 1993. Controlled release of albumin from biodegradable poly(DL-lactide) cylinders. *J. Controlled Release*. 25: 61-69.
- (31) Bhardwaj, R., and Blanchard, J., 1997. In vitro evaluation of poly(DL-lactide-co-glycolide) polymer-based implants containing the alpha-melanocyte stimulating hormone analog, Melanotan-I. *J. Controlled Release*, 45: 49-55.
- (32) Lewis, K. J., Irwin, W. J., and Akhtar, S., 1995. Biodegradable poly(L-lactic acid) matrices for the sustained delivery of antisense oligonucleotides. *J. Controlled Release*, 37: 173-183.
- (33) Mauduit, J., Perouse, E., and Vert, M., 1996. Hydrolytic degradation of films prepared from blends of high and low molecular weight poly (DL-lactic acid)s. *J. Biomed. Mater. Res.*, 30: 201-207.
- (34) Brannon-Peppas, L., Vert, M., Polylactic and polyglycolic acids as drug delivery carriers. In: Wise, et al., editors. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. New York: Marcel Dekker, 2000. 108-119.
- (35) Conti, B., Genta, I., Giunchedi, P., and Modena, T., 1995. Testing of in vitro dissolution behavior of microparticulate drug delivery systems. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 21: 1223-1233.

- (36) Sansdrap, P., and Moes, A. J., 1997. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of the dispersed and aggregated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Controlled Release*, 43: 47-58.
- (37) Witschi, C., and Doelker, E., 1998. Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *J. Controlled Release*, 51: 327-341.
- (38) Youxin, L., and Kissel, T., 1993. Synthesis and properties of biodegradable ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic acid) or poly(L-lactic-co-glycolic acid) A-blocks attached to central poly(ethylene) B-blocks. *J. Controlled Release*, 27: 247-257.
- (39) Hiljanen-Vainio, M. P., Orava, P. A., and Seppälä, J. V., 1997. Properties of ϵ -caprolactone/DL-lactide (ϵ CL/DL-LA) copolymers with a minor ϵ -CL content. *J. Biomed. Mater. Res.*, 34: 39-46.
- (40) Jin, X., Carfagna, C., Nicolais, L., and Lanzetta, R., 1995. Synthesis, characterization and in vitro degradation of a novel thermotropic ternary and p-hydroxybenzoic acid, glycolic acid, and p-hydroxycinnamic acid. *Macromolecules*, 28: 4785-4794.
- (41) Colombo, P., Santi, P., Bettini, R., Brazel, Ch. S., Drug Release from Swelling-Controlled Systems. In: Wise, et al., editors. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. New York: Marcel Dekker, 2000. 183-192.
- (42) Caramella, C., Ferrari, F., Bonferoni, M C., Ronchi, M., and Colombo, P., 1989. Rheological properties and diffusion dissolution behaviour of hydrophilic polymers. *Boll. Chim. Farmaceutico*, 128: 298-301.
- (43) Harland, R. S., Gazzaniga, A., Sangalli, M. E., Colombo, P., and Peppas, N. A., 1988. Drug/polymer matrix swelling and dissolution, *Pharm. Res.*, 5: 488-494.
- (44) Bonferoni, M. F., Rossi, S., Ferrari, F., Bertoni, M., Sinistri, R., and Caramella, C., 1995. Characterization of three hydroxypropylmethyl-cellulose substitution types: rheological properties and dissolution behaviour, *Eur J. Pharm. Biopharm.*, 41: 242-246.
- (45) Lee. P. I., 1981. Controlled drug release from polymeric matrices involving moving boundaries. In: D. H. Lewis (Ed.), *Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals*, Plenum Publishing, New York, pp. 39-48.

- (46) Bettini, R., Peppas, N. A., and Colombo, P., 1998. Polymer relaxation in swellable matrices contributes to drug release. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 25, pp. 26-37.
- (47) Lee, P. I., and Kim, C., 1991. Probing the mechanisms of drug release from hydrogels. *J. Controlled Release*, 16: 229-236.
- (48) Colombo, P., Bettini, R., Massimo, G., Catellani, P. L., Santi, P., and Peppas, N. A., 1995. Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets. *J. Pharm. Sci.*, 84: 991-997.
- (49) Bettini, R., Colombo, P., Massimo, G., Santi, P., Catellani, P. L., and Peppas, N. A., 1994. Moving fronts and drug release from hydrogel matrices. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 21: 19-20.
- (50) Colombo, P., Gazzaniga, A., Caramella, C., Conte, U., and 1987. In vitro programmable zero-order release drug delivery system. *Acta Pharm. Technol.*, 33: 15-20.
- (51) Faulkner, A. *Stanovení osmoticky aktivních degradačních produktů oligoesterových nosičů*. (Diplomová práce) Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 2008. 53 s.
- (52) Colombo, P., Maggi, L., Gazzaniga, A., Conte, U., La Manna, A., and Peppas, N. A., 1988. Drug release from swellable matrices restricted by impermeable film coatings. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Mater.*, 15: 40-41.
- (53) Conte, U., Colombo, P., Gazzaniga, A., Sangalli, M. E., and La Manna, A., 1988. Swelling-activated drug delivery systems, *Biomaterials*, 9: 489-493.
- (54) Shenouda, L. S., Adams, K. A., Zoglio, M. A., 1990. A controlled release delivery system using two hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.*, 61: 127-134.