

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO LJUBLJANA

MATEJ ŠTUHEC

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJ ŠTUHEC

**SINTEZA IN KARAKTERIZACIJA NOVIH BIORAZGRADLJIVIH
KOPOLIMEROV IZ TRIMETILENKARBONATA IN D,L – LAKTIDA TER
MOŽNOST IZDELAVE NANODELCEV**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NOVEL BIODEGRADIBLE
COPOLYMERS FROM TRIMETHYLENE CARBONATE AND D,L – LACTIDES,
NANOPARTICLE - BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS**

Ljubljana, 2010

M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. Saše Baumgartner in somentorja izr. prof. dr. Aleša Obreze. Spektroskopske meritve, elementne analize, mikroskopijo in druga merjenja so opravili Fakulteta za farmacijo in Kemijski inštitut.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom Izr. prof. dr. Saše Baumgartner in somentorja izr. prof. dr. Aleša Obreze.
Diplomantov lastnorocni podpis

VSEBINSKO KAZALO

POVZETEK	6
ABSTRACT	7
SEZNAM OKRAJŠAV	9
1. UVOD	11
1.1. POLIMERI.....	11
1.2. PREDNOSTI BIORAZGRADLJIVIH POLIMERNIH BIOMATERIALOV.....	11
1.3. POMEN MEHANSKIH LASTNOSTI POLIMEROV ZA IZDELAVO VSADKOV	13
1.4. LASTNOSTI, KI VPLIVAJO NA IZBIRO POLIMERA ZA MEDICINSKE NAMENE ..	14
1.4.1. MIKROSTRUKTURNI FAKTORJI	14
1.4.2. MAKROSTRUKTURNI FAKTORJI.....	16
1.4.3. FAKTORJI OKOLJA	17
1.5. EROZIJA IN RAZGRADNJA BIORAZGRADLJIVIH POLIMEROV	17
1.6. POGOSTO UPORABLJENI BIORAZGRADLJIVI POLIMERI	20
1.6.1. POLIGLIKOLID (PGA)	21
1.6.2. POLILAKTIDI (PLA).....	22
1.6.3. LAKTID IN TRIMETILENKARBONAT, KOPOLIMER (PLCA).....	23
1.7. POLIMERNI NANODELCI NA OSNOVI BIORAZGRADLJIVIH MATERIALOV	24
1.7.1. PLGA KOT POGOST OGRODNI MATERIAL ZA IZDELAVO POLIMERNIH NANODELCEV	25
1.7.2. POSTOPKI ZA IZDELAVO POLIMERNIH NANODELCEV IN NJIHOVA STABILIZACIJA.....	26
2. NAMEN DELA	28
3. METODE IN MATERIALI	29
3.2. METODE	31
3.2.1. SINTEZA MONOMERA TMC.....	31

3.2.2. SINTEZA POLIMEROV	31
3.2.3. VREDNOTENJE POLIMEROV Z METODO NMR.....	32
3.2.4. VREDNOTENJE POLIMEROV Z METODO DSC	33
3.2.5. RAZPADNOST POLIMEROV	33
3.2.6. IZDELAVA NANODELCEV Z METODO NANOPRECIPITACIJE	34
3.2.7. MERJENJE VELIKOSTI NANODELCEV IN ZETA POTENCIALA	34
4. REZULTATI IN DISKUSIJA.....	36
4.1. SINTEZA MONOMERA TRIMETILENKARBONATA (TMC)	36
4.2. SINTEZA POLIMEROV PLCA.....	37
4.3. DSC MERITVE	41
4.4. REZULTATI TESTA RAZPADNOSTI.....	43
4.5. IZDELAVA NANODELCEV	46
4.6. VELIKOST NANODELCEV	47
4.7. ZETA POTENCIAL	49
5. SKLEP.....	52
6. VIRI.....	54
9. PRILOGE.....	56

POVZETEK

Biorazgradljivi biomateriali se uporabljajo za proizvodnjo implantantov za podporo, obnovo in usmerjanje rasti tkiva. Njihova uporabnost se širi predvsem na področje razvoja nanodostavnih sistemov, saj biorazgradljivi polimeri omogočajo razpad po določenem in naprej znanem času do komponent, ki jih telo zlahka metabolizira ali izloči. S tem je seveda zmanjšana možnost kopičenja telesu tujih snovi in tako manjša možnost neželenih učinkov. Ena izmed najbolj obetavnih spojin na področju biorazgradljivih polimerov je kopolimer trimetilenkarbonata (TMC) in laktida (DLLA), s slovenskim INN imenom trimetilenkarbonat in laktid, kopolimer, zato je bil namen našega dela sinteza tega polimera. Sintezo TMC smo izvedli iz 1,3-propandiola in dietilkarbonata. Za sintezo monomera trimetilenkarbonata in polimerov smo sestavili posebno aparaturo, ki je zagotavljala inertne pogoje med reakcijo. Polimerizacijo smo izvajali 48 ur pri 120 °C v prisotnosti katalizatorja SnOct₂ v argonovi atmosferi. Po mehanizmu jo uvrščamo med koordinativne polimerizacije z odpiranjem obroča, ki so zelo pogoste pri sintezi polimerov. Sintetizirali smo pet novih kopolimerov z različnim razmerjem TMC : DLLA in jih ovrednotili. Izkoristki sintez so bili visoki med 72 % in 98 %. Z NMR smo določili razmerje posameznih monomernih gradnikov in ugotovili, da se ujema s teoretičnimi predvidevanji. Iz NMR spektrov smo ugotovili večjo reaktivnost molekule trimetilenkarbonata v primerjavi z laktidom. Predlagali smo ustrezen kordinacijski mehanizem, pri čemer je prva stopnja aktivacija molekule trimetilenkarbonata. Polimerom smo določili termične lastnosti in ugotovili, da imajo polimere z večjim deležem laktida višjo temperaturo steklastega prehoda. Ker sta za biorazgradljive polimere zelo pomembna parametra čas in kinetika razpada, smo v vodi pri 37 °C ovrednotili razpad sintetiziranih polimerov v trimesečnem obdobju. Ugotovili smo, da večja vsebnost DLLA monomera pospeši razpad, saj večja vsebnost molekul DLLA v polimeru omogoča večjo penetracijo vode v polimer in posledično cepitev vezi ter tako večjo erozijo. Kopolimeri z večjim deležem laktida so v treh mesecih skoraj popolnoma razpadli, medtem ko so v istem obdobju polimeri z večjim deležem trimetilenkarbonata razpadli za manj kot 50 % začetne mase. V procesu razgrajevanja polimerov gre za kombinacijo površinske in globinske erozije. Iz sintetiziranih

polimerov smo izdelali tudi nanodelce z metodo nanoprecipitacije in jim določili velikost, polidisperznost in zeta potencial. Velikost nanodelcev je bila odvisna od sestave polimera. Rezultati so pokazali, da uporaba stabilizatorja ni potrebna, zato je to metoda izbora. Ugotovili smo, da lahko zgolj z izbiro ustreznega začetnega množinskega razmerja v zmesi vplivamo na čas razpadnosti in na vse merjene lastnosti nanodelcev. Načrtovani, sintetizirani in ovrednoteni novi biorazgradljivi polimeri so tako zelo obetavne pomožne snovi za izdelavo različnih nosilnih sistemov za dostavo zdravilnih učinkovin.

ABSTRACT

Biodegradable biomaterials are useful materials for production of implants to support, replace and enable proper orientation of tissue growth. The applicability of these materials is spreading especially in the development of nano delivery systems. Biodegradable polymers are definitely a better choice for application as biostable polymers because after a definite time they degrade to the components that can be easily metabolized by the body or excreted. This reduces the possibility of accumulation of foreign material and the possibility of side effects. For our work we chose one of the most promising polymers from this group, co-polymer from trimethylene carbonate (TMC) and lactic acid (DLA). We synthesized monomer trimethylene carbonate from 1,3-propanediol and diethyl carbonate. For the synthesis of monomer trimethylene carbonate and polymer we have created a special apparatus which provided the inert conditions during the reaction. Synthesis was performed in small ampoules under applied conditions of polymerization; the temperature 120 °C for the duration of 48 hours using SnOct₂ as a catalyst. According to the mechanism, the reaction was ring opening polymerization which is very common in polymeric industry. The yields of synthesis were high between 72 % and 98%. We synthesized five new co-polymers and evaluated them. We evaluated the time of disintegration of the polymer, glass transition temperature and the ratio of the basic components in the polymer. With NMR

spectrometry we determined the ratio of individual monomer building blocks and found out that they match theoretical expectations. Purity of polymers was determined by NMR and thermal properties by DSC. We found out that polymers with higher content of lactic acid have higher glass transition temperature. From NMR spectra, we found greater reactivity of trimethylene carbonate compared to lactic acid. We proposed appropriate coordination mechanism whereby the first stage is activation of trimethylene carbonate molecules. As the half-time and kinetics of decay are very important parameters for biodegradable polymers, we monitored them in water at 37 ° C for three-months. The kinetics changed from zero to the first order after four weeks. We also found that a higher content of DLLA monomer accelerated disintegration, as a higher content of DLLA molecules in a polymer increased the penetration of water into the polymer and, consequently the splitting of chemical bonds and erosion. Co-polymers with higher lactic acid content almost completely disintegrated in three months, while those with higher trimethylene carbonate content did not disintegrate more than 50%. The polymers were used to prepare nanoparticles by solvent exchange method. The size, polydispersity and zeta potential of nanoparticles were determined. The results showed that the use of stabilizer is not required. We established that only by choosing appropriate initial molar ratios in the mixture the disintegration time and all the measured properties of nanoparticles were influenced. These designed, synthesized and evaluated new biodegradable co-polymers are promising candidates as platforms for drug delivery systems.

SEZNAM OKRAJŠAV

S_n2	bimolekularna nukleofilna substitucija
DLLA	D,L–laktid (ciklični dimer mlečne kisline)
d	dublet (NMR)
dd	dublet dubleta (NMR)
NMR	jedrska magnetna resonanca
PLCA	kopolimer iz trimetilenkarbonata in D,L–mlečne kisline
q	kvartet (NMR)
J	sklopitvena konstanta (NMR)
m	multiplet (NMR)
ND	nanodelci
σ	natezna napetost snovi
SR – PLLA	ojačani polimer PLLA
μ	Poissonovo število
PCA	polikarbonat (polycarbonate)
PCL	polikaprolakton (polycaprolactone)

M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev

PGA	poliglikolna kislina (polyglycolic acid)
Pi	polidisperzni indeks
PLA	polilaktid (polylactide)
PLLA	poli L–mlečna kislina (poly-L-Lactide Acid)
PVA	polivinilacetat (polyvinyl acetate)
PVC	polivinilklorid (polyvinyl chloride)
E	prožnostni modul snovi
Mr	relativna molekulska masa
RSD	relativna standardna deviacija
s	singlet (NMR)
t	triplet (NMR)
Tg	temperatura steklastega prehoda
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
Tm	temperatura tališča
TMC	trimetilenkarbonat (trimethylene carbonate)
ZP	zeta potencial

1. UVOD

1.1. POLIMERI

Polimeri so naravne ali sintezno pridobljene makromolekule, ki nastanejo iz osnovnih enot monomerov pri mehanistično različnih reakcijah, ki jih s skupnim imenom poimenujemo polimerizacije. V širšem smislu je vsa materija biorazgradljiva, vendar pa s terminom biorazgradljivost v nalogi označujemo materijo, ki se v telesu razgrajuje pod vplivom določenih bioloških dejavnikov. Odločujoči dejavniki so bakterije, encimsko okolje, telesni mediji in produkti metabolizma. Za nastanek ustreznega polimera je treba upoštevati številne dejavnike, kot so temperatura, pH, masa posameznih monomerov, tlak, koncentracija in vrsta katalizatorja. Osnovne reakcije polimerizacije so: anionsko katalizirana reakcija, kationsko katalizirana reakcija, polimerizacija z uporabo kompleksov in radikalska polimerizacija.

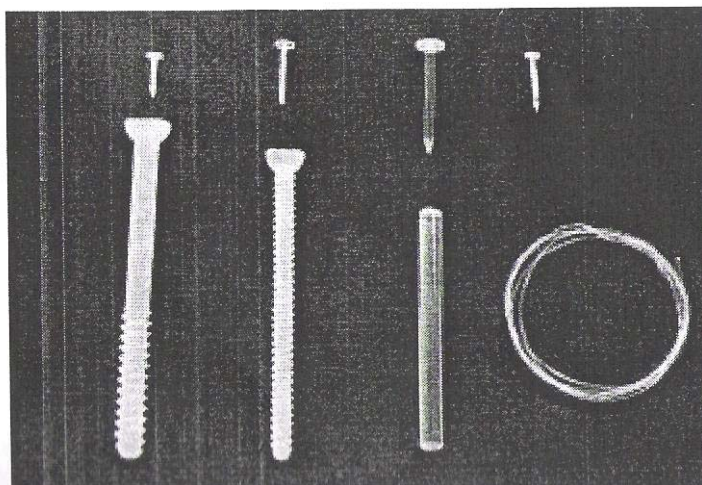
Tudi med sintezniimi polimeri se stremi k njihovi biorazgradnji, zato gre razvoj polimerov v smeri njihovega razpada, zlasti v prisotnosti encimov. V zadnjem desetletju so spoznanja iz tega področja vplivala na razvoj številnih medicinskih pripomočkov, kot so: različne proteze, vijaki za kosti, obliži in podobno ... Danes potekajo intenzivne raziskave tudi v povezavi z dostavnimi sistemi iz novih biorazgradljivih polimerov, ki so osrednjega pomena pri dostavi določenih učinkovin in genov v terapijo za različne bolezni (1), 2), 3)).

1.2. PREDNOSTI BIORAZGRADLJIVIH POLIMERNIH BIOMATERIALOV

Glede na obnašanje v živih organizmih ločimo biostabilne in biorazgradljive polimere. Biostabilni polimeri so fiziološko inertni, v dolgotrajnih raziskavah '*in vivo*' se kemično zelo malo spremenijo ter obdržijo podobne fizikalno-kemične lastnosti skozi daljše obdobje. Primeri iz te skupine so: polietilen, polipropilen in polimetilmetakrilat. V medicinske namene jih uporabljajo kot trajne implantante (vložke) pri različnih poškodbah.

Pri večini poškodb trajni implantanti niso želeni, saj imamo opravka s tkivom, ki se obnavlja. Zato so primernejši biorazgradljivi polimeri (slika 1), ki s hitrostjo svojega razpada na netoksične fragmente spreminjajo rigidnost skozi čas in omogočajo, da funkcijo vsadkov s časom prevzamejo obnovljena tkiva. Že nekaj časa so poznane plošče, vijaki in obroči iz biorazgradljivih polimerov, ki odločilno vplivajo na razvoj zdravstva na tem področju. Čas razpadnosti lahko nadzorujemo na več načinov, pomembna pa je predvsem kemijska struktura polimera, ki jo lahko načrtujemo: z razmerjem reaktantov v sintezi, vrsto in količino katalizatorja, temperaturo in tlakom reakcije, ojačitvenimi polimeri, segrevanjem na mestu aplikacije in podobno. Za prodor v medicinski prostor so pomembne tudi mehanske lastnosti polimerov. Takšni vsadki morajo omogočati močno oporo tkivu, ki se obnavlja, s čimer zmanjšamo verjetnost poškodb. Razpadni produkti ne smejo biti toksični ali povzročati alergijskih reakcij, kar zmanjša možnost kasnejših komplikacij.

Vsadki iz biorazgradljivih polimerov so opora tkivu v začetni stopnji regeneracije, za odstranjevanje ni potrebna dodatna operacija kot pri klasičnih vsadkih (biostabilnih, kovinskih). S tem zmanjšamo verjetnosti poškodb, ki lahko nastanejo pri odstranjevanju vsadkov, zmanjšamo število potrebnih operacij in izboljšamo complianco zdravljenja (4).



Slika 1: Izdelki za medicinske aplikacije iz biorazgradljivih kopolimerov (4).

1.3. POMEN MEHANSKIH LASTNOSTI POLIMEROV ZA IZDELAVO VSADKOV

Polimerne vsadke uporabljajo v veliki meri pri operacijah meniskusa, golenice, lobanjskih kosti, komolca in gležnja. V prvi stopnji, ko tkivo še ni dovolj obnovljeno, so ti vsadki mehansko zelo obremenjeni. Zunanje mehanske vplive opredelimo s Hookovim zakonom (enačba 1).

$$\sigma = E\varepsilon \quad \text{/enačba 1/}$$

kjer je σ (Pa) natezna napetost, ε (/) raztezek in E (Pa) konstanta, ki jo imenujemo prožnostni modul. Prožnostni modul (E) ali tudi Youngov modul je fizikalna konstanta snovi, določena pri raztezanju ali stiskanju teles kot razmerje med mehansko napetostjo (silo na enoto preseka) in relativnim raztezkom v območju veljavnosti Hookovega zakona. Enačba 1 velja, dokler smo v območju elastične deformacije, ko to območje preidemo, linearna zveza več ne velja (5). E je merilo elastične odpornosti telesa proti deformaciji oziroma opisuje elastično togost telesa. Iz enačbe 1 vidimo, da je pri dani ustrezni natezni napetosti raztezek tem manjši, čim večji je E . Težko raztegljive snovi imajo velik E , lahko raztegljive pa majhen E .

Kadar izdelujemo vsadke iz biorazgradljivih polimerov, morajo izkazovati velik E in tako onemogočati velike raztezke. Majhen raztezek je pri biorazgradljivih polimerih zaželen zaradi čim manjše mobilnosti obnavljajočega tkiva.

Natezno napetost je enostavno meriti, zato jo pri delu s polimernimi vsadki uporabljamo kot merilo za začetno jakost polimera in tkiva. Za lobanjsko kost so denimo izmerili vrednost natezne napetosti 200 MPa, kar pomeni, da bi v primeru uporabe vsadka na začetku potrebovali polimer, ki bi določen čas prenesel takšno obremenitev (6).

Le malo polimerov prenese napetost, ki je potrebna pri obnavljanju tkiva. Posledično smo pri izboru zelo omejeni, zato je že zgodaj prišlo do ideje, da bi polimer ojačali, s čimer bi izboljšali odpornosti na mehanske obremenitve (7), (8). Izmerjena je bila vrednost natezne napetosti za ojačani polimer poli L–mlečne kisline (SR – PLLA) 300

MPa, kar je vrednost, ki se pojavlja pri nekaterih tkivih (9). Z ojačanjem polimera poli L–mlečna kislina (PLLA) s trakovi iz poliglikolne kisline (PGA) pa se je sila za prelom polimera še povečala, in sicer iz s GPa na 6 GPa. Opazili so tudi, da se je plošča iz PLLA po obremenitvi zlomila v enem mesecu, medtem ko je plošča s trakovi iz PGA ostala cela tudi več kot pol leta (10).

1.4. LASTNOSTI, KI VPLIVAJO NA IZBIRO POLIMERA ZA MEDICINSKE NAMENE

Biorazgradljivi polimeri se ne uporabljajo samo za izdelavo vsadkov, ampak tudi na drugih področjih, v zadnjem času predvsem pri izdelavi različnih nanodelcev. Kadar izdelujemo nov polimer, so seveda lastnosti polimera pomembne pri izbiri primernega izhodnega materiala za sintezo želenega končnega produkta. V grobem lahko lastnosti, ki vplivajo na izbiro polimera za medicinske namene, razdelimo na tri podenote (11), in sicer: mikro in makro-strukturni faktorji ter faktorji okolja. Podrobneje so opredeljeni v nadaljevanju.

1.4.1. MIKROSTRUKTURNI FAKTORJI

- **Kemijska sestava polimera:** Medatomske vezi v molekulah polimera vplivajo na lipo-hidrofilne lastnosti polimerov. Te lastnosti so pomembne za obnašanje polimera. Hitrost razpada polimera je odvisna tako od vrste vezi (kovalentnih in nekovalentnih interakcij) kot tudi od števila vodikovih vezi, kar vpliva na stopnjo penetracije vode. Pri kemijski sestavi je zelo pomembna tudi reaktivnost vezi, saj se najbolj reaktivne vezi cepijo najprej. Kemijska sestava pomembno vpliva tudi na stabilnost vgrajenih učinkovin in proteinov, saj imajo polimeri zaradi nekaterih prostih skupin naboj, ki vpliva na stabilizacijo vgrajenih učinkovin in proteinov. Najbolj pogoste kemijske skupine so estrske, etrske, fosfatne, karbonatne in karboksilne. Z začetno izbiro množinskega razmerja monomerov lahko pogosto vplivamo na končne lastnosti polimerov, kar je pomembno predvsem pri biorazgradljivih polimerih, kjer na takšen način vzpostavimo nadzor nad

sproščanjem učinkovine in razpadom polimera. Kemijska sestava polimera vpliva tudi na vrsto razpadnih produktov, ki se lahko vključujejo v različne biološke procese. Načrtovanje kemijske sestave polimerov je zaradi omenjenih lastnosti bistvenega pomena.

- **Molekulska masa polimera.** Večja molekulska masa polimera pomeni večji volumen polimera. Pri implantantih je pomembna dimenzija, ki je odvisna tudi od molekulske mase polimera. Pri razpadu polimera se zmanjša njegova molekulska masa, pri čemer se cepijo kovalentne vezi. Poleg molekulske mase polimera navajamo tudi stopnjo polimerizacije, stopnjo substitucije in molarno substitucijo.
- **Stranski produkti pri reakciji polimerizacije in nečistote v izhodnih substancah** vplivajo na pojav neželenih učinkov in alergijskih reakcij. Velikokrat po koncu polimerizacije ostanejo topila, ki lahko vplivajo na pojav neželenih reakcij. Pogoste so reakcije povezovanja enakih monomerov med seboj, kadar imamo dva različna monomera. Velikokrat imajo monomeri različno reaktivnost, ki je velikokrat odvisna od izbire katalizatorja. Poleg pravilne izbire katalizatorja je zelo pomembna tudi njegova količina, saj katalizator v velikih količinah lahko vpliva na številne stranske učinke v organizmu. Neuspešna polimerizacija je lahko posledica neustreznega nadzora pogojev sinteze, saj mnogi polimeri razpadejo pod vplivom kisika, UV žarkov, vlage in toplote. Lahko pride tudi do drugih stranskih reakcij kot so racemizacija, premestitev in hidroliza. Tudi shranjevanje izhodnih monomerov in samega katalizatorja je zelo pomembno, saj lahko ob nepravilnem shranjevanju določene spojine zreagirajo in so neuporabne za sintezo. Pogosto se to zgodi pri zelo reaktivnih karbonatih.
- **Kristaliničnost končnega izdelka.** Kristalna rešetka ima drugačne kemijske in fizikalne lastnosti kot amorfno stanje, zato je pomembno, da ugotovimo, v kakšnem stanju se nahaja polimer. Amorfno stanje ima ponavadi večjo hitrost raztapljanja in večjo topnost. Vsaka sprememba kristalne rešetke pa privede tudi do spremenjenih fizikalno-kemijskih lastnosti, ki jih izkazuje polimer. V farmaciji je kristaliničnost zaradi večje stabilnosti farmacevtskih oblik večinoma zaželena. Pomembna lastnost amorfni snovi je temperatura steklastega prehoda (T_g). Nad T_g postanejo vezi (predvsem vodikove) šibkejše, polimer se zmehča in postane bolj gibljiv. Bolj gibljiv polimer omogoča bolj čvrsto prilagajanje tkivu, zato je v medicinskih namenih zelo pomembno, da je T_g približno oziroma malo nad telesno temperaturo. Gibljivost polimera v tem temperaturnem intervalu je povečana in stik s

poškodovanim delom boljši - tesnejši. Na podlagi kliničnih študij so ugotovili, da je tudi prodornost bakterij iz okolja v poškodovano tkivo pri večji mobilnosti molekul polimera manjša (12) 13).

- **Poroznost** vpliva na globinsko erozijo in razpadnost polimera. V bolj porozen polimerni material voda lažje penetrira, zato je globinska erozija večja. Kadar želimo pridobiti bolj porozen material, za sušenje uporabimo liofilizacijo.
- **Relacija med temperaturo steklastega prehoda in temperaturo tališča za polimere.** Polimeri so lahko amorfni ali kristalinični. Pomembni karakteristiki kristaliničnih polimerov sta T_g in T_m . Amorfni polimeri pa imajo samo T_g in jih enostavno s termičnimi metodami ločimo od kristaliničnih polimerov. Amorfno stanje je termodinamsko nestabilno in ob določenih spremembah preide v kristalinično, ki je termodinamsko bolj ugodno stanje, saj ima urejeno strukturo, ki se skozi sistem ponavlja. Po določenem času vsak amorfni sistem preide v kristaliničnega, saj tako nakazujejo zakoni termodinamike. Včasih pa termodinamsko nestabilne sisteme stabiliziramo, da ostanejo nekaj časa v termodinamski manj stabilni obliki, v tem primeru govorimo o kinetični stabilizaciji amorfnega sistema. T_g lahko označimo kot spremembo drugega reda, v angleščini jo pogosto označujemo kot solid-solid transformation, kjer se spremeni mobilnost molekul in specifična toplota snovi. S T_m pa označujemo spremembo prvega reda, saj se spremeni entalpija snovi.

1.4.2. MAKROSTRUKTURNI FAKTORJI

- **Velikost in geometrija implantanta.** Geometrija implantanta je pomembna zaradi obsega in hitrosti razpada implantanta. Večja površina daje večjo možnost stika s topilom in s tem posledično večjo penetracijo topila. Velikost je odvisna tudi od molekulske mase polimera. Molekulske mase razpadnih produktov velikokrat ne moremo nadzorovati, je pa pomembna zlasti zaradi možnosti njihovega izločanja iz organizma skozi ledvice.

- **Razmerje med prostornino in površino.** Omenjeno razmerje bistveno vpliva na hitrost in obseg tako površinske kot globinske erozije polimera.

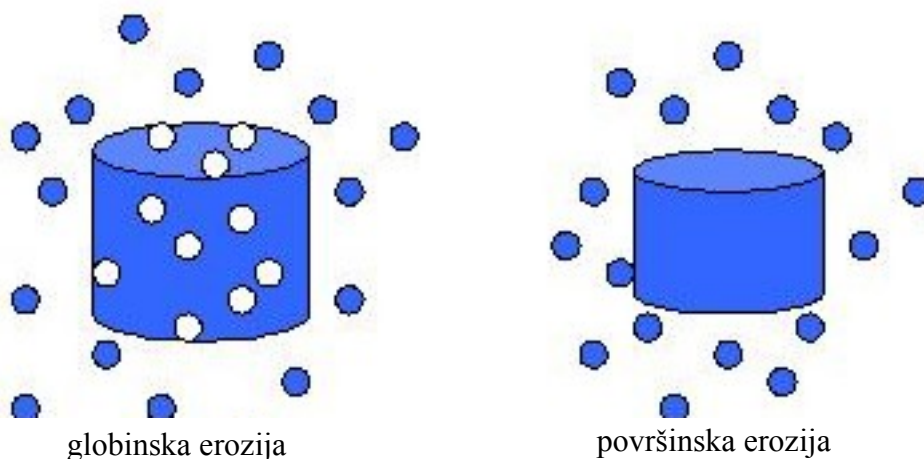
1.4.3. FAKTORJI OKOLJA

- **Lastnosti tkiva** kot so vrsta poškodbe, vrsta tkiva, encimske reakcije v okolici, pH, ionska moč okolice, sposobnost regeneracije in starost tkiva pomembno vplivajo na načrtovanje lastnosti polimera. Izbiro polimera včasih narekuje že vrsta poškodbe, saj vseh polimerov ne moremo aplicirati na vsa mesta. Tkivo lahko s svojim okoljem, npr. pH, različno vpliva na razpad polimerov in lahko povzroči avtokatalizo nekaterih polimerov. Od okolice je tudi odvisno, kako rigiden polimer potrebujemo za medicinske namene. V začetku je ponavadi nujen zelo rigiden polimer, ki prenese velike sile iz okolice in s tem omogoči celjenje tkiva. Po določenem času pa želimo, da se polimer razgradi v netoksične produkte in se izloči iz telesa.
- **Način vnosa implantanta** lahko pri tem povzroči dodatne poškodbe, zato so pri razvoju polimerov potrebne dolgotrajne študije, ki dokazujejo varnost in učinkovitost polimerov.
- **Ekonomski vidiki sinteze.** Razvoj biorazgradljivih polimerov je zaradi zahtevnih postopkov sintez in številnih študij veliko ekonomsko breme, zato je uporaba biorazgradljivih polimerov primerna, ko je res povečana komplanca zdravljenja.

1.5. EROZIJA IN RAZGRADNJA BIORAZGRADLJIVIH POLIMEROV

Polimerne molekule po eni strani erodirajo, kar dostikrat pomeni enostavno odpletanje verig, po drugi strani pa se razgrajujejo s cepitvijo na manjše fragmente, včasih monomere. Razgradnja je kemijski proces, kjer potekajo cepitve kemijskih vezi, medtem ko gre pri eroziji za fizikalne procese raztapljanja in difuzijo polimernih verig s površine ogrodja. Pri biorazgradljivih polimerih ponavadi potekata oba procesa hkrati,

fizikalni in kemijski razpad polimernega ogrodja. Oba procesa dostikrat pokriva kar enoten izraz erozija. Glede na mehanizem erozije ločimo površinsko in globinsko erozijo (slika 2). Površinska erozija je značilna za ogrodja, ki jih tvorijo poliortoestri in polifosfati. Želena je v nekaterih primerih, ko želimo zaščititi v notranjosti vgrajene učinkovine, in to dosežemo s procesom površinske erozije. Za površinsko erozijo je značilno zmanjšanje volumna polimera, medtem ko je kvocient med maso in volumenom konstanten. Za globinsko erozijo je značilno, da se volumen ogrodja ohranja, dokler se polimerne verige ne ločijo. Najlažje primerjamo obe vrsti erozije pri hidrofobnem polimeru, katerega razpad je izključno hidroliza. Pri tem polimeru erozija poteka zaradi dveh dejavnikov: časa difuzije vode v ogrodje in časa razcepitve vezi polimera z vodo. V primeru, ko je čas difuzije vode v ogrodje daljši kot čas razcepitve vezi, poteka površinska erozija. V nasprotnem primeru pride do globinske erozije (14).



Slika 2: Globinska (ang. bulk) in površinska (ang. surface) erozija polimerov.

Pri hitrosti erozije polimerov je najpomembnejših naslednjih pet dejavnikov:

- **Stabilnost vezi v polimeru.** Za hitrejšo erozijo polimernega ogrodja v vodnem mediju je potrebna prisotnost občutljivih kemijskih vezi, ki bodo hitro in že pri milih pogojih hidrolizirale. Najbolj pogoste so estrske, amidne, fosfatne in karbonatne skupine, ki se med seboj razlikujejo po reaktivnosti. Karbonatne skupine so bolj reaktivne kot estrske, najmanj pa so za hidrolizo dovzetne amidne vezi, zaradi dodatne resonančne stabilizacije (15).

- **Hidrofobnost polimera.** Bolj hidrofobni polimeri imajo manjšo tendenco do erozije kot hidrofilni. Hidrofobni polimeri so sestavljeni tako, da imajo v svoji strukturi hidrofobna področja, ki jih tvorijo, npr. aromati in dolge lipofilne verige. Pomembne so tudi hidrofobne skupine polimera na koncu verig polimera, ki veliko prispevajo k razgradnji polimera, saj je prav pri teh skupinah stik z okoljem največji. Kljub lipofilnosti celotnega polimera lahko hidrofilne končne skupine prispevajo k hitrejši eroziji, saj so produkti hidrolize kisli, bazični in nevtralni, kar avtokatalitično pospešijo razgradnjo določenega polimera.
- **Sterični efekti v molekulah polimera.** Polimeri, ki imajo več steričnih ovir za penetracijo vode, erodirajo počasneje, saj je mobilnost molekul vode otežena. Najpogosteje so to metilne ali fenilne skupine. Erozijska poliglikolna kislina PGA je hitrejša kot PLA, ker PLA vsebuje metilno skupino, ki ovira penetracijo vode.
- **Produkti razgradnje polimera.** Nekateri polimeri hidrolizirajo do kislinskih ali bazičnih spojin, ki vplivajo na nadaljnjo hitrost erozije polimera – pride do avtokatalize. Tako erozija PLA sproti katalizira nastala mlečna kislina in s tem povečuje erozijo, saj v kislinskih pogojih hidroliza estra poteka hitreje kot v nevtralnih.
- **Mikrostruktura polimerov** (kristaliničnost, poroznost). Na penetracijo topila imata veliki vpliv tudi poroznost in amorfno stanje. Bolj porozen material omogoča hitrejšo penetracijo in s tem hitrejšo erozijo in razgradnjo polimera. Tudi manjša urejenost delcev (amorfno stanje) pripomore k hitrejši sorpciji topila, zato je amorfno stanje včasih zaželeno. Na hitrejšo razpadnost in erozijo ima vpliv tudi površina, ki omogoča stik polimera s topilom, večja je, hitrejši je razpad (16).

1.6. POGOSTO UPORABLJENI BIORAZGRADLJIVI POLIMERI

Biorazgradljivi polimeri imajo različne lastnosti za različne namene uporabe. Lastnosti nekaterih pogosto uporabljenih polimerov so zbrane v Tabeli 1. Polimer naj bi izkazoval naslednje lastnosti (15):

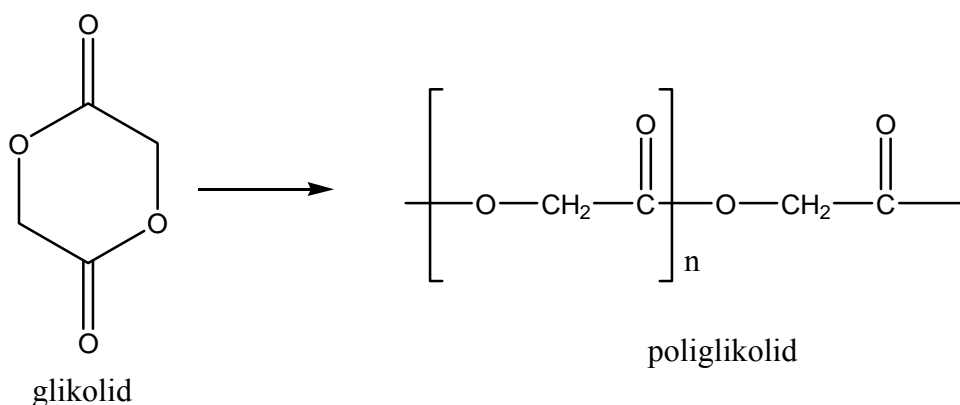
- **mehanske lastnosti primerne za namen uporabe.** Z merjenjem natezne napetosti polimera dobimo podatek o jakosti polimera. V primerjavi z znanimi podatki nateznih napetosti določenih tkiv lahko izberemo polimer primernih mehanskih lastnosti za medicinske aplikacije. V začetnem obdobju celjenja poškodbe potrebujemo polimere velikih nateznih napetosti. Zato je dostikrat potrebno sintetizirati cel set polimerov in izmeriti vrednosti natezne napetosti kot predpogoj za samo aplikacijo. V primeru izdelave nanodostavnih sistemov pa same mehanske lastnosti niso ključnega pomena,
- **brez neželenih učinkov.** Biorazgradljive polimere je potrebno testirati na številne neželene učinke. Načrtujemo ali izberemo polimer, ki ne bo povzročal alergijskih reakcij ob vnosu, ne bo interagiriral z učinkovinami ali poškodoval zdravega tkiva, in ne bo povzročal težav pri eliminaciji,
- **produkti hidrolize polimera se metabolizirajo in ne puščajo zaostankov v organizmu.** Želimo materiale, katerih metabolne poti so dobro opisane. Najbolj primerni so polimeri, katerih razgradni produkti so udeleženi v raznih fizioloških procesih, kot je denimo Krebsov cikel. Za omenjene poti imamo dobro opisane smeri, kar olajša študije o eliminaciji naših polimerov,
- **lahko se sterilizirajo v končni obliki.** Ob parenteralnem vnosu v telo potrebujemo sterilizirane materiale. Ker so postopki sterilizacije različni, je treba paziti, da ne poškodujemo bodisi samega polimera bodisi izdelanega implantanta ali nanodelca. Kot metoda sterilizacije se velikokrat uporabljajo gama žarki.

Tabela I: Lastnosti nekaterih biorazgradljivih polimerov (15).

Polimer	Temperatura tališča (T _m) °C	Temperatura steklastega prehoda (T _g) °C	Elastični modul (GPa)	Razpolovni čas (meseči)
PGA	220 – 230	35- 40	7,0	6-12
LPLA	173 –178	60- 65	2.7	Več kot 24
DLPLA	amorfen	55–60	1.9	12 –18
PCL	58–63	-60 – 65	0.4	Več kot 24
PGA – TMC	Nedoločen	Nedoločen	2.4	6–12
85 / 15 DLPLG	Amorfen	50 –55	2.0	5 –6
75 / 25 DLPLG	Amorfen	50–55	2.0	4 - 5
65 / 35 DLPLG	Amorfen	45–50	2.0	3–4
50 / 50 DLPLG	Amorfen	45–50	2.0	1–2

1.6.1. POLIGLIKOLID (PGA)

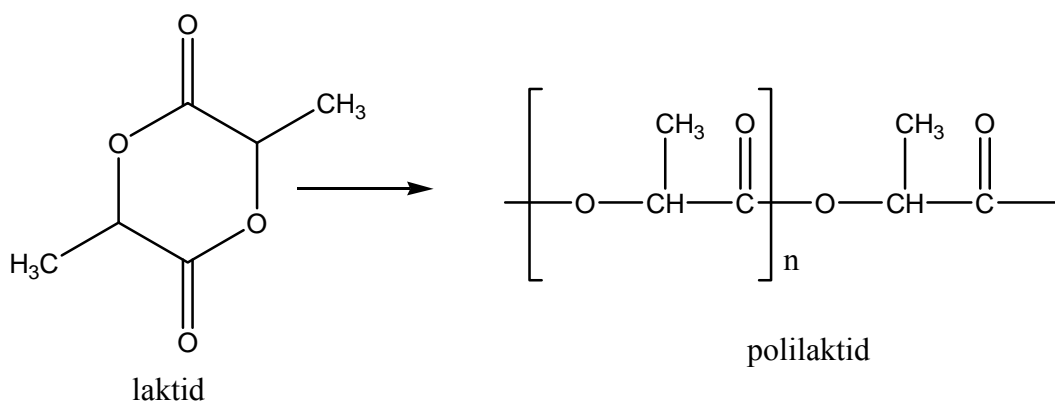
Poliglikolid oziroma poliglikolna kislina je bil prvi biorazgradljivi polimer, ki se je leta 1962 pojavil na tržišču (18). Kemijsko je homopolimer glikolida (slika 3) cikličnega dimera glikolne kisline. PGA je kristalinična substanca. Tališče ima pri 220 °C, T_g območje pa 35–40 °C. Material je zelo tog in v večini primerov ni primeren za izdelavo implantantov, razen pri kopolimerizaciji za ojačevalne trakove ali v vlogi kopolimera z drugimi materiali. Razpolovni čas PGA je 6–12 mesecev, razgradni produkti pa so netoksični.



Slika 3: Polimerizacija glikolida v PGA z odpiranjem obroča.

1.6.2. POLILAKTIDI (PLA)

Med najbolj uporabljane biorazgradljive polimere sodijo homopolimeri mlečne kisline, ki jih imenujemo polilaktidi. Polilaktid nastane s polimerizacijo cikličnega dimera mlečne kisline, laktida (slika 4). Molekula je zanimiva tudi zaradi svoje stereokemije. Za polimerizacijo se najpogosteje uporablja racemni L,D-laktid. L-PLA je kristaliničen in elastičen, kar je pomembno pri biomedicinskih aplikacijah. Tališče ima pri 175–178 °C, Tg pa pri 60–65 °C. V primerjavi s PGA je PLA bolj lipofilen polimer. Njegov razpolovni čas je dve leti. Zaradi velike elastičnosti ima tudi nekaj pomankljivosti, največja je premajhna rigidnost v začetni fazi uporabe za oporo tkivu, zato laktid pogosto kopolimeriziramo z drugimi monomeri, da dobimo bolj rigidne polimere. Poleg medicine se PLA uporablja še v proizvodnji plastičnih mas, strojni in živilski industriji. Razgradni produkti so netoksični in rokovanje s polimerom ni nevarno. Polimer racemata mlečne kisline D,L – PLA je amorfen s Tg 50–60 °C in se uporablja za lepila in maziva. Glavne prednosti D,L–PLA in PLA polimerov so: nizka cena, biorazgradnja, enostavna sinteza in karakterizacija (19) 20).



Slika 4: Polimerizacija laktida v PLA.

1.6.3. LAKTID IN TRIMETILENKARBONAT, KOPOLIMER (PLCA)

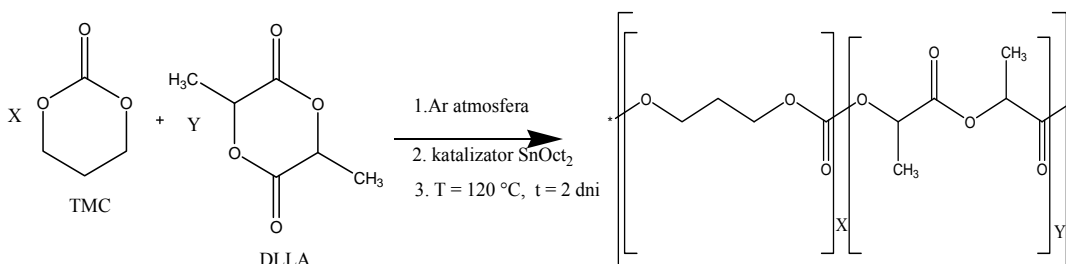
Racemat laktida DLLA so kombinirali s trimetilenkarbonatom TMC in dobili primeren polimer za medicinsko uporabo. Končne lastnosti polimera so odvisne od razmerja reaktantov in izbire katalizatorja (slika 5). Kopolimeri, kjer je delež DLLA večji, so bolj hidrofilni, kar omogoča hitrejšo penetracijo topila in posledično poteče poleg površinske tudi globinska erozija.

PLCA se v glavnem uporablja za izdelavo vijakov, plošč in obročev pri operacijah različnih tkiv. Kopolimeri z večjim deležem DLLA so v začetni fazi biorazgradnje bolj rigidni kot tisti z večjim deležem TMC. Produkt razgradnje polimera je tudi mlečna kislina, ki deluje avtokatalitično na kopolimer ter posledično povečuje hitrost razgradnje. Mlečna kislina vstopa v biorazgradnji v Krebsov cikel, kar je dobro opisana eliminacijska pot. Dodatek trimetilenkarbonata k laktidu prinese večjo hidrofobnost, amorfno in daljši razpolovni čas. Molekule TMC zmanjšajo globinsko erozijo, zato lahko v te polimere vgrajena učinkovina ostane obstojna dalj časa, kar je pomembno tudi pri vgrajenih proteinih. Posledično so polimeri z večjim deležem TMC bolj primerni kot dostavni sistemi, predvsem za lipofilne učinkovine in proteine, polimeri z večjim deležem laktida pa kot biorazgradljivi implantanti v oporo tkivu.

PLCA polimere lahko primerjamo s kopolimerom glikolida z laktidom (PLGA). V primerjavi z dobro opisanim PLGA je kopolimer PLCA manj rigiden v začetni fazi, erozija poteka tako površinsko kot globinsko, kar je odvisno od razmerja med DLLA in

TMC. Poleg tega je razpolovni čas PLCA v primerjavi s PLGA daljši, kar je včasih prednostno pri izdelavi implantantov.

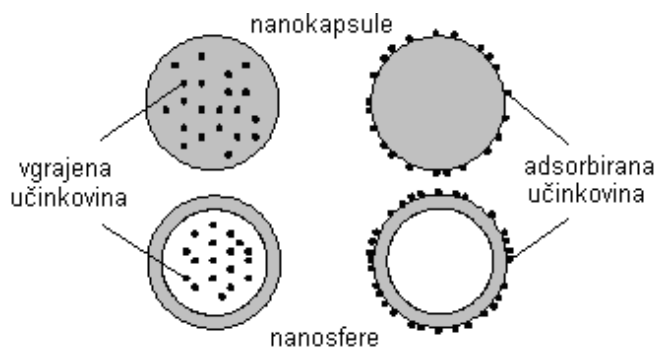
Iz vsega sledi, da je PLCA kopolimer širokega spektra uporabe in njegova varnost sprejemljiva, kar ga uvršča med najbolj uporabne kopolimere v zadnjem času (21) (22).



Slika 5: Kopolimer PLCA laktida (DLLA) in trimetilenkarbonata (TMC).

1.7. POLIMERNI NANODELCI NA OSNOVI BIORAZGRADLJIVIH MATERIALOV

Široka uporaba biorazgradljivih polimerov pa je tudi v oblikovanju ND. Polimerni ND so trdni koloidni delci velikosti od 50 do 1000 nm in se uporabljajo v različne namene. Izdelani so iz naravnih ali umetnih polimerov. Glede na porazdelitev učinkovine in obliko ločimo nanosfere in nanokapsule (slika 6) (23). Za nanosfere je značilno, da se učinkovina nahaja po celotnem delcu, pri nanokapsulah pa jedro nosilnega materiala in učinkovino obdaja še zunanja obloga. Široka uporaba ND je zastopana predvsem v farmacevtski industriji, industriji čipov in biotehnologiji. Nanodelci se kot nosilni sistemi lahko uporabljajo za dostavo hidrofilnih in hidrofobnih učinkovin, proteinov, vakcin, bioloških makromolekul in podobno. Z ustrezno zgradbo nanodelcev lahko zaradi njihove dolgotrajne sistemske cirkulacije dosežemo ciljano dostavo učinkovin v limfatični sistem, možgane, arterijske stene, pljuča, jetra in vranico (24). Uporaba v farmaciji se je uveljavila predvsem zaradi nizke toksičnosti, boljše biološke uporabnosti, dobre penetracije in možnosti ciljane terapije. (25), (26). Mnogokrat so nosilni sistemi izbora, predvsem za določene zelo lipofilne učinkovine.



Slika 6: Različne vrste nanodelcev z učinkovino.

1.7.1. PLGA KOT POGOST OGRODNI MATERIAL ZA IZDELAVO POLIMERNIH NANODELCEV

Najširše uporabljani polimeri za izdelavo sinteznih polimernih nanodelcev so poliestri, predvsem polimlečna kislina (PLA), poliglikolna kislina (PGA) in njuni kopolimeri (PLGA), ki so kot dostavni sistemi za učinkovine odobreni tudi s strani FDA. Ti polimeri so zanimivi zlasti zaradi že prej opisane *biorazgradljivosti*, *biokompatibilnosti* in *možnosti eliminacije po naravnih poteh*. S spreminjanjem razmerja med bolj hidrofilno glikolno kislino in bolj hidrofobno mlečno kislino ter spreminjanjem molekulskih mas PLGA lahko vplivamo na hitrost razgradnje PLGA in posledično tudi hitrost sproščanja vgrajene učinkovine. Pri tem je pomembno, ali so končne karboksilne skupine proste ali zaestrene, saj tudi to odloča o hidrofilnem/hidrofobnem značaju polimera. Na primeru mikrosfer je bilo dokazano, da biološka razgradnja PLGA poteka v dveh stopnjah. Najprej poteče hidrolitična cepitev estrskih vezi (razgradnja), pri čemer nastanejo oligomerne in monomerne enote; posledično se močno zniža molekulska masa polimera. Sledi druga stopnja biološke razgradnje (erozija), v kateri pride do zmanjšanja mase nanodelcev. Hkrati poteka pospešena cepitev polimernih verig zaradi avtokatalize. Mlečna in glikolna kislina nato vstopita v Krebsov cikel in se dokončno metabolizirata v CO₂ in vodo. Morebitna vloga encimov pri razgradnji PLGA je še nejasna. Večina

literaturnih virov poroča le o čisti hidrolitični razgradnji, vendar razlike med hitrostjo razgradnje *in vitro* ter *in vivo* nekateri raziskovalci pripisujejo v *in vivo* prisotnim encimom (27) 28).

1.7.2. POSTOPKI ZA IZDELAVO POLIMERNIH NANODELCEV IN NJIHOVA STABILIZACIJA

Za izdelavo nanodelcev so opisane različne metode: polimerizacija iz monomerov in različne obarjalne metode:

- metode polimerizacije iz monomerov

Za izdelavo nanodelcev lahko uporabljamo metode polimerizacije monomerov v disperziji, emulziji ali v inverzni mikroemulziji, odvisno od pogojev izdelave pa kot produkte dobimo nanosfere ali nanokapsule.

- metode obarjanja iz makromolekul in polimerov

Pri teh metodah izdelave nanodelce izdelamo z obarjanjem ali denaturacijo makromolekul, ki so lahko lipofilne ali hidrofilne. Metode za izdelavo z denaturacijo vključujejo vročo denaturacijo, izsoljevanje, kemijsko premreževanje in ionotropno geliranje.

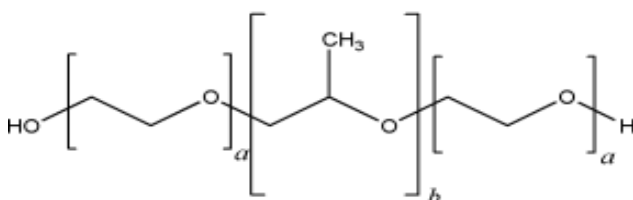
Obarjanje polimerov je metoda, ki se najpogosteje uporablja predvsem za izdelavo nanodelcev iz polimlečne (PLA) in poliglikolne (PGA) kisline ter njunih kopolimerov (PLGA). Glavni prednosti metode obarjanja sta odsotnost ostrih pogojev pri izdelavi ter odsotnost morebitnih zaostankov monomerov in katalizatorjev, ki se pojavijo pri metodah izdelave nanodelcev s polimerizacijo monomerov.

Obarjanje polimera lahko dosežemo z odparevanjem ali difuzijo organskega topila, kar zavisi od lastnosti uporabljenega organskega topila.

Med metodami obarjanja se pogosto za izdelavo nanodelcev uporablja metoda nanoprecipitacije, ki temelji na uporabi dveh mešajočih topil. Polimer raztopimo v ustreznem organskem topilu, ki se popolnoma meša z vodo. Ob stiku te raztopine z netopilom, ki je običajno voda, pride do obarjanja polimera. Nanoprecipitacija je posledica hitre desolvatacije polimera po stiku raztopine le-tega z netopilom. Pri tem

pride do hitre difuzije topila z raztopljenima polimerom v disperzni medij (netopilo). Sočasno se učinkovina ujame v polimerno ogrodje. Osnova za hitro spontano tvorbo nanodelcev je tako imenovan Marangonijev učinek, ki poteka na medfazi topilo-netopilo. Zaradi hitre difuzije organskega topila (npr. acetona) v vodo in znižanja medpovršinske napetosti dveh faz prihaja na medfazi do turbulence, ki omogoča nastanek nanodelcev. Metoda difuzije topila omogoča izdelavo nanodelcev z velikostjo od 100 do 300 nm in unimodalno distribucijo velikosti ter je primerna je za izdelavo nanodelcev iz vrste različnih polimerov (29) 30).

Nanodelci zaradi svoje majhne velikosti in velike medfazne energije težijo k združevanju, zato pri izdelavi nanodelcev uporabljamo stabilizatorje. Njihova izbira je že v postopku izdelave ključnega pomena za kasnejšo fizikalno stabilnost nanodelcev v disperziji. Za povečanje stabilnosti disperzije nanodelcev uporabljamo sterične in ionogene stabilizatorje. Sterični stabilizatorji se predvsem z van der Waalsovimi in vodikovimi interakcijami vežejo na nanodelec, s čimer povečajo fizikalno stabilnost ND v mediju. Zaradi neionskega značaja so sterični stabilizatorji fiziološko bolj kompatibilni kot ionogeni. Pri ionogenih stabilizatorjih je kritični parameter koncentracija ionogenega stabilizatorja, saj le-ta v večjih koncentracijah lahko destabilizira sistem. Poloksameri (slika 7) so blok kopolimeri polietilenglikola in polipropilenglikola in se uporabljajo kot neionogeni stabilizatorji, ki s svojo razvejano strukturo pripomorejo k stabilizaciji nastalega sistema. Molekule polipropilenglikola prispevajo k razvejanosti verige, ki nastali sistem še bolj stabilizira, saj omogoča tvorbo več vezi z nanodelci. Uporabljajo se tudi za stabilizacijo drugih sistemov, kot so npr. emulzije, saj zmanjšajo medfazno energijo sistema (31).



Slika 7: POLOKSAMER – blokkopolimer polietilenglikola in polipropilenglikola.

2. NAMEN DELA

Danes potekajo intenzivne raziskave sinteze in uporabe biorazgradljivih polimerov zlasti za medicinske namene. Poudarek je na izbiri monomerov, pogojih sinteze in razgradnji na netoksične fragmente. Zato bomo pri delu pripravili serijo kopolimerov, pripravljenih s polimerizacijo trimetilenkarbonata in D,L-laktida v različnih molarnih razmerjih.

V prvem delu diplomske naloge bomo v inertnih pogojih iz dietilkarbonata in 1,3-propandiola sintetizirali trimetilenkarbonat. Sintetizirani trimetilenkarbonat bomo polimerizirali z D,L-laktidom v prisotnosti katalizatorja kositrovega(II) 2-etilheksanoata. Pripravljene polimere bomo izolirali, očistili in okarakterizirali s spektroskopskimi metodami in DSC.

Vsem polimerom bomo določili temperaturo steklastega prehoda in razpadnost. Test razpadnosti bomo izvedli v trimesečnem intervalu in ob časovnih točkah določili delež razpadlega polimera. V zadnjem delu bomo z novimi kopolimeri izdelali nanodelce z metodo nanoprecipitacije in določili vpliv razmerja posameznih monomernih enot v kopolimerih na velikost izdelanih nanodelcev, zeta potencial in hidrolipofilne lastnosti.

3. METODE IN MATERIALI

Reagenti in topila

aceton (Merck, Nemčija)

brezvodni metanol (Pharmachem, Pharmchem Laboratories, ZDA)

dietilkarbonat (Merck, Nemčija)

diklorometan (Merck, Nemčija)

etilacetat (Merck, Nemčija)

1,3–propandiol (Aldrich, USA)

izopropanol (Aldrich, USA)

kositrov(II) 2-etilheksanoat (Sigma, ZDA)

kloroform (Merck, Nemčija)

metanol (Pharmachem, Pharmchem Laboratories, ZDA)

makrogol 2000 monometil eter (Fluka, Švica)

polivinilalkohol (PVA)

Poloksamer 188, Lutrol[®]F68 (dobavitelj Lek, Slovenija)

TMC (Boehringer Ingelheim, Nemčija)

toluen (Merck, Nemčija)

Laboratorijska oprema

lioofilizator Christ Beta 1-8K (Martin Christ, Nemčija)

magnetno mešalo IKA RCT basic (IKA[®] Werke GmbH & Co. KG, Nemčija)

PCS naprava Malvern instruments Zetasizer 3000 (Malvern, VB)

rotavapor Buechi R-114 (Buechi Glas Uster, Nemčija)

M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev

tehtnica Mettler Toledo AG245 (Mettler Toledo, Švica)

ultrazvočna kadička Iskra Sonis 4 (Iskra, Slovenija)

UV-vis spektrofotometer Hewlett Packard 8453 (HP, ZDA)

Spektroskopske metode

¹H NMR spektri so bili posneti na inštrumentu Bruker Avance DPX 300 v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti v Ljubljani. Kot topila smo uporabili kloroform CDCl₃ in dimetilsulfoksid DMSO-d₆ in tetrametilsilan TMS kot interni standard.

3.2. METODE

3.2.1. SINTEZA MONOMERA TMC

Zmesi 45,0 g (381,2 mmol) dietilkarbonata in 23,5 g propan-1-3-diola (309,2 mmol) (32) v 100 mL bučki s povratnim hladilnikom po kapljicah dodamo metanolno raztopino NaOMe, ki smo jo sveže pripravili z 0,30 g Na in 5 mL brezvodnega metanola. Bučko opremimo s klorkalcijevo cevko, povežemo z bučko za lovljenje destilata (priloga 2) in 2 dni segrevamo na oljni kopeli pri 100 °C (priloga 2). Nato zamenjamo bučko za lovljenje destilata in počasi dvignemo temperaturo na 130 °C (t= 4 h). Ponovno zamenjamo bučko za lovljenje destilata. Temperaturo počasi dvigemo do 180 °C (t= 4 h). Frakciji, ki je destilirala v temperaturnem intervalu 130 °C–180 °C, dodamo 3 x 20 mL etilacetata, 3 x 20 mL vode in ločimo fazi. Organsko fazo sušimo 30 minut z Na₂SO₄, filtriramo in topilo odparimo pod znižanim tlakom. Preostanek v bučki prelijemo z 10 mL izopropanola in postavimo čez noč v hladilnik. Izpadejo beli kristali, ki jih odfiltriramo in posušimo na zraku do konstantne mase.

T tališča: 46– 47 °C

Izkoristek reakcije: 18 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ = 2,14 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂O, J = 5,7 Hz), 4,45 (t, 4H, OCH₂CH₂CH₂O) ppm.

IR (NaCl, cm⁻¹): 3488, 2940, 1732, 1479, 1422, 1248, 1189, 1146, 1122, 1062, 983, 938, 771, 677, 549.

3.2.2. SINTEZA POLIMEROV

V 10 mL ampulo v argonovi atmosferi (priloga 1) smo dodali znano maso TMC in DLLA (glede na željeno molsko razmerje) in kapljico katalizatorja SnOct₂ (33) ter zatalili ampulo z ognjem. Ampulo smo segrevali na oljni kopeli ob konstantnem

mešanju pri 120 °C, 48 ur. Nato smo odlomili del ampule, dodali 10 mL kloroforma, prenesli vsebino v 100 mL erlenmajerico in filtrirali skozi fini filter. Po odparevanju topila iz filtrata z rotavaporjem in črpalko (P = 1 mbar, T = 25°C in t = 2 uri) je sledilo preobarjanje z zmesjo aceton/voda. Polimer smo raztopili v 5 ml acetona in dodali 30 ml vode. Na ledu smo dobili belo voskasto snov, oddekantirali vodno fazo in preostanek posušili z nizkotlačno črpalko (P = 1 mbar, T = 25°C in t = 2 uri).

Reakcijo smo ponovili v 100 ml bučki. Natehtali smo začetna monomera (masa odvisna od želenega razmerja monomerov v končnem produktu) TMC in DLLA, bučko prepihali z argonom in dodali dve kapljici katalizatorja SnOct₂ (33). Reakcijo smo izvajali na oljni kopeli pri konstantnem mešanju, T = 120 °C, v Ar atmosferi, 48 ur. Dodali smo 10 ml kloroforma, prenesli vsebino v erlenmajerico in filtrirali skozi občutljiv filter. Po odparevanju topila iz filtrata na rotavaporju in črpalki (P = 1 mbar, T = 25°C in t = 2 uri) je sledila kristalizacija iz mešanice aceton/voda. Polimer smo raztopili v 5 ml acetona in dodali 30 ml vode. Na ledu smo dobili belo voskasto snov, oddekantirali vodno fazo in jo posušili z nizkotlačno črpalko (P = 1 mbar, T = 25°C in t = 2 uri).

Izkoristek reakcije: 71 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ = 1,55 (m, 3,52H, O(C=O)CH(CH3)O(C=O)), 2,05 (m, 0,83H, OCH₂CH₂CH₂O), 4,25 (t, 0,76H, OCH₂CH₂CH₂O), 5,15 (m, 1H, O(C=O)CH(CH₃)O(C=O)) ppm.

3.2.3. VREDNOTENJE POLIMEROV Z METODO NMR

Razmerje osnovnih komponent v polimeru smo določili s 300 MHz NMR spektrometrom. Kot topilo smo uporabljali CDCl₃ in DMSOd₆. S pomočjo NMR tehnike smo spremljali tudi uspešnost sinteze, morebitne nezreagirane monomere in stranske produkte. Iz integralov smo določili razmerje osnovnih enot DLLA in TMC v končnem polimeru. Zaradi premika integralov skupin iz monomerov smo v spektrih polimerov v primerjavi s spektri monomerov ugotovili uspešnost sinteze. Posneli smo spektre vseh osnovnih enot DLLA in TMC ter vse sintetizirane kopolimere.

3.2.4. VREDNOTENJE POLIMEROV Z METODO DSC

Termične lastnosti polimera smo določili z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC). Vzorce (5–10 mg) posameznih polimerov smo zatehtali v aluminijaste lončke na analizni tehtnici. Aluminijaste lončke z vzorci smo nato nehermetično zaprli z luknjastimi aluminijastimi pokrovčki na DSC stiskalnici. Tako pripravljene vzorce smo analizirali na DSC-ju, kjer smo jih segrevali s hitrostjo 10 °C/min v temperaturnem območju - 20 °C do 180 °C pod dušikovo atmosfero. Vzorce smo ohladili na sobno temperaturo (25 °C), nato smo postopek segrevanja ponovili. Na ta način smo s prvim segrevanjem iz vzorca odstranili eventuelno rezidualno topilo ostalo od sinteze, pri drugem segrevanju smo lahko odčitali T_g, ki je značilna za posamezen polimer. Kot standard pri kalibraciji smo uporabili indij. Za čim večjo zanesljivost rezultatov smo vsako meritev vzorca ponovili trikrat.

3.2.5. RAZPADNOST POLIMEROV

Za spremljanje razgradnje izdelanih polimerov smo uporabili nekoliko spremenjeno v literaturi že opisano metodo (34). V 15 mL acetona smo raztopili 1,5 g našega polimera. V 1,5 ml vialo iz zatemnjenega stekla smo odpipetirali 1 ml 10 % (m/V) raztopine polimera v acetonu. Tako smo pripravili 15 vial z raztopljenim polimerom, kar je zadostovalo za pet meritev po tri vzorce. Vialo smo pustili odprto 72 ur pri 25 °C, da je aceton izhlapel; na dnu vialo pa je nastal polimerni film. V vsako vialo smo nato z injekcijsko brizgo dodali 1 mL prečiščene vode (pH 7,0, prevodnost 0,055 μS/cm, 25 °C) in vzorce inkubirali na vodni kopeli pri 37 °C 2, 4, 6, 8 oz. 12 tednov. V posamezni časovni točki smo z injekcijsko brizgo najprej odstranili medij nad polimernim filmom, film 2-krat previdno sprali z 2 mL prečiščene vode in vzorce sušili v vakuumskem sušilniku pri 40 °C do konstantne mase (~ 3 ure). Iz zaostanka mase polimera smo posredno določili delež razpadlega polimera. Test razpadnosti smo izvedli v treh paralelkah.

$$\text{odstotek razpadnosti} = ((\text{masa zaostanka} - \text{masa prazne vial}) / 0,1 \text{ g}) * 100$$

Enačba 2: Izračun odstotka razpadnosti v 'in vitro' testu za naše polimere.

3.2.6. IZDELAVA NANODELCEV Z METODO NANOPRECIPITACIJE

50,0 mg polimera smo raztopili v 5 mL acetona pri 25 °C in dobljeno raztopino med mešanjem na magnetnem mešalu (7000 obratov/min) injicirali v 50 ml vodne raztopine stabilizatorja (0,25 % (m/V) PVA oz. 0,50 % (m/V) poloxamer 188 ali prečiščene vode. Ob stiku obeh faz je prišlo do obarjanja polimera in nastanka nanodelcev. Disperzijo ND smo na magnetnem mešalu mešali še 2 uri, sledilo je merjenje velikosti nanodelcev in njihovega zeta potenciala.

3.2.7. MERJENJE VELIKOSTI NANODELCEV IN ZETA POTENCIALA

Merjenje velikosti ND poteka na principu fotonske korelacijske spektroskopije, in sicer z napravo, ki izkorišča odboj oziroma sipanje laserskega žarka za detekcijo hitrosti Brownovega gibanja delcev. Le-to je odvisno od pogojev medija, kjer se delci nahajajo, kot sta temperatura in viskoznost medija, ter od same velikosti delcev. Željeno je, da je polidisperzni indeks (Pi), ki je merilo porazdelitve velikosti delcev (območje med 0 in 1) v območju pod 0,3. Ustrezno redčen vzorec vstavimo v nosilec.

Meritev zeta potenciala temelji na potovanju delcev proti nasprotno nabiti elektrodi, t.i. končna hitrost, ki jo dosežejo delci, pa je odvisna od jakosti električnega polja in dielektrične konstante medija, kar sta znana podatka, in površinskega naboja na delcih – zeta potenciala. Priprava vzorca je enaka kot pri merjenju velikosti delcev.

Pogoji meritev za velikost nanodelcev:

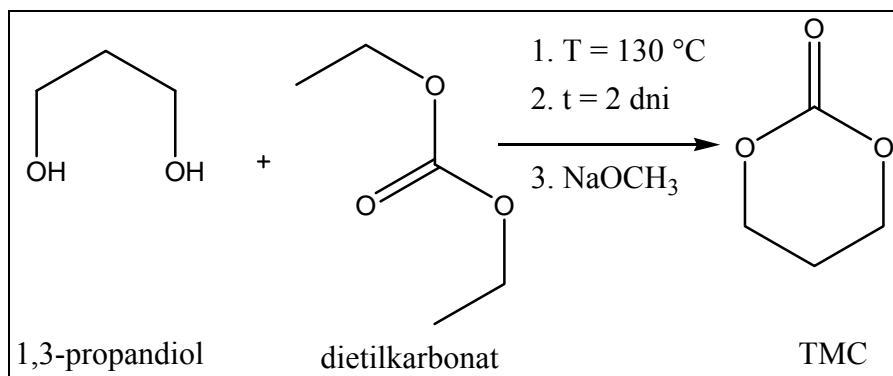
- temperatura 25 °C,
- viskoznost 0,89 cP,

M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev

- čas merjenja 60 s in 1 mL disperzije nanodelcev,
- λ laserske svetlobe (He-Ne laser) 633,0 nm,
- lomni količnik medija: 1,330,
- kot merjenja 173°,
- število ponovitev - 5,
- čas meritev: takoj po izdelavi in 24 ur po izdelavi,
- razredčeni nanodelci z bidestilirano vodo, disperzija nanodelcev : voda = 1:20.

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1. SINTEZA MONOMERA TRIMETILENKARBONATA (TMC)



Slika 8: Sinteza monomera TMC.

Ciklični karbonat smo sintetizirali iz ustreznega diola in dietilkarbonata (slika 8). Namesto dietilkarbonata bi lahko uporabili tudi fosgen in CO₂. Za ustrezen organski karbonat smo se odločili zaradi nevarnosti rokovanja s fosgenom in nereaktivnosti CO₂. Mehanizem reakcije je adicija s sledečo eliminacijo. Zaradi slabe nukleofilnosti hidroksilnih skupin 1,3-propandiola smo za aktivacijo uporabili natrijev metilat (NaOCH₃). Pomembna je tudi izbira ustreznega karbonata, ki ima dobre izstopajoče skupine. Po vezavi nukleofila se odcepi etanol (tega zlahka oddestiliramo) in dobimo produkt reakcije TMC. Vidimo, da je smotrna izbira dietilkarbonata, zaradi lahke dostopnosti, nizke toksičnosti in simetrične reaktivnosti (ob nesimetričnem karbonatu bi lahko prišlo do neenakomerne reakcije zaradi različnih energij vezi in s tem reaktivnosti karbonata). Število stranskih produktov smo s tem zmanjšali na minimalno vrednost. Stranski produkt bi lahko bil tudi ciklični eter, vendar smo z aktivacijo propan 1,3-diola z natrijem zmanjšali elektrofilnost elektrofilnega C-atoma (poleg OH-skupin) in s tem povečali verjetnost nastanka produkta TMC.

Pomembna je uporaba brezvodnih pogojev, da ne pride do hidrolize produkta TMC. Z destilacijo in ekstrakcijo smo uspeli ločiti različne frakcije. Prva frakcija je vsebovala lahko hlapne alkohole. Pri drugi frakciji smo dobili pretežno nezreagirani dietilkarbonat (100 °C–130 °C). Tretja frakcija destilacije (130 °C–180 °C) je vsebovala želeni

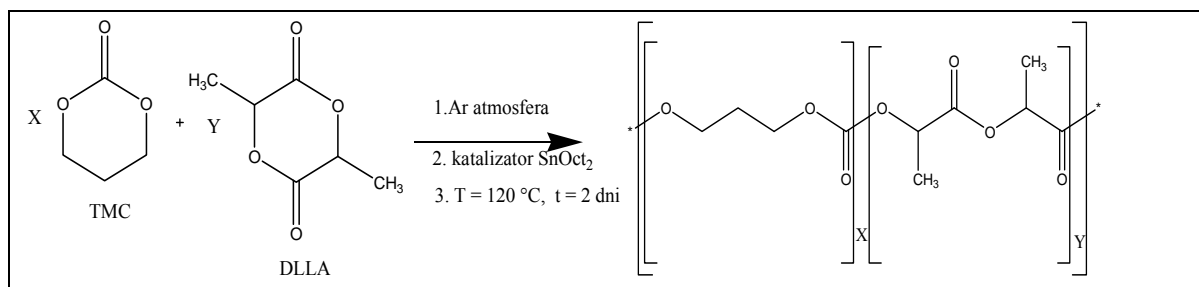
produkt. Sledila je ekstrakcija z etilacetatom, kjer smo ločili še vedno prisotni nezreagirani 1,3-propandiol od produkta.

Vzorec smo posneli z NMR metodo. Iz spektra je vidnih več vrhov (priloga 8). Pri 2,14 ppm sta vodika, ki sta najbolj oddaljena od kisikov. Signal je multiplet, in sicer kvintet, kar je značilno za H¹ jedro, ki ima štiri sosednje vodike, pri čemer vidimo, da ni simetrije vodikov, čeprav je molekula simetrična. Zaradi možne elektronske delokalizacije v karbonatni skupini pride do razlik med obema vodikoma, čeprav sta na istem C-atomu. Pri 4,45 ppm opazimo triplet z integralom 4, kar je značilno za ostala vodikova jedra v molekuli TMC. Podoben premik je značilen za eterske skupine, sicer malo nižji, kar je posledica karbonilne skupine v karbonatni skupini.

Posneli smo IR spekter naše spojine TMC in dobili identični spekter referenčnemu spektru, ki smo ga dobili v literaturi (priloga 9). Produkt ima karbonatno strukturo, ki daje signal pri 1722 cm⁻¹.

Izkoristek sinteze je 18 %. Zaradi dolgotrajne izolacije ga lahko označimo kot zadovoljivega. Veliko izgub je bilo pri destilaciji, nekaj pa tudi pri ekstrakciji. Z optimizacijo destilacije in ekstrakcije bi mogoče lahko prišli še do večjih izkoristkov.

4.2. SINTEZA POLIMEROV PLCA



Slika 9: Reakcija nastanka polimera iz obeh monomerov, reaktanti TMC (trimetilenkarbonat), DLLA (laktid), katalizator in ustrezni pogoji; sinteza v zataljeni ampuli v argonovi atmosferi; X, Y so množine reaktantov.

Polimerizacijo (slika 9) smo izvedli s pomočjo katalizatorja SnOct₂. Slednjega smo izbrali, zato ker se veliko uporablja za sintezo biorazgradljivih polimerov ter je zelo učinkovit pri sintezah (35). Mehanizem sinteze je koordinacijski z odprtjem obroča (ang. ring opening polymerization). Katalizator deluje podobno kot Lewisova kislina

M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev

(AlCl₃ pri Friedel Craftsovih reakcijah), s karbonilno skupino (kisikom) laktida tvori koordinativno vez in s tem bolj aktivira karbonilni ogljik v estrski skupini za napad. Po odprtju obroča dobimo prosti konec laktida, ki kot nukleofil napade karbonilni ogljik TMC. Polimerizacija teče tako dolgo, dokler količina produkta ali pomanjkanje katalizatorja ne ustavi reakcije.

Izbira neionskega katalizatorja je razumljiva, saj zmanjša možnost poteka stranskih reakcij. Anionski katalizator bi denimo lahko odcepil tudi vodike v D,L–laktidu in privedel do racemizacije. Težava kationskega katalizatorja pa je nizka obstojnost in možnost racemizacije.

Sintetizirali smo šest polimerov z začetno molsko vsebnostjo TMC od 20 do 80 mol % (tabela II). Preizkusili smo številne metode za izolacijo in čiščenje polimerov. Najustreznejša metoda je bilo preobarjanje iz zmesi 5 mL acetona in 30 mL vode.

Tabela II: Kopolimerizacija TMC z DLLA v prisotnosti katalizatorja Sn(oct)₂.

Oznaka vzorca	Razmerje reaktantov DLLA/TMC (razmerje molov vhodnih komponent)	Razmerje molov DLLA/TMC v končnem polimeru (razmerje NMR integralov po sintezi)	Izkoristek sinteze (%)
OSM 12	4/1	3,60/1,00	0,863
OSM 9	3/1	2,66/1,00	0,722
OSM 11	2/1	2,16/1,00	0,771
OSM 10	1/1	0,98/1,00	0,845
OSM 8	1/3	1,00/2,93	0,750
OSM 13	1/4	1,00/4,91	0,976

Polimere smo karakterizirali z NMR spektroskopijo. Signali posameznih vodikov v polimeru imajo nekoliko drugačne kemijske premike kot v monomeru (priloga 7). Signala za metilenski skupini, ki sta bili v TMC pri (t, 4H $\delta = 4.44$ ppm) imata v

polimeru (m, 4H $\delta = 4.15\text{--}4.35$ ppm) nekoliko manjše kemijske premike. V laktidu prisotni metilni skupini sta pri (d, 6H $\delta = 1,65$ ppm), v polimeru pri (m, 2H $\delta = 1.40\text{--}1.70$ ppm). V spektru polimera opazimo še dva signala. Signala pri $\delta_1 = 5.00\text{--}5.35$ ppm in $\delta_2 = 2.00\text{--}2.15$ ppm) sta značilna za metilenske skupine iz TMC dela molekule.

Na osnovi NMR spektrov lahko trdimo, da v naših produktih ni nezreagiranih reaktantov. S primerjavo integralov smo izračunali tudi sestavo končnega polimera (tabela II). Razmerje smo izračunali po naslednji formuli:

$$\text{Razmerje DLLA/TMC v končnem polimeru} = ((\text{vrednost integrala (m, 2H } \delta = 5.00\text{--}5.35 \text{ ppm)})/2) / ((\text{vrednost integrala } \delta = 4.15\text{--}4.35 \text{ ppm)})/4)$$

Enačba 3: Izračun razmerje monomernih enot v polimeru.

Iz enačbe 3 dobimo razmerje med monomernima enotama v polimeru. Iz tabele 2 vidimo, da je razmerje v polimeru med osnovnima komponentama glede na razmerje pred reakcijo najbolj podobno pri enakemu molskemu razmerju izhodnih reagentov v reakcijski zmesi (1/1). Večje so razlike, ko je razmerje zelo izraženo v korist enega reaktanta.

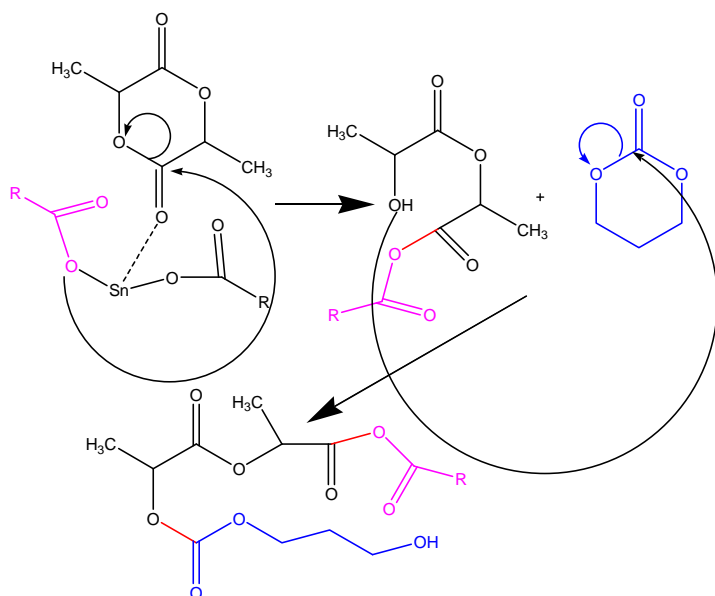
Polimer je topen v acetonu, THF in CH_2Cl_2 , slabo topen pa v alkoholih, vodi in dietiletru.

Na sliki 9 je prikazana reakcija polimerizacije, vendar je mehanizem potrebno podrobno pojasniti. Predlagali smo dva mehanizma reakcije:

- prva stopnja, napad oktanoatne skupine SnOct_2 na laktid (slika 10),
- prva stopnja, napad oktanoatne skupine SnOct_2 na trimetilenkarbonat (slika 11).

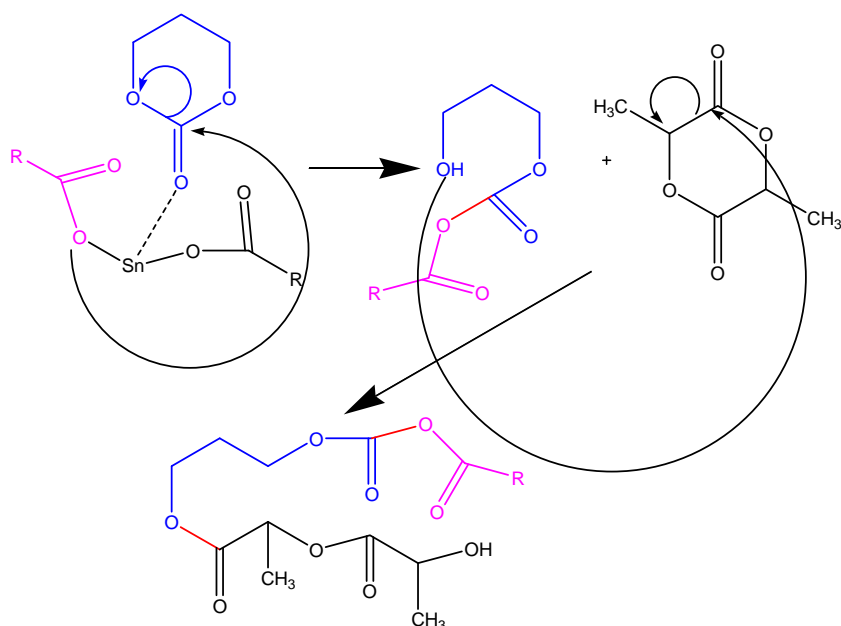
Slika 10 prikazuje napad nukleofilne skupine katalizatorja na molekulo laktida. Kovinski atom kositra poveča elektrofilnost estrske skupine in poveča verjetnost napada oktanoatne skupine na elektrofilni ogljikov atom. Poteče adicija s sledečo intramolekularno eliminacijo, pri čemer dobimo nov nukleofil (hidroksilno skupino), ki v drugi stopnji reagira z molekulo trimetilenkarbonata. Hidroksilna skupina napade karbonatno skupino, pri čemer dobimo dimer. Pri reakciji ponovno dobimo novo prosto hidroksilno skupino iz molekule trimetilenkarbonata, ki reagira naprej kot nukleofil na

elektrofilnih centri novih molekul laktida ali trimetilenkarbonata. Polimerizacija se zaključi (terminacija), ko zmanjka monomerov. Na terminalnem koncu imamo anhidridno skupino, ki je bistveno bolj reaktivna kot esterska, zato ob vezavi vode hitro tvori prosto karboksilno skupino, ki daje polimerom negativen naboj.



Slika 10: Možen mehanizem polimerizacije PLGA. Nove vezi so označene z rdečo barvo. Z modro barvo deli TMC, z črno DLLA in z vijolično SnOct₂. V prvi stopnji se aktivira najprej molekula DLLA.

Na sliki 11 je predstavljena drugačna začetna stopnja polimerizacije. V tem primeru molekula SnOct₂ napade molekulo trimetilenkarbonata in v drugi stopnji prosta hidroksilna skupina kot nukleofil napade elektrofilni center laktida. Nadaljevanje reakcije je enako kot pri prejšnjem mehanizmu, napad nukleofila na molekule laktida ali trimetilenkarbonata.

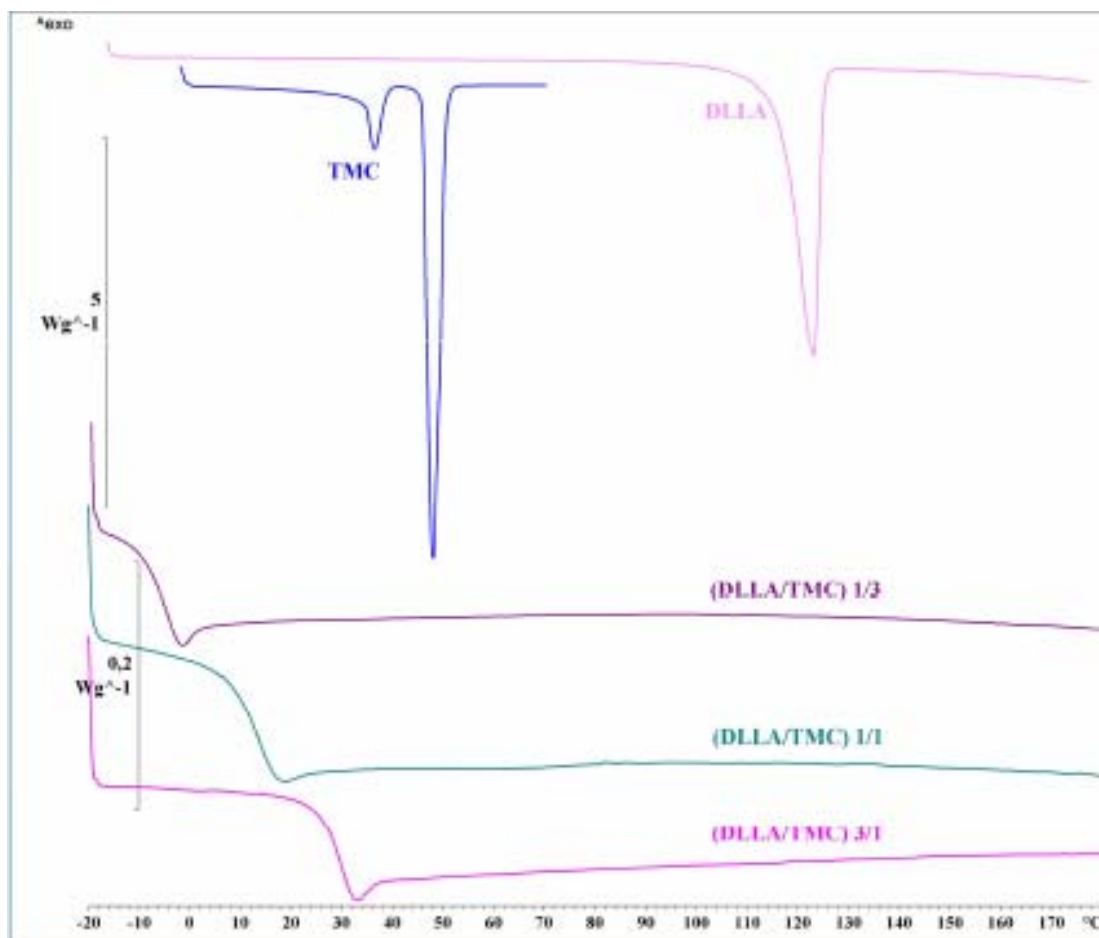


Slika 11: Možen mehanizem polimerizacije PLCA. Nove vezi so označene z rdečo barvo. Z modro barvo deli TMC, z črno DLLA in z vijolično SnOct₂. V prvi stopnji se aktivira najprej molekula TMC.

Po kateri shemi gre mehanizem, težko zaključimo, vendarle je mehanizem na sliki 11 bolj verjeten, ker je karbonatna skupina bolj reaktivna za nukleofile kot estrska (ogljikov atom je boljši elektrofilni center). Posledično zato ob obeh omenjenih lastnosti predlagamo mehanizem na sliki 11. Pri obeh primerih vidimo, da gre za kordinacijski mehanizem z odprtjem obroča.

4.3. DSC MERITVE

Termične spremembe, ki jih razberemo z DSC, delimo na spremembne prvega in drugega reda. Pri spremembah prvega reda, kot sta kristalizacija in taljenje, se spremeni entalpija snovi, medtem ko se pri spremembah drugega reda spremeni specifična toplota snovi (36). Na sliki 12 je prikazan DSC termogram za tri različne kopolimere PLCA in primerjava z DSC izhodnih komponent. Pri vseh kopolimerih smo opazili spremembe drugega reda (T_g), kar je pomembna karakteristika amorfni polimerov.



Slika 12: Termogrami izhodnih substanc TMC in DLLA ter nekterih sintetiziranih kopolimerov. Merjenje je potekalo s hitrostjo segrevanja 10 °C/min v temperaturnem območju - 20 °C do 180 °C pod dušikovo atmosfero. Vzorce smo ohladili na sobno temperaturo (25 °C), nato smo postopek segrevanja ponovili.

Sintetizirani kopolimeri so čisti, kar potrjuje ugotovitev iz NMR spektra in DSC meritev. Iz termogramov vidimo, da z večjo vsebnostjo DLLA v polimeru temperatura steklastega prehoda kopolimera raste, kar lahko pojasnimo z manjšo mobilnostjo verig teh kopolimerov, kar izhaja iz kemijske strukture molekule. V zmesi ni opaziti značilnega vrha TMC in DLLA, kar je dodaten dokaz, da v izdelanih polimerih ni zaostanka izhodnih komponent. Vsi kopolimeri imajo Tg pod telesno temperaturo, zato so primerni za medicinske namene, kjer je potreben dober stik med tkivom in biorazgradljivim materialom. Kot najprimernejši za te namene pa bi bil kopolimer s sestavo DLLA/TMC=3/1, ki ima Tg \approx 26 °C. Pri nižjih temperetaurah je ta polimer bolj

rigiden in primeren za oblikovanje različnih medicinskih pripomočkov, pri telesni temperaturi pa se njegova gibljivost poveča.

Zelo zanimivo je, da smo pri vseh kopolimerih dobili manjši endotermni efekt opažen kot vdolbina pri koncu intervala za T_g , za kar razlage v literaturi nismo zasledili. Gre za majhno endotermno spremembo, ki bi lahko bila posledica spremembe določene urejenosti verig kopolimera. Za monomer TMC pa opazimo, da je pred T_g tališča manjši endotermni vrh, kar bi lahko bila sprememba kristalne rešetke (ang. solid-solid transformation), ker nečistoč v NMR spektru nismo detektirali.

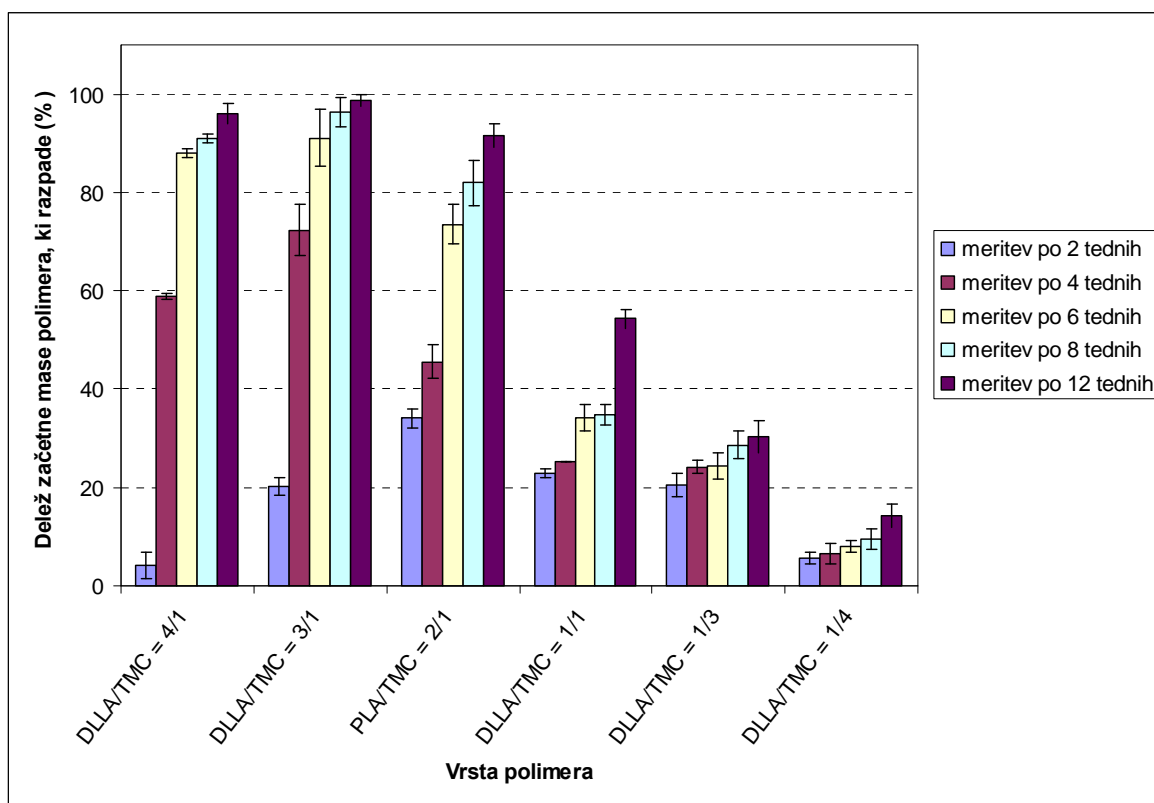
Z DSC metodami smo dokazali, da smo pridobili amorfne kopolimere, ki imajo jasno viden T_g . Višina T_g pa sovпада tudi s kemijsko strukturo kopolimerov: večji je delež DLLA, manjša je gibljivost polimera, višja je T_g (tabela III) .

Table III: Temperature steklastega prehoda za posamezne sintetizirane polimere.

Začetno množinsko razmerje monomerov	Temperatura steklastega prehoda (°C)
DLLA/TMC=1/3	-10
DLLA/TMC=1/1	12
DLLA/TMC=3/1	26

4.4. REZULTATI TESTA RAZPADNOSTI

Slika 13 prikazuje rezultate trimesečnega testa razpadnosti (rezultati in njihove relativne standardne deviacije so navedeni v prilogi 5). Polimeri, ki imajo največjo vsebnost DLLA komponente (4/1 in 3/1), razpadajo najhitreje, kar sovпада z njihovo večjo hidrofilnostjo, in zato boljšo penetracijo vode v izdelane polimerne filme. Polimeri, ki imajo večji delež TMC v zmesi, pa razpadajo zelo počasi. Vidimo, da je razpadanje polimera z največjo vsebnostjo TMC (80 %) zelo počasno, saj v treh mesecih ni razpadlo niti 10 % začetne mase polimera. V primeru polimera z velikim deležem DLLA je po treh mesecih razpadel ves polimer.



Slika 13: Odstotek razpadlega začetnega polimera za vse polimere v odvisnosti od časa.

Molekula PLCA kopolimera hidrolizira do manjših enot. Hidroliza kovalentne vezi poteče na esterskih in karbonatnih skupinah, ki so v molekuli PLCA najbolj dovzetne za hidrolizo. Najbolj verjetna hidrolitska cepitev je cepitev najreaktivnejše skupine, ki pa je odvisna predvsem od količine vode, ki pride v stik s tem področjem kopolimera. Bolj kot je hidrofilen polimer, boljši je stik z vodo, hitrejši je razpad polimera.

Iz prve meritve po štirinajstih dneh vidimo, da je najhitrejši razpad polimera, ki vsebuje enak delež obeh izhodnih komponent. To lahko razložimo z najhitrejšo površinsko erozijo, saj polimeri še niso bili dovolj časa v stiku s topilom, da bi prišlo do opazne globinske erozije.

Po štirih tednih opazimo, da polimeri z večjim deležem DLLA razpadajo bistveno hitreje kot polimeri z velikim deležem TMC, kjer razpada skoraj ne opazimo. To lahko pojasnimo z večjo hidrofilnostjo molekule DLLA kot TMC, kar vpliva na sposobnost hidratacije površine polimera ter seveda z avtokatalizo zaradi produktov hidrolize polimera. Produkt hidrolize izbranih polimerov PLCA je mlečna kislina, ki zaradi

kislega značaja pospešuje nadaljnjo hidrolizo sintetiziranih polimerov. Kopolimer PLCA namreč vsebuje esterske skupine, ki pod vplivom kisline razpadajo hitreje kot v nevtralnem pH-ju. Kinetika hidrolize se spremeni iz ničtega v prvi red. Po štirih tednih tako pride do izraza tudi globinska erozija, ki je zaradi hidrofilnega DLLA zelo verjetna. Pri kopolimerih PLCA, kjer je več TMC, je avtokataliza manj izražena, pa tudi lipofilnost je večja, zato polimer razpada večinoma zaradi površinske erozije.

Po šestih tednih opazimo manjše razlike v razpadnosti PLCA z večjim deležem DLLA kot po štirih. Najverjetneje je razlog v tem, da po tem obdobju intenzivna globinska erozija, ki povzroči predvsem zaradi avtokatalize v kislih pogojih erozijo kopolimerov in s tem skorajšnjo porušitev osnovne strukture. Vidimo, da so v tem času kopolimeri z večinskim deležem DLLA v zmesi skoraj že popolnoma razpadli. Na drugi strani kopolimeri z večinskim deležem TMC skoraj ne kažejo nobene razlike v razpadnosti.

Zanimive rezultate dobimo po dveh in treh mesecih spremljanja razpada polimerov. Kopolimeri PLCA z več DLLA so že skoraj popolnoma razpadli, medtem ko je erozija kopolimer z enakim množinskim deležem obeh monomerov šele nekje pri 50 odstotkih. To lahko utemeljimo z večjo reaktivnostjo TMC v sintezi kopolimerov, večjo površinsko erozijo in manjšo penetracijo topila v polimerni film. Po treh mesecih kopolimer z 20 % množinskim deležem DLLA skoraj nič ne razpade, kar je posledica velike hidrofobnosti, zato majhne penetracije vode in majhne avtokatalize v kislem, ki so posledice manjšega deleža DLLA v kopolimeru.

Poleg omenjenih podatkov so za potek erozije pomembni še nekateri dejavniki, kot so: končna skupina v kopolimeru, geometrija polimera in ponavljajoča zaporedja v kopolimeru, o katerih pa nimamo podatkov. Iz podatkov razpadnosti lahko sklepamo na ponavljajoče zaporedje v kopolimeru. Vidimo, da kopolimeri z večjim deležem DLLA razpadajo bistveno hitreje, tako da prednostno hidrolizirajo kovalentne vezi med dvema laktidoma. Verjetno kopolimeri z velikim deležem DLLA vsebujejo tudi veliko povezav DLLA – DLLA, torej prednostno poteka cepitev esterskih vezi. Kopolimeri z velikim deležem TMC sicer vsebujejo zelo reaktivne karbonatne skupine, ki pa zaradi nizkega deleža DLLA in nekislega produkta razgradnje TMC ne povzročajo avtokatalize, zato razpad poteka počasneje.

Iz vsega tega sledi, da lahko z začetnim razmerjem obeh komponent vplivamo na želen čas biorazgradljivosti, kar je še posebej pomembno pri določenih medicinskih opornih sistemih (vijaki, polimerne plošče in vsadki). Predvsem pri določenih kosteh, katerih celjenje je dolgotrajno, bi lahko z uporabo naših polimerov vplivali k bolj učinkoviti regeneraciji tkiva, saj na začetku aplikacije potrebujemo rigidni sistem, ki bi omogočil dovolj dobro celjenje tkiva, nato pa bi se nadomestil s tkivom. Z mehanskimi merjenji bi lahko določili, kakšna je natezna napetost izdelanih polimerov in s tem primerjali dobljene parametre (natezna napetost in prožnostni modul) z vrednostmi za človeške kosti ter ugotovili, katero začetno razmerje vhodnih spojin omogoča izdelavo optimalnega polimera.

Biorazgradljivost in predvsem njena hitrost pa sta ključna parametra tudi za izdelano nanodostavnih sistemov. Le s primerno kinetiko razpada lahko po eni strani nadziramo sproščanje učinkovine iz ogrodja in izločanje samega dostavnega sistema. Načrtovani in sintetizirani polimeri so zaradi ustrezno izbranih gradnikov zelo varni, saj so produkti razgradnje netoksični, njihov metabolizem in izločanje pa sta znana in potekata po znanih fizioloških poteh. Zaradi ugodnega razpolovnega časa so najbolj verjetni kandidati tako za izdelavo medicinskih pripomočkov kot nanodelcev kopolimeri DLLA:TMC=3:1, 2:1 in 1:1.

Če povzamem, z začetnim razmerjem monomerov lahko vplivamo na vrsto erozije, hitrost avtokatalize, razpolovni čas kopolimera, tip hidroliziranih vezi, ponavljajoča zaporedja monomerov v kopolimeru in kinetiko hidrolize, kar omogoča dobro napoved omenjenih lastnosti.

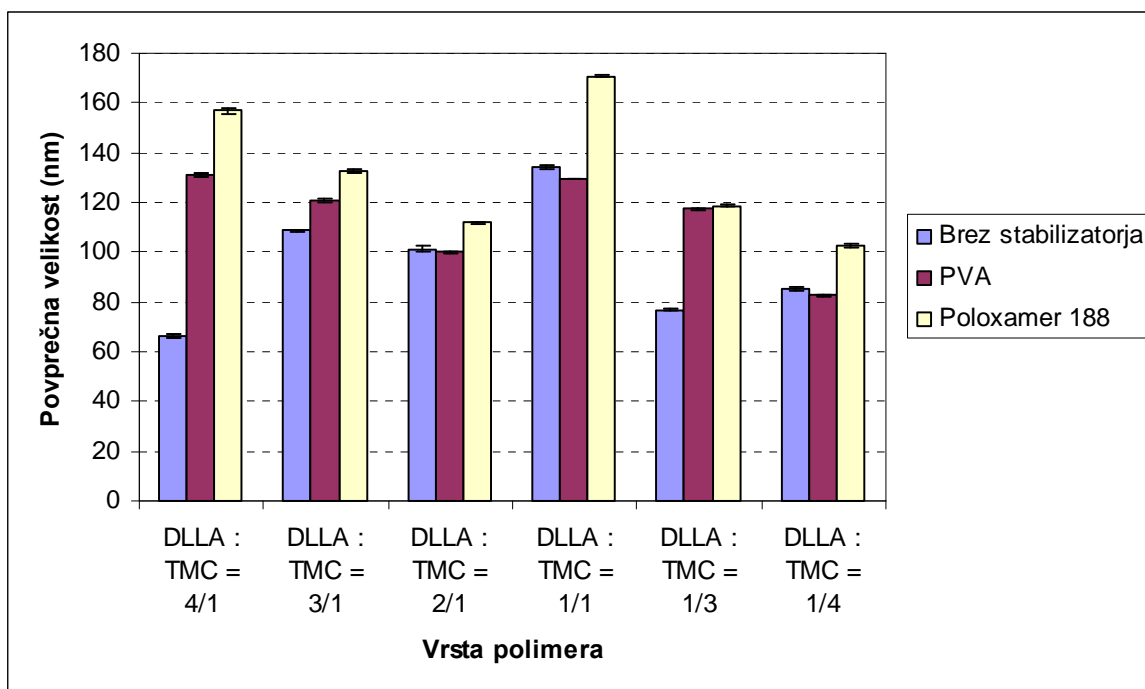
4.5. IZDELAVA NANODELCEV

V nalogi sintetizirani biopolimeri se lahko potencialno uporabljajo tudi za izdelavo nanodostavnih sistemov kot so ND. ND smo izdelali z metodo nanoprecipitacije. Prva naloga je bila izbira ustreznega organskega topila za izdelavo ND, pri čemer smo se izogibali toksičnih topil, kot je denimo tetrahidrofuran (THF). Kot ustrezno organsko topilo smo izbrali aceton, čeprav se izdelani polimeri v njem počasi raztapljajo. Po injiciranju raztopljenega polimera v vodno fazo smo opazili Tyndalov učinek, ki je značilen za koloidne disperzije. Ob stiku disperznega medija (vode) z

raztopino polimera v acetonu je prišlo do hitre difuzije acetona v vodo in posledično do obarjanja polimernih nanodelcev, saj polimer v vodi ni topen. Izdelane disperzije ND smo opazovali še en mesec po izdelavi, pri čemer do vidnih sprememb disperzij ni prišlo.

4.6. VELIKOST NANODELCEV

Na sliki 14 so prikazane velikosti ND v odvisnosti od sestave polimera in od vrste uporabljenega stabilizatorja. Rezultati kažejo, da nastanejo ND že brez uporabe stabilizatorja, in da je njihova velikost manjša kot pri ND, ki smo jih izdelali v prisotnosti stabilizatorja. Poleg tega pa rezultati kažejo, da na velikost delcev vpliva tudi vrsta stabilizatorja, ki smo ga uporabili.



Slika 14: Velikost nanodelcev v odvisnosti od sestave polimera in prisotnosti stabilizatorja.

Velikost ND brez stabilizatorja je v območju 60–135 nm. V prisotnosti stabilizatorja poloksamera 188 smo dobili velikost ND v območju 100–170 nm. Največje ND smo tako kot pri izdelavi ND brez stabilizatorja dobili ponovno pri množinskem razmerju DLLA in TMC 1:1, kar nakazuje, da sestava polimera vpliva na dobljeno velikost ND

neodvisno od uporabe stabilizatorja. S stabilizatorjem PVA so bile velikosti ND v območju 80–140 nm. Največji ND so bili spet pri množinskem razmerju DLLA in TMC 1:1. Vidimo tudi, da je pri uporabi PVA kot stabilizatorja območje porazdelitve velikosti izdelanih ND najožje. V primerjavi ND izdelanih brez in z dvema različnima stabilizatorjema vidimo, da je bila povprečna velikost ND izmerjena takoj po izdelavi, največja v primeru uporabe poloksamera 188 kot stabilizatorja.

Vidimo, da smo največje ND dobili v primeru, ko imamo enako začetno razmerje monomerov. Zanimivo majhna vrednosti je pri ND brez stabilizatorja, kar lahko pojasnimo s prisotnostjo nabitih karboksilnih skupin in s tem nabojem, ki prispeva k elektrostatski stabilizaciji nastalih ND. S stabilizatorjem PVA in brez stabilizatorja smo dobili ND približno enake velikosti. Največjo razliko v velikosti ND opazimo pri razmerju monomerov 4:1 v korist DLLA. Povzamemo lahko, da uporaba stabilizatorja za samo izdelavo ND ni potrebna in je s toksikološkega vidika celo prednostna. Opravili smo tudi meritve velikosti ND dan po izdelavi, ko je iz disperzije izhlapel aceton (priloga 4). Rezultati kažejo, da ni večjih sprememb v velikosti ND v disperziji.

Iz slike 19 vidimo, kako je odvisna velikost izdelanih ND od množinskega deleža TMC v začetni reakcijski zmesi. Največje ND dobimo pri kopolimerih z deležem DLLA 80 % in DLLA 50 %. Velikosti ND iz polimerov z deležema DLLA 75 % in 66 % so zelo podobne, podobne velikosti ND smo dobili tudi iz kopolimerov z deležem DLLA 25 % in 20 %. Večji kot je delež TMC v začetni zmesi, bolj lipofilne lastnosti ima izdelan kopolimer in posledično so tudi izdelani ND bolj lipofilni. V primerih, kjer imamo več DLLA v začetni zmesi, so izdelani ND praviloma večji, ker imamo bolj hidrofilen polimer, ki ima večjo afiniteto do disperznega medija.

Iz priloge 3 in 4 vidimo vrednosti PI za izdelane disperzije ND. PI so za vse disperzije ND manjši od 0,2, kar pomeni ozko porazdelitev velikosti delcev. Najnižje PI smo dobili za disperzije ND, ki smo jih izdelali z uporabo poloksamera 188 kot stabilizatorja, sledijo ND izdelani brez stabilizatorja in največji PI so imele disperzije ND s PVA. Najnižje vrednosti PI (pod 0,1) smo dobili za vse disperzije ND, ki smo jih izdelali iz polimera z razmerjem DLLA in TMC 1:1.

Zaključimo lahko, da razmerje monomerov v polimeru vpliva na velikost izdelanih ND, zato lahko z izbiro ustreznega polimera delno vplivamo na končno velikost in lastnosti

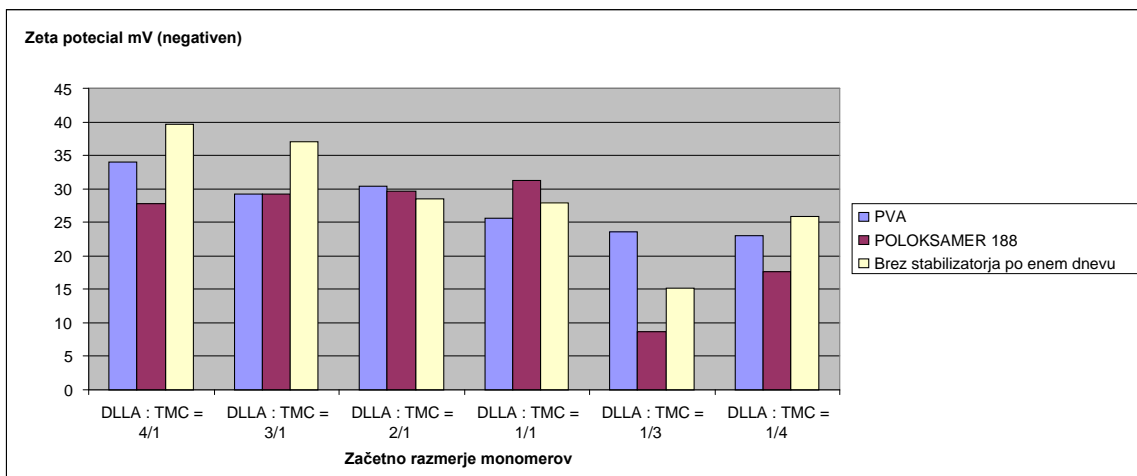
izdelanih ND. Poleg same sestave polimera vpliva na velikost ND tudi stabilizator, ki ga uporabimo za izdelavo ND. Prednost v tej nalogi sintetiziranih polimerov je tudi ta, da omogočajo izdelavo ND že brez prisotnosti stabilizatorja, a bi v nadaljnjih študijah morali ovrednotiti še dolgoročno stabilnost takšnih disperzij ND.

4.7. ZETA POTENCIAL

K stabilnosti ND v disperziji prispeva tudi prisotnost naboja na delcih, ki ga ovrednotimo z merjenjem zeta potenciala ND. Najprej smo izmerili zeta potencial ND takoj po izdelavi (natančne vrednosti v prilogi 3 in 4): brez stabilizatorja, s stabilizatorjem PVA in s stabilizatorjem poloksamerom 188 (slika 15). Rezultati kažejo, da imajo vsi izdelani ND negativni ZP (-25– -40 mV), kar je posledica prisotnih prostih karboksilnih skupin DLLA na površini ND.

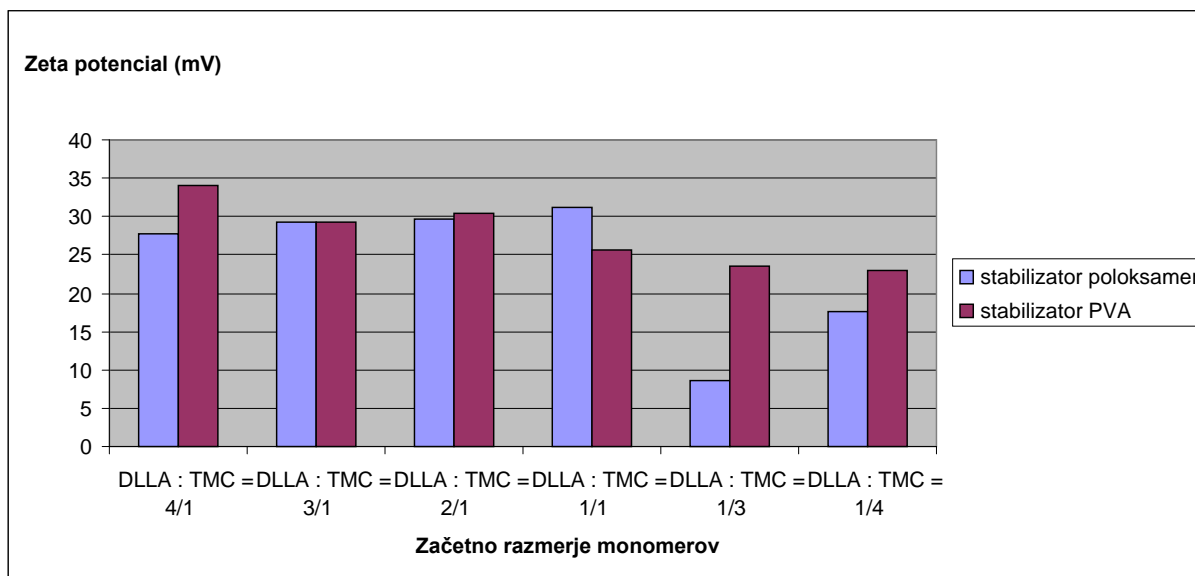
Velike vrednosti ZP nam povejo, da so delci zaradi velikega naboja na površini delcev bolj narazen eden od drugega, kar nam prinese večjo kinetično stabilizacijo ND. Velike vrednosti ZP so zaželene, zato velikokrat hočemo povečati naboj delcem in s tem njihovo stabilnost. Najlažji način povečanja ZP je večji naboj delcev, ki ga najlažje dosežemo z ustrežno koncentracijo delcev ali pa zamenjavo dvovalentnih ionov za enovalentne. Pri ND za povečanje naboja na površini pogosto uporabljamo stabilizatorje.

Največjo absolutno vrednost zeta potenciala imajo ND, ki smo jih izdelali brez stabilizatorja. Molekule stabilizatorja, ki so nenabite, se adsorbirajo na površino ND, kar zmanjša negativni naboj na površini delcev. Pri uporabi stabilizatorja PVA imajo ND večji zeta potencial kot pri poloksameru 188. Zaradi relativno velikih absolutnih vrednosti ZP pri ND brez stabilizatorja lahko sklepamo, da uporaba stabilizatorja za fizikalno stabilnost izdelane disperzije ND ni potrebna. .



Slika 15: Zeta potencial ND v odvisnosti od sestave polimera in prisotnosti stabilizatorja takoj po izdelavi.

Primerjali smo tudi ZP pet dni po izdelavi ND (slika 16) in ugotovili, da se vrednosti ne razlikujejo glede na vrsto stabilizatorja, ki smo ga uporabili. Vidimo tudi, da se ZP v primerjavi z meritvijo takoj po izdelavi nanodelcev skoraj ni spremenil.



Slika 16: Zeta potencial ND v odvisnosti od sestave polimera in prisotnosti stabilizatorja pet dni po izdelavi.

Zaključimo lahko, da smo izdelali polimerne ND, ki imajo na površini dokaj visoko absolutno vrednost zeta potenciala, ki se v času petih dni ni bistveno spremenila. Zeta potencial je negativen zaradi prisotnih negativno nabitih karboksilnih skupin naših kopolimerov. Izdelani ND so zato primerni kandidati kot nosilni sistemi za pozitivno

M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev

nabite lipofilne učinkovine, saj bodo v takšnem sistemu med nosilcem in učinkovino najbolj izrazite.

Naših ND v literaturi nismo zasledili. Iz tega sledi, da smo izdelali nove nanodelce in s tem pripomogli k razvoju nanodelcev.

5. SKLEP

Nove kopolimere PLCA smo sintetizirali s koordinativno polimerizacijo z odprtjem obroča s katalizatorjem kositrovim(II) 2-etilheksanoatom. Najprej smo sintetizirali trimetilenkarbonat in z NMR metodo identificirali spojino. Kopolimer smo tudi uspešno pegilirali. Pri sintezi kopolimerov smo dobili dobre izkoristke v razponu od 77 % do 98 %, kar nam omogoča sintezo večje količine kopolimerov. Pri sintezi kopolimerov smo ugotovili ustrezen mehanizem ravnice, pri čemer je prva stopnja aktivacija molekule trimetilenkarbonata (TMC).

Z NMR tehniko smo uspešno določili razmerje osnovnih komponent v kopolimeru po reakciji, iz česar smo ugotovili, da je monomer TMC bolj reaktivna spojina kot DLLA. Prav tako smo iz NMR spektrov videli, da smo dobili čiste spojine, saj dodatnih vrhov v spektrih nismo opazili. Z DSC tehniko smo določili temperaturo steklastega prehoda za naše kopolimere. Ugotovili smo, da se Tg viša z večanjem deleža DLLA v kopolimeru.

Trimesečni test spremljanja razpada polimerov v *in vitro* pogojih je pokazal, da se na podlagi kemijskih in fizikalnih lastnosti kopolimera dobro napovedati obnašanje polimera. Ugotovili smo, da hidrofobnost kopolimerov raste z manjšim deležem laktida v zmesi, ter da polimeri z večjo vsebnostjo TMC kot laktida kažejo predvsem površinsko erozijo, medtem ko je pri kopolimerih z večjim deležem DLLA bolj intenzivna globinska erozija. Površinska erozija prevladuje pri kopolimerih, kjer je več ali enako trimetilenkarbonata kot laktida. Ugotavljali smo tudi kinetiko razpada in ugotovili, da po štirih tednih sledi sprememba kinetike razpada iz ničtega v prvi red, zaradi avtokatalize kot posledice razpadnih kislih produktov.

Z izbranim polimerom smo z metodo nanoprecipitacije uspešno izdelali tudi nanodelce in jih ovrednotili. Povprečna velikost ND je bila od 60 do 170 nm in zeta potencial -9 do -40 mV, odvisno od sestave tj. množinskega razmerja monomerov v polimerni verigi in uporabe stabilizatorja. Porazdelitev velikosti ND je bila relativno ozka, kar nakazujejo vrednosti P_i , ki so bile v vseh primerih manjše od 0,15. Ugotovili smo, da uporaba stabilizatorja bistveno ne vpliva na velikost in kratkotrajno stabilnost izdelanih ND, ima pa vpliv na zeta potencial. Ugotovili smo, da prisotnost stabilizatorja ni bistvena za nastanek ND in da dobimo najmanjše ND iz polimera z razmerjem monomerov DLLA

M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev

in TMC 1:1. Zaključimo lahko, da so v nalogi sintetizirani kopolimeri DLLA in MTC, katerih lastnosti so odvisne od razmerja monomerov v polimerni verigi, primeren izhodni material za izdelavo biorazgradljivih polimernih nanodelcev.

6. VIRI

- 1) Qiu L K, Bae Y H. Polymer architecture and drug delivery. *Pharm. Res.* 2006; **23**: 1–30.
- 2) Dailey L A, Wittmar M, Kissel T. The role of branched polyesters and their modifications in the development of modern drug delivery vehicles. *J. Controlled Release* 2005; **101**: 137–149.
- 3) Breitenbach A, Jung T, Kamm W, Kissel T. Biodegradable comb polyesters containing polyelectrolyte backbones facilitate the preparation of nanoparticles with defined surface structure and bioadhesive properties. *Polym. Adv. Technol.* 2002; **13**: 938–950.
- 4) Tormala P, Pohjonen T, Rokkanen P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proc Instn Mech Engrs* 1996: 101–111.
- 5) Kladnik R. Visokošolska fizika, Mehanski in toplotni pojavi. *DZS* 1985; **6**: 126–148.
- 6) Strnad J. Fizika 1 del, poglavje mehanika 1977: 1–284.
- 7) Vainionpaa S, Rokkanen P, Tormala P. Surgical applications of biodegradable polymers in human tissues. *Prog. Polymer. Sci.* 1989; **14**: 679–716.
- 8) Kelley B S, Dunn R L, Jackson T E, Potter A G, Ellis D N. Assessments of strength loss in biodegradable composites: Transactions of the Third World Biomaterials Congress, Kyoto, Japan 1998: 471.
- 9) Tormala P. Ultra-high strength, self-reinforced absorbable polymeric composites for applications in different disciplines of surgery. *Clin. Mater.* 1993; **13**: 35–40.
- 10) Stone J L, Beaupre G S, Hayes W C. Multiaxial strength characteristic of trabecular bone. *J. Biomechanics* 1983; **16**: 743–752.
- 11) Tormala P, Pohjonen T, Rokkanen P. Bio-absorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proc. Instn. Mech. Engrs* 1998; **212**: 101–111.
- 12) Jurgens C, Porte T, Wolter D, Schmidt H G, Kricheldorf H R, Kreiser Saunders I. Development and characterization of absorbable temporary wound dressing. *Unfallchirurg* 1995; **98**: 233–240.
- 13) Jurgens C, Wolter D, Kricheldorf H R, Kortmann H. Development of a resorbable temporary skin replacement for large surface burn wounds. *Langenback Arch. Chir.* 1991; **91**: 611–616.
- 14) Heller J. Development of poly(ortoesters), a historical overview. *Biomaterials* 1990; **11**: 659–665.
- 15) Tipton J A, Middleton J C. Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices. *Medical Plastics and Biomaterials Magazine* 1998: 1–9.
- 16) Daniels A U, Chang M K O, Adriano K P. Mechanical Properties of Biodegradable Polymers and Compounds Proposed for Internal Fixation of Bone. *J Appl Biomaterials* 1990; **1**: 57–78.
- 17) Tormala P. Biodegradable Self-Reinforced Composite Materials; Manufacturing Structure and Mechanical Properties. *Clinical Materials* 1992; **10**: 29–34.
- 18) Schmitt E E, Polistina R A. Surgical sutures 1954; US. Pat. 2,676,945, (1954).
- 19) Yasuda H, Katsuhiko Y, Nakayama Y, Tsutsumi C, Lecomte P, Jerome R, McCarty S, Kaplan D. Comparison of Sm complexes with Sn compounds for syntheses of copolymers composed of lactide and caprolactone and their biodegradabilities. *Reactive & Functional Polymers* 2004; **61**: 277–292.

M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev

- 20) Tamura H, Jayakumar R. Synthesis, characterization and thermal properties of chitin-g-poly(caprolactone) copolymers by using chitin gel. *International Journal of Biological Macromolecules* 2007; **21**: 2185–2190.
- 21) Wang X Y, Liao K R, Quan D P, Wu Q. Bulk ring-opening polymerization of lactides initiated by ferric alkoxides. *Macromolecules* 2005; **38**: 4611–4617.
- 22) Kenley R A, Lee M O, Mahoney T R, Sanders L M. Poly(lactide-co-glycolide) decomposition kinetics in vivo and in vitro. *Macromolecules* 1987; **20**: 2398–2403.
- 23) Bauer K, Froemming K, Fuehrer C. *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie* 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1999: 354.
- 24) Kruter J., Swarbrick J, Boylan J C, Dekker M. Nanoparticles. *Encyclopedia of pharmaceutical technology* 1993; **vol. 10**: 165–190.
- 25) Qiu L K, Bae Y H. Polymer architecture and drug delivery. *Pharm. Res.* 2006; **23**: 1–30.
- 26) Dailey L A, Wittmar M, Kissel T J. The role of branched polyesters and their modifications in the development of modern drug delivery vehicles. *J. Controlled Release* 2005; **101**: 137–149.
- 27) Tamber H, Johansen P, Merkle H. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; **57**: 357–376.
- 28) Jain R A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000; **21**: 2475–2490.
- 29) Kristl J, Allémann E, Gurny R. Formulation and evaluation of zinc-phthalocyanine loaded poly(D, L-lactic acid) nanoparticles. *Acta pharm (Zagreb)* 1996; **46 (1)**: 1–12.
- 30) Bilati U, Allémann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur J Pharm Sci* 2005; **24**: 67–75.
- 31) Bala I, Hariharan S, Kumar R. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2004; **21**: 387–422.
- 32) Jie C, Zhu K J. Preparation, Characterization and Biodegradable Characteristics of Poly(D,L-lactide-co-1,3-trimethylene carbonate). *Polymer International* 1997; **42**: 373–379.
- 33) Paula Pego A, Poot A, Grijpma W, Feijen J. Physical properties of high molecular weight 1,3-trimethylene carbonate and D,L-lactide copolymers. *Journal of material science, Material in medicine* 2003; **14**: 767–768.
- 34) Wang X, Xie X, Cuifang C, Rytting E, Steele T, Kissel T. Biodegradable Branched Polyesters Poly(vinyl sulfonate-covinylalcohol)-graft Poly(d,l-lactic-coglycolic acid) as a Negatively Charged Polyelectrolyte Platform for Drug Delivery: Synthesis and Characterization: *Macromolecules* 2009; **41**: 2791-2799.
- 35) Kricheldorf H R, Syntheses and application of polylactides: *Chemosphere* 2001; **43**: 49–54.
- 36) Skoog, Douglas A F, Holler J, Nieman T. *Principles of Instrumental Analysis* (5 ed.). New York 1998: 805–808.

9. PRILOGE



Priloga 1: Slika zataljene ampule po končani sintezi kopolimera.



Priloga 2: Aparatura za sintezo TMC.

PRILOGA 3: ZDRUŽENI PODATKI MERITEV (ZETA POTENCIAL, INDEKS POLIDISPERZNOSTI IN VELIKOST) ZA NANODELCE. VSE MERITVE TAKOJ PO IZDELAVI NANODELCEV PRI RAZLIČNIH PRIPRAVAH NANODELCEV: BREZ STABILIZATORJA, PVA STABILIZATOR IN POLOXAMER 188 STABILIZATOR.

VSE MERITVE TAKOJ PO IZDELAVI NANODELCEV	BREZ STABILIZATORJA	BREZ STABILIZATORJA	BREZ STABILIZATORJA	PVA STABILIZATOR	PVA STABILIZATOR	PVA STABILIZATOR	POLOXAMER 188 STABILIZATOR	POLOXAMER 188 STABILIZATOR	POLOXAMER 188 STABILIZATOR
Začetno množinsko razmerje monomerov v polimeru DLLA : TMC	Povprečna velikost delcev (nm)	Pi vrednost nanodelcev	ZETA potencial mV	Povprečna velikost delcev (nm)	Pi vrednost nanodelcev	ZETA potencial mV	Povprečna velikost delcev (nm)	Pi vrednost nanodelcev	ZETA potencial mV
DLLA : TMC = 4/1	66,44 ± 0,69	0,117 ± 0,0150	- 39,6 ± 6,4	131 ± 0,9074	0,0810 ± 0,120	- 23,0 ± 0,900	156,9 ± 1,136	0,0630 ± 0,00800	- 17,6 ± 3,10
DLLA : TMC = 3/1	108,8 ± 0,30	0,124 ± 0,00800	- 37,1 ± 0,6	120,8 ± 0,7572	0,131 ± 0,00600	- 29,3 ± 2,00	132,5 ± 0,9292	0,103 ± 0,00600	- 29,3 ± 3,00
DLLA : TMC = 2/1	101,3 ± 1,012	0,0950 ± 0,0240	- 28,5 ± 2,00	100,1 ± 0,4703	0,122 ± 0,0150	- 30,4 ± 2,30	112,0 ± 0,3512	0,0830 ± 0,0190	- 29,7 ± 10,1
DLLA : TMC = 1/1	134,5 ± 0,8623	0,0970 ± 0,00700	- 27,9 ± 1,30	129,5 ± 0,1000	0,078 ± 0,00400	- 25,6 ± 6,40	170,9 ± 0,3000	0,0740 ± 0,0100	- 31,2 ± 1,70
DLLA : TMC = 1/3	76,95 ± 0,6841	0,0630 ± 0,0180	- 15,2 ± 0,700	117,4 ± 0,5568	0,138 ± 0,0120	- 23,6 ± 0,600	118,6 ± 0,5132	0,0810 ± 0,0180	- 8,70 ± 2,20
DLLA : TMC = 1/4	85,04 ± 0,6180	0,112 ± 0,0200	- 25,9 ± 1,60	82,62 ± 0,6634	0,146 ± 0,00900	- 34,0 ± 1,10	102,7 ± 0,6429	0,131 ± 0,00500	- 27,8 ± 2,30

M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev

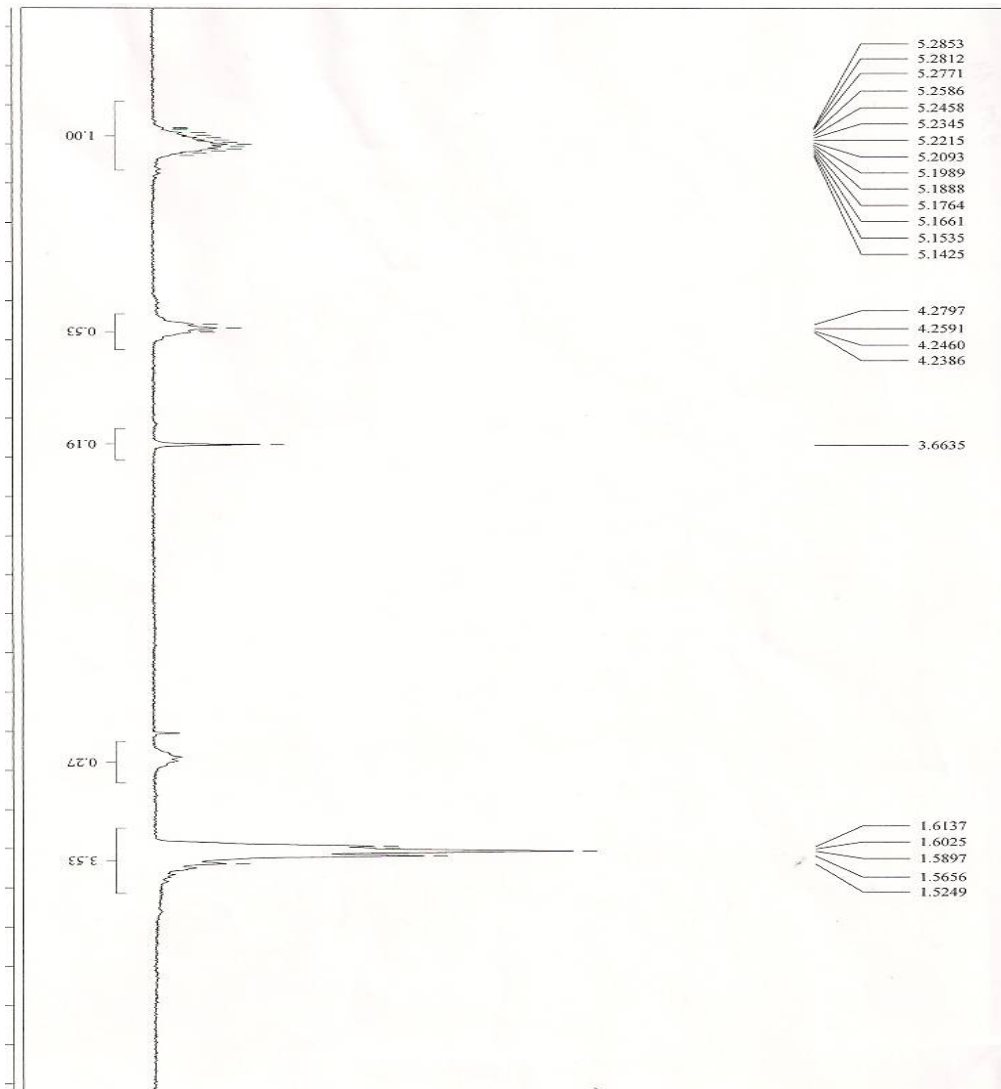
VSE MERITVE DAN PO IZDELAVI NANODELCEV	BREZ STABILIZATORJA	BREZ STABILIZATORJA	STABILIZATOR PVA	STABILIZATOR PVA	STABILIZATOR POLOXAMER 188	STABILIZATOR POLOXAMER 188
Začetno množinsko razmerje monomerov v polimeru DLLA: TMC	Povprečna velikost delcev (nm)	PI	Povprečna velikost delcev (nm)	PI	Povprečna velikost delcev (nm)	
DLLA : TMC = 4/1	60,94 ± 0,3904	0,114 ± 0,0120	125,8 ± 1,097	0,0520 ± 0,0170	146,6 ± 0,6807	0,0490 ± 0,0260
DLLA : TMC = 3/1	101,1 ± 0,5500	0,0465 ± 0,0	114,4 ± 0,5686	0,147 ± 0,0130	125,7 ± 0,2517	0,0940 ± 0,00500
DLLA : TMC = 2/1	91,44 ± 0,4652	0,0940 ± 0,00400	94,76 ± 0,7539	0,112 ± 0,00800	103,7 ± 0,4163	0,103 ± 0,0100
DLLA : TMC = 1/1	120,6 ± 0,3055	0,0940 ± 0,00500	123,2 ± 1,137	0,0850 ± 0,0170	159,3 ± 1,193	0,0620 ± 0,0200
DLLA : TMC = 1/3	92,71 ± 0,4190	0,134 ± 0,00400	114,9 ± 0,7539	0,147 ± 0,0170	111,9 ± 0,3786	0,0690 ± 0,0110
DLLA : TMC = 1/4	81,27 ± 0,3600	0,107 ± 0,0160	98,15 ± 0,8533	0,110 ± 0,0170	96,35 ± 0,2404	0,127 ± 0,0110

PRILOGA 4: ZDRUŽENI PODATKI MERITEV (INDEKS POLIDISPERZNOSTI IN VELIKOST) ZA NANODELCE. VSE MERITVE DAN PO IZDELAVI NANODELCEV PRI RAZLIČNIH PRIPRAVAH NANODELCEV: BREZ STABILIZATORJA, PVA STABILIZATOR IN POLOXAMER 188 STABILIZATOR.

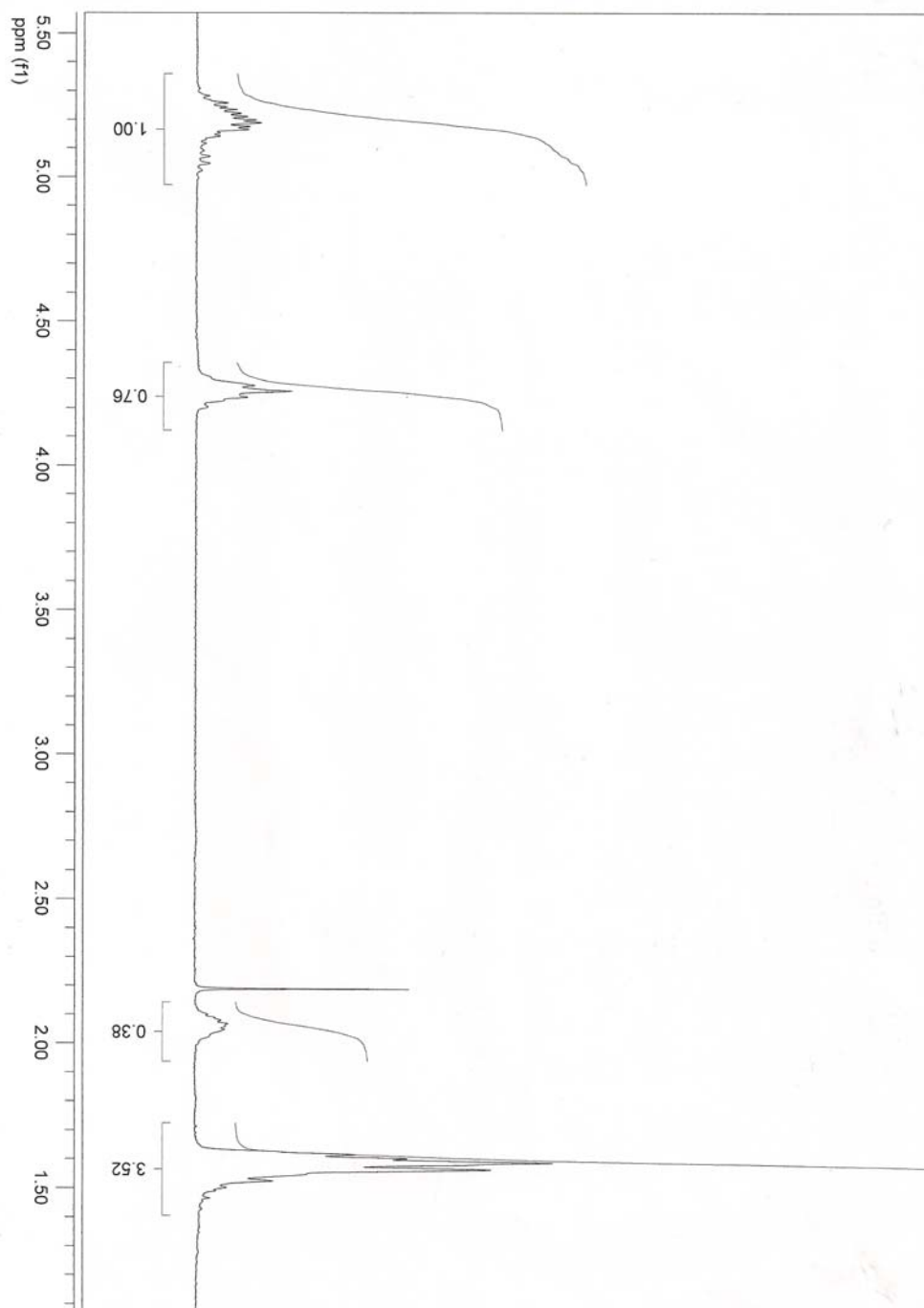
M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev

PRILOGA 5: ZDRUŽENI REZULTATI TESTA RAZPADNOSTI KOPOLIMEROV. REZULTATI PODANI KOT ODSOTOK ZAČETNE MASE POLIMERA, KI RAZPADE PO ČASOVNIH INTERVALIH (2 TEDNA, 1 MESEC, 6 TEDNOV, 2 MESECA IN 3 MESECI). SPODAJ NAVEDENE RELATIVNE STANDARDNE DEVIACIJE (RSD) ZA REZULTATE TESTA.

Začetno množinsko razmerje monomerov v polimeru	Odstotek začetne mase, ki razpade				
	14 dni	en mesec	6 tednov	2 meseca	3 meseca
DLLA: TMC					
DLLA : TMC = 4/1	4,23	58,76	88,1	90,93	95,97
DLLA : TMC = 3/1	20,27	72,29	91,12	96,31	98,68
DLLA : TMC = 2/1	34,07	45,5	73,5	81,94	91,63
DLLA : TMC = 1/1	22,89	25,38	34,23	34,76	54,35
DLLA : TMC = 1/3	20,5	24,12	24,43	28,59	30,43
DLLA : TMC = 1/4	5,6	6,51	8,06	9,56	14,2

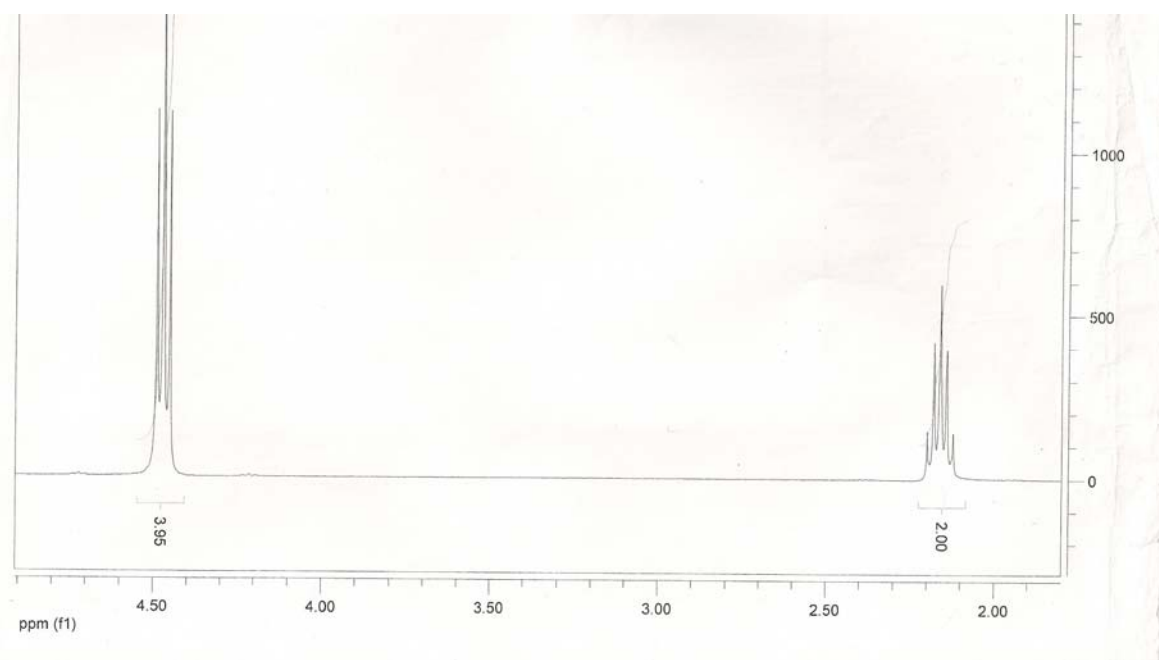


Priloga 6: NMR spekter pegiliranega kopolimera PLCA.

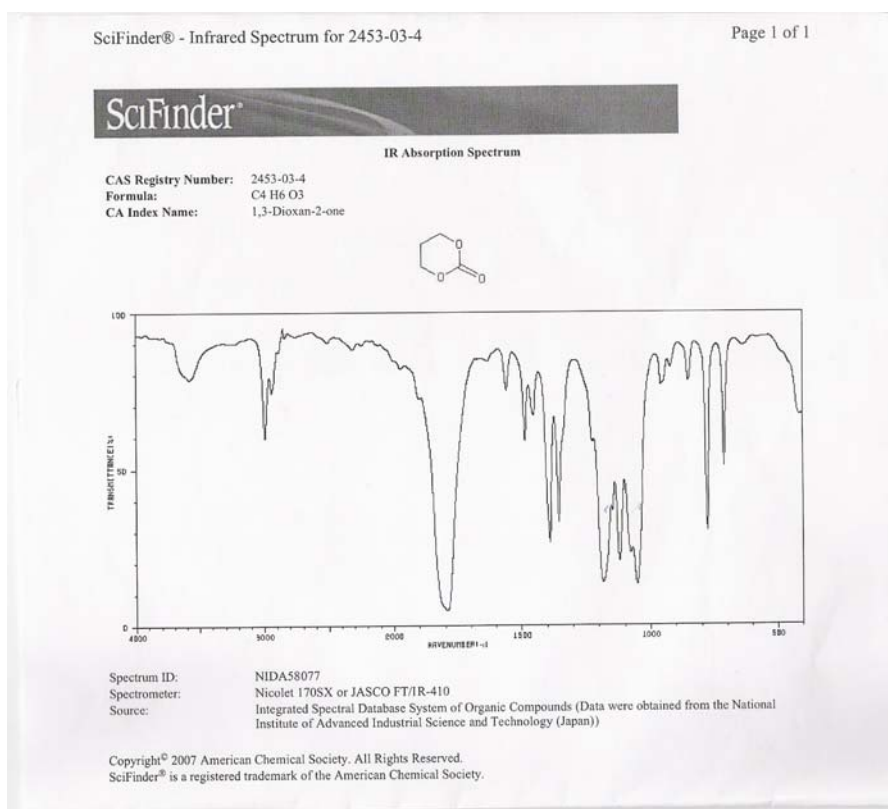


Slika 7: NMR spekter kopolimera PLCA.


M. Štuhec: Sinteza in karakterizacija novih biorazgradljivih kopolimerov iz trimetilenkarbonata in D,L – laktida ter možnost izdelave nanodelcev



Slika 8: NMR spekter trimetilenkarbonata.



Priloga 9: IR spekter TMC spojine v referenčni literaturi.



Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF BIODEGRADABLE COPOLYMERS BASED ON LACTIC ACID AND TRIMETHYLEN CARBONATE FOR FORMULATION OF SLOWLY DEGRADING NANOPARTICLES

P. Kocbek, M. Štuhec, M. Pavli, A. Obreza, J. Kristl, S. Baumgartner
University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Ljubljana, Slovenia

Introduction

During the past two decades significant advances have been made in the development of biodegradable polymeric materials for medical applications. Among them, polylactic (PLA) acid is the most frequently used material, since it is biocompatible, bioabsorbable and degradation products are non-toxic. Numerous copolymers containing LA have already been established, the most known are copolymers with glycolic acid (PLGA) (1,2). However, LA has been previously copolymerized also with trimethylenecarbonate (TMC) resulting in co-polymers with characteristics similar to PLGA. However, incorporation of TMC units increases the stability and decreased the degradation rate due to higher polymer surface hydrophobicity. Such materials are mostly used for preparation of different implants especially for surgical application, but they may also be used in drug delivery (3). The aim of our work was to synthesize polymers with various ratios between DLLA and TMC to achieve polymers with different characteristic for nanoparticle engineering.

Results

Synthesis of polymers

The synthesis of polymers presented in this research (Fig. 1) can be described as ring opening polymerization. Selection of catalyst was crucial to prevent other side reactions.

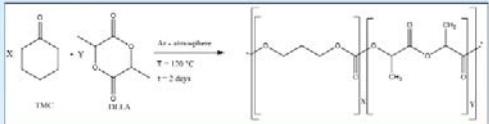


Figure 1: Scheme of synthesis of biodegradable polymers.

Characterization of polymers

Six polymers differing in ratio between TMC and DLLA were synthesized. NMR characterization showed good correlation between theoretical and experimental TMC/DLLA ratio, confirming the expected compositions of polymers (Table 1).

Table 1: Theoretical versus NMR determined molar ratio between DLLA and TMC monomers in synthesized polymers and the yield of polymer synthesis.

Sample name and theoretical molar ratio	NMR determined molar ratio	The yield of synthesis (%)
(DLLA/TMC) 4/1	3.60 / 1.00	86.3
(DLLA/TMC) 3/1	2.66 / 1.00	72.2
(DLLA/TMC) 2/1	2.16 / 1.00	77.1
(DLLA/TMC) 1/1	0.98 / 1.00	84.5
(DLLA/TMC) 1/3	1.00 / 2.93	75.0
(DLLA/TMC) 1/4	1.00 / 4.91	97.6

These results were supported by DSC measurements where T_g is shifted towards higher temperatures with increasing amount of DLLA in polymer (Fig. 2).

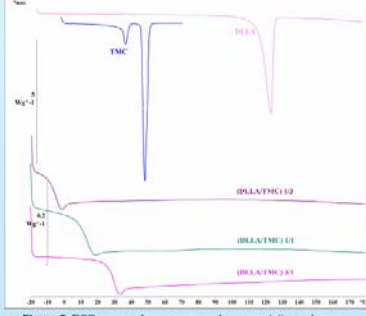


Figure 2: DSC curves of monomers and representative polymers.

Degradation behavior of polymers

Degradation studies demonstrated that increasing amount of TMC in polymer chain decreased the degradation rate of polymer (Fig. 3). These observation is of great importance when choosing a suitable polymer for drug delivery applications, since, degradation rate of polymeric matrix often affects drug release kinetics from delivery system.

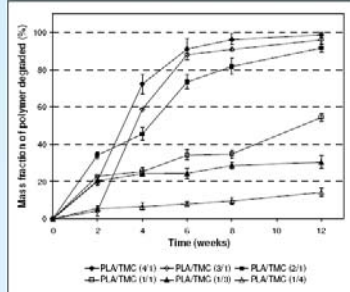


Figure 3: *In vitro* degradation profiles of polymers in aqueous environment.

As potential candidates for various drug delivery applications, these novel polymers were used in nanoparticle formulation experiments. The results indicated successful formation of nanosized particles (55–125 nm) with zeta potential 15–40 mV.

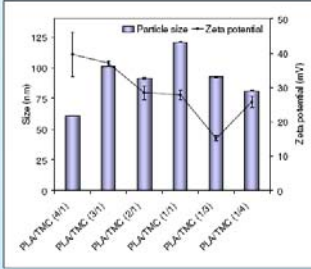


Figure 4: Particle size and zeta potential of formulated nanoparticles.

Conclusions

- Successful synthesis and characterization of new slowly degrading biodegradable polymers as materials for drug delivery applications.
- Preparation of polymeric nanoparticles from synthesized polymers as a promising delivery system in diagnostics and therapy.

References:

- 1 Majota A, Vaniopola S, et al. Clin Orthop. 268: 260–269, 1991
- 2 Zhu, K. J., Hendra, R. W., Jensen, K., Pitt, C. G. Macromolecules, 24 (1991) p. 1726.
- 3 Wang, X. Y., Liao, K. R., Guan, D. P., Wu, Q. Macromolecules, 28 (2005) 4611–4617.
- 4 Chowdhry, J.S., Amiji, M.M. Int. J. Pharm., 2002, 249(1–2), 127–136.

