

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

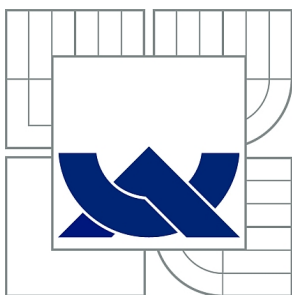
VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH TECHNIK NA BÁZI PLYNOVÉ A KAPALINOVÉ
CHROMATOGRAFIE S RŮZNÝM TYPEM DETEKTORŮ PRO
STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK A VYBRANÝCH
XENOBIOTIK

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

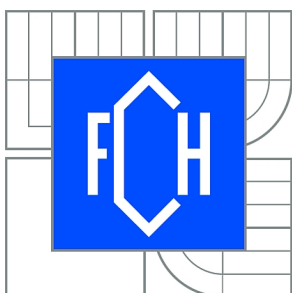
Ing. LUDMILA MRAVCOVÁ

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

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

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

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. LUDMILA MRAVCOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2011



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

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce: **FCH-DIZ0032/2010** Akademický rok: **2010/2011**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Ing. Ludmila Mravcová**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (P2805)
Studijní obor: Chemie životního prostředí (2805V003)
Vedoucí práce **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**
Konzultanti:

Název dizertační práce:

Využití separačních technik na bázi plynové a kapalinové chromatografie s různým typem detektorů pro stanovení biologicky aktivních látek a vybraných xenobiotik

Zadání dizertační práce:

- zpracovat literární rešerši k dané problematice
- výběr, modifikace a optimalizace používaných analytických metod
- zhodnocení průběhu degradace vybraných syntetických biopolymerů aplikovaných v lékařství a ve farmacii
- zhodnocení kontaminace salámu "Poličan" polycyklickými aromatickými uhlovodíky

Termín odevzdání dizertační práce: 10.1.2011

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

Ing. Ludmila Mravcová
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2004

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

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

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

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

KLÍČOVÁ SLOVA

biodegradovatelné polymery, kyseliny glykolové, kyselina mléčná
PAU, salám, dvojdimenzionální plynová chromatografie, TOF-MS

ABSTRACT

This work deals with the using and application of separation techniques for analysis of polymers degradation and polycyclic aromatic hydrocarbons. Thereby this work is separated to two special parts.

In the first part, the degradation properties of synthetic biopolymers based on lactic acid, glycolic acid and poly(ethyleneglycol) PLGA-PEG-PLGA and ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA (modified by itaconic acid) were studied. These copolymers (firstly their thermosensitive hydrogels) should be used for therapy of fractures in orthopedy (as adhesives). Therefore, the sol-gel and gel-sol phase diagrams were determined for selected samples of copolymers. The samples forming gel at 37 °C was used for other study. Polymer samples were degraded in phosphate buffer at 37°C. The degradation process of physical hydrogels was described by the decrease of molecular weight and the increase of concentration lactic acid and glycolic acid in phosphate buffer. The obtained results confirmed that the degradation of polymer modified by itaconic acid is faster process than no modified polymer and polymers with lower ratio PLGA/PEG degrade also faster than lower ratio PLGA/PEG. The influence of pH it was also tested. The rate of degradation of polymers was follow pH 4,0 < pH 7,4 and pH 9,0. The differences of degradation rate were observed between various rates PLGA/PEG.

In the second part, the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in the samples of salami Poličan from company KMOTR, spol. s r.o. was studied. Two dimensional gas chromatography with mass detection (GC × GC–TOF-MS) was chosen as a suitable analytical method. The salami samples were collected in a different technological phases of their production, four samplings were made during five weeks, it means the sum were 120 samples. The content of PAH was compared with actual legislative. The analysis of samples confirmed that limit for BaP wasn't exceeded in all samples. Fenanthren was identified in the highest concentration (up 2,7 µg·kg⁻¹). The content of PAH allows assess the technology of production. The type smoking chambers were compared and the influence of type of smoking chambers on the PAH concentration were also study.

KEYWORDS

biodegradable polymers, glycolic acid, lactic acid
PAH, salami, two dimensional gas chromatography, TOF-MS

MRAVCOVÁ, L. *Využití separačních technik na bázi plynové a kapalinové chromatografie s různým typem detektorů pro stanovení biologicky aktivních látek a vybraných xenobiotik*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 150 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svojí vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za ceněné rady, velkou pomoc během celého mého studia a za neutuchající optimismus a vytrvalost. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Josefu Čáslavskému za velmi užitečné rady při práci v analytické laboratoři. Ing. Lucy Vojtové, Ph.D. a Ing. Lence Michlovské a Bc. Janě Oborné děkuji za přípravu vzorků a pomoc v nouzi.

Mé díky si zaslouží i všichni kolegové, studenti, laborantky a další zaměstnanci naší fakulty (za 7 let jich bylo opravdu spoustu, proto nebudu všechny vyjmenovávat), kteří mně pomohli během laboratorní činnosti a při nabírání potřebných sil k další práci.

V neposlední řadě chci také poděkovat svému manželovi Filipovi za trpělivost, pomoc a nekonečnou podporu. Děkuji také celé své rodině a kamarádům, že ještě věřili a podpořili mě.

I. STUDIUM DEGRADACE SYNTETICKÉHO BIOKOMPATIBILNÍHO KOPOLYMERU

1 OBSAH

1	OBSAH	7
2	ÚVOD	10
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	PŘÍRODNÍ BIODEGRADOVATELNÉ POLYMERY	11
3.1.1	<i>Kolagen</i>	11
3.1.1.1	<i>Želatina</i>	11
3.1.2	<i>Chitin a chitosan</i>	12
3.1.3	<i>Škrob</i>	12
3.1.4	<i>Celulosa</i>	12
3.2	SYNTECKÉ BIODEGRADOVATELNÉ POLYMERY	12
3.2.1	<i>Polyestery</i>	13
3.2.2	<i>Polyanhydridy</i>	13
3.2.3	<i>Polyuretany</i>	13
3.2.4	<i>Polyorthoestery</i>	13
3.2.5	<i>Poly(ethylenglykol)</i>	13
3.3	VLASTNOSTI, BIODPATIBILITA A TOXICITA	14
3.3.1	<i>Kyselina mléčná</i>	14
3.3.2	<i>Kyselina glykolová</i>	14
3.3.3	<i>Ethylenglykol</i>	15
3.4	BIODEGRADACE POLYMERŮ.....	15
3.4.1	<i>Degradace poly(mléčné kyseliny) (PLA)</i>	15
3.4.2	<i>Degradace poly(glykolové kyseliny) (PGA)</i>	16
3.4.3	<i>Degradace poly(ethylenglykolu)</i>	17
3.4.4	<i>Degradace kopolymeru PLGA</i>	17
3.4.5	<i>Příprava</i>	17
3.4.6	<i>Velikost a tvar</i>	17
3.4.7	<i>Teplota a pH</i>	18
3.4.8	<i>Autokatalýza</i>	18
3.4.9	<i>Délka vznikajících řetězců</i>	18
3.4.10	<i>Vnitřní vlastnosti polymeru</i>	19
3.5	POLYMERNÍ GELY, HYDROGELY	19
3.6	POUŽITÍ HYDROGELŮ	19
3.7	VODA V HYDROGELECH	20
3.7.1	<i>Rovnovážná teorie botnání</i>	20
3.7.2	<i>Dynamika botnání</i>	21
3.7.3	<i>Popis botnání</i>	21
3.8	HYDROGELY REAGUJÍCÍ NA VNĚJŠÍ PODNĚTY	21
3.8.1	<i>pH-citlivé hydrogely</i>	22
3.8.1.1	Kopolymery s kyselinou itakonovou.....	22
3.8.2	<i>Světlo-citlivé hydrogely</i>	23
3.8.3	<i>Elektro-citlivé hydrogely</i>	23
3.8.4	<i>Specifické ion-citlivé hydrogely</i>	23
3.8.5	<i>Teplotně-citlivé hydrogely</i>	24
3.8.5.1	Triblokový kopolymer PEG-PLGA-PEG.....	25

3.8.5.2	Triblokový kopolymer PLGA-PEG-PLGA.....	26
3.8.5.3	Mechanismus gelovatění.....	26
3.8.5.4	Fázový diagram.....	28
3.9	ANALÝZA DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ.....	30
3.9.1	HPLC.....	30
3.9.1.1	Reverzní fáze a použití pufrů v mobilní fázi.....	30
3.9.1.2	Ion-párová chromatografie.....	30
3.9.1.3	Derivatizace.....	31
3.10	GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE.....	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
4.1	SYNTÉZA KOPOLYMERU PLGA-PEG-PLGA A ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA.....	33
4.2	SEZNAM TESTOVANÝCH POLYMERŮ.....	34
4.3	PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ, SOFTWARE.....	35
4.3.1	Příprava vzorků.....	35
4.3.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	35
4.3.3	Gelová permeační chromatografie.....	35
4.3.4	Software pro zpracování a prezentaci dat.....	35
4.4	POUŽÍVANÉ CHEMIKÁLIE A STANDARDY.....	36
4.4.1	Chemikálie.....	36
4.4.2	Standardy.....	36
4.5	STANOVOVANÉ ANALYTY A JEJICH VLASTNOSTI.....	36
4.5.1	Kyselina mléčná.....	36
4.5.2	Kyselina glykolová.....	36
4.6	PŘÍPRAVA A DEGRADACE VZORKŮ.....	36
4.6.1	Stanovení kritické koncentrace gelu a kritické teploty gelu, sestavení sol-gel diagramu (inverzní vialková metoda).....	37
4.6.2	Degradace vzorků.....	37
4.6.3	Identifikace a kvantifikace degradačních produktů pomocí HPLC.....	37
4.6.3.1	Standardy.....	37
4.6.3.2	Nastavení HPLC.....	38
4.6.4	Analýza molekulové hmotnosti degradovaného polymeru.....	38
4.6.4.1	Nastavení GPC.....	38
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
5.1	FÁZOVÉ SOL-GEL DIAGRAMY.....	39
5.2	STUDIUM DEGRADACE BLOKOVÉHO KOPOLYMERU.....	49
5.2.1	Problémy při přípravě roztoků polymeru.....	49
5.2.2	Sledování degradace různých kopolymerů PLGA-PEG-PLGA.....	49
5.2.3	Porovnání rychlosti degradace vzorků bez modifikace a s modifikací kyselinou itakonovou..	53
5.2.4	Vliv pH pufru na průběh degradace.....	58
6	ZÁVĚR.....	63
7	POUŽITÉ ZKRATKY.....	65
8	PŘÍLOHY.....	66
8.1	SCHEMA POUŽITÍ ZKOUMANÝCH KOPOLYMERŮ.....	66

I. Studium degradace syntetického biokompatibilního kopolymeru

8.2	FOTOGRAFIE PŘIPRAVENÝCH ROZTOKŮ VZORKŮ PRO SESTAVOVÁNÍ SOL-GEL DIAGRAMU.....	67
8.3	ZMĚNA DISTRIBUCE MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI (Z GPC) V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ DEGRADACE	68
8.4	HPLC ANALÝZA ROZTOKU PUFRU PO DEGRADACI	69
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	70

2 Úvod

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

Snahy o napodobení přírodních materiálů, které mají jak hydrofilní, tak hydrofobní vlastnosti, vedly k vývoji biokompatibilních amfifilních syntetických polymerů. Do této klasifikace jsou zahrnuty hydrogely, k jejichž vytvoření došlo pomocí fyzikálního nebo chemického zesíťování polymerních řetězců. Polymery mají zvláštní povrchové a fyzikální vlastnosti a schopnost absorbovat více než 20 % vody [3], v poměru k jejich celkové hmotnosti. Biomedicínská aplikace hydrogelů je velmi široká, od kontaktních čoček přes diagnostické a terapeutické nástroje na implantabilních biosenzorech s krátkou nebo dlouhou životností.

V poslední době byly připraveny tzv. chytré hydrogely se schopností reagovat změnou stavu na různé externí podněty. Tato citlivost na okolní prostředí může být řízena změnou teploty, pH, iontovou povahou, elektrickým polem, rozpouštědlem, tlakem, světlem nebo napětím [4]. Aktuálně je snaha o přípravu hydrogelů technikou "in situ", tzn. vznik gelu přímo v místě aplikace přímo v místě aplikace. V případě reverzibilního fázového přechodu je výsledkem gel (sol-gel), který má reverzibilní vlastnosti a může přecházet zpět na roztok (gel-sol).

Vývoj degradovatelných polymerů (hydrogelů), které mohou injekčně vpraveny do postižených oblastí kostí a kloubů, má řadu výhod v oblasti tkáňového inženýrství v porovnání s předem připravenými kostrami. Hlavní výhodou je možnost vstříknout roztok polymeru do těla, kde vznikne gel. Toho je možné využít k zaplnění volných (postižených) míst s často velmi složitými tvary [1].

V této práci budou studovány dva typy termosensitivních blokových kopolymerů na bázi poly(mléčné kyseliny), poly(glykolové kyseliny) a polyethylenglykolu, PLGA-PEG-PLGA, ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA (koncové skupiny funkcionalizované kyselinou itakonovou). Předpokládané použití těchto polymerů spadá do oblasti medicíny, a to pro léčbu zlomenin. Bude použito injekční aplikace roztoku polymeru s delší dobou života, ve kterém budou nanočástice hydroxyapatitu, a které budou obaleny polymerem s dlouhou dobou života. Po nutné době léčby nebude zapotřebí jakéhokoliv chirurgického zákroku pro odstranění implantátu, protože dojde k jeho úplné degradaci a vyloučení degradačních produktů z těla.

Pro funkcionalizaci již dříve publikovaného typu blokového kopolymery je možné použít kyselinu itakonovou, která vnáší do polymerního řetězce reaktivní dvojnásobné vazby a karboxylovou skupinu. Navíc, ITA může být získávána z obnovitelných zdrojů pomocí pyrolýzy kyseliny citronové nebo kvašením polysacharidů. Výsledné kopolymery mohou tvořit chemický gel (fotopolymerizace) nebo fyzikální gely (iontové interakce).

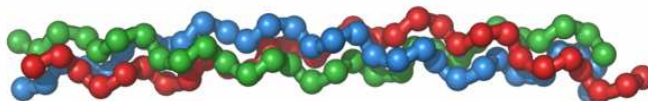
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Přírodní biodegradovatelné polymery

Velkou skupinu biodegradovatelných polymerů hojně využívaných v lékařství tvoří přírodní biopolymery. Přírodní biodegradabilní polymery jsou syntetizované během přirozených metabolických procesů v průběhu růstu organismu (rostliny, živočichové). Do této skupiny patří především kolagen, gelatin, dextrin, chitin, chitosan, škrob, celuloza, atd. [5].

3.1.1 Kolagen

Kolagen je extracelulární skleroprotein, který je ve vodě nerozpustný. Tvoří 20 – 30 % všech proteinů v těle savců. Je základní stavební hmotou pojivových tkání, ale najdeme ho také v kostech, kloubech, chrupavkách, kůži a šlachách. Ve formě kolagenních vláken je složkou mezibuněčné hmoty. K jeho syntéze dochází ve fibroblastech a patří mezi obnovitelné zdroje [6]. V současnosti je známo nejméně 27 rozdílných typů kolagenu [7].



Obr. 1: Tropokolagen [8]

Molekula kolagenu je tvořena hlavně aminokyselinami glycinem, prolinem, hydroxyprolinem a hydroxylysinem. Kolagen se skládá z řetězců alfa 1 a alfa 2, které se jen málo liší pořadím aminokyselin. Řetězce tvoří trojitou spirálu, která se označuje jako tropokolagen. Je to základní jednotka kolagenu, dlouhá přibližně 256 – 290 nm. V tropokolagenové molekule jsou všechny tři řetězce udržovány při sobě vodíkovými vazbami mezi sousedními řetězci [9].

K degradaci molekul kolagenu dochází působením enzymů kolagenas a dalších nespecifických enzymů. Po naštípnutí helixové struktury se kratší fragmenty štěpí na malé molekuly peptidů a aminokyselin [10].

Kolagen nachází široké použití především v kosmetickém průmyslu a v lékařství (doplňky stravy – klouby, vyhlazení vrásek, posílení vlasů, vstřebatelné obvazy a membrány).

3.1.1.1 Želatina

Při zahřívání vlhkého kolagenu dochází při určité teplotě k výrazné změně struktury, provázené zvýšeným bobtnáním a změně fyzikálně chemickými vlastnostmi. Takto modifikovaný kolagen není již odolný proti běžným proteasám a má mnohem nižší stupeň uspořádání. Označuje se názvem želatina. Přeměna kolagenu na želatinu nastává obvykle při teplotě kolem 60 °C, závisí však také na pH, iontové síle, složení roztoku a na stupni kovalentního zesíťování kolagenu [11].

Želatina je hojně používána v potravinářském průmyslu (pojivo, zahuš'ovadlo, cukrovinky, atd.), ve farmaceutickém průmyslu a v lékařství (měkké a tvrdé kapsle, pojivo v tabletách) [12], případně ve fotografickém průmyslu (pojivo).

3.1.2 Chitin a chitosan

Chitin a chitosan jsou přírodní polymery, které jsou produkovány velkou řadou živočichů a rostlin. Chitin je lineární polysacharid tvořený N-acetyl-glukosaminovými jednotkami vázanými $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidovou vazbou. Chitosan je derivátem chitinu a vzniká alkalickou N-deacetylací [13]. V přírodě se ani jeden polymer nevyskytuje jako 100% čistý. Chitin má spoustu unikátních vlastností, kvůli kterým je hojně používán. Jsou to především jeho biokompatibilita, biodegradabilita a bioaktivita, dále pak jeho chelační a adsorpční vlastnosti. Svoje uplatnění najde rovněž jako součást textilních produktů, balících materiálů, krevní antikoagulant, prostředek umožňující řízené uvolňování léčiv, kosmetika, úprava, čištění vody atd. [14], [15], [16].

3.1.3 Škrob

Škrob je polymer, který je syntetizován v rostlinách. Je konečným produktem fotosyntézy. Mezi hlavní producenty škrobu patří brambory, kukuřice a rýže. Škrob je polysacharid se vzorcem $(C_6H_{10}O_5)_n$, který je složený ze dvou polysacharidů – amylosy a amylopektinu. Používá se v potravinářském, papírenském a textilním průmyslu, dále jako lepidla, obaly v potravinářství i v zemědělství (biodegradovatelné) [5].

3.1.4 Celulosa

Celulosa je polysacharid o molekulové hmotnosti okolo 400 kDa tvořený β -glukosovými jednotkami. Glukosové jednotky jsou spojené vazbou $\beta(1\rightarrow4)$ a tvoří dlouhé, nerozvětvené řetězce, které jsou zcela nerozpustné ve vodě. Je hlavní stavební látkou rostlinných primárních buněčných stěn (spolu s ligninem se podílí na stavbě sekundárních buněčných stěn). Na rozdíl od škrobu se celulosa nevětví ani nekrouťí, ale zůstává ve formě dlouhých rovných řetězců. Je syntetizována extracelulárně z aktivované formy glukosy (UDPglukosa). Většina živočichů nemá enzymy, které by dokázaly rozštěpit $\beta(1\rightarrow4)$ vazby mezi jednotlivými glukosovými jednotkami. Při hydrolytickém štěpení celulosy vznikají různé štěpné produkty (celopentosa, celotetrosa, celotriosa, celobiosa) až po glukosu [17].

Celulosa je využívána jako konstrukční materiál (ve formě dřeva), případně na výrobu textilu nebo papíru. Dále je celulosa všestranný výchozí materiál vhodný pro následné chemické úpravy, ze kterých vycházejí vlákna a filmy, stejně jako velká spousta stabilních rozpustných celulosových derivátů. Deriváty jsou produkty etherifikace, esterifikace, oxidace, roubování, síťování a degradace [5].

3.2 Syntetické biodegradovatelné polymery

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

3.2.1 Polyestery

Alifatické polyestery, jako jsou hydrofobní poly(mléčná kyselina) (PLA), poly(glykolová kyselina) (PGA), poly(β -butyrolakton) (PBL) a hydrofilní poly([RS]-3,3-dimethyljablečná kyselina) (PdMMLA), reprezentují důležitou skupinu biodegradovatelných makromolekul s výbornou biokompatibilitou a degradovatelností. Jsou získávány z obnovitelných zdrojů. Doba degradace se pohybuje v rozmezí několika dní až roků, a to v závislosti na typu polymeru nebo kopolymery. Značnou roli zde hraje molekulová hmotnost, funkční skupiny, typy vazeb, případně enzymatická degradace [18]. Polyestery jsou převážně používány v lékařství a ve farmacii.

Poly(mléčná kyselina), poly(glykolová kyselina) (PGA) a jejich kopolymery (PLGA) jsou nejčastěji studované a používané polyestery. Již řadu desetiletí jsou používány v praxi na chirurgické šití, na fixaci zlomenin, nosičový systém buněk při transplantacích, apod. [15].

Používání syntetických biodegradovatelných polyesterů jako vstřebavatelného šití nebo výztuží kostí bylo zavedeno už téměř před 50 lety [19]. Stále ještě patří mezi nejvíce používané syntetické polymery využitelné v lékařství. Na trhu jsou dostupné výrobky pod názvy Dexon, Vicryl, Maxon a Monocryl pro šití; Lactomer a Absolol jako svorky; Biofix a Phusiline jako tabulky a šrouby; Decapeptyl, Lupron, Depot, Zoladex, Adriamycin, Regel a Capronor jako matrice pro nosičové systémy [20]. I přes tyto deklarované výrobky je oblast vývoje nových kopolymerů na bázi polyesterů stále aktuální a v současnosti se hledají nové možnosti jejich využití.

3.2.2 Polyanhydridy

Polyanhydridy (PA) jsou polymery s vláknitou strukturou, které lehce podléhají hydrolyze a k jejich degradaci dochází především povrchovou erozí. Jsou velmi dobře biokompatibilní. Rychlost degradace závisí na typu polymeru. Alifatické PA degradují během několika dnů, zatímco aromatické PA degradují pomalu, často i několik roků. Využívají se především jako nosiče léků [1] [5].

3.2.3 Polyuretany

Polyuretany (PU) reprezentují důležitou skupinu syntetických elastomerů, které jsou používány v lékařství především jako implantáty (kardiostimulátory, cévní štěpy). Mají výborné mechanické vlastnosti a jsou biokompatibilní.

PU bývají často syntetizovány tak, aby chemické vazby byly náchylné k biodegradaci. Lze říci, že polyuretany na bázi polyetheru jsou vůči biodegradaci odolné a polyuretany na bázi polyesteru jsou lehce degradovatelné. Působením mikroorganismů (*Aspergillus niger*, *Aspergillus funeigatus*, *Fusarium solanii*, atd.) a enzymů (papin, subtilisin, atd.) dochází k jejich účinné degradaci [1] [5].

3.2.4 Polyorthoestery

Polyorthoestery jsou hydrofobní polymery syntetizované polykondenzací acetalů a diolů. Příslušnou polymerní reakcí vznikají ortho-esterové vazby, které jsou stabilní při neutrálním pH, avšak rychle degradují při pH okolo 5,5. Polyorthoestery se aplikují jako nosiče léčiv nebo v ortopedii [21].

3.2.5 Poly(ethylenglykol)

Polyethylenglykoly (PEG) jsou neionogenní, ve vodě rozpustné polymery, které se používají v lékařství, kosmetickém, farmaceutickém nebo potravinářském průmyslu již

mnoho desetiletí [22] [23]. Jejich použití je vesměs ovlivněno molekulovou hmotností. Velmi často nachází uplatnění jejich nejrůznější deriváty (stearáty, alkylpolyethoxyláty, laueráty, aj.) [24].

3.3 Vlastnosti, biokompatibilita a toxicita

3.3.1 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná (2-hydroxypropanová kyselina) hraje důležitou roli v biochemických procesech. Přirozeně se vyskytují dva optické izomery D(-), L(+), případně jejich racemická směs (DL). Biologicky významná je L(+) mléčná kyselina [25].

V buňkách je L-laktát produkován během anaerobního metabolismu (fyzická zátěž) pyruvátu, a to působením enzymu laktátdehydrogenasa (LDH). Koncentrace laktátu v krvi je obvykle $1 - 2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, avšak během fyzické námahy může dojít k jeho zvýšení až na $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z laktátu obsaženého v játrech (Coriho cyklus) dochází ke glukoneogenezi (tvorba glukosy).

Průmyslově se kyselina mléčná vyrábí fermentací, a to především bakteriemi rodu *Lactobacillus* [25].

Kyselina mléčná působí dráždivě při styku s pokožkou. Protože je nezbytná zejména v biochemických procesech, její akutní toxicita je velmi nízká. Člověk toleruje orální dávky až do $1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti. Smrtelná koncentrace v krvi je asi $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace okolo letální dávky podávaná orálně krysám způsobila ztrátu hmotnosti a anemii; současně došlo ke snížení koncentrace CO_2 v krvi. Zvýšená koncentrace kyseliny mléčné v krvi vede k acidose (pH okolo 6,95), což způsobuje změny v koagulaci krve. Studie chronických a subchronických testů neprokázaly žádné kumulativní účinky [26].

Tab. 1: Akutní toxicita D,L-laktátu [26]

Druh	Aplikace	LD ₅₀ mg·kg ⁻¹
krysa	orálně, podkožně	3730
krysa	intraperitoneálně	2000
myš	orálně, podkožně	4875
morče	orálně	1810

3.3.2 Kyselina glykolová

Kyselina glykolová (2-hydroxyethanová kyselina) je nejmenší z α -hydroxy kyselin (AHA). Je to pevná, bezbarvá, hygroskopická, krystalická, ve vodě rozpustná látka. Pro své vlastnosti se používá v dermatologii jako přísada do produktů péče o pleť (např. při léčbě akné, vrásky), dále v textilním průmyslu a v potravinářském průmyslu. Kromě toho je vhodná pro přípravu polymerů (PGA) a biokompatibilních kopolymerů (např. PLGA). Nejvíce aplikací těchto polymerů je při jejich využití jako chirurgického šití (Dexon, American Cynamide Co.) [19].

Z těla je kyselina glykolová vyloučena močí v nezměněné formě, jako šťavelan nebo oxyglykolát, případně je tato kyselina v Krebsově cyklu metabolizována až na CO_2 , který je vyloučen při dýchání.

Akutní toxicita kyseliny glykolové je nízká; stejně jako kyselina mléčná působí dráždivě při styku s pokožkou. Kyselina šťavelová, která vzniká při metabolismu kyseliny glykolové, tvoří s ionty vápníku soli. Tyto soli mohou při vyšších koncentracích krystalizovat v močových cestách a způsobit tak jejich blokáci [26].

Tab. 2: Akutní toxicita glykolátu [26]

Druh	Aplikace	LD ₅₀ mg·kg ⁻¹
krysa	orálně	1950
krysa	intravenosně	1000
morče	orálně	1920

3.3.3 Ethylenglykol

Ethylenglykol je bezbarvá, ve vodě rozpustná kapalina, bez zápachu, s nasládlou chutí. Používá se k výrobě polymerů (např. PET) a do nemrznoucích směsí.

Ethylenglykol má nízkou akutní toxicitu. Způsobuje pouze minimální podráždění při styku s kůží. Jen v několika případech působil dráždivě při vdechování [27], v provedených *in vitro* a *in vivo* studiích nebyl ethylenglykol prokázán jako genotoxický.

Průběh odbourávání ethylenglykolu a jeho vyloučení z těla navazuje na cyklus kyseliny glykolové. V důsledku toho je vylučován především močí nebo jako CO₂.

3.4 Biodegradace polymerů

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

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

Rychlost hydrolyzy ovlivňuje řada faktorů jako např.:

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

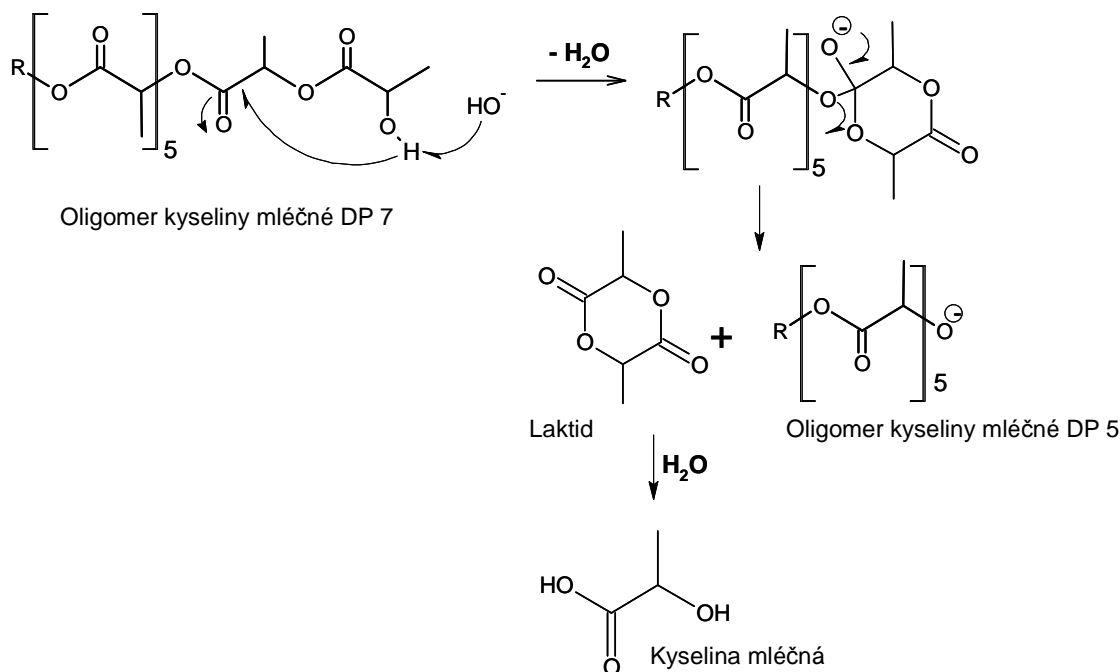
3.4.1 Degradace poly(mléčné kyseliny) (PLA)

Poly(mléčná kyselina) se může, stejně jako kyselina mléčná, vyskytovat v D, L formě nebo jako racemická směs D,L. Je to semikrystalická látka s obdobnými rychlostmi degradace jako PGA. PLA je více hydrofobní než PGA a je více chráněna před hydrolytickou degradací, a to díky methylové skupině, která stericky brání přístupu molekuly vody k řetězci. Pro hodně aplikací je použit polymer L-PLA, protože je přednostně metabolizován v těle [1].

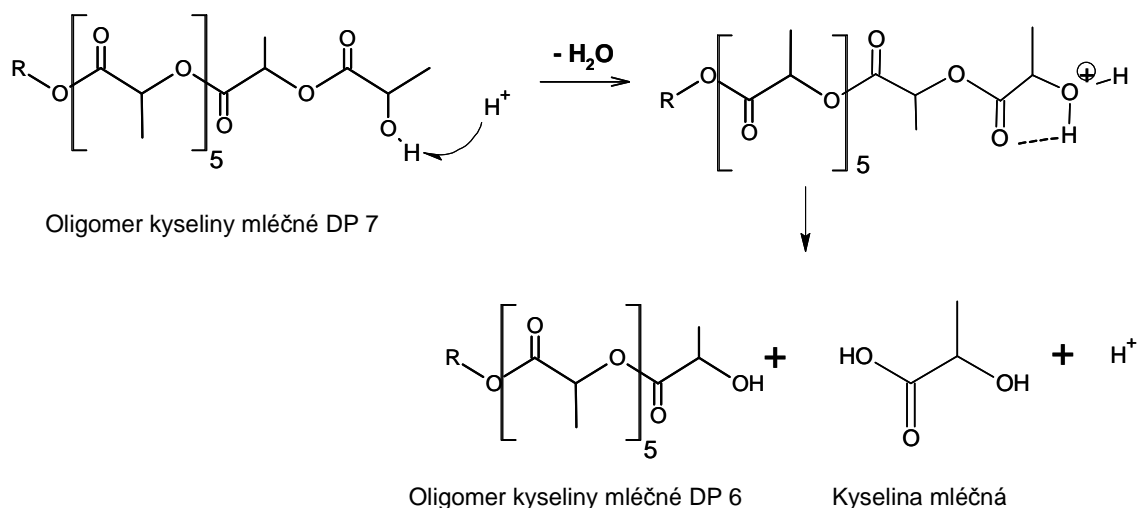
V neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí je degradace polymeru PLA způsobena vnitřní transesterifikací, přičemž dojde k odtržení dimeru. Hydrolyza v kyselém prostředí probíhá odtržením molekuly kyseliny mléčné z konce řetězce polymeru [28-29].

Na začátku bazicky katalyzované degradace dojde k nukleofilní reakci hydroxyly a druhé karbonylové skupiny; viz Obr. 2.: Vznikne tak oligomer kratší o dvě molekuly LA a stabilní cyklický dimer LA, který dále degraduje na kyselinu mléčnou. Doba života dimeru je menší než 1 minuta, a proto je jen velmi těžko detekovatelný. U kysele katalyzované reakce začíná

degradace protonací koncové OH skupiny a tvorbou pětičlenného cyklu (vodíková vazba), který je nejstabilnější (Obr. 3:) [28, 30]. V důsledku toho dojde ke zvýšení elektrofily karbonylové skupiny; tím je v tomto místě umožněn přístup molekuly vody. Dojde k odštěpení molekuly kyseliny mléčné a zůstane oligomer o jednotku kratší.



Obr. 2: Bazicky katalyzovaná degradace oligomeru kyseliny mléčné [28]



Obr. 3: Kyselé katalyzovaná degradace oligomeru kyseliny mléčné [28]

3.4.2 Degradace poly(glykolové kyseliny) (PGA)

Poly(mléčná kyseliny) je pevná vysoce krystalická látka (46 – 50 %). Kvůli vysoké krystalinitě je PLA nerozpustná ve většině organických rozpouštědel, kromě fluorovaných (např. hexafluoropropanol) [1].

Degradace probíhá ve dvou krocích. Nejdříve dojde k difúzi vody do oblasti s amorfni strukturou a k jednoduchému rozštěpení esterové vazby. Poté teprve dochází k pomalejší degradaci v oblastech s krystalickou strukturou [1].

3.4.3 Degradace poly(ethylenglykolu)

PEG může být vstřebán gastrointestinálním traktem, což je však závislé na molekulové hmotnosti. Kromě toho může být PEG vylučován močí. Stejně tak je tomu u vstřebávání přes pokožku, kde však již PEG o nízké molekulové hmotnosti je vstřebáván jen velmi málo, při molekulové hmotnosti 4000 a větší už není vstřebáván vůbec. Nezávisle na molekulové hmotnosti může PEG proniknout přes kůži, která je nějakým způsobem porušená [24].

Po orální nebo intravenosní expozici je PEG vyloučen především močí a faeces v nezměněné podobě. Malá část absorbovaného polymeru je metabolizována na menší oligomerní řetězce, kyselinu glykolovou, hydroxyglykolové kyseliny a diglykolové kyseliny, CO₂ (detekován ve vydechovaném vzduchu) a ve velmi malém množství rovněž na kyselinu šťavelovou. Biochemické studie také prokázaly, že alkohol dehydrogenasa (ADH) je schopná iniciovat oxidaci PEG [24].

3.4.4 Degradace kopolymery PLGA

V minulých letech bylo provedeno mnoho studií zaměřených na studium degradace často používaných nástrojů z PLGA (mikrokuličky, filmy, fixační pomůcky, šití, atd.). Hydrolytické štěpení esterových vazeb v PLGA kopolymery poskytuje na koncích řetězce karboxylovou a hydroxylovou skupinu. Karboxylové skupiny katalyzují další hydrolyzu esterových vazeb, dochází k autokatalýze.

Faktory, které ovlivňují rychlost průběhu hydrolyzy PLGA zařízení:

- průběh přípravy
- velikost a tvar
- teplota a pH
- autokatalýzy
- molekulová hmotnost vznikajících oligomerů
- vnitřní vlastnosti polymeru.

3.4.5 Příprava

V lékařství mohou být použity různé typy přípravků z PLGA. Metoda přípravy těchto předmětů hraje důležitou roli při určování jejich degradačního chování a současně ovlivňuje jejich mechanické a termální vlastnosti [31]. Bylo prokázáno, že z mikrosfér (duté částice) připravených sprejováním a sušením byla rychlost uvolňování monomeru větší, v porovnání s mikrosférami připravenými pouhým odpařováním rozpouštědla. Degradace PLGA mikrosfér byla rychlejší než PDLLA, protože PLGA je více hydrofilní [32].

3.4.6 Velikost a tvar

Velikost a tvar použité pomůcky výrazně ovlivňuje rychlost degradace [33] [34]. Větší objekty degradují heterogenně, rychleji uprostřed, než na koncích, a také mnohem rychleji než objekty menší [35]. Rozpustné oligomery mohou totiž snadněji penetrovat ven. U větších předmětů k tomu dochází jen u oligomerů blízko povrchu, jinak díky relativně nízkým difúzním koeficientům zůstávají oligomery uvnitř [36]. Bylo publikováno, že v závislosti na tvaru používaného materiálu může dojít ke změně, a to z objemové na povrchovou erozi [37]. U polymerních filmů hraje při degradaci důležitou roli jeho tloušťka, protože silnější film

degraduje rychleji [38]. Rychlejší uvolnění léčiva bylo pozorováno u částic se silnější membránou [35].

3.4.7 Teplota a pH

Hodnota pH výrazně ovlivňuje reakce, které probíhají během degradace. Při kyselém pH dochází k rychlejší degradaci než při pH neutrálním. Jestliže je pH okolního prostředí neutrální, dochází k neutralizaci vznikajících kyselých produktů degradace. Zásadité pH urychluje povrchovou erozi [39].

Teplota okolního prostředí rovněž hraje při degradaci značnou roli. Při nižších inkubačních teplotách vykazovaly částice z PLGA krátkou počáteční periodu, než začala vlastní degradace. Rychlost degradace se zvyšuje se zvyšující se teplotou [34]. K vyjádření závislosti rychlosti degradace na teplotě může být použita Arrheniova rovnice, ze které lze vypočítat aktivační energii [40].

3.4.8 Autokatalýza

Degradace polymeru je heterogenní degradace, která závisí na reakčních a difúzních procesech. Na začátku je polymerní matrice homogenní (rovnoměrné rozložení střední molekulové hmotnosti). Po umístění do roztoku penetruje voda do vzorku a začíná štěpení esterových vazeb. Rozštěpením každé esterové vazby vznikne nová karboxylová skupina. Dochází tak k autokatalýze a ke zvýšení rychlosti degradace. Z počátku probíhá degradace v objemu a navenek homogenně. Ke změně situace dochází v okamžiku, jakmile se zvýší počet vzniklých oligomerních řetězců, které se v oblasti povrchu dostávají difúzí do okolního prostředí. Vzniká rozdíl mezi povrchem a vnitřkem polymeru, kde již k difúzi nedochází a snižuje se vnitřní pH [38].

Jestliže má okolní roztok neutrální pH 7,4 (použití fosfátového pufru *in vitro*) dojde k neutralizaci a ke snížení kyselosti u povrchu. Proto je autokatalýza větší ve vnitřním objemu polymeru a způsobuje rozdíly mezi vnitřkem a povrchem. Jak degradace pokračuje, vzniká více a více karboxylových skupin, které degradaci dále urychlují a zvyšují rozdíl mezi povrchem a vnitřkem [41-42]. Dokonce je možné pozorovat rozdíly v rozložení molekulové hmotnosti a vznik dvou různých skupin makromolekul, které degradují rozdílnou rychlostí. Nakonec lze také pozorovat vznik duté struktury, když je vnitřní polymer totálně přeměněn na oligomery schopné difúze [20]. Některé větší mikrosféry mohou vykazovat totální zhroucení struktury [42]

3.4.9 Délka vznikajících řetězců

Oligomery produkované během hydrolýzy vytváří osmotický tlak mezi vnitřkem předmětu a okolním prostředím. Tento osmotický tlak způsobuje průnik vody do polymeru a vnější vrstva působí jako polopropustná membrána. Všechno vede opět k rychlejší vnitřní degradaci. Jakmile jsou vzniklé oligomery natolik malé (kritická molekulová hmotnost oligomeru), že jsou rozpustné, dochází k jejich difúzi přes povrchovou vrstvu do okolního prostředí. Dochází ke snižování molekulové hmotnosti. Pro mikrosféry z PLA se pohybovala kritická molekulová hmotnost oligomeru mezi 1050 a 1150 [41]. Se zvyšující se molekulovou hmotností polymeru je doba potřebná ke vzniku ve vodě rozpustných řetězců a doba, kdy dochází ke změně M_w , delší. Vnitřní i povrchová eroze je závislá na tvorbě oligomerů schopných difúze [43].

Pro PLGA implantáty a mikrosféry je počáteční zpoždění v poklesu molekulové hmotnosti typické. Je to způsobeno pomalým průnikem vody do hydrofobní matrice; teprve potom dojde k hydrolyze polymeru [33].

3.4.10 Vnitřní vlastnosti polymeru

Je známo, že rychlost degradace alifatických polyesterů je výrazně určena jejich molekulovou hmotností, stejně jako krystalickou nebo amorfní strukturou, případně poměrem hydrofilních a hydrofobních polymerů [41]. Velmi malé rozdíly v degračních rychlostech byly pozorovány na různých místech těla.

Degrační chování nanočásticového systému závisí na hydrofilních vlastnostech polymeru. Čím více je polymer hydrofilní, tím rychlejší je jeho degradace. Hydrofilita je ovlivněna poměrem krystalických a amorfních oblastí polymeru, které jsou určeny složením kopolymery a optickou aktivitou monomerů [44]. PLGA kopolymer, připravený z L-PLA a PGA, je krystalický kopolymer, zatímco z D,L-PLA a PGA vzniká amorfní kopolymer. Kyselina mléčná je více hydrofobní než kyselina glykolová. Proto kopolymery s větším obsahem kyseliny mléčné jsou méně hydrofilní a degradace je pomalejší [45].

Složení polymerního řetězce (poměry L-PLA, D-PLA a PGA) určuje rychlost degradace PLGA kopolymerů [35, 38, 41-42]. U kopolymeru obsahujícího více procent jednotek kyseliny glykolové dochází k uvolňování více L-LA do okolního média. Je to způsobeno tím, že PGA je hydrofilnější, a proto dochází k rychlejšímu štěpení vazeb jak mezi GA jednotkami, tak mezi GA a LA. U testovaných polymerů (PLA/PGA: 90/10, 80/20, 70/30 a 50/50) probíhala degradace nejrychleji u kopolymeru s poměrem 50/50 [42], který měl nejvyšší obsah PGA. Je známo, že biodegradace PGA *in vivo* je rychlejší než biodegradace semikrystalického PLA [19] a kopolymer degraduje rychleji než homopolymer [46]. Navíc amorfní kopolymer PLGA degraduje rychleji (nepravidelná morfologie) ve srovnání se semikrystalickým analogem.

3.5 Polymerní gely, hydrogely

Jako gel je definována trojrozměrná síť, která bobtná v rozpouštědle. Xerogel tak může zvýšit svůj objem více jak o 100 %. Rozpouštědlo je hlavní součástí gelového systému. Gely mohou být rozděleny do dvou kategorií: *chemické gely* vznikající tvorbou kovalentních vazeb a *fyzikální gely* tvořené sekundárními silami. Jestliže je rozpouštědlem zabudovaným v síti voda, nazýváme tento systém **hydrogel**.

3.6 Použití hydrogelů

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

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

3.7 Voda v hydrogelech

Charakter vody v hydrogelech může určovat celkový průnik látek do gelu a z gelu. V okamžiku, kdy suchý xerogel začne absorbovat vodu, první molekuly vody vstupující do matrice hydratují polární hydrofilní skupiny. Je to tzv. primární vázaná voda. Když jsou polární skupiny hydratované, dochází k dalšímu botnání. Hydrofobní skupiny začínají také interagovat s molekulami vody a vzniká hydrofobně vázaná voda (sekundární vázaná voda). Primární a sekundární vázaná voda tvoří celkovou vázanou vodu [47].

Pokud je voda vázaná na hydrofilní i hydrofobní místa v polymeru, dochází díky osmotickým silám k další absorpci vody (volná voda), a to směrem k nekonečnému zředění. Toto botnání je protichůdné k fyzikálním nebo kovalentním vazbám a vede k uvolnění sil tvořících elastickou síť. V systému je dosažena rovnováha. Volná voda vyplňuje místa mezi makromolekulami, makropóry nebo jiný volný prostor. Pokud jsou vazby botnajícího polymeru degradovatelné, dochází k rozrušení gelu a jeho rozpouštění. Rychlost závisí na složení polymeru. Gely používané v tkáňovém inženýrství by neměly být nikdy suché, ale vždy by měly obsahovat vázanou nebo volnou vodu [47].

3.7.1 Rovnovážná teorie botnání

Botnání polymerní sítě v organických rozpouštědlech je předmětem studia již přes 60 let. Pro popis tohoto chování může být použito mnoho teorií a jejich modifikací [48].

V lékařství jsou jako nosiče léčiv používány hydrogely; jejich chování při specifických aplikacích závisí do značné míry na jejich vnitřní struktuře.

Struktura hydrogelů, které neobsahují iontové sloučeniny, může být popsána pomocí Flory-Rehnerovy teorie [49]. Tato termodynamická teorie je založena na předpokladu, že v zesíťovaném polymerním gelu působí proti sobě dvě síly; směšovací termodynamická síla a elastická síla polymerního řetězce. Rovnice 1 popisuje tuto situaci použitím Gibbsovy volné energie.

$$\Delta G_{celk} = \Delta G_{elast} + \Delta G_{mix} \quad (1)$$

Kde ΔG_{elast} je příspěvek elastických smršťovacích sil vznikajících uvnitř gelu a ΔG_{mix} je energie samovolných směšovacích sil molekul kapaliny a polymerních řetězců. Termín ΔG_{mix} je mírou kompatibility polymeru a okolní kapaliny.

Jiné vyjádření rovnice 1, s ohledem na počet solvatovaných molekul za konstantní teploty a tlaku, je uvedena v rovnici 2.

$$\mu_1 - \mu_{1,0} = \Delta\mu_{elast} + \Delta\mu_{mix} \quad (2)$$

V rovnici 2 je μ_1 chemický potenciál rozpouštědla v polymerním gelu, $\mu_{1,0}$ je chemický potenciál čistého rozpouštědla. V rovnováze musí být rozdíl mezi chemickými potenciály roven nule.

Jestliže jsou v hydrogelu přítomny iontové skupiny, musí být teorie botnání rozšířena o Gibbsovu energii ΔG_{ion} (rovnice 3).

$$\Delta G_{celk} = \Delta G_{elast} + \Delta G_{mix} + \Delta G_{ion} \quad (3)$$

Podobné vyjádření jako je rovnice 2, je pro chemické potenciály v rovnici 4.

$$\mu_1 - \mu_{1,0} = \Delta\mu_{elast} + \Delta\mu_{mixing} + \Delta\mu_{ionic} \quad (4)$$

Zde je $\Delta\mu_{ion}$ změna chemického potenciálu způsobená iontovým charakterem hydrogelu.

3.7.2 Dynamika bobtnání

Průnik vody do sklovité matrice polymeru je rozdělen do třech po sobě následujících kroků:

1. *difúze* molekul vody do polymerní sítě
2. *relaxace* – hydratace polymerních řetězců
3. *expanze* polymerní sítě do okolního vodného prostředí.

Průběh bobtnání se může lišit v závislosti na tom, který z kroků je dominantní. Ten potom určuje rychlost celého procesu. Podle mechanismu transportu vody do polymeru může být bobtnání difúzně kontrolované nebo relaxačně kontrolované.

3.7.3 Popis bobtnání

Bobtnání může být vyjádřeno změnou hmotnosti, objemu nebo délkou. Informace by se měly sbírat v okamžiku ustanovení rovnováhy. Hmotnost vodné frakce v hydrogelu je

$$W_f = \frac{(\text{mokr\u00e1 hmotnost} - \text{such\u00e1 hmotnost})}{(\text{mokr\u00e1 hmotnost})} \quad (5)$$

Obsah vody v % je

$$W_p = W_f \times 100 \quad W_p < 100 \quad (6)$$

Bobtnání vztažené k suchému stavu polymeru je také nazýváno hydratace. Procento hydratace nebo index bobtnání je vyjádřen jako

$$H_p = \frac{100 (\text{mokr\u00e1 hmotnost} - \text{such\u00e1 hmotnost})}{(\text{such\u00e1 hmotnost})} \quad (7)$$

H_p může být větší než 100. Stupeň bobtnání je vyjádřen jako

$$D_{sw} = \frac{(\text{mokr\u00e1 hmotnost})}{(\text{such\u00e1 hmotnost})} \quad D_{sw} \geq 1 \quad (8)$$

Stupeň bobtnání může být vyjádřen i pomocí objemů:

$$R_{sw} = D_{sw} \frac{d_0}{d_{sw}} = \frac{\text{mokr\u00fd objem}}{\text{such\u00fd objem}} \quad (9)$$

kde d_0 je hustota suchého gelu a d_{sw} je hustota nabotnalého gelu.

3.8 Hydrogely reagující na vnější podněty

Hydrogely reagující na vnější podněty (SRH – stimuli responsive hydrogel) jsou polymery, které dramaticky změni své vlastnosti se změnou vnějšího prostředí. Mohou vykazovat změny v bobtnání, struktuře polymerní sítě, permeabilitě nebo mechanické pevnosti. Podle typu vnějšího podnětu jsou polymery rozděleny na polymery citlivé na změnu teploty, pH, iontovou sílu, světlo, elektrické nebo magnetické pole [50]. Některé polymery mohou reagovat na více než jeden podnět [48]. Reverzibilní hydrogely (fyzikální hydrogely) vykazují vratné sol-gel přechody. Jedná se o nižší přechod, při kterém roztok (sol) přechází na gel a o vyšší přechod z gelu na sol, kdy může dojít ke kolapsu sítě, k vypuzení částic nebo všeho, co bylo absorbováno. Hydrogelům, u kterých dochází k přechodu sol-gel v prostředí lidského těla, se také říká „chytré“ (smart) hydrogely.

Hydrogely (polymery) citlivé na vnější prostředí mají ohromný potenciál v různých aplikacích. Některé změny prostředí, jako nízké pH a zvýšená teplota, jsou běžné v lidském těle. Proto mohou být polymery reagující na tyto změny použity jako nosiče léčiv. Hydrogely, které reagují na specifickou molekulu (glukosa, antigen), mohou být použity jako biosenzory

i jako nosiče léčiv. Světlo-citlivé, dále na tlak reagující nebo elektro-citlivé hydrogely mají také podobné uplatnění v lékařství.

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

Důležitou vlastností pro SRH je jejich biokompatibilita. Syntéza stále nových polymerů, v mnoha případech kopolymerů, je zaměřena na vývoj nových materiálů s větší biokompatibilitou a biodegradovatelností, které zaručují úspěšné použití v lékařských aplikacích. Pozornost je zaměřena především na biopolymery lidskému tělu vlastní nebo syntetické polymery, které obsahují řetězce z látek tělu vlastních [51].

V posledních letech došlo k výzkumu vstřikovatelných (injectable) polymerů, které tvoří gel až v místě potřeby. Tento systém má několik výhod: tekutý materiál může vyplnit prostor nepravidelného tvaru, případně může obsahovat různé léčebné prostředky, neobsahuje zbytky rozpouštědel, které mohou být přítomny u předem připravených skeletů (scaffolds). Pokud jsou použity biodegradovatelné polymery, není za potřebí následné operace z důvodu odstranění použitého materiálu [52]. Vzhledem k jejich vlastnostem je možné jejich použití jako nosičů léčiv, tkáňové bariéry a také v tkáňovém inženýrství [53].

Mechanismů, které způsobí tvorbu gelu *in situ*, je několik a jsou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

3.8.1 pH-citlivé hydrogely

Hydrogely, u kterých je bobtnání závislé na změně pH, jsou tvořeny iontovými sítěmi. Tyto sítě obsahují buď kyselé funkční skupiny (karboxylové nebo sulfonové kyseliny) nebo bazické funkční skupiny (aminy). Při vhodném pH a iontové síle dochází ve vodném prostředí k ionizaci funkčních skupin; takto vzniká náboj polymerní sítě. Výsledkem těchto elektrostatických odpudivých sil je zvýšená absorpce vody a tvorba hydrogelu. K ionizaci dochází při pH prostředí menším než pK_a u kyselých funkčních skupin, případně při pH vyšším než je pK_b v přítomnosti bazických funkčních skupin [48] [54]; pH-citlivé hydrogely jsou využívány pro aplikace v gastrointestinálním traktu (GI-trakt).

Poly(akrylová kyselina) (PAA), poly(methakrylová kyselina) (PMAA), poly(ethylenimin), poly(L-lysin) a poly(N, N-dimethylaminoethylmethakryl amid) jsou typickým příkladem na pH citlivých hydrogelů [50] [55]. Tyto polymery, případně jejich kopolymery patří k nejčastěji zkoumaným pH-citlivým hydrogelům.

3.8.1.1 Kopolymery s kyselinou itakonovou

Kyselina itakonová (ITA) je nenasycená dikarboxylová kyselina, která může být získávána z obnovitelných zdrojů (z melasy, hydrolýzou škrobu, fermentací) [56]. ITA může být jednoduše začleněna do polymerů např. akrylové nebo methakrylové kyseliny. ITA má dvě ionizovatelné skupiny s rozdílnými hodnotami pK_a , které mohou tvořit vodíkové můstky. Je velmi hydrofilní a je biokompatibilní [57].

Kyselina itakonová je velmi snadno použitelná pro syntézu kopolymerů, kde do vzniklého polymerního řetězce vnáší karboxylové skupiny. Malé množství ITA jako komonomeru v gelové síti zapříčiňuje pH citlivost a zvyšuje stupeň bobtnání [58]. Navíc vznik vodíkových můstků v polymerní síti může zvýšit mechanickou pevnost hydrogelu [57].

V nedávné době byla ITA použita pro syntézu řady kopolymerů jako poly(*N*-isopropylakrylamid-*co*-itakonová kyselina) (PNIPAM-*co*-ITA) [59], poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidon-*co*-itakonová kyselina) (PNVP-*co*-ITA) [58] nebo poly(2-hydroxyethylmethakrylát-*co*-itakonová kyselina) (PHEMA-*co*-ITA) [60]. Současně byly hodnoceny průběhy bobtnání a reakce na změnu teploty. U všech kopolymerů byla pozorována také citlivost na změnu pH díky přítomnosti kyseliny itakonové.

3.8.2 Světlo-citlivé hydrogely

Hydrogely citlivé na UV záření jsou chemické hydrogely (nevykazují vratný přechod). K zesíťování může dojít použitím fotoiniciátoru přidaného k monomerům, případně je k zesíťování použit sám monomer (obsahuje dvojnou vazbu).

West a spol. [61] popsali fotopolymerační hydrogel, který má možné použití jako nosič léčiv pro bioaktivní materiály. Prekurzor hydrogelu byl tvořen kopolymerem poly(ethylen glykolu) a α -hydroxy kyseliny s akrylátem na každém konci řetězce. Podmínky nutné pro polymerizaci byly velmi mírné a tak je bylo možné provést v přímém kontaktu s buňkami. Rychlost degradace a permeabilita hydrogelu byla vázána na složení prekurzoru. Výsledný kopolymer byl použit k uvolňování proteinů a oligonukleotidů *in vitro*.

Wei a spol. [62] syntetizovali nový polymer, který gelovatěl (fyzikální gel, bez UV) ve vodě díky supramolekulárním samo-shlukovacím α -cyklodextrinům, navlečeným na amfifilní LA-PEG-LA copolymer ukončený methakrylovou skupinou. Při expozici UV záření, kdy byl předem přidán fotoiniciátor, docházelo k fotopolymerizaci *in situ*. Vznikal chemicky zesíťovaný hydrogel s výrazně lepšími mechanickými vlastnostmi. Oba dva typy gelu (fyzikální a chemický) mohou nalézt své uplatnění jako vstříkovatelný biomateriál.

3.8.3 Elektro-citlivé hydrogely

Elektrický proud může být také použit k iniciaci tvorby hydrogelu. Hydrogely citlivé na elektrický proud jsou obvykle polyelektrolyty a rovněž jsou pH-citlivé. Ke srážení nebo bobtnání dochází při aplikaci elektrického pole [51].

Elektro-citlivé hydrogely a mikročástice byly aplikovány při kontrolovaném uvolňování léčiv [63]. Bioaktivní molekuly jako glukosa a insulin, byly uvolňovány z hydrogelu působením elektrického pole, které bylo aplikováno principem vypínače (on/off).

Elektricky modulovanou transdermální migraci léčiva diklofenak (sodná, draselná sůl, diethylamonium) z hydrogelu tvořeného alginátem sodným (NaAlg) a Carbopolem[®] (CP) v různých poměrech (2:1; 2:1,5; 2:2), zkoumal a hodnotil Sunil a spol.[64]. Byl pozorován pulzní transport v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti elektrického pole.

3.8.4 Specifické ion-citlivé hydrogely

Ve vodě rozpustné nabitě polymery mohou formovat gel v případě, když reagují s di- nebo tri-valentními protiionty. Alginátové gely jsou příkladem iontově zesíťovaných gelů. Alginát je biodegradovatelný polysacharid s manuronovými a glukuronovými opakujícími se jednotkami. Vodný roztok alginátu tvoří gel, pokud se smíchá s divalentními kationty, např. vápenatými solemi. Algináty byly rozsáhle studovány za účelem aplikace ve tkáňovém inženýrství jako materiál pro enkapsulaci buněk nebo jako vstříkovatelná 3D matrice. V mnoha publikacích bylo konstatováno, že vápenatý alginátový gel vykazuje zvýšenou imunogenicitu a slabou bioresorpci, což mohlo vést k nepříznivým reakcím tkáně [52, 65].

Westhaus a spol. [66] zkoumal termálně zpuštěné uvolňování Ca^{2+} z liposomů pro tvorbu vápenatého alginátového hydrogelu. Dalším sledovaným systémem pro uvolnění Ca^{2+} byla

aktivace transglutaminasy. Liposomy uvolnily více než 90 % zachyceného vápníku, pokud došlo k zahřátí na 37 °C. Při ponechání systému za laboratorní teploty nedošlo ani po několika dnech k tvorbě vápenatého alginátového gelu, avšak po zahřátí a rychlém uvolnění Ca^{2+} došlo k tvorbě gelu během několika hodin.

Příkladem jiných hydrogelů tohoto typu jsou vstřikovatelné bioabsorbovatelné supramolekulární hydrogely, tvořené z poly(ethylenoxidu) (PEO) a α -cyklodextrinů (α -CD), vhodné pro řízený přenos léčiv [67]. Vznik hydrogelu je založen na fyzikálním zesíťování vyvolaném supramolekulárními samo shlukujícími molekulami. Kinetika gelace je závislá na koncentraci jednotlivých složek a také na molekulové hmotnosti PEO. Ve vznikajícím hydrogelu mohou být přímo uzavřena léčiva bez přítomnosti dalších organických rozpouštědel.

3.8.5 Teplotně-citlivé hydrogely

Změna teploty je nejpoužívanějším stimulem pro tvorbu hydrogelů. Je lehce kontrolovatelná a testy *in vitro* a *in vivo* jsou dobře proveditelné [15, 51]. Proto se teplotně-citlivé hydrogely hodí k nejrůznějším aplikacím v oblasti farmaceutického průmyslu [2, 47] a stále je jim při výzkumu věnována velká pozornost.

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

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

U syntetických polymerů dochází ve většině případů ke gelování při LCST. Takovým prototypem syntetického teplotně-citlivého polymeru je poly(N-isopropylakrylamid) (PNIPAAm) [2, 53]. Jeho LCST je přibližně 32 °C. Bohužel PNIPAAm není vhodný pro biomedicínské aplikace, protože je cytotoxický a není biodegradovatelný [15, 51].

Dobré gelační vlastnosti, s možností regulace teploty gelace, bylo dosaženo syntézou kopolymerů, ve kterých jsou vhodným způsobem kombinovány vlastnosti jednotlivých polymerů. Některé typy blokových kopolymerů (diblokové nebo triblokové kopolymery), připravených z poly(ethylenoxidu) (PEO) a poly(propylenoxidu) (PPO), jsou teplotně-reverzibilní hydrogely. Protože jejich LCST je okolo teploty těla, jsou široce používány pro vývoj systémů pro řízené uvolňování léčiv. Velký počet PEO-PPO blokových kopolymerů je komerčně dostupný pod různými komerčními názvy, např. Pluronic[®] (nebo Poloxamer[®]) a Tetronics[®] [51]. Potenciální nevýhodou poloxamerních gelů je jejich malá mechanická pevnost, rychlá eroze a to, že nejsou biodegradovatelné. Proto nemohou být použity polymery o větší molekulové hmotnosti [15]. Kissel a spol. publikovali rozsáhlý přehled o nových triblokových kopolymerech typu ABA připravených z biodegradovatelných polyesterů a hydrofilních poly(ethylen oxidů) [68].

Biodegradovatelný teplotně-citlivý polymer poly(kaprolakton-*b*-ethylenglykol-*b*-kaprolakton) (PCL-PEG-PCL) zkoumali Bae a spol. [69]. Tento triblokový kopolymer tvoří

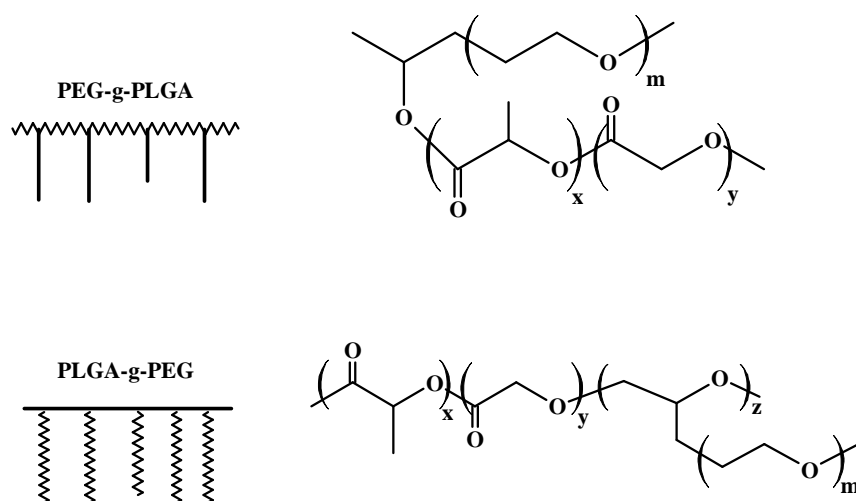
při pokojové teplotě prášek. Vodný roztok kopolymery (20 %) přechází po jedné hodině při laboratorní teplotě do fáze neprůhledného gelu. Tento problém může být vyřešen syntézou multiblokového kopolymery PEG/PCL z triblokových kopolymery [70]. Oba dva typy kopolymery (jejich 20% roztoky) vykazují přechod sol-gel při teplotě 37 °C. Multiblokový kopolymery je fázově stabilní i při pokojové teplotě.

3.8.5.1 Triblokový kopolymery PEG-PLGA-PEG

Syntéza nového typu biodegradovatelného triblokového kopolymery poly(ethylenglykol)-poly(mléčná-co-glykolová kyselina)-poly(ethylenglykol) (PEG-PLGA-PEG) byla poprvé publikována Jeongem a spol. [71-74]. Jedná se o typ termoreverzibilního kopolymery BAB (hydrofilní-hydrofobní-hydrofilní), který vykazuje fázové přechody při kontinuální změně teploty. První je přechod sol-gel (nižší teplota) a poté přechod gel-sol (vyšší teplota). Změny ve fázovém přechodu mohou být zaznamenány ve fázovém diagramu jako závislost teploty a koncentrace. Z diagramu lze potom určit kritickou teplotu gelovatění (CGT) a kritickou koncentraci gelovatění (CGC). Molekulová hmotnost PLGA ovlivňuje velikost CGT a CGC. Zvýšení molekulové hmotnosti (z 2 320 na 2 480 g·mol⁻¹) mělo za následek posun CGC k nižším hodnotám (z 26% na 15% roztok), avšak CGT zůstala nezměněna.

Studie ukázaly, že triblokový kopolymery PEG-PLGA-PEG je vhodný pro použití jako vstřikovatelný nosičový systém. V publikaci Jeonga a spol. [75] byly popsány *in situ* testy na krysách. Po podkožní aplikaci 33% roztoku PEG-PLGA-PEG byly pozorovány změny vlastností vzniklého gelu v místě vstříknutí. Gel vykazoval dobrou mechanickou odolnost a integrita gelu zůstala nezměněna po dobu delší než měsíc.

Vzhledem k triblokové struktuře polymeru existuje limitace v molekulové hmotnosti, kterou polymer může mít, aby ještě docházelo k fázovým přechodům při změně teploty. Teplota přechodu sol-gel je vysoce závislá na molekulové hmotnosti PEG. Celková molekulová hmotnost PEG-PLGA-PEG by neměla přesáhnout 4 000 – 5 000 [76]. Tribloková topologie polymeru částečně limituje délku trvání gelu nebo uvolňování léčiv. Proto Jeong a spol. syntetizovali roubovaný kopolymery PEG-g-PLGA nebo PLGA-g-PEG (Obr. 4:) [74, 77-78]. Teploty přechodů sol-gel roubovaných kopolymery mohou být v rozmezí 15 a 45 °C, s ohledem na různý počet PEG nebo složení polymeru.



Obr. 4: Schema triblokového kopolymery PEG-g-PLGA a PLGA-g-PEG [72]

3.8.5.2 Triblokový kopolymer PLGA-PEG-PLGA

Jako první syntetizoval tento triblokový kopolymer PLGA-PEG-PLGA Zentner a spol. [79]. Kopolymer byl registrován pod značkou ReGel[®]. ReGel[®] byl vyvinut jako biodegradovatelný nosičový systém léčiv, který je do těla vstříknut jako roztok a při teplotě těla se formuje gel. Uvolňování léčiv pak může trvat 1 – 6 týdnů. ReGel[®] může být použit pro lokální, ale také pro systémovou aplikaci léčiv.

Malé alkylové skupiny na koncích řetězců mohou změnit fyzikální vlastnosti kopolymerů z PEG a PLGA. Tento vliv koncových skupin zkoumal Yu a spol. [80]. U většiny derivátů zůstává zachována schopnost reverzibilního gelovatění. Typ koncové skupiny ovlivňuje hydrofobicitu a tím také kritickou micelární koncentraci (CMC) a CGC. Tento vliv je větší než zvýšení molekulové hmotnosti PLGA.

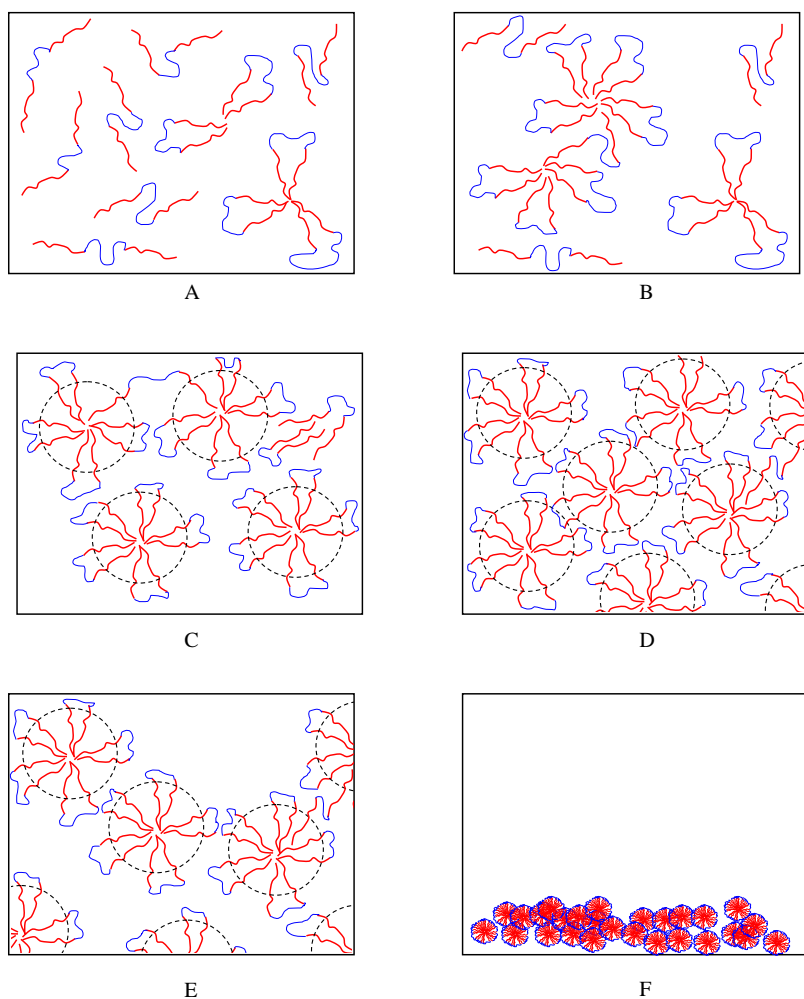
Pro rozdílné typy kopolymerů platí, že pro ABA typ (PLGA-PEG-PLGA) je CGC menší než u typu BAB (PEG-PLGA-PEG), u kterého se typicky pohybuje nad 20 % [81]. Dále bylo pozorováno, že se zóna gelu ve fázovém diagramu rozšiřuje se zvyšujícím se poměrem PLGA/PEG.

3.8.5.3 Mechanismus gelovatění

Tvorba micel a jejich chování je závislé na struktuře molekuly polymeru a poměru hydrofobní/hydrofilní části, které hrají významnou roli při gelovatění. Vstřikovatelný, biodegradovatelný, teplotně-citlivý triblokový kopolymer PLGA-PEG-PLGA (ABA) se skládá z hydrofobního kopolymeru poly(mléčná-co-glykolová kyselina) a hydrofilního polymeru poly(ethylenglykol). Ve vodném roztoku se tvoří micely s hydrofobním centrem (core) a hydrofilním obalem (shell).

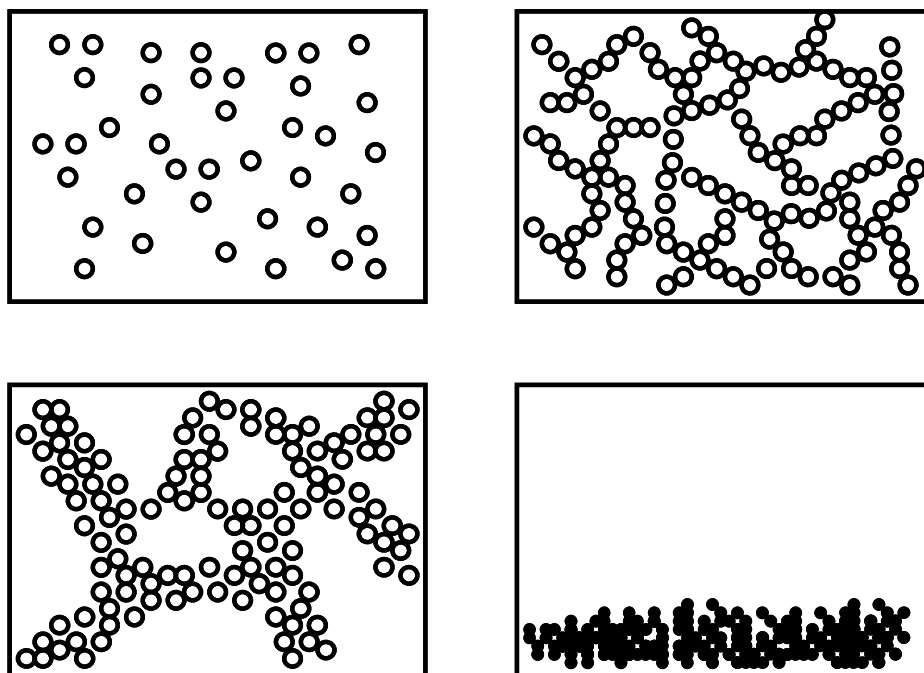
U tohoto typu kopolymeru byly publikovány dvě teorie pro vysvětlení přechodů sol-gel a gel-sol.

Shim a spol. [82] se zabývali tvorbou micel u PLGA-PEG-PLGA kopolymeru. Charakterizovali velikost micel a jejich distribuci pomocí dynamického rozptylu světla. Nejmenší micely měly velikost pod 5 nm (unimery, volné řetězce). Při teplotě pod CGT byly pozorovány micely větší než 20 nm (spojené micely). Pokud byla zvyšována teplota, velikost individuálních micel se moc neměnila, zato u spojených micel došlo až ke dvojnásobnému zvětšení. To ukazuje na to, že spojené micely expandují prostřednictvím spojení (bridging) s individuálními micelami. Při teplotě blízké CGT vyrostly micely až na 95 nm a pozorovaný pík byl širší a větší. Zde pravděpodobně došlo ke vzniku gelu. Mechanismus gelovatění byl takto vysvětlen pomocí teorie přemostění micel (bridging micelle theory). Podobný mechanismus byl již popsán v publikaci, kterou zveřejnili Lee a spol. [83]. Na Obr. 5: je schematicky zakreslen popis gelovatění pomocí této teorie. Změna z roztoku na gel, ke které dochází zvýšením teploty, není nikdy ostrá; vždy je postupná a doprovázená změnami v uspořádání molekul v roztoku. Při teplotě mnohem nižší než je CGT, existují v roztoku volné řetězce polymeru a individuální micely, avšak spojené micely se zde nevyskytují Obr. 5: (část A). Se zvyšováním teploty klesá počet volných řetězců; Obr. 5: (část B). Dále se velmi rychle začínají tvořit spojené micely a dochází k přechodu sol-gel; Obr. 5: (část C). Se zvyšováním teploty rostou agregační interakce mezi micelami a vzniká hustší a pevnější gel; Obr. 5: (část D). Při dalším růstu teploty se hydrofobní řetězce uprostřed micely těsněji stáhnou a hydrofilní PEG blok podléhá dehydrataci. Dochází k přechodu gel-sol; Obr. 5: (část E). Zhroucené micely se srážejí ve vodě a roztok se rozdělí na dvě fáze vody a sraženinu polymeru Obr. 5: (část F).



Obr. 5: Schematický popis tvorby gelu podle Lee a spol. [83]

Jiný princip gelování popsali ve své práci Yu a spol. [80] Podle jejich názoru existují spojené micely už i ve fázi roztoku. Proto vznik gelu není možné dostatečně vysvětlit pouze tvorbou můstků mezi micelami. Některé blokové kopolymery jako PEO-PPO-PEO nemohou tvořit můstky, ale jejich koncentrované roztoky přesto vykazují teplotně závislý přechod sol-gel. Proto Yu a spol. navrhl, že hydrofobní agregace mezi micelami (micelární síť) je hlavním mechanismem přechodu sol-gel u kopolymery PLGA-PEG-PLGA. Uvažovaný mechanismus je schematicky znázorněn na Obr. 6:. V roztoku agregují amfifilní blokové kopolymery samovolně. Při postupném zvyšování teploty vytváří micely makroskopický gel s nehomogenní micelární sítí. Při fázovém přechodu sol-gel je dosaženo neporušené micelární struktury. V okamžiku, kdy jsou hydrofobní síly tak velké, že indukují tvorbu makroskopických asociátů, nastal přechod sol-gel. Micelární síť se může dále zvětšovat se zvyšující se teplotou. Pokud velikost micelárních klastrů nebo mezer mezi nimi spadne do rozmezí vlnové délky viditelného světla, zdá se gel neprůhledný. Je také možné, že micely nejsou kulovité nebo micelární klastry mohou tvořit velké zdeformované micely. Srážení polymeru nastane, když je celá struktura zničena vzhledem k velké hydrofobitě blokového kopolymery při vyšší teplotě.



Obr. 6: Schématický popis tvorby gelu podle Yu a spol.[80]

3.8.5.4 Fázový diagram

Triblokový kopolymer PLGA-PEG-PLGA má dva fázové přechody sol-gel a gel-sol. Jak už bylo dříve zmíněno, jsou tyto přechody závislé na teplotě a také na koncentraci roztoku polymeru. Tato závislost může být zaznamenána v přechodovém fázovém diagramu (Obr. 8):

Vliv složení kopolymery na přechod sol-gel

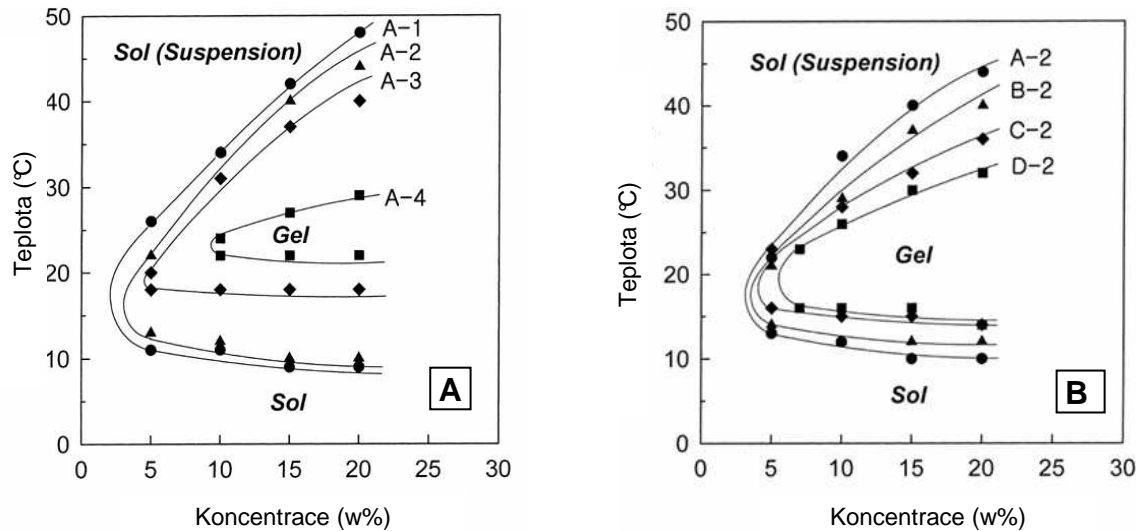
Složení triblokového kopolymery významně ovlivňuje jeho gelační chování (Obr. 7:). Rozdíly mohou být sledovány změnami CGT, CGC nebo vymezenou oblastí, kde zůstává gel průhledný. Molekulární hmotnost polymeru a poměry individuálních polymerů ovlivňují tyto vlastnosti [71-72, 74-78, 82]. Byly provedeny testy fázových přechodů na PLGA-PEG-PLGA kopolymerech různého složení [79, 82, 84].

PEG/PLGA (wt/wt)	DLLA/GA (mol/mol)					
	3.4	3.0	2.5	2.0	1.5	1.3
1/3.2 (1600-1000-1600)	I	I	I	I	I	I
1/3.0 (1500-1000-1500)	I	A-1	B-1	C-1	D-1	—
1/2.7 (1350-1000-1350)	—	A-2	B-2	C-2	D-2	—
1/2.5 (1200-1000-1200)	—	A-3	B-3	C-3	D-3	—
1/2.0 (1000-1000-1000)	—	A-4	B-4	C-4	D-4	S
1/1.8 (900-1000-900)	S	S	S	S	S	S

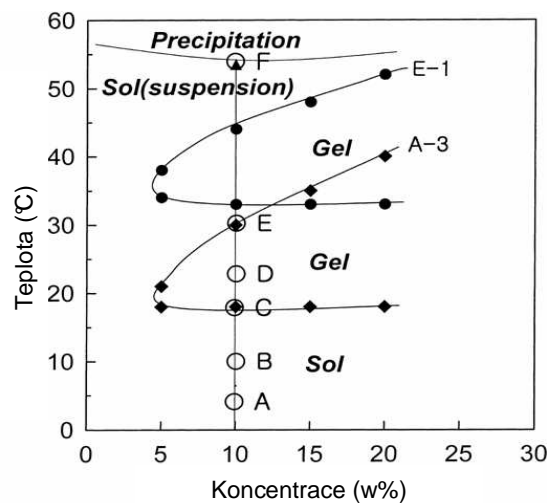
Obr. 7: Vlastnosti polymerů, u kterých byly sestaveny fázové sol-gel diagramy; I – nerozpustný ve vodě, S – rozpustný ve vodě [82]

Jako kritický faktor se jeví rovnováha mezi hydrofobními a hydrofilními bloky polymeru. Triblokový kopolymer založený na centrálním PEG ($M_n = 1\ 000$) s PLGA na koncích ($M_n \leq 900$) je nerozpustný ve vodě. Pouze PLGA o molekulové hmotnosti 900 – 1 600 vykazují termoreverzibilní přechody [82]. CGT a CGC se zvyšují se snižujícím se poměrem

PEG/PLGA; na druhou stranu se zužuje v diagramu oblast fáze gelu. Dalším důležitým poměrem je poměr PLA/PGA (obr. 8: A). CGT a CGC zůstávají se změnou poměru téměř stejné, avšak dochází k zužování oblasti gelu (obr. 8: B). Při sledování vlivu molekulové hmotnosti PEG se prokázalo, že delší polymery s dalším PEG mají obdobný tvar křivek a stejné CGC jako polymery s kratším PEG; dochází však k posunu CGT k vyšším hodnotám (obr. 9:).



Obr. 8: Vliv složení PLGA-PEG-PLGA triblokového kopolymery na průběh fázového sol-gel diagramu: (A) stejný poměr LA/GA a rozdílné poměry PEG/PLGA; (B) stejné poměry PLGA/PEG a rozdílné poměry LA/GA [82]



Obr. 9: Fázový sol-gel diagram PLGA-PEG-PLGA triblokového kopolymery s rozdílnou molekulovou hmotností PEG; A-3 $M_n = 1000$; E-1 $M_n = 1500$ [82]

3.9 Analýza degradačních produktů

3.9.1 HPLC

V dostupné literatuře bylo popsáno několik metod pro sledování degradačních produktů polymeru PLGA-PEG-PLGA za použití kapalinové chromatografie.

3.9.1.1 Reverzní fáze a použití pufrů v mobilní fázi

Použití pufrů jako mobilní fáze je zcela běžné a časté i ve spojení s reverzními fázemi [85]. V případě, že je potřeba separovat od sebe látky obsahující ionizovatelnou skupinu, je často nezbytné, aby analýza probíhala při definovaném pH. Hodnotu pH ovlivňuje stupeň disociace kyselých/zásaditých sloučenin a volných silanolových skupin na povrchu stacionární fáze a; pH může výrazně ovlivnit separaci, retenční čas a tvar píků.

Hodnota pH vybraného pufru by měla být dvě jednotky od pK_a (pK_b) analyzované látky, protože v této oblasti pH se vyskytují molekuly v jedné formě, buď nedisociované nebo disociované. Analyty s kyselým charakterem se při pH nižším o dvě jednotky než je pK_a vyskytují převážně v nedisociované formě, naopak při pH vyšším o dvě jednotky jsou všechny molekuly disociované (vznikají anionty). Pokud se týče iontové síly použitého pufru je důležité, aby měl dostatečnou kapacitu, avšak zase příliš velká iontová síla může způsobit problémy při smíchání pufru s organickým rozpouštědlem. Obvykle se používají pufrы o koncentraci 0,01 – 0,05 mol·l⁻¹. Smícháním pufru s methanolem nebo acetonitrilem dochází ke zvýšení pH [86].

HPLC analýza

Marcato a spol. [87] použili pro analýzu konečných produktů degradace PLGA kapalinovou chromatografii. K separaci byla použita kolona Bondesil SAX (250 x 4,6 mm; 5 μm) a jako mobilní fáze směs acetonitril a fosfátový pufr (75 : 25, v/v). Ve své publikaci poukazují autoři na kritické složení pufru, které výrazně ovlivňuje separaci a tvar píků. Při pH vyšším než 6 byly píky příliš široké nebo docházelo k jejich zdvojení.

3.9.1.2 Ion-párová chromatografie

Ion-párová chromatografie je alternativou k iontově-výměnné chromatografii. Ve spojení s ion-párovou chromatografií může být rovněž použit princip reverzní fáze. Používá se k separaci slabých kyselin a zásad. Do mobilní fáze se přidá organická látka, která tvoří iontový pár s komponentou vzorku, která má opačný náboj. Vzniká tak molekula, která se v chromatografických podmínkách chová jako neutrální molekula.



Výhody tohoto typu chromatografie použité při separaci látek nesoucích náboj jsou následující:

- pro separaci může být použitý systém reverzní fáze
- může být separována směs kyselin, zásad, neutrálních i amfoterních molekul
- selektivita může být lehce ovlivněna výběrem jiného proti iontu.

HPLC analýza

Giunchedi a spol. [32] publikovali studii, ve které bylo dosaženo potřebné separace a rozlišení kyseliny glykolové a kyseliny mléčné ve standardním systému reverzní fáze za použití hydrofobního iont-párového činidla přidaného do mobilní fáze. Optimální výsledky

byly pozorovány, pokud byl použit 2% methanol ve fosfátovém pufru (0,025 M, pH 7,4) obsahujícím tetrabutylamonium iodid (0,002 M). Použitá kolona byla Ultrasphere ODS column (150x4.6 mm; 5 μm).

3.9.1.3 Derivatizace

Jedna z dalších možností, jak je možné analyzovat degradační produkty kopolymery PLGA-PEG-PLGA na HPLC, je derivatizace -COOH skupin polymeru.

V článku, který publikoval Ding a spol. [88], byl popsán způsob derivatizace před vlastní analýzou pomocí HPLC. Metoda byla použita pro stanovení degradačních produktů a nečistot polymeru PLGA. Do sucha odpařené, ve vodě rozpustné degradační produkty, byly znovu rozpuštěny v acetonitrilu, k němu byl přidán dvojnásobek triethylaminu (TEA) a roztok bromfenacyl bromidu (*p*BPB) v ACN. Směs byla v tmavé vialce umístěna do vyhřívané lázně (50 °C po dobu 3 hodin). Po zreagování byl vzorek umístěn do chladničky až do vlastní analýzy kapalinovou chromatografií. K analýze byla použita kolona Symmetry C18, (250 x 4,6 mm) (Waters) a mobilní fáze ACN:H₂O (70:30, v/v), s lineárním nárůstem na 80:20 (v/v) během 2 – 4 min.

3.10 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (GPC) je obecný název kapalinové chromatografie, při které dochází k separaci podle velikosti molekul. GPC je synonymum pro další často používané názvy především z anglického: „size exclusion chromatography“ (SEC), „gel filtration chromatography“ (GFC), apod. Pomocí spojení této metody s vhodným detektorem může být ve vzorcích určena distribuce molekul podle molekulové hmotnosti. Při syntéze makromolekul vznikají polymerní řetězce s různou délkou, resp. jinou molekulovou hmotností. Statistický charakter reakcí, kterým jsou připravovány polymery, zapříčiňuje vznik polymeru s relativně širokou distribucí molekulových hmotností. Tato distribuce a průměrná molekulová hmotnost je základní charakteristikou daného polymeru. Rozdíl mezi nízkou molekulárními látkami a polymery je ten, že u polymerů rozhoduje o většině jejich vlastností právě molekulová hmotnost a její distribuce (polydisperzita).

Průměrné molekulové hmotnosti jsou počítány podle následujících rovnic (10 – 12). Každá průměrná molekulová hmotnost charakterizuje polymer v jiném bodě píku změřeného pomocí GPC.

$$\text{průměrná číselná molekulová hmotnost } M_n = \frac{\sum h(M) \cdot M}{\sum h(M)} = \frac{\sum w(M)}{\sum w(M)/M} \quad (10)$$

$$\text{průměrná hmotnostní molekulová hmotn. } M_w = \frac{\sum h(M) \cdot M^2}{\sum h(M)} = \frac{\sum w(M) \cdot M}{\sum w(M)} \quad (11)$$

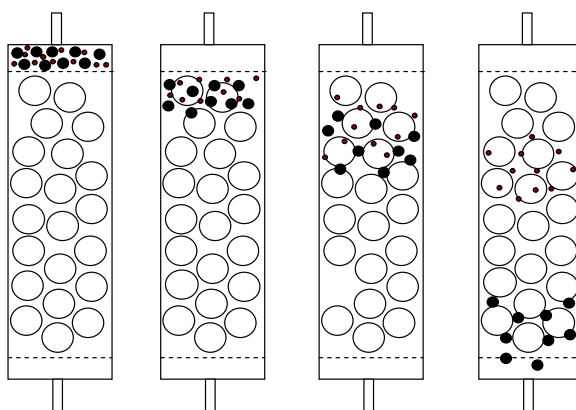
$$\text{z-průměrná molekulová hmotnost } M_z = \frac{\sum h(M) \cdot M^3}{\sum h(M)^2} = \frac{\sum w(M) \cdot M^2}{\sum w(M) \cdot M} \quad (12)$$

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

Distribuce molekulových hmotností je obvykle popsána indexem polydispersity (D):

$$D = \frac{M_w}{M_n} \quad (13)$$

Na obrázku Obr. 10: je zjednodušeně naznačena separace ideální směsi dvou makromolekulárních látek s rozdílnou velikostí [89]. Částice stacionární fáze jsou porézní s definovanou velikostí pórů. Menší molekuly při průchodu kolonou penetrují do těchto pórů, zato větší molekuly zůstávají v prostoru mezi částicemi nebo se nedostanou do pórů tak hluboko. Kolonou projdou větší částice rychleji než menší. Na GPC chromatogramu je většinou vidět kontinuální pík, který může mít více maxim. Zcela oddělené píky bývají pouze u analytů, které se výrazně liší svou molekulovou hmotností. Rozsah molekulových hmotností, které mohou být na koloně ještě separovány, závisí na její charakteristice.



Obr. 10: GPC separace dvou makromolekulárních látek o různé molekulové [89]

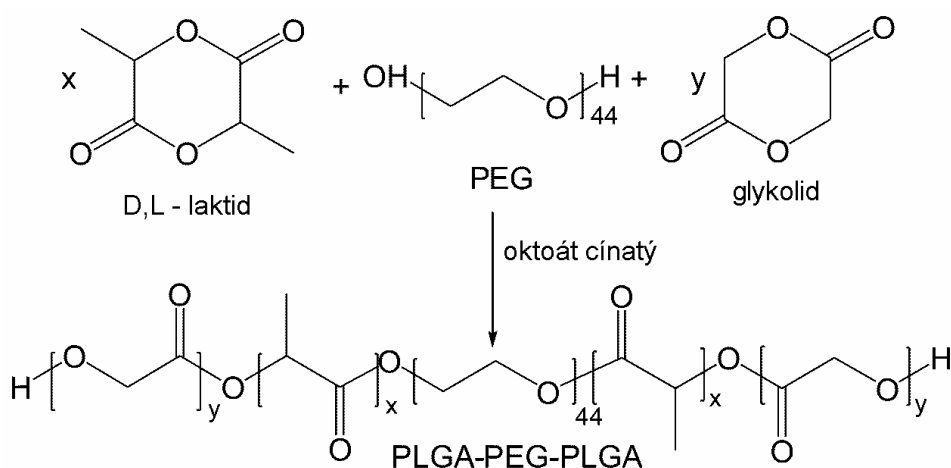
Nejjednodušší metodou kalibrace je použití externí kalibrační křivky, kdy každé molekulové hmotnosti přísluší určitý eluční objem (retenční čas). Jako standardy se používají polymery s velmi úzkou molekulovou distribucí (MMD). Bohužel však neexistují pro každý polymer vhodné standardy stejného složení, což může u tohoto způsobu určení molekulové hmotnosti způsobovat nepřesnosti. Mezi obvykle používané standardy s úzkou MMD patří polystyren, poly(methylmethakrylát), polyisopren, polybutadien, poly(ethylenoxid), poly(methakrylová kyselina), atd.[90].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Syntéza kopolymery PLGA-PEG-PLGA a ITA/PLGA-PEG-PLGA/ITA

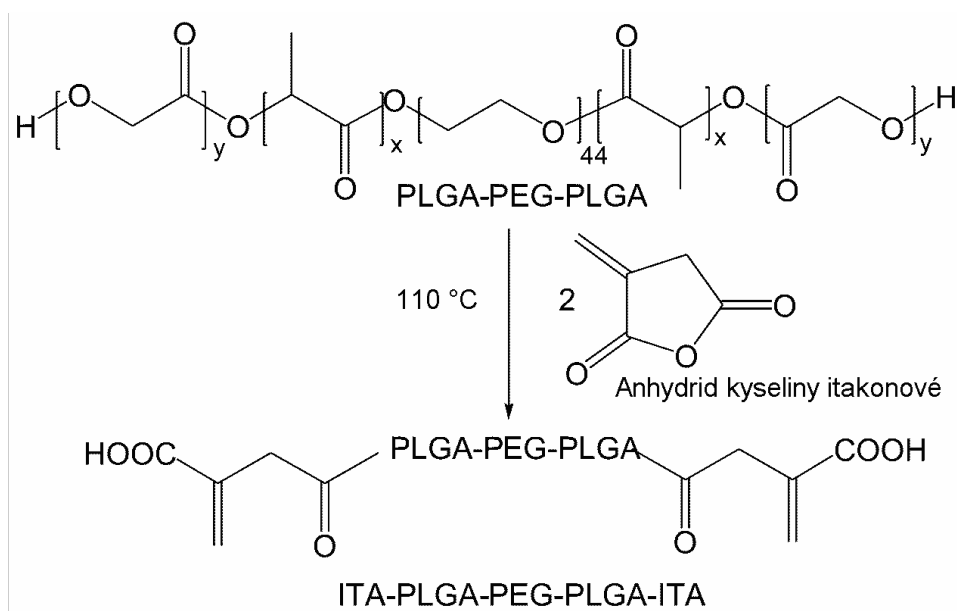
V rámci spolupráce s Ústavem materiálů Fakulty chemické VUT v Brně byly jejich pracovníky a studenty připravovány v laboratoři syntézy polymerů testované polymery. Nejdříve byl syntetizován vzorek polymeru PLGA-PEG-PLGA a potom byl tento vzorek modifikován kyselinou itakonovou. Samotnými problémy a postupy při syntéze se tato práce nezabývá. V následujících odstavcích je stručně popsán postup přípravy polymeru.

Syntéza polymerů byla prováděna na vakuové aparatuře pod inertním plynným N_2 pomocí Schlenkových technik. Triblokové kopolymery na bázi polyethylenglykolu, kyseliny polymlečné a polyglykolové (PLGA-PEG-PLGA) byly připraveny polymerací za otevření kruhu z původních i přesublimovaných monomerů D,L-laktidu a glykolidu, dále polyethylenglykolu (PEG) jako makroniciátoru a cínoktoátu jako katalyzátoru (Obr. 11:). Syntéza probíhala v tavenině při 130 °C (po dobu 8 a 3 hodin) pod dusíkem.



Obr. 11: Schéma syntézy PLGA-PEG-PLGA kopolymery

Kopolymery byly následně modifikovány anhydridem kyseliny itakonové, a to opět katalytickou reakcí za otevření kruhu pod dusíkem při teplotě 130 – 150 °C po dobu 8 hodin (vzorky 1 – 7). V důsledku optimalizace reakčních podmínek byly PLGA-PEG-PLGA kopolymery (vzorky 8 – 17) funkcionalizovány sublimovaným anhydridem kyseliny itakonové při 110 °C po dobu 3 hodin (Obr. 12:).



Obr. 12: Schéma funkcionalizace PLGA-PEG-PLGA kopolymery pomocí anhydridu kyseliny itakonové

4.2 Seznam testovaných polymerů

Připravené polymery byly typu ABA (hydrofobní-hydrofilní-hydrofobní) a ITA-ABA-ITA (funkcionalizovaný polymer kyselinou itakonovou). Ve většině případů byly připraveny k sobě příslušné kopolymery PLGA-PEG-PLGA a ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA.

Tab. 3: Charakteristika zkoumaných polymerů

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

Jednotlivé vzorky jsou charakterizovány molekulovou hmotností M_n , která byla změřena pomocí GPC, molekulovou hmotností komerčně dodávaného PEG, hmotnostním PLGA/PEG

a molárním poměrem PLA/PGA. Dále byly na Ústavu materiálů provedeny analýzy NMR a IČ, pomocí kterých byla ověřována modifikace kyselinou itakonovou a struktura vzniklého polymeru. Jejich výsledky zde nejsou prezentovány, protože nejsou součástí této práce. V tab. 3 je uveden přehledný seznam testovaných polymerů. U všech vzorků byl sestaven sol-gel diagram. U některých byla sledována rychlost a průběh degradace.

4.3 Přístroje, zařízení, software

4.3.1 Příprava vzorků

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

4.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

- kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1100 Series, (Agilent Technologies, USA)
 - gradientové čerpadlo
 - vakuový odplyňovač
 - automatický dávkovač
 - termostat kolon
 - detektor s diodovým polem (DAD)
- kolona Restek Aqueous C18 (250 × 4,6 mm ID; 5 μm) a (150 × 2,1 mm ID; 3 μm), (Restek, USA)
- předkolona Restek Aqueous C18 (4 × 2 mm ID; 5 μm nebo 3 μm), (Restek, USA)

4.3.3 Gelová permeační chromatografie

- kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1100 Series, (Agilent Technologies, USA)
 - izokratické čerpadlo
 - vakuový odplyňovač
 - automatický dávkovač
 - termostat kolon
 - refraktometrický detektor (RID)
- kolona PLgel Mixed C (300 × 7,5 mm ID; 5 μm), (Polymer Laboratories, USA)
- předkolona PLgel Mixed C (50 × 7,5 mm ID; 5 μm), (Polymer Laboratories, USA)

4.3.4 Software pro zpracování a prezentaci dat

- Microsoft® Word
- Microsoft® Excel
- Chemstation Rev. A 02.01.
- Mn Agilent GPC – Addon Rev. A 02.02.
- Chemstation Rev. B 01.01.

4.4 Používané chemikálie a standardy

4.4.1 Chemikálie

- kyselina mravenčí, čistota p.a., (Riedel-de Haën, Německo)
- tetrahydrofuran, čistota gradient grade for liquide chromatography, LiChrosolv, (Merck KGaA, Německo)
- acetonitril, čistota gradient grade for liquide chromatography, (Lach:ner, Česká republika)
- dihydrofosforečnan draselný, čistota p.a., (Sigma-Aldrich, Německo)
- hydrogenfosforečnan draselný, čistota p.a., (Sigma-Aldrich, Německo)

4.4.2 Standardy

- kyselina glykolová p.a., (Merck KGaA, Německo)
- D, L-kyselina mléčná 90%, (Sigma-Aldrich, Německo)
- připraveny kalibrační řady o koncentracích 0,01 – 5 mg·ml⁻¹ pro kyselinu glykolovou a 0,1 – 7 mg·ml⁻¹ pro kyselinu mléčnou
- polystyrenové standardy EasyCal Mp = 580 – 377 400, (Polymer Laboratories, USA) o koncentraci od 3 do 5 mg·ml⁻¹

4.5 Stanovované analyty a jejich vlastnosti

Pro určení rychlosti degradace byl sledován nárůst kyseliny mléčné a glykolové v roztoku pufru.

4.5.1 Kyselina mléčná

- (C₃H₆O₃)
- D,L-2-hydroxypropanová kyselina
- M = 90,08 g·mol⁻¹
- teplota tání 53 °C (pro racemickou směs T_t = 16,8 °C)
- teplota varu 122 °C
- hustota 1,209 g·cm⁻³
- pK_a = 3,9
- v pevném stavu bílý prášek, vyskytuje se ve stavu kapalném jako bezbarvá hydroskopická kapalina.

4.5.2 Kyselina glykolová

- (C₂H₄O₃)
- hydroxyethanová kyselina
- M = 76,05 g·mol⁻¹
- teplota tání 70 – 74 °C
- hustota 1,27 g·cm⁻³
- pK_a = 3,83
- bílý prášek dobře rozpustný ve vodě

4.6 Příprava a degradace vzorků

Kopolymer PLGA-PEG-PLGA i kopolymer modifikovaný kyselinou itakonovou je vysoce viskózní a lepkavý. Nemodifikovaný kopolymer byl bezbarvý, modifikovaný byl jantarové barvy. Při přípravě vzorků bylo naváženo potřebné množství podle aktuální hmotností

koncentrace. K naváženému množství kopolymery bylo přidáno vypočítané množství Milli-Q vody pro dosažení potřebné koncentrace. Takto připravené vzorky byly za laboratorní teploty byly rozpouštěny ve vialkách, a to i několik dní. Doba, která byla nutná pro rozpuštění navážky, se u jednotlivých vzorků lišila. Nejdelší byla 10 dní. U modifikovaných vzorků byla tato doba kratší než u nemodifikovaných, což bylo pravděpodobně způsobeno koncovou skupinou –COOH, která je polární a usnadňuje rozpuštění ve vodě.

4.6.1 Stanovení kritické koncentrace gelu a kritické teploty gelu, sestavení sol-gel diagramu (inverzní vialková metoda)

Pro sledování gelovatění vzorků polymeru je nejjednodušší používanou metodou inverzní vialková metoda [71, 74, 78, 91]. Její výhodou je, že je levná, nenáročná, zapotřebí je pouze vhodná vodní lázeň; je možné také sledovat barevné změny, popř. zakalení roztoku. Nevýhodou je její nepřesnost (± 2 °C), malá exaktnost získaných dat (pouze lidské oko) a také časová náročnost. Přesto je dosud nejpoužívanější metodou pro sestavení fázového sol-gel diagramu. Dalšími metodami aplikovanými pro sledování změn vlastností gelu jsou především reologická měření [92-95], případně také spektrofotometrická měření (určení kritické micelární koncentrace) [71, 75].

Připravená koncentrační řada polymeru (4 – 24 %) byla použita pro sestavení fázového sol-gel diagramu. Vzorky byly umístěny do 4ml vialek. Vialky byly upevněny do stojanu a pak ponořeny do vodní lázně. Měření bylo prováděno v rozmezí teplot od 23 °C do 59 °C. Teplota vodní lázně byla postupně zvyšována o 1 °C. Vzorky byly při dané teplotě temperovány 5 minut. Po uplynutí tohoto intervalu byly lahvičky vyjmuty a byla pozorována změna viskozity a zbarvení každého vzorku. Změny byly zaznamenány a následně byl sestaven sol-gel diagram. Z diagramu byly určeny CGC CGT.

4.6.2 Degradace vzorků

Pro sledování degradace vzorku polymeru byla zvolena jednoduchá metoda, která mohla být použita v našich laboratorních podmínkách. Tento postup byl prezentován v několika odborných publikacích [35, 38, 41, 96-97]. Byly připraveny zásobní vzorky PLGA-PEG-PLGA a ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA kopolymery o různých koncentracích. Do vialek bylo napipetováno 300 μ l každého vzorku. Takto byly vialky ponechány v inkubátoru, dokud se z roztoku nestal gel. Následně bylo přidáno 700 μ l temperovaného fosfátového pufru o pH 7,4. Připravené vzorky byly ponechány v inkubátoru při 37 °C. Od prvního dne počátku inkubace bylo odebíráno 400 μ l fosfátového pufru, který tvořil fázové rozhraní hydrogelu a samotného fosfátového pufru. Tento odebraný pufr byl následně analyzován pomocí HPLC a zbytek hydrogelu byl 24 hodin lyofilizován.

4.6.3 Identifikace a kvantifikace degradačních produktů pomocí HPLC

Odebraný fosfátový pufr, který obsahoval degradační produkty, byl analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s DAD detektorem na přístroji Agilent 1100 Series.

4.6.3.1 Standardy

V odměrných baňkách o objemu 10 ml byl připraven zásobní roztok směšného standardu kyseliny glykolové a mléčné (GA a LA). Jejich koncentrace byly různé, protože v reálných vzorcích byla kyselina mléčná ve vyšších koncentracích než kyselina glykolová.

4.6.3.2 *Nastavení HPLC*

- mobilní fáze: 0,01 mol/l roztok kyseliny mravenčí, acetonitril
- poměr mobilních fází: (1:99) 0,01M HCOOH : acetonitril
- průtok mobilní fáze: 0,8 ml/min
- nástřik: 5 μ l
- teplota kolony: 30 °C
- vlnová délka: 192 nm
- izokratická eluce

4.6.4 *Analýza molekulové hmotnosti degradovaného polymeru*

Po odebrání 400 μ l fosfátového pufru byla inkubace vzorku ukončena. Po ukončení inkubace byl každý vzorek lyofilizován. Před lyofilizací byl vzorek zmražen v mrazničce na teplotu mínus 30 °C. Samotná lyofilizace probíhala při teplotě -80 °C a tlaku 15 Pa po dobu 24 hodin. Následně bylo z každého lyofilizovaného vzorku odebráno zhruba 5 mg zdegradovaného kopolymeru, který byl rozpuštěn v 1 ml tetrahydrofuranu. Po rozpuštění byla zjišťována změna molekulové hmotnosti a polydisperzity gelovou permeční chromatografií (GPC).

Lyofilizované a v tetrahydrofuranu rozpuštěné vzorky byly analyzovány pomocí gelové permeační chromatografie s refraktometrickým detektorem na přístroji Agilent 1 100 Series.

Analýza byla prováděna na koloně PLgel MixedC (300 \times 7,5 mm ID; 5 μ m) s předkolonou. Jako standardy byly použity polystyrenové standardy EasyCal, kdy podle návodu byl proužek s nanesenými standardy ponořen do 4 ml tetrahydrofuranu a asi po 1 hodině byly standardy rozpuštěny a připraveny pro měření. Hotové standardy byly uchovávány v ledničce. Kalibrační křivka byla vždy proměřena před každou analýzou nové sady vzorků.

4.6.4.1 *Nastavení GPC*

- mobilní fáze: tetrahydrofuran
- průtok mobilní fáze: 1 ml/min
- nástřik: 50 μ l
- teplota kolony: 30 °C
- teplota detektoru: 30 °C

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Fázové sol-gel diagramy

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

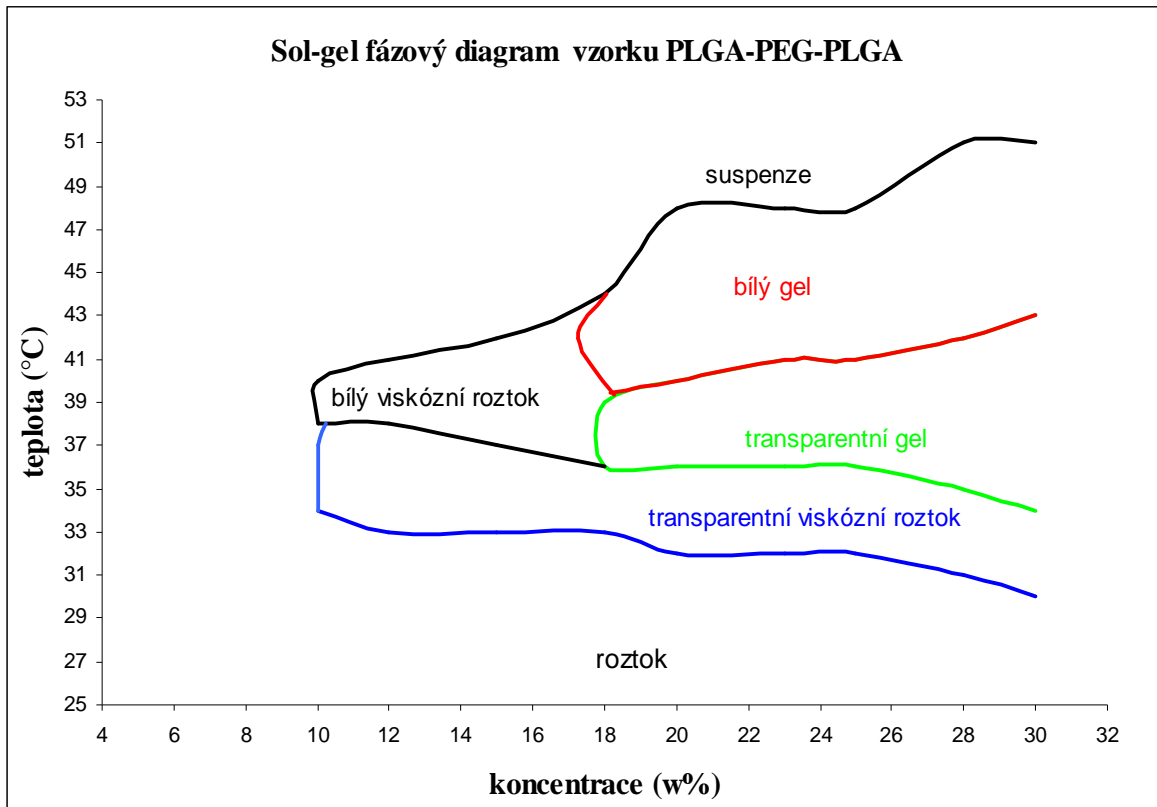
Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.8.5.4, složení kopolymery (M_n , poměry jednotlivých polymerů) ovlivňuje kromě rozpustnosti, kritické teploty a koncentrace gelování také průběh celého procesu tvorby gelu (sol-gel fázový diagram). Do následující tabulky byl pro přehlednost zpracován souhrn všech prováděných experimentů.

Tab. 4: Souhrnná tabulka provedených experimentů

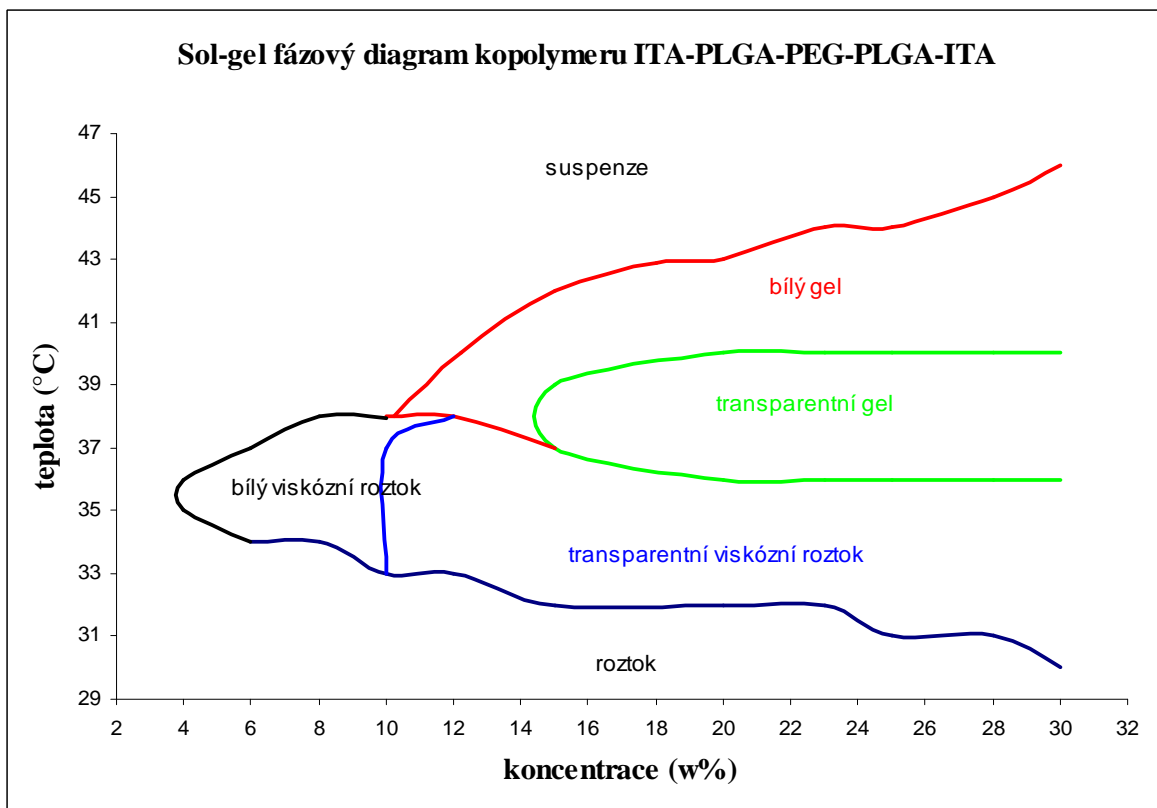
vzorek	typ	rozpustnost ve vodě	sol-gel diagram	degradace
1	PLGA-PEG-PLGA	ano	ano	ne
2	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	ano	ano	ne
3	PLGA-PEG-PLGA	ano	ano	ne
4	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	ano	ano	ne
5	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	ano	ano	ne
6	PLGA-PEG-PLGA	ano	ano	ano
7	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	ano	ano	ano
8	PLGA-PEG-PLGA	ano	ano	ano
9	PLGA-PEG-PLGA	ne	ne	ne
10	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	ne	ne	ne
14	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	ano	ano	ne
16	ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	ano	ano	ano
17	PLGA-PEG-PLGA	ano	ano	ano

Ze všech vzorků rozpustných ve vodě byly pro sestavení sol-gel fázového diagramu připraveny roztoky kopolymery ve vodě. U většiny vzorků to byly roztoky v rozmezí koncentrací 4 – 24 %. U některých vzorků nebylo větší množství polymeru už rozpustné, a proto byl sledovaný rozsah koncentrací jiný.

Na následujících stránkách jsou uvedeny získané sol-gel fázové diagramy pro jednotlivé vzorky. Současně je zde také uveden vizuální popis fázové změny.



Obr. 13: Sol-gel fázový diagram vzorku 1 (PLGA-PEG-PLGA)



Obr. 14: Sol-gel fázový diagram vzorku 2 (ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA)

U všech vzorků bylo vizuální pozorování průběhu vzniku gelu obdobné. Z tekutého roztoku polymeru se při postupném zvyšování teploty stává viskózní roztok, a to buď transparentní, nebo bílý, v závislosti na daném vzorku, teplotě a koncentraci. Při nízkých koncentracích zůstávají vzorky jenom tekuté a s teplotou mění pouze barvu. Okolo teploty 37 °C vzniká transparentní gel, který se zvyšující se teplotou přechází na bílý gel. Při teplotách okolo 45 °C dochází k vysrážení polymeru a rozdělení vzorku na dvě fáze (polymer a voda). Při opětovném zchlazení se vzorek polymeru znovu rozpustí a vykazuje opět sol-gel přechod. Pozorování odpovídá výsledkům uvedeným v kapitole 3.8.5.3.

Vzorek 1 a 2 má poměry PLGA/PEG 2,50 a PLA/PGA 3,00, M_n PEG je 1 500 g·mol⁻¹. Vzorek 2 je modifikován ITA a jeho molekulová hmotnost je o něco málo menší než molekulová hmotnost původního kopolymery. Malé snížení molekulové hmotnosti se projevilo u všech vzorků (o 100–200). Pro oblast transparentního gelu byla určena kritická teplota (CGT) a kritická koncentrace gelovatění (CGC) (Obr. 13: a Obr. 14:). U obou vzorků se tato teplota pohybovala okolo 37°C, u modifikovaného kopolymery došlo k snížení CGC. Z grafu je zřejmé, že při nižších koncentracích nedochází vůbec k tvorbě gelu (4–8 %). U vzorku 2 je celková oblast gelu (transparentní i bílý gel) mnohem širší než u vzorku 1. Oba vzorky jsou vhodné pro sledování degradace při teplotě lidského těla 37 °C.

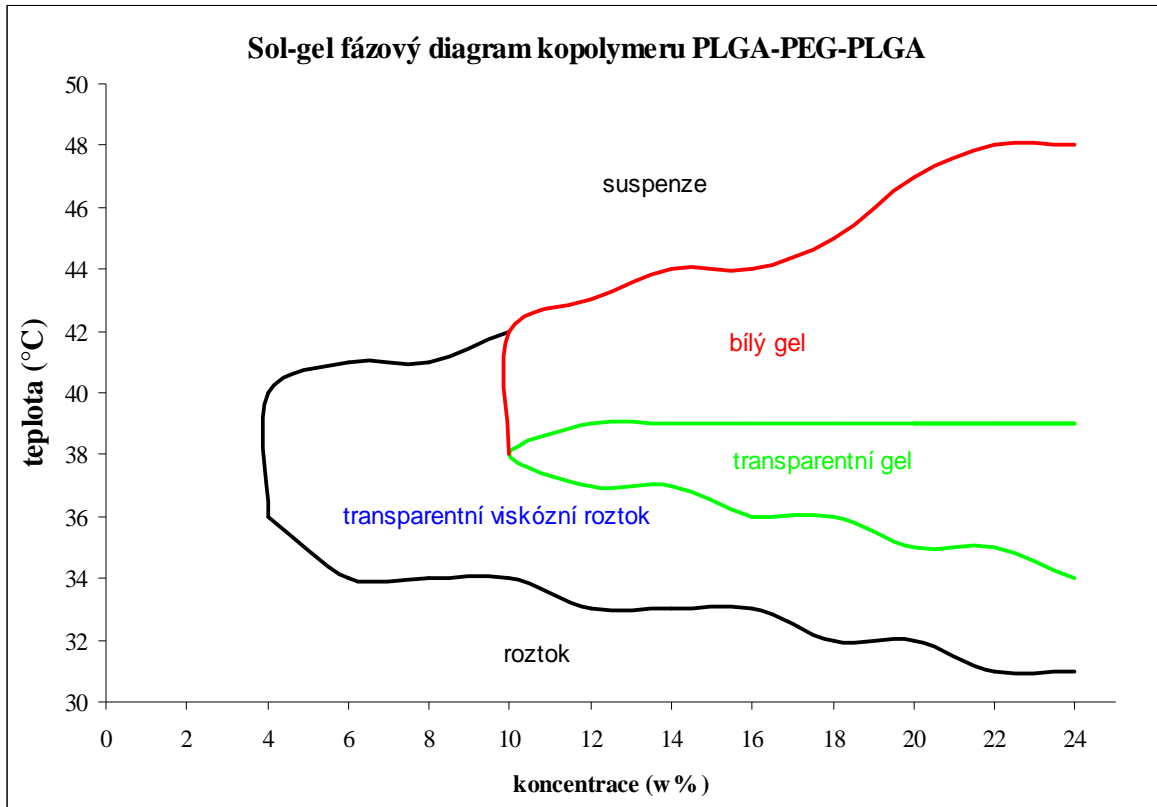
Tab. 5: Kritická teplota a koncentrace gelovatění pro vzorek 1 a 2

vzorek	CGT (°C)	CGC (w%)
1 (bez ITA)	37	18
2 (s ITA)	38	14

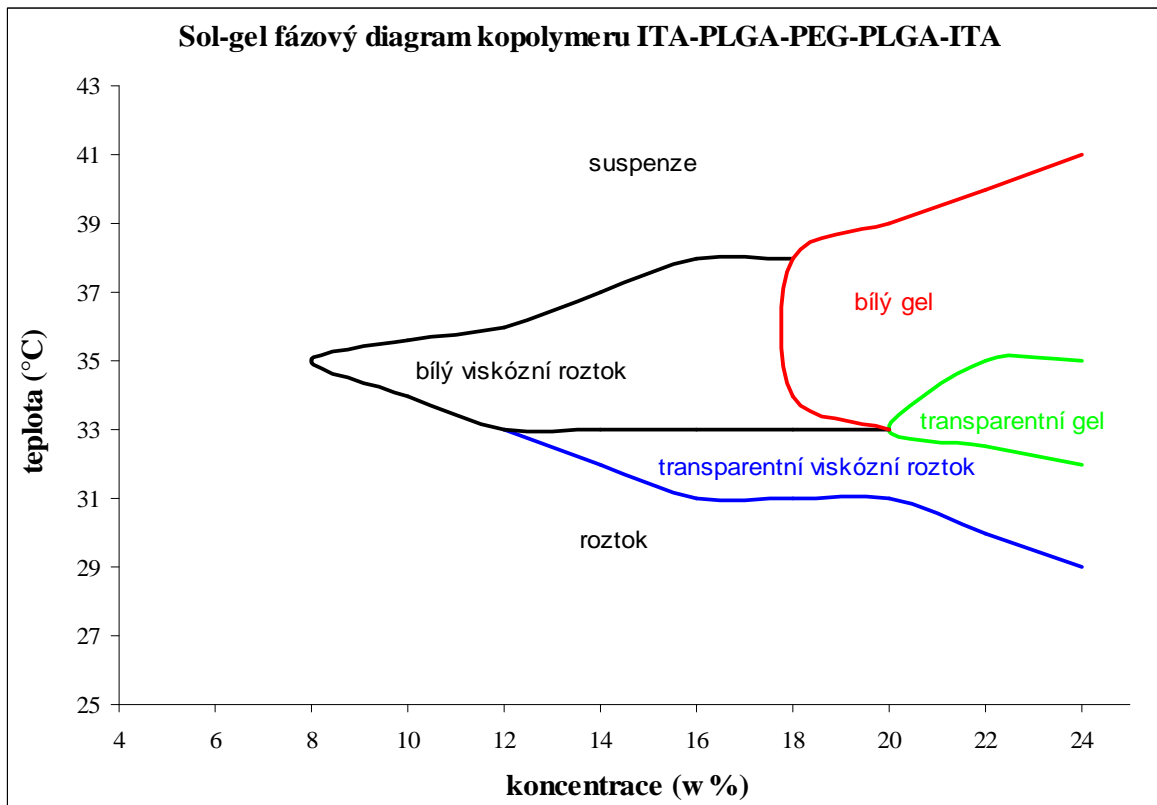
Vzorek 3 a 4 má poměry PLGA/PEG 2,50 a PLA/PGA 3,00, M_n PEG je 1 500 g·mol⁻¹, stejně jako u vzorků 1 a 2. V porovnání s předchozími vzorky měly tyto výsledné polymery asi o 500 g·mol⁻¹ větší molekulovou hmotnost. Z grafů je patrný především výrazný posun CGT pro vzorek 4 (Obr. 15: a Obr. 16:). Lze si to vysvětlit tak, že při modifikaci zřejmě došlo k většímu navázání kyseliny itakonové, což následně způsobilo posun CGT. Tyto vzorky nebyly použity pro sledování degradace. U modifikovaného vzorku je pro dosažení fáze gelu nutné použít více koncentrovaný roztok. Ke vzniku dvou fází (suspenze) dochází rovněž při nižší teplotě (asi 40 °C) než u vzorku bez ITA.

Tab. 6: Kritická teplota a koncentrace gelovatění pro vzorek 3 a 4

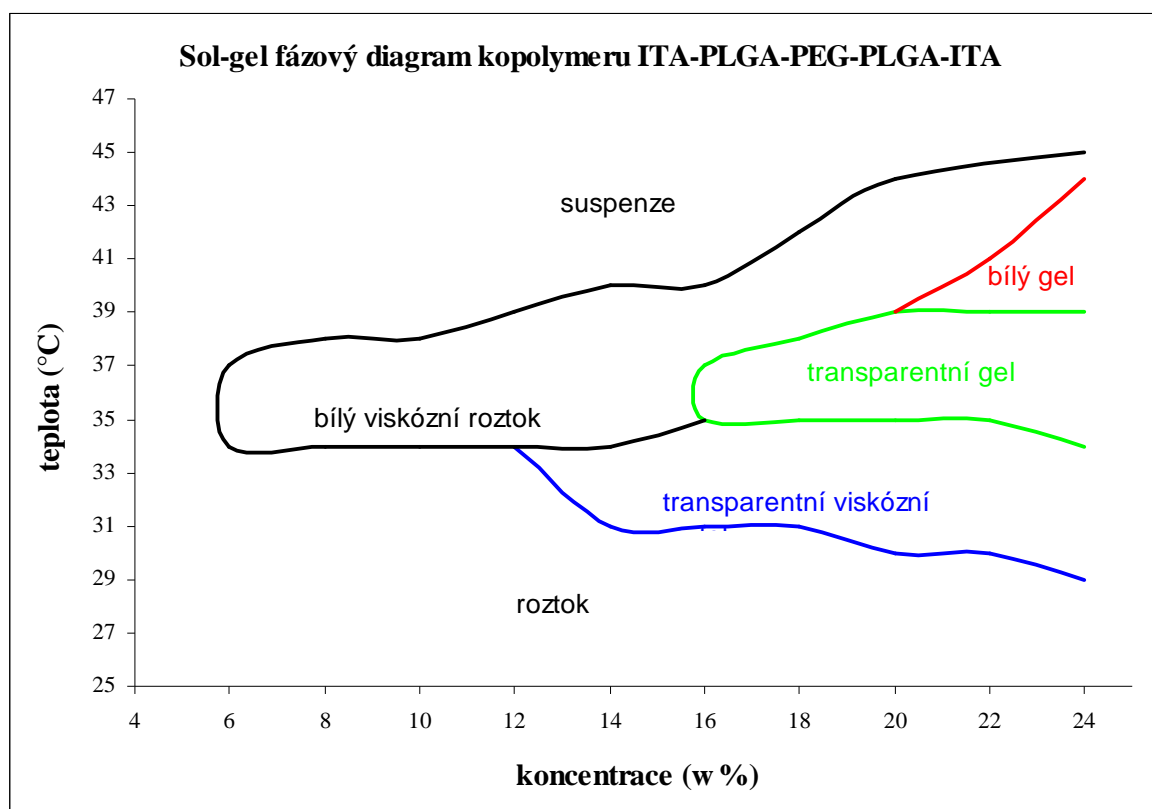
vzorek	CGT (°C)	CGC (w%)
3 (bez ITA)	38	10
4 (s ITA)	33	20



Obr. 15: Sol-gel fázový diagram vzorku 3 (PLGA-PEG-PLGA)



Obr. 16: Sol-gel fázový diagram vzorku 4 (ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA)

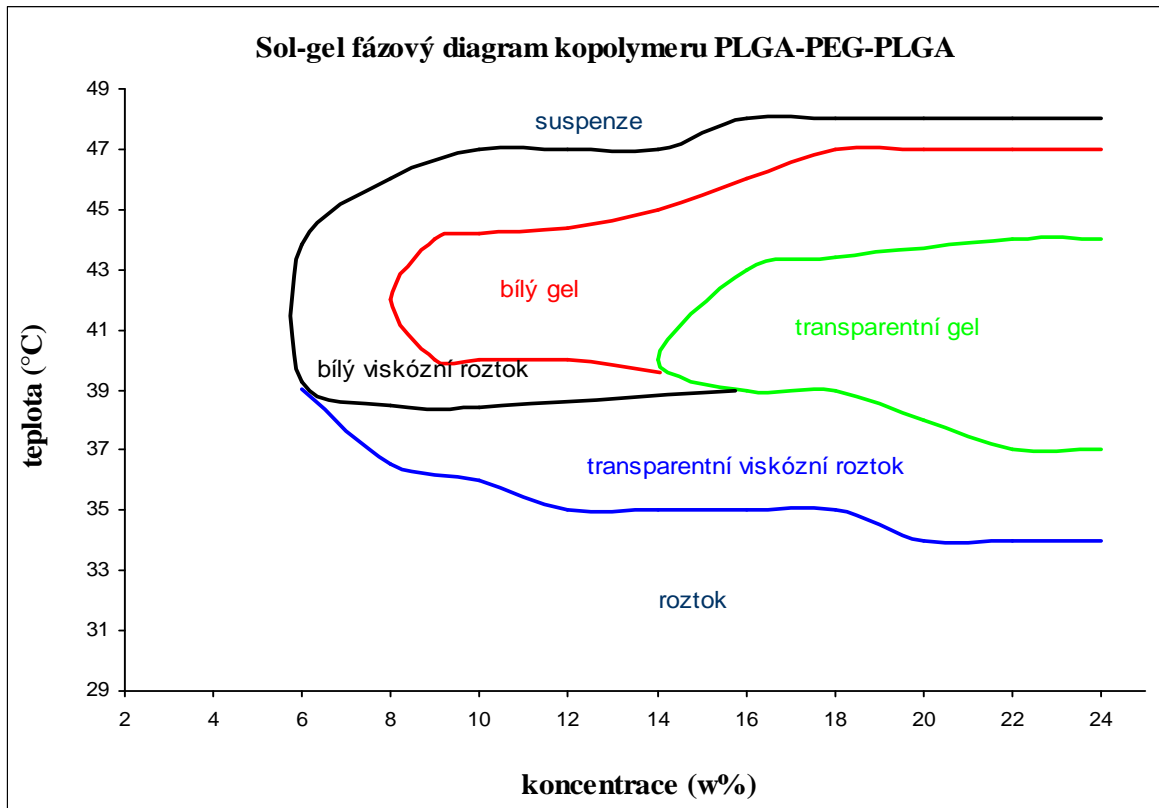


Obr. 17: Sol-gel fázový diagram vzorku 5 (ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA)

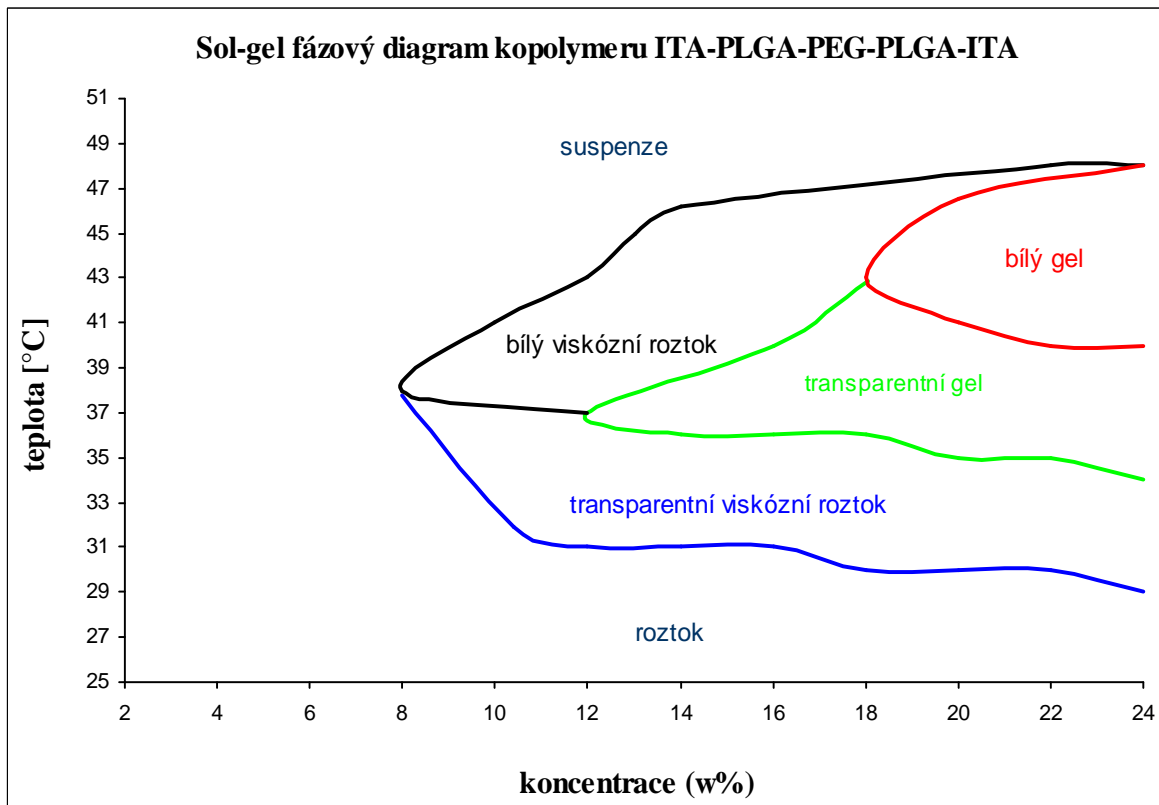
Vzorek 5 (Obr. 17:) má poměry PLGA/PEG 2,50 a PLA/PGA 3,00, M_n PEG je $1\,500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, stejně jako u předchozích vzorků. Vzorek 5 je modifikován ITA, příslušný nemodifikovaný vzorek k němu je vzorek 3. Pro oblast transparentního gelu byla určena kritická teplota (CGT) a kritická koncentrace gelovatění (CGC) (Tab. 7:). Při porovnání hodnot se stejným vzorkem (vzorek 4) bylo dosaženo lepších výsledků. Oblast transparentního gelu je širší, vzniká při vyšší teplotě a již od koncentrace 16 % (oproti 20 %). Tento vzorek nebyl použit pro provedení degračních pokusů.

Tab. 7: Kritická teplota a koncentrace gelovatění pro vzorek 5

vzorek	CGT (°C)	CGC (w%)
5 (s ITA)	36	16



Obr. 18: Sol-gel fázový diagram vzorku 6 (PLGA-PEG-PLGA)



Obr. 19: Sol-gel fázový diagram vzorku 7 (ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA)

Vzorek 6 a 7 (Obr. 18: a Obr. 19:) má poměry PLGA/PEG 2,50 a PLA/PGA 3,00, M_n PEG je $1\,500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, shodně s předchozími vzorky. Pro oblast transparentního gelu byla určena kritická teplota (CGT) a kritická koncentrace gelovatění (CGC) (Tab. 8:). Pro modifikovaný gel je CGT při teplotě 37°C . Transparentní gel se tvoří od 12 % do 24 %, pro nemodifikovaný transparentní gel je toto rozmezí 14 % až 24 %. U vzorku 6 (bez ITA) se tvoří gel již od 8 % a od teploty 39°C ; gel však byl zakalený až bílý. Z grafů je zřetelně vidět, že celková oblast gelu je u modifikovaného polymeru mnohem užší. Vzorky byly použity pro sledování průběhu degradace.

Tab. 8: Kritická teplota a koncentrace gelovatění pro vzorek 6 a 7

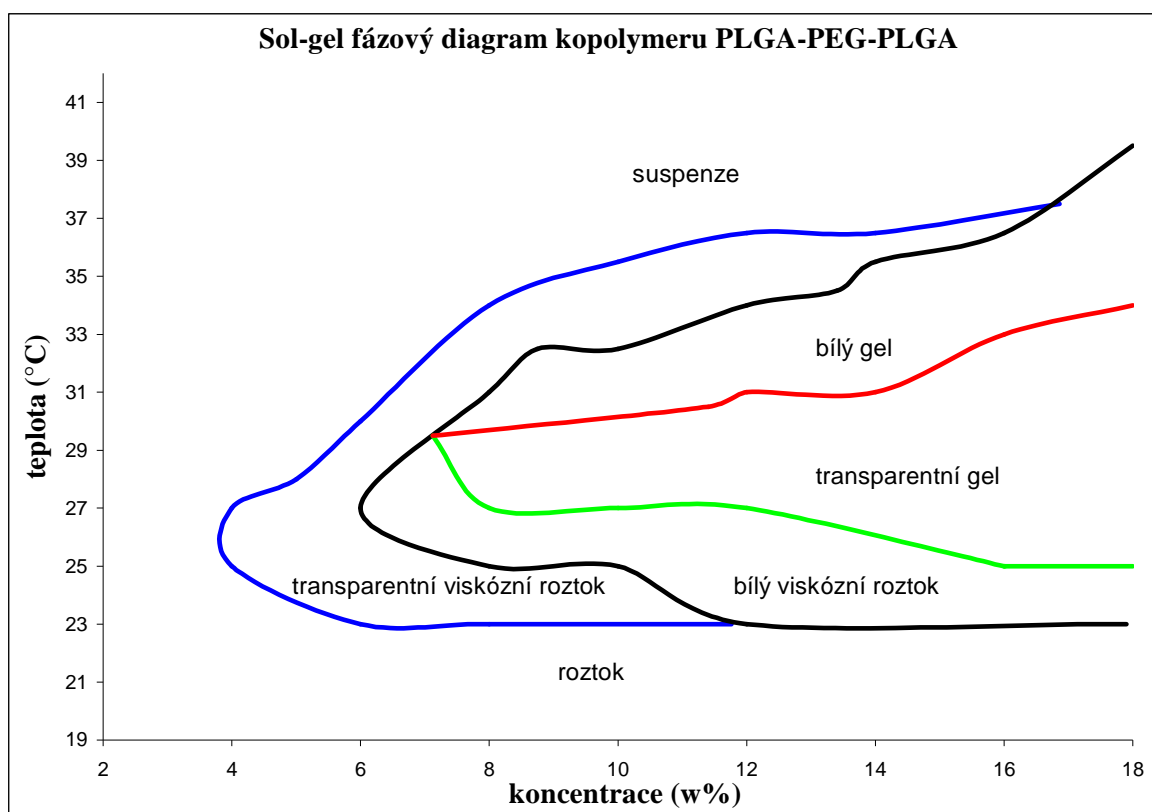
vzorek	CGT ($^\circ\text{C}$)	CGC (w%)
6 (bez ITA)	39	14
7 (s ITA)	37	12

Vzorek 8 (Obr. 20:) má poměry PLGA/PEG 2,50 a PLA/PGA 3,00, M_n PEG je $1\,500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, stejně jako u předchozích vzorků, avšak průběh syntézy byl v některých krocích odlišný. Především se používaly přečištěné vzorky komerčně dostupných chemikálií a teplota při syntéze byla nižší (viz. kapitola 4.1). Pro oblast transparentního gelu byla určena kritická teplota (CGT) a kritická koncentrace gelovatění (CGC) (Tab. 9:). Při porovnání s předchozími vzorky stejného složení je sol-gel diagram tohoto vzorku značně odlišný. Kritická gelační teplota je už 30°C , při koncentraci 6 %. Při rozpouštění vzorku pro následné testy musely být koncentrace roztoků nižší než u jiných vzorků. Při koncentraci nad 18 % se už vzorek nerozpustil. Vzorek byl dále použit pro sledování degradace při 37°C ve fázi bílého gelu.

Tab. 9: Kritická teplota a koncentrace gelovatění pro vzorek 8

vzorek	CGT ($^\circ\text{C}$)	CGC (w%)
8 (bez ITA)	30	6

U dalších dvou vzorků 9 a 10 bylo změněno složení kopolymery. Poměr PLGA/PEG byl 3,75 a PLA/PGA 3,00, M_n PEG byl $1\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. V polymeru se zvýšil obsah hydrofobní složky (PLGA) a to způsobilo, že tyto polymery (i v případě polymeru modifikovaného ITA) nebyly rozpustné ve vodě, ale pouze v organickém rozpouštědle. Z tohoto důvodu nebyly u vzorků sestaveny sol-gel diagramy.

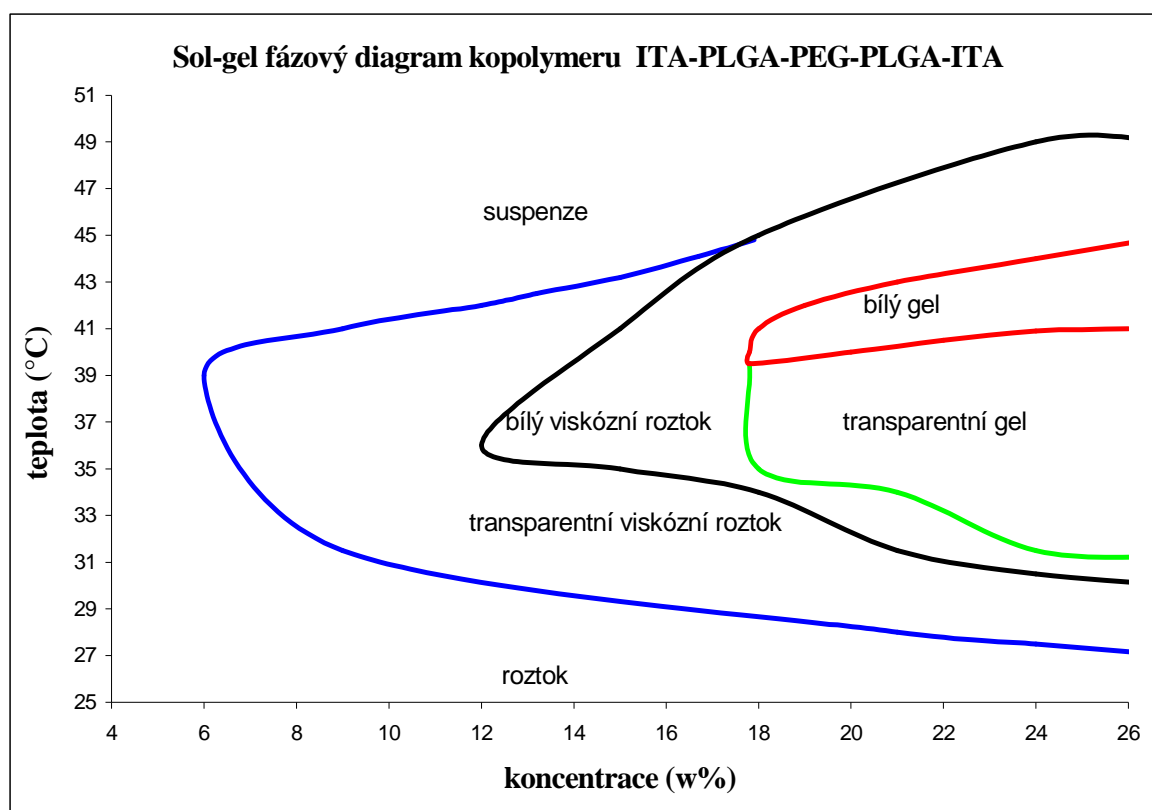


Obr. 20: Sol-gel fázový diagram vzorku 8 (PLGA-PEG-PLGA)

Vzorek 14 byl připraven a testován jenom jako kopolymer, modifikovaný kyselinou itakonovou (Obr. 21:). Poměry jsou následující: PLGA/PEG 2,00 a PLA/PGA 2,42, M_n PEG je $1\,500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Pro oblast transparentního gelu byla stanovena kritická teplota (CGT) 35 °C a kritická koncentrace gelovatění (CGC) 18 % (Tab. 10:). Transparentní gel se tvořil při vyšší koncentraci a již od teploty 39 °C přecházel na bílý gel. Celková molekulová hmotnost polymeru byla stanovena pomocí GPC a byla asi o $2000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ menší než u předchozích kopolymerů. Vzorek sice vytvářel gel, avšak ten velmi rychle degradoval a došlo k rozpuštění gelu. Proto s ním nebyly provedeny degradační pokusy.

Tab. 10: Kritická teplota a koncentrace gelovatění pro vzorek 14

vzorek	CGT (°C)	CGC (w%)
14 (s ITA)	35	18

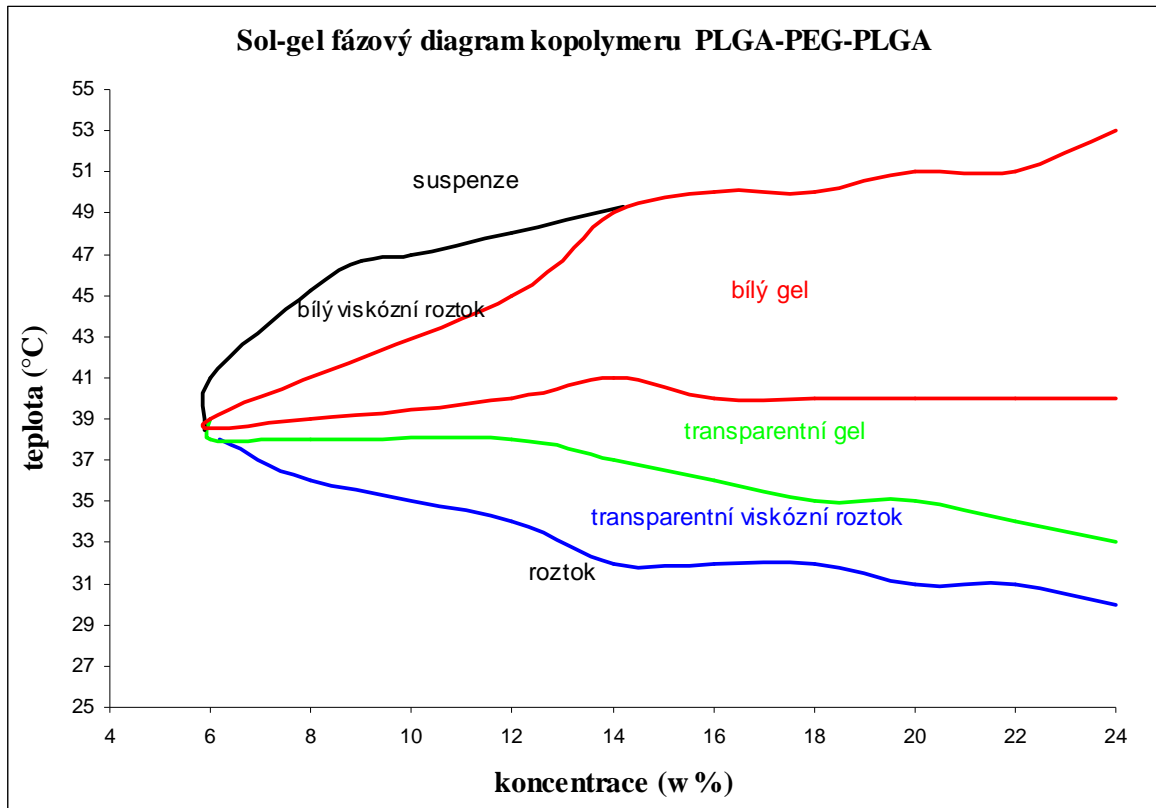


Obr. 21: Sol-gel fázový diagram vzorku 14 (ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA)

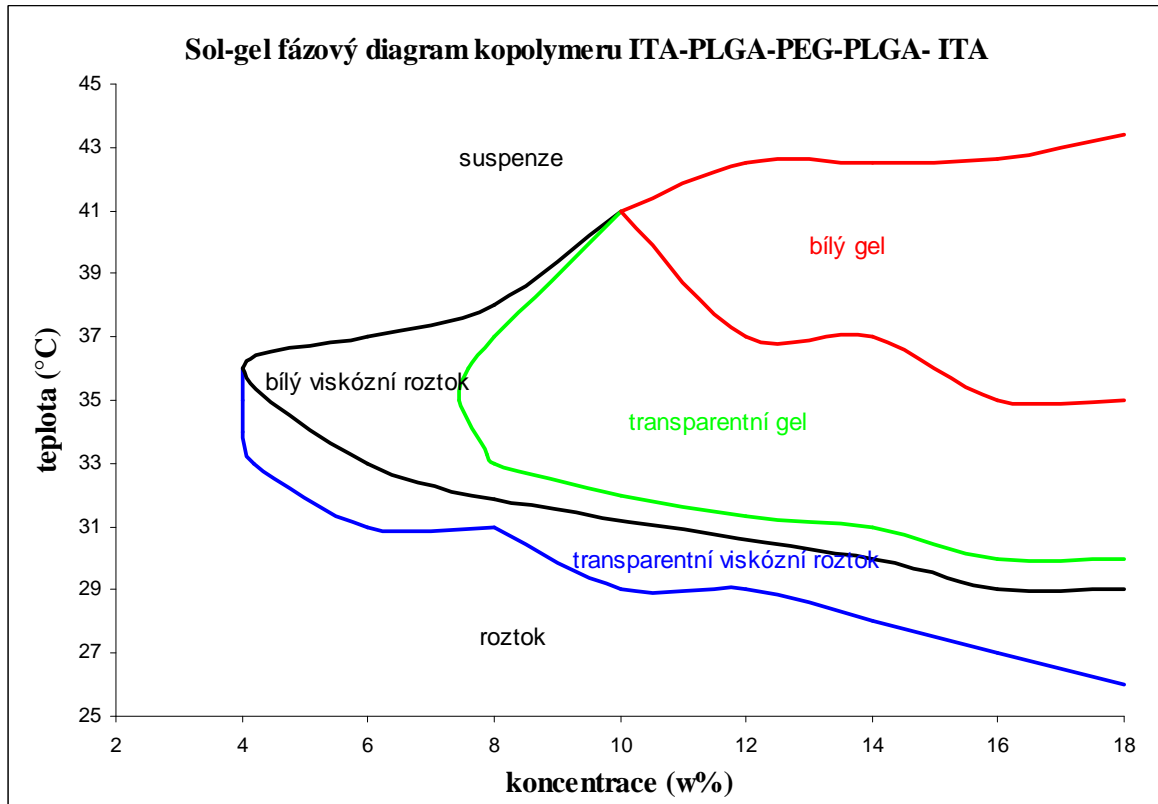
Vzorek 16 a 17 (Obr. 23: a Obr. 22:) má poměry PLGA/PEG 2,00 a PLA/PGA 3,00, M_n PEG je $1\,500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, shodně s předchozími vzorky. Pro oblast transparentního gelu byla určena kritická teplota (CGT) a kritická koncentrace gelovatění (CGC) (Tab. 8:). Pro modifikovaný polymer je kritická teplota CGT 37°C . Transparentní gel se tvoří již v rozmezí od 12 % až do 24 %, pro nemoifikovaný transparentní gel je tento rozsah od 14 % do 24%. U vzorku 16 (bez ITA) se sice tvoří gel už od 8 % od teploty 39°C , ale je bíle zakalený až bílý. Z grafů vyplývá, že celková oblast gelu je u modifikovaného polymeru mnohem užší. Vzorky byly použity pro sledování průběhu degradace.

Tab. 11: Kritická teplota a koncentrace gelovatění pro vzorek 16 a 17

vzorek	CGT ($^\circ\text{C}$)	CGC (w%)
17 (bez ITA)	38	6
16 (s ITA)	35	8



Obr. 22: Sol-gel fázový diagram vzorku 17 (PLGA-PEG-PLGA)



Obr. 23: Sol-gel fázový diagram vzorku 16 (ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA)

5.2 Studium degradace blokového kopolymeru

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

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

Po přerušení degradace bylo z roztoku pufru nad gelem odebráno 0,4 ml pro analýzu obsahu konečných degradačních produktů kopolymeru, zjišťovaných pomocí HPLC. Zbytek polymeru ve vialce byl zmražen a poté lyofilizován. Bezvodý zbytek polymeru byl po degradaci navážen a rozpuštěn v tetrahydrofuranu a následně analyzován GPC, v souladu s literaturou [32, 35, 41-42, 71, 98-99].

5.2.1 Problémy při přípravě roztoků polymeru

Při sledování rozdílů mezi polymerem modifikovaným ITA a bez modifikace ITA byly první rozdíly pozorovány již při samotné přípravě vzorků. Modifikované vzorky měly tmavší barvu a byly o něco měkčí a mazlavější. Jejich důležitou vlastností je, že se při stejných podmínkách rozpouští rychleji než vzorky nedomodifikované. To je pravděpodobně zapříčiněno koncovými karboxylovými skupinami. Rozpustnost vzorků se pohybovala v časovém rozmezí od 5 do 14 dnů. Rozpouštění bylo postupné. Tuhý vzorek xerogelu nejdříve nabotnal a poté se pomalu rozpouštěl. Již při rozpouštění docházelo k částečné degradaci polymeru, avšak pokles molekulové hmotnosti nebyl zase tak výrazný (max. o 300 g·mol⁻¹). Vzorky s vyšší koncentrací se rozpouští pomaleji.

Samotná degradace byla ukončena v případě, že hydrogel už nebyl v roztoku pufru tuhý (byl již rozpuštěný a polymer sedimentovaný u dna). Tato doba degradace nebyla u všech vzorků stejná.

5.2.2 Sledování degradace různých kopolymerů PLGA-PEG-PLGA

Pro samotné pozorování degradace byly použity vzorky různého složení. Nutná podmínka byla, že musí být rozpustné a tvořit gel, a to nejlépe v rozmezí 36 – 42 °C. Pro tyto účely byly vhodné vzorky 5, 6, 7, 8, 16 a 17. V publikacích se pro studium degradace nejčastěji používají metody pro sledování změny hmotnosti předmětu, molekulové hmotnosti a termoanalytické metody jako DSC [96, 100-101].

Za účelem posouzení celkového průběhu degradace pomocí sledování molekulové hmotnosti bylo nejvhodnější spočítat procentuální pokles molekulové hmotnosti v průběhu degradace. Doba degradace byla zvolena pro všechny vzorky stejná, a to 11 dnů. Hodnota pH pufru, ve kterém degradace probíhala, byla 7,4. V Tab. 12: jsou uvedeny všechny vypočítané hodnoty poklesu M_n (%) pro různé koncentrace polymeru. Procentuální vyjádření je vhodnější z toho důvodu, že počáteční molekulová hmotnost polymeru nebyla nikdy úplně stejná a

přímé porovnání by nemělo smysl. Vzorek 5 a 7 má v souladu s podmínkami syntézy stejné složení. Mezi vzorky jsou přesto rozdíly, i když ne příliš velké. Vzorek 6 a 8 také patří svým složením do stejné skupiny. U těchto vzorků však již byly rozdíly výrazné. U vzorku 8 byl mírně změněn postup při syntéze, vzorek byl připraven z přesublimovaných látek (větší čistota). Vzorek byl tvrdší a špatně rozpustný ve vodě, a proto nejvyšší koncentrace byla pouze 20 %. Přes jeho horší rozpustnost degradoval rychleji, než stejný vzorek 6. U kopolymerů 16 a 17 byl nižší poměr PLGA/PEG. To bylo také důvodem rychlejší degradace, ve srovnání se vzorky 6 a 7.

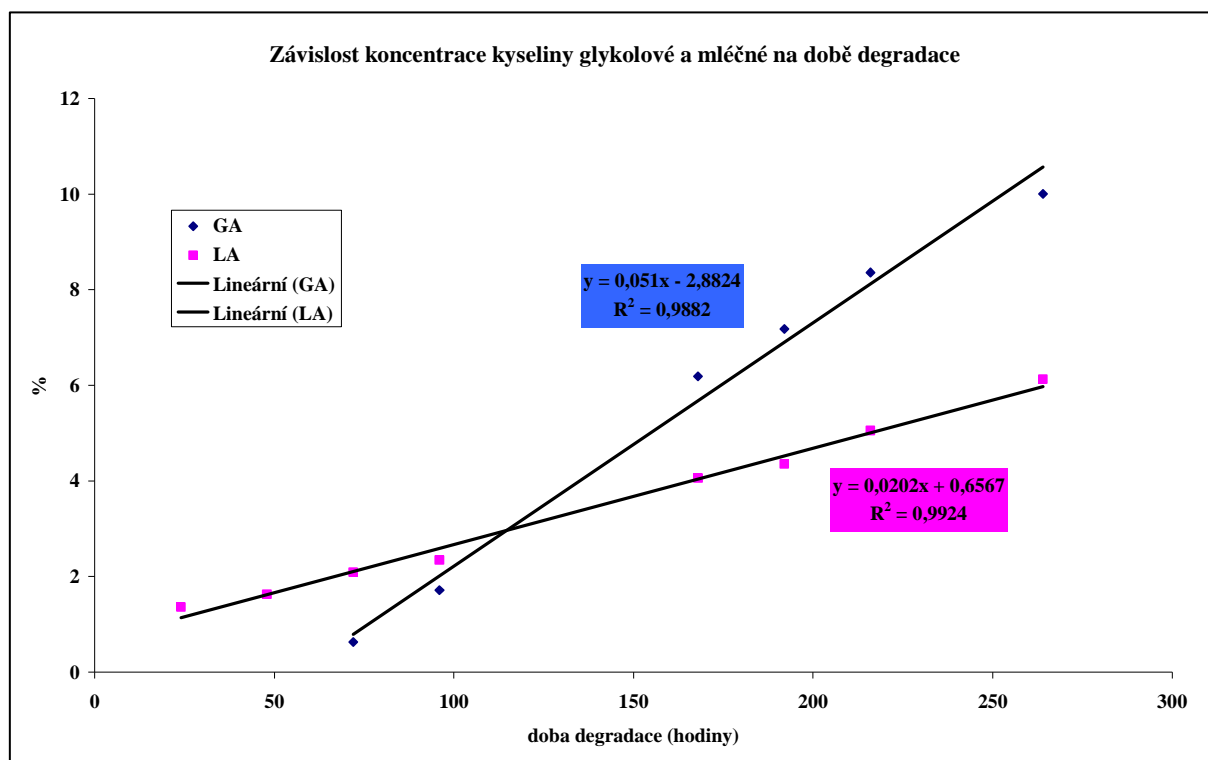
Tab. 12: Pokles molekulové hmotnosti M_n (%) po 11 dnech degradace

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

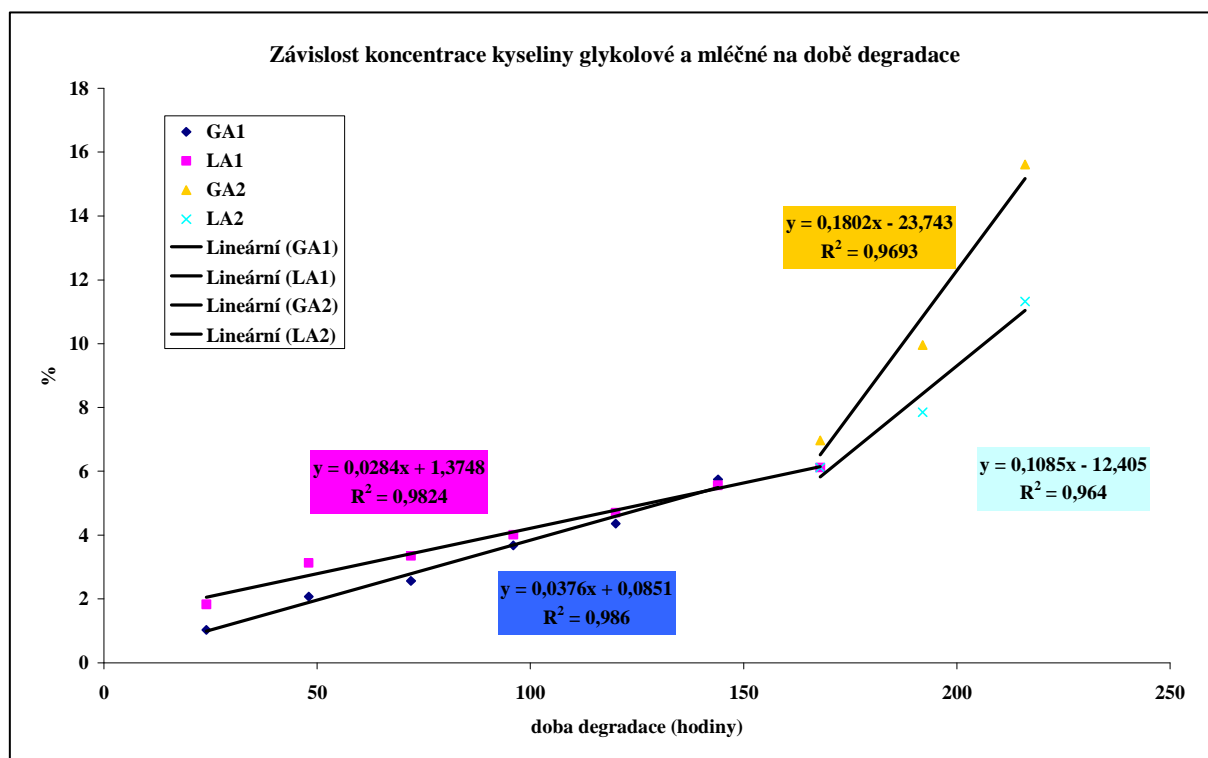
Při degradaci byl rovněž sledován nárůst kyseliny glykolové a kyseliny mléčné v roztoku pufru. Ve všech vzorcích bylo trojnásobné množství kyseliny mléčné oproti kyselině glykolové (PLA/PGA = 3,00). Nalezené koncentrace kyseliny mléčné v pufru byly rovněž větší než u kyseliny glykolové. Při proměření vzorků odebraných po 24 hodinách se u nižších koncentrací polymeru (a především u polymeru bez ITA) stávalo, že koncentrace GA byla pod detekčním limitem a první pozorovatelná koncentrace byla zjišťována až po více dnech (Graf 1:). Naopak u kyseliny mléčné je z uvedených závislostí patrné, že nějaká LA se do pufru uvolnila hned po zalití hydrogelu. To je zřejmě způsobeno částečnou degradací kopolymeru už při přípravě a rozpouštění xerogelu v MilliQ vodě. Lze předpokládat, že shodně se chová i kyselina glykolová, kterou však vzhledem k její nižší koncentraci nebylo možné v roztocích detekovat.

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

Zajímavá situace nastala u některých vzorků (vzorky 5, 6, 7), u kterých rychlost degradace měla po určitém čase zlomový charakter a probíhala rychleji [34]. Tento jev nebyl pozorován u všech vzorků. Pro tento případ byla získaná experimentální data proložena dvěma lineárními závislostmi a pro výpočet 5 % byla použita ta, u které byl předpoklad k dosažení této hodnoty (příkladem je Graf 2:).



Graf 1: Vzorek 17, koncentrace 20 %; závislost nárůstu koncentrace kyseliny glykolové a mléčné v procentech (vztaženo k teoretickému množství obsaženém v polymeru); rozdíl mezipočáteční koncentrací kyselin v roztoku



Graf 2: Vzorek 5, koncentrace 16 %; závislost nárůstu koncentrace kyseliny glykolové a mléčné v procentech (vztaženo k teoretickému množství obsaženém v polymeru); změna rychlosti degradace charakterizována proložení dvěma lineárními závislostmi

V Tab. 13: jsou shrnuty vypočítané hodnoty doby degradace (hod) a s ní související příslušné změny koncentrace (%), nárůst koncentrace kyselin v roztoku). Znamená to, že např. pro vzorek 5, koncentraci 16% a pro kyselinu glykolovou byla pozorována změna rychlosti degradace po 167 hodinách, což odpovídalo 6,3 % z teoretického množství polymeru.

Tab. 13: Hodnoty času (hod) a k němu příslušné koncentrace (%) při změně průběhu degradace pro vzorky 5, 6 a 7; n – průběh degradace nevykazoval změnu

	kyselina glykolová		kyselina mléčná	
	koncentrace %	hodiny	%	hodiny
5	16	167	6,3	156
	20	164	8,2	130
	24		n	
6	16	232	4,8	213
	20	181	3,9	n
	24	214	6,3	146
7	16		n	
	20	230	13,6	195
	24	244	15,6	225

V Tab. 14: jsou v hodinách uvedeny hodnoty ($t_{5\%}$), při kterých bylo přítomno v roztoku pufru 5 % kyseliny glykolové a kyseliny mléčné z teoretického množství výchozího polymeru. Závislost koncentrace kyselin na době degradace byla vyjádřena pomocí lineární regrese. Z rovnic přímkou byla potom vypočítána doba odpovídající zdegradovaným 5 % polymeru. Z hodnocení závislosti nárůstu kyseliny glykolové je patrné, že se zvyšující se koncentrací roztoku polymeru se rychlost degradace zvyšuje. Je to pravděpodobně způsobeno zvyšující se koncentrací kyseliny glykolové v roztoku (z důvodu vyšší koncentrace polymeru), to má za následek mírné snížení pH, které způsobuje rychlejší vnitřní degradaci. Dále bylo prokázáno, že u vzorků modifikovaných kyselinou itakonovou je 5 % dosaženo mnohem dříve než u vzorků nemodifikovaných (až téměř o polovinu času v porovnání s příslušnými vzorky nemodifikovanými). Pro dvojici vzorků 6 (bez ITA) a 7 (s ITA) byla pro koncentraci 16 % stanovena doba 224 hodin, resp. 111, pro 20 % 181 hodin, resp. 91 a pro 24 % 170 hodin, resp. 86. Pro kyselinu mléčnou není tento vliv koncentrace polymeru tak výrazný. Dokonce bylo prokázáno, že u některých vzorků vedla zvýšená koncentrace k posunutí $t_{5\%}$ k vyšší hodnotě, než u koncentrace nižší (vzorky 6, 8, 16 a 17). Na základě toho lze konstatovat, že změna pH nemá na degradaci bloku polymeru kyseliny mléčné takový vliv, jako u kyseliny glykolové.

Při dalším porovnání rozdílů mezi nárůstem koncentrace kyseliny glykolové a mléčné je výrazná především větší směrnice pro závislost koncentrace kyseliny mléčné na čase. Z toho vyplývá rychlejší degradace PGA spolu s PEG. Je to dáno jejich charakterem, protože GA a PEG jsou hydrofilnější a zvýšený obsah PLA snižuje rychlost degradace [20].

Tab. 14: Doba (hod), po které bylo zdegradováno 5 % původního polymeru na jednotlivé kyseliny (glykolovou a mléčnou)

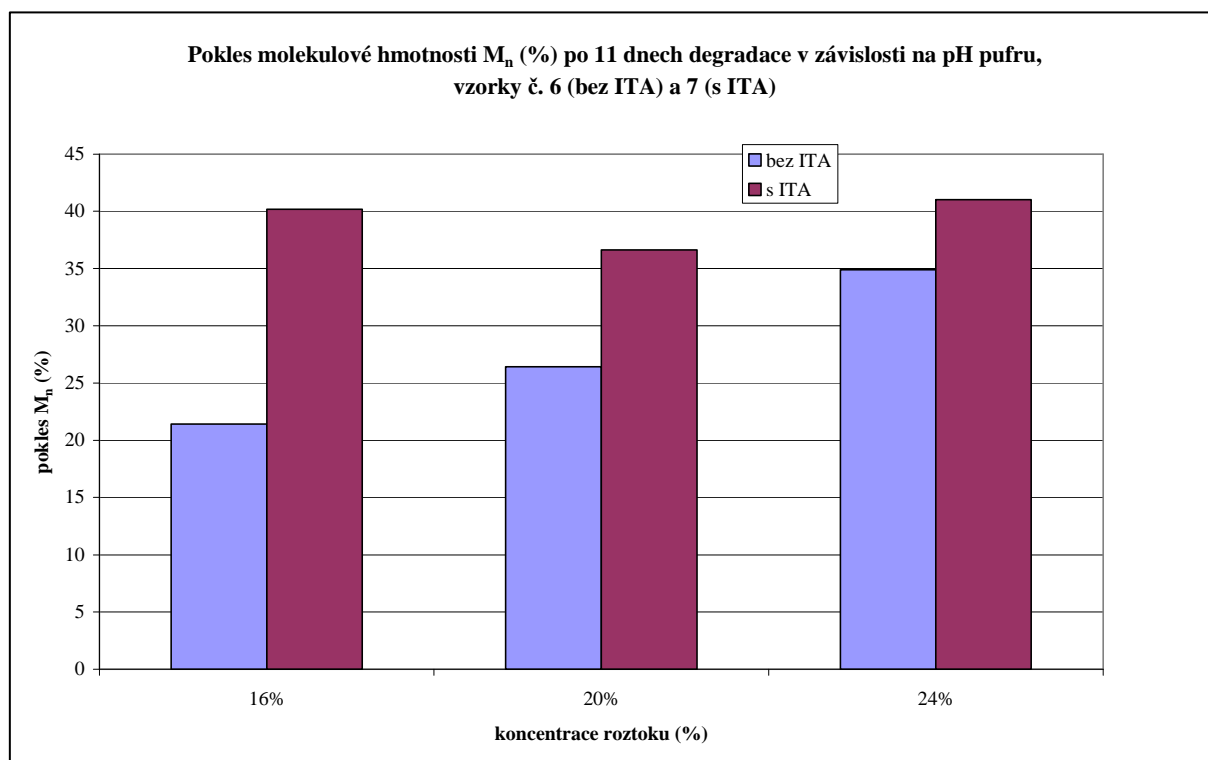
	koncentrace	kyselina glykolová	kyselina mléčná
	%	(hod)	(hod)
5 (bez ITA)	16	173	184
	20	151	155
	24	128	141
6 (bez ITA)	16	224	270
	20	181	292
	24	170	286
7 (s ITA)	16	111	165
	20	91	149
	24	86	142
8 (bez ITA)	12	113	118
	16	108	135
	20	98	136
16 (s ITA)	16	77	90
	20	103	110
	24	71	73
17 (bez ITA)	16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

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

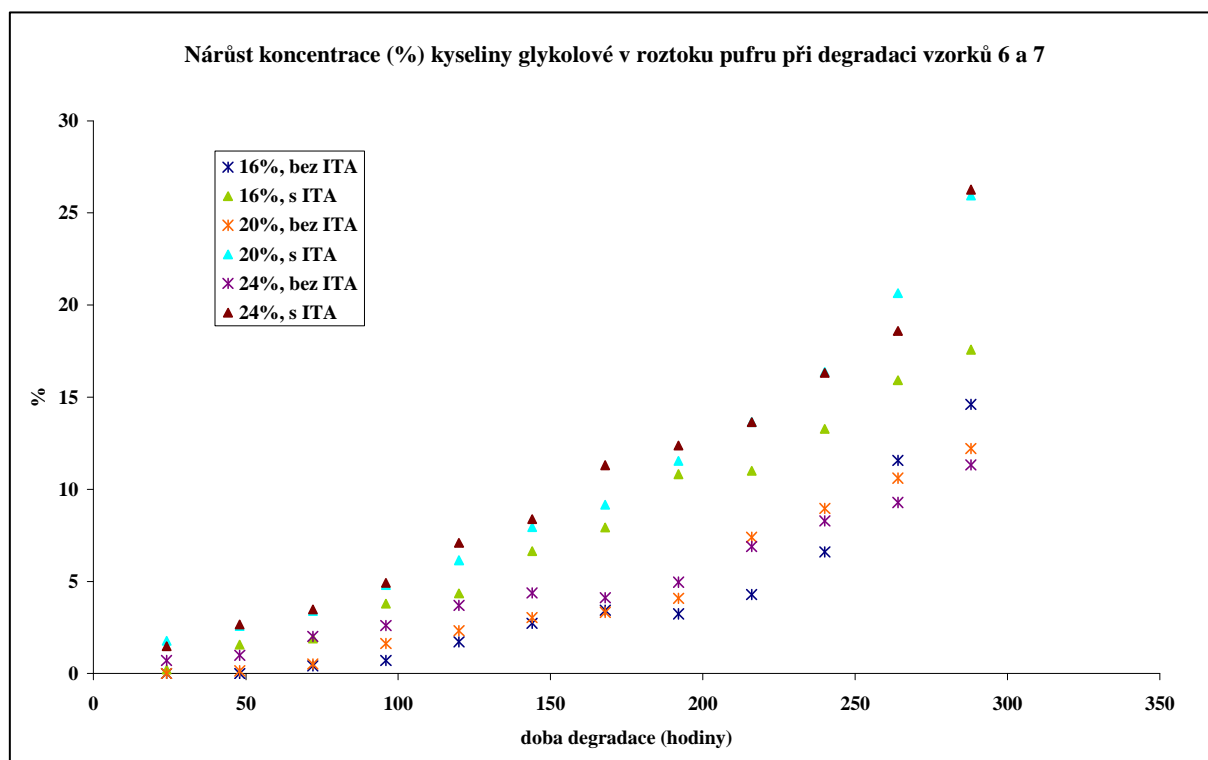
Pro porovnání vlivu modifikace kyselinou itakonovou na degradační vlastnosti hydrogelu byly vybrány vzorky 6 a 7; 16 a 17. Rozdíly byly hodnoceny podle poklesu molekulové hmotnosti M_n polymeru a koncentrací kyseliny glykolové a mléčné v pufru.

V Graf 3: jsou porovnány vzorky nemodifikovaného (6) a modifikovaného (7) kopolymery. U kopolymery s ITA byl pokles molekulové hmotnosti M_n po 11 dnech vyšší než u druhého kopolymery. Vliv koncentrace byl větší u nemodifikovaného kopolymery (21 – 35 %), u kopolymery s ITA nebyl tento rozdíl tak výrazný (37 – 41 %).

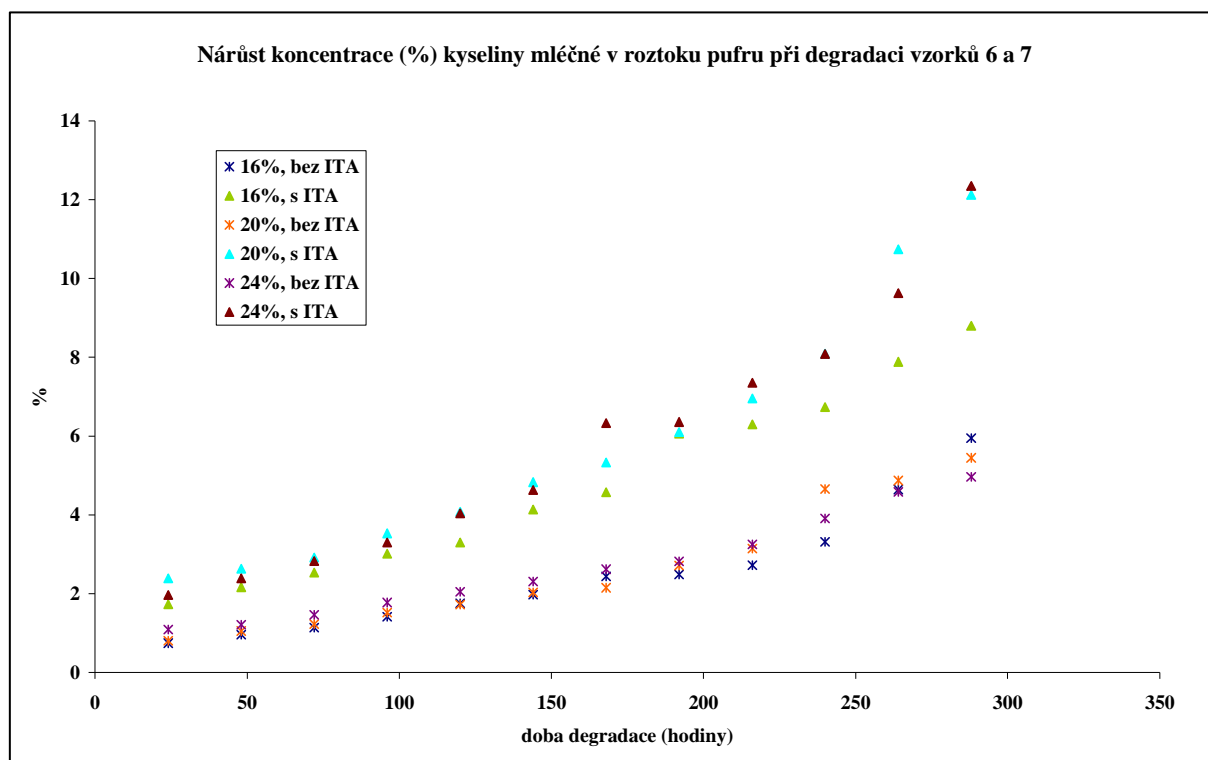
Pro porovnání koncentrace kyseliny glykolové a mléčné uvolněných do vzorku pufru, byly spočítány teoretické koncentrace, které by se v závislosti na poměrech v kopolymery a na navážce měly uvolnit do pufru při 100% degradaci. Od této hodnoty byla odečtena koncentrace zjištěná v roztoku pomocí HPLC a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



Graf 3: Pokles molekulové hmotnosti M_n v % vztažený k molekulové hmotnosti před začátkem degradace pro tři koncentrace kopolymerů.



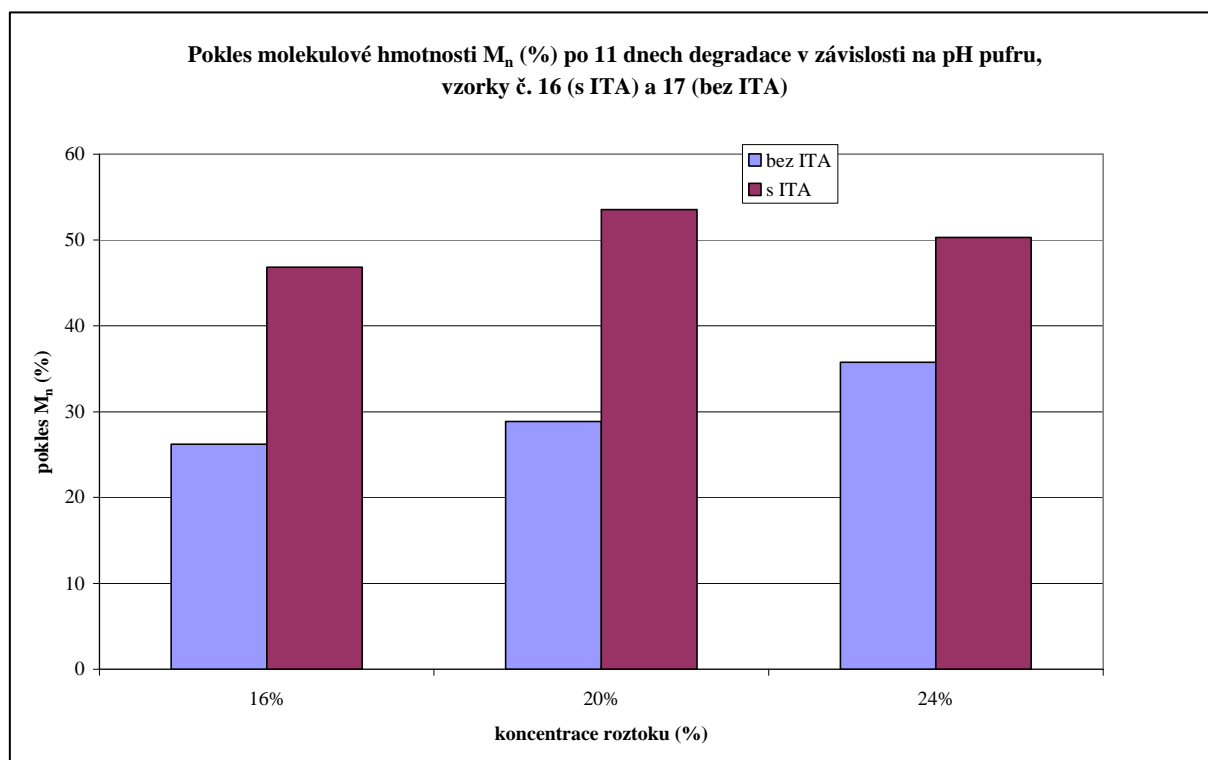
Graf 4: Závislost zvyšování koncentrace kyseliny glykolové v roztoku pufru (pH 7) vyjádřené jako procentuální úbytek z původního degradovaného kopolymeru; bez ITA vz. 6 (hvězdičky), s ITA vz. 7 (trojúhelníky)



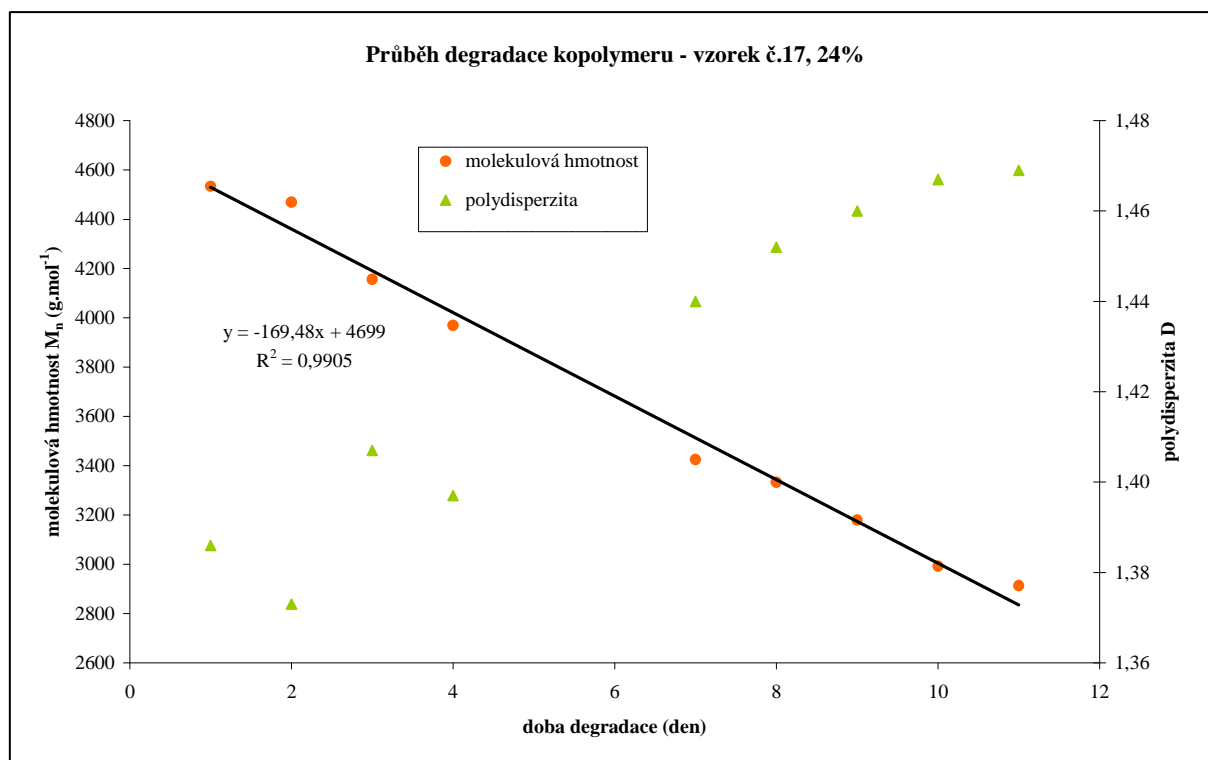
Graf 5: Závislost zvyšování koncentrace kyseliny mléčné v roztoku pufru (pH 7) vyjádřené jako procentuální úbytek z původního degradovaného kopolymery; bez ITA vz. 6 (hvězdičky), s ITA vz. 7 (trojúhelníky)

Na grafech (Graf 4: a Graf 5:) je zřetelně viditelné oddělení dvou skupin, a to podle modifikace kopolymery. U modifikovaného kopolymery byl nárůst monomerů kyseliny glykolové a kyseliny mléčné v pufru vyšší. Z toho lze také usoudit na rychlejší degradaci tohoto polymeru. Mezi různými koncentracemi u obou vzorků byly rovněž patrné rozdíly.

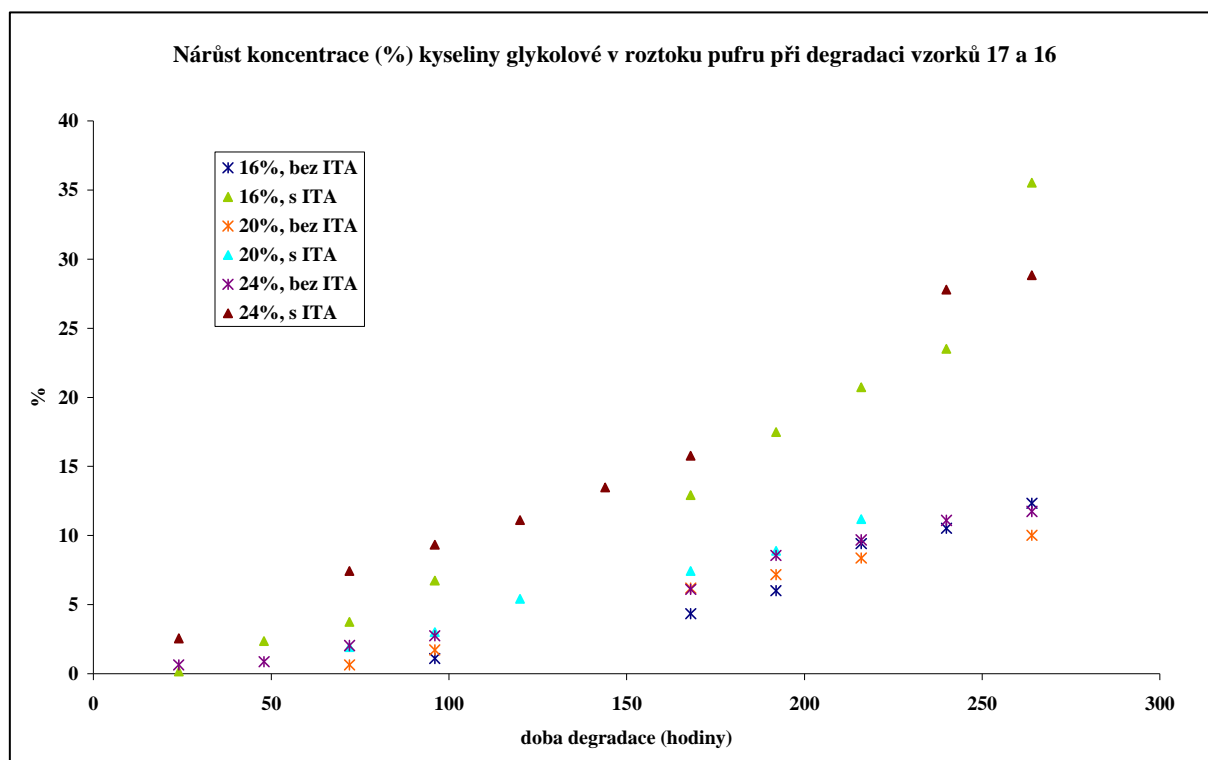
Z Graf 6: je jasně vidět rozdíl v rychlosti degradace vzorků 17 a 16 a v poměru PLGA/PEG 2,0. U modifikovaného kopolymery se pokles molekulové hmotnosti pohybuje okolo 50 %, pro nemodifikovaný kopolymer bylo rozpětí molekulových hmotností 26 – 36 %. Se zvyšující se koncentrací je patrný větší pokles molekulové hmotnosti původního polymeru. Na Graf 7: je ukázka závislosti molekulové hmotnosti na době degradace. Kromě M_n jsou do grafu vyneseny i hodnoty polydisperzity. V tomto případě vykazuje závislost polydisperzity pokles její hodnoty s rostoucí dobou degradace. U jiných vzorků však tato závislost často vykazuje úplně opačný trend. Proč u některých vzorků polydisperzita roste a u jiných klesá, případně někdy nevykazuje žádnou závislost, se nepodařilo na podkladě dostupných údajů jednoznačně vysvětlit.



Graf 6: Pokles molekulové hmotnosti M_n v % proti molekulové hmotnosti před začátkem degradace pro tři koncentrace kopolymerů.

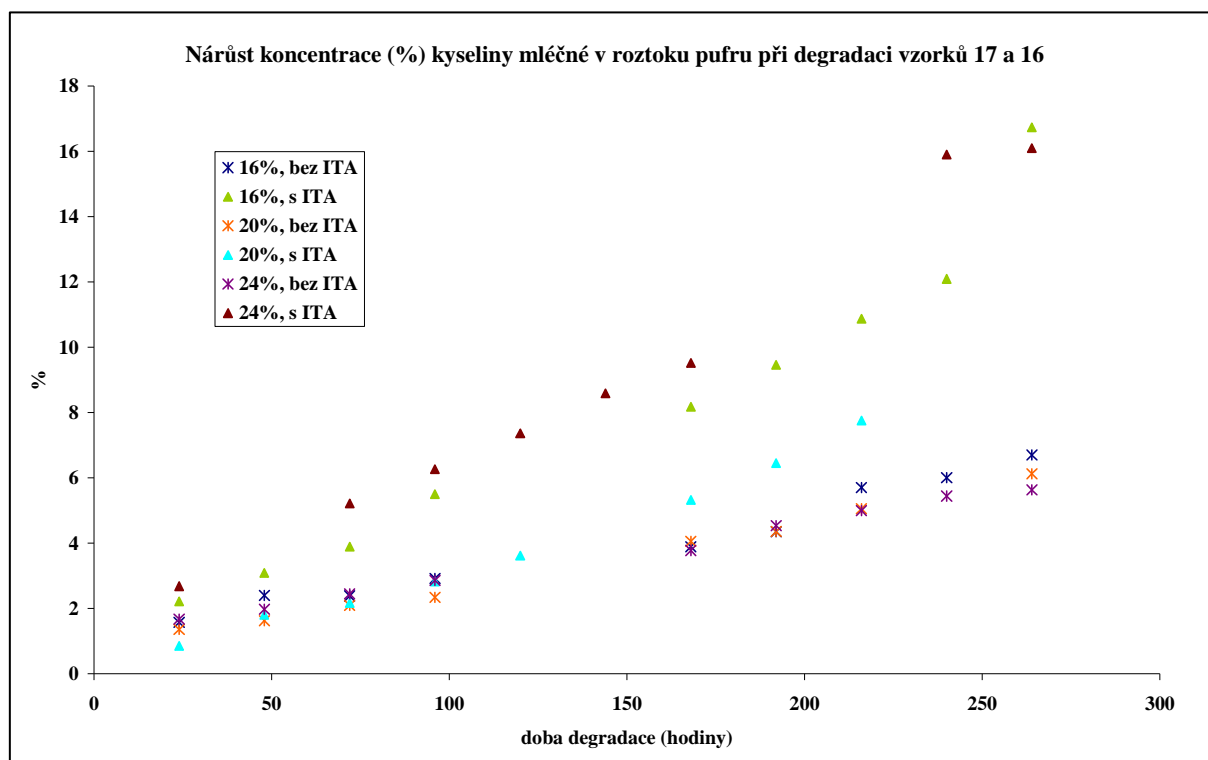


Graf 7: Ukázka závislosti poklesu molekulové hmotnosti na době degradace pro vzorek č. 17 (bez ITA) o koncentraci 24 %. Hodnoty polydisperzity D jsou vyneseny na vedlejší ose.



Graf 8: Závislost zvyšování koncentrace kyseliny glykolové v roztoku pufru (pH 7) vyjádřené jako procentuální úbytek z původního degradovaného kopolymeru; bez ITA vz. 17 (hvězdičky), s ITA vz. 16 (trojúhelníky)

I z těchto získaných závislostí je zřejmá rychlejší degradace vzorků modifikovaných ITA. Rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi nejsou tak výrazné. Na základě porovnání dvou sledovaných kyselin je možno konstatovat, že koncentrace kyseliny mléčné se v roztoku zvyšuje pomaleji než koncentrace kyseliny glykolové.



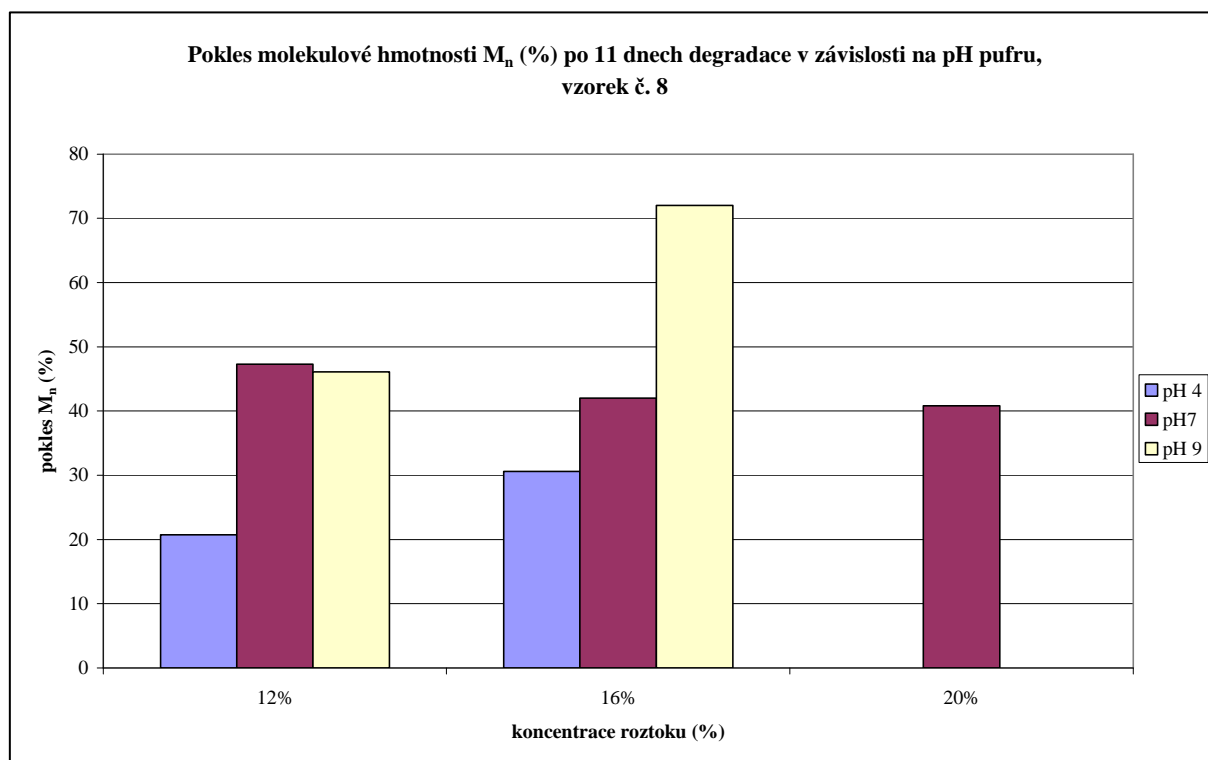
Graf 9: Závislost zvyšování koncentrace kyseliny mléčné v roztoku pufru (pH 7) vyjádřené jako procentuální úbytek z původního degradovaného kopolymery; bez ITA vz. 17 (hvězdičky), s ITA vz. 16 (trojúhelníky)

U těchto vzorků a z výše uvedených grafů je také dobře patrný rozdíl mezi dvojicemi polymerů v závislosti na jejich poměru PLGA/PEG. Pro vzorky 6 a 7 je tento poměr 2,5 a pro vzorky 16 a 17 2,0. Snížený obsah kopolymery PLGA oproti PEG má za následek rychlejší degradaci. Polymer PLGA je z dvojice PLGA, PEG ten více hydrofobní. Proto hydrolyza vazeb polymeru probíhá rychleji. Jako pozitivní fakt můžeme přičíst tomuto rozdílu lepší rozpustnost polymeru při přípravě vzorků.

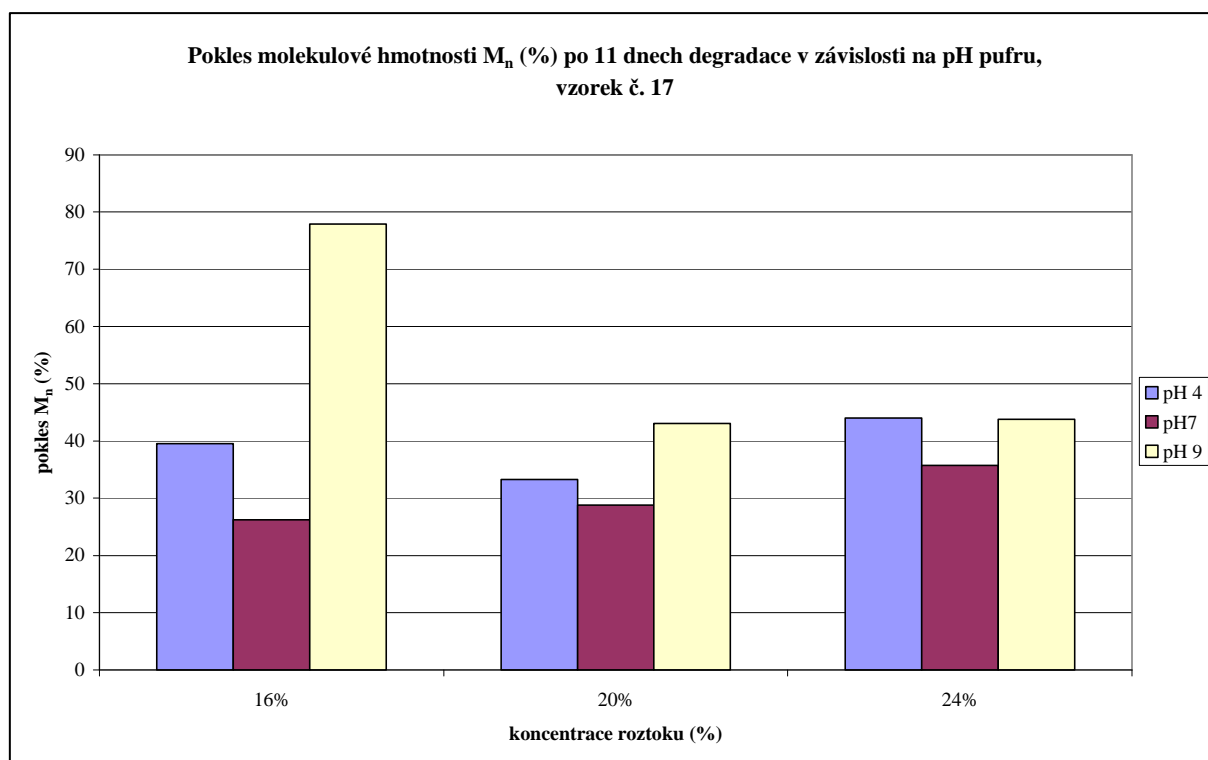
5.2.4 Vliv pH pufru na průběh degradace

Všechny výše uvedené pokusy byly prováděny při teplotě 37 °C a pH fosfátového pufru bylo 7,4. Pro následující testy bylo změněno pH fosfátového pufru na 4,0 a 9,0. Vyšší pH pufru mělo při HPLC analýze vliv na separaci látek a dobře separovaná zůstala pouze kyselina mléčná. Proto porovnání vlivu pH bylo provedeno pouze pro LA. Vliv pH byl sledován na vzorcích 8 a 17 (oba bez ITA).

Na Graf 10: a Graf 11: je vynesena závislost poklesu molekulové hmotnosti po 11 dnech degradace při různém pH. U vzorku 8 je dobře vidět, že zvyšující se pH zvyšuje degradaci kopolymery (podobný průběh byl potvrzen i pozorováním okem), vliv koncentrace při pH 7,4 nebyl téměř žádný. Podobný průběh byl očekáván i u vzorku 17, kde ale nebyl potvrzen. Je pravda, že degradace probíhala rychleji pro pH 9, avšak rozdíly s ostatními vzorky nebyly tak výrazné. Pro pH 7,4 byla změna molekulové hmotnosti nejmenší. Koncentrace neměla vliv. Vše je zřejmě způsobeno menším poměrem PLGA/PEG.

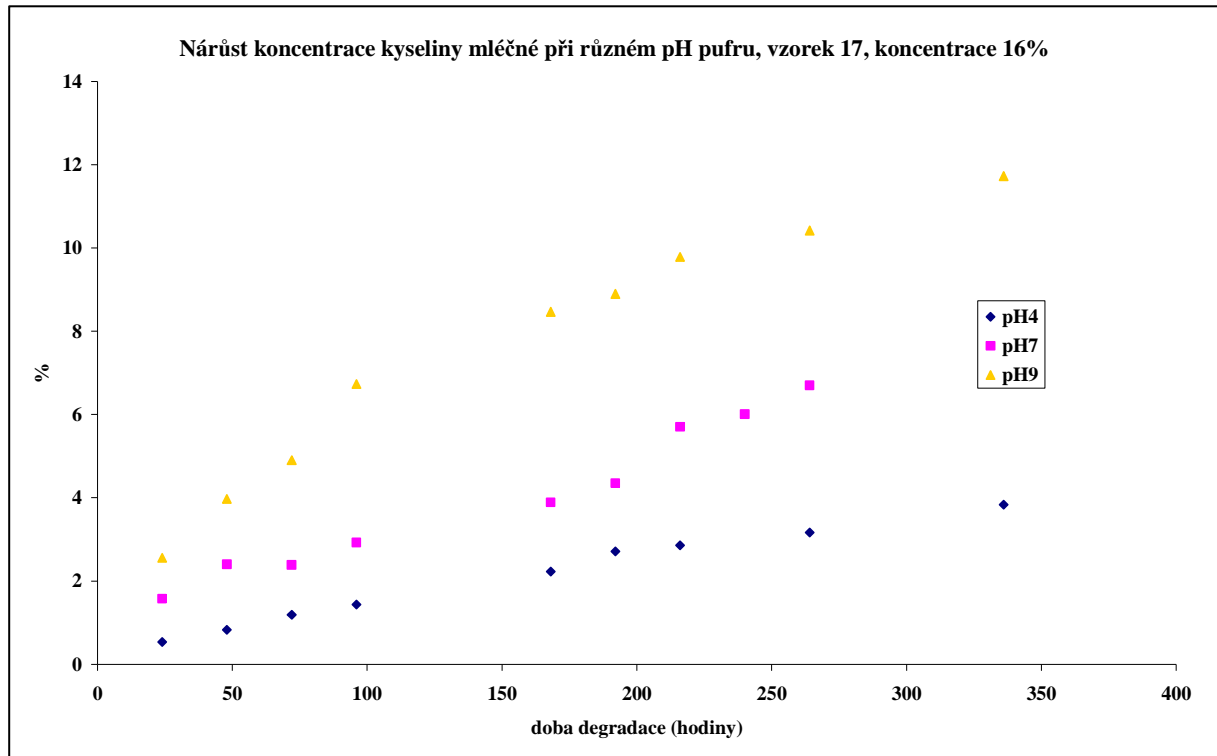


Graf 10: Vliv pH na změnu molekulové hmotnosti po 11 dnech degradace, vzorek 8

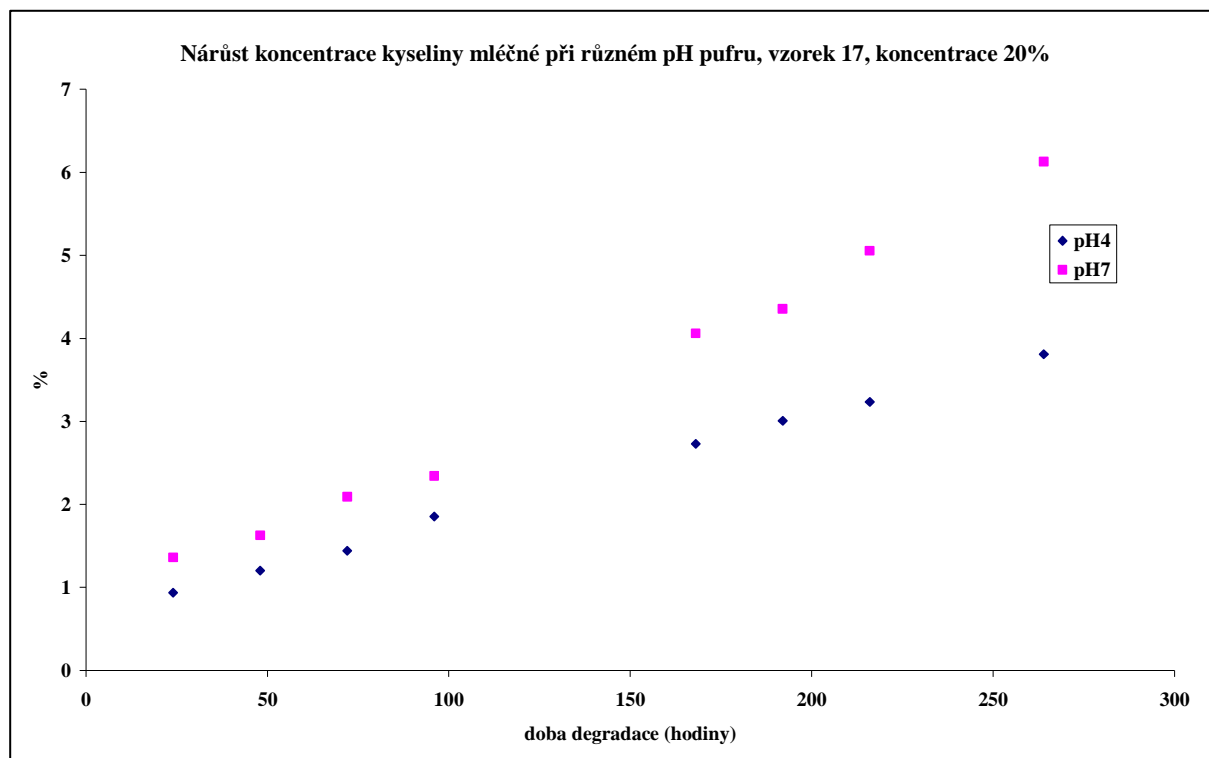


Graf 11: Vliv pH na změnu molekulové hmotnosti po 11 dnech degradace, vzorek 17

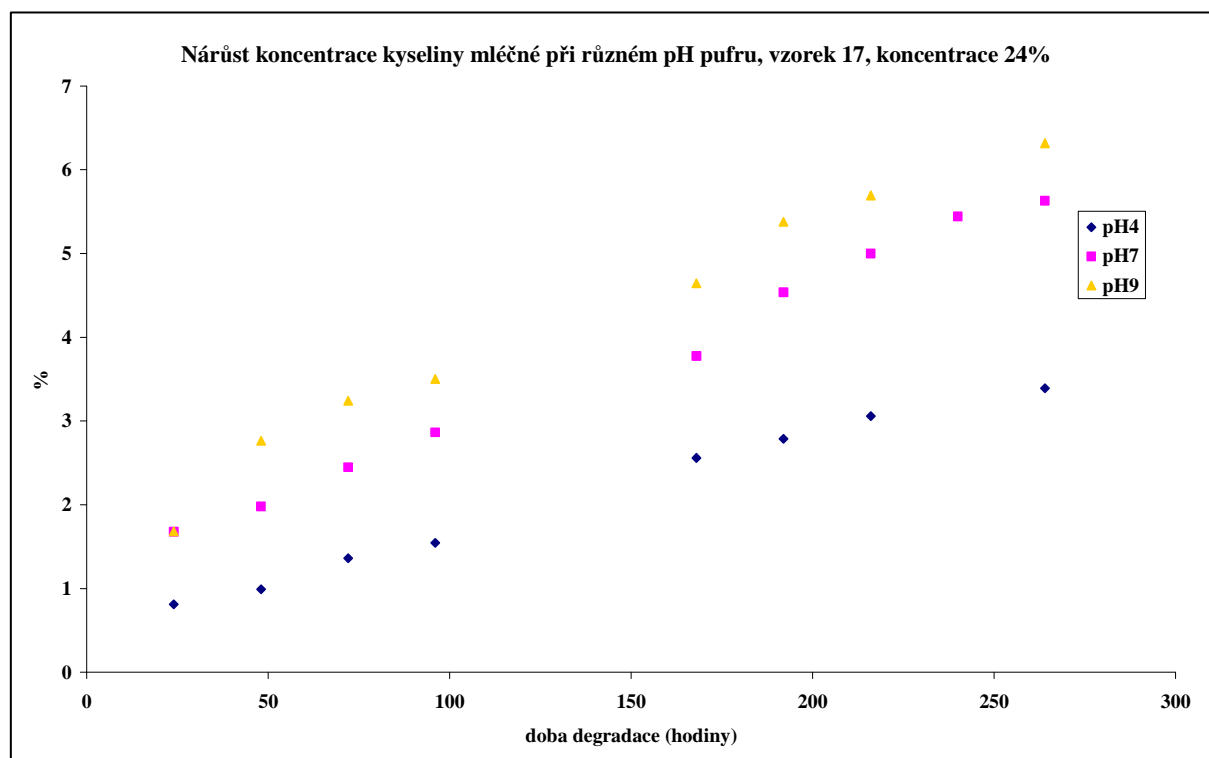
V grafech (0 až Graf 16:) jsou prezentovány závislosti nárůstu kyseliny glykolové v čase a při různém pH. Ze všech grafů je dobře patrný rozdíl mezi různým pH pufru. Nejpomaleji dochází k nárůstu vždy při pH 4; při pH 7,4 a pH 9 jsou rozdíly ještě rovněž patrné, avšak tyto dvě křivky mají průběh blíže u sebe (zejména při koncentraci 16 %). Na základě toho se v reálném prostředí lidského těla předpokládá spíše snižování pH, a proto je nutné počítat s možným zpomalením degradace kopolymeru.



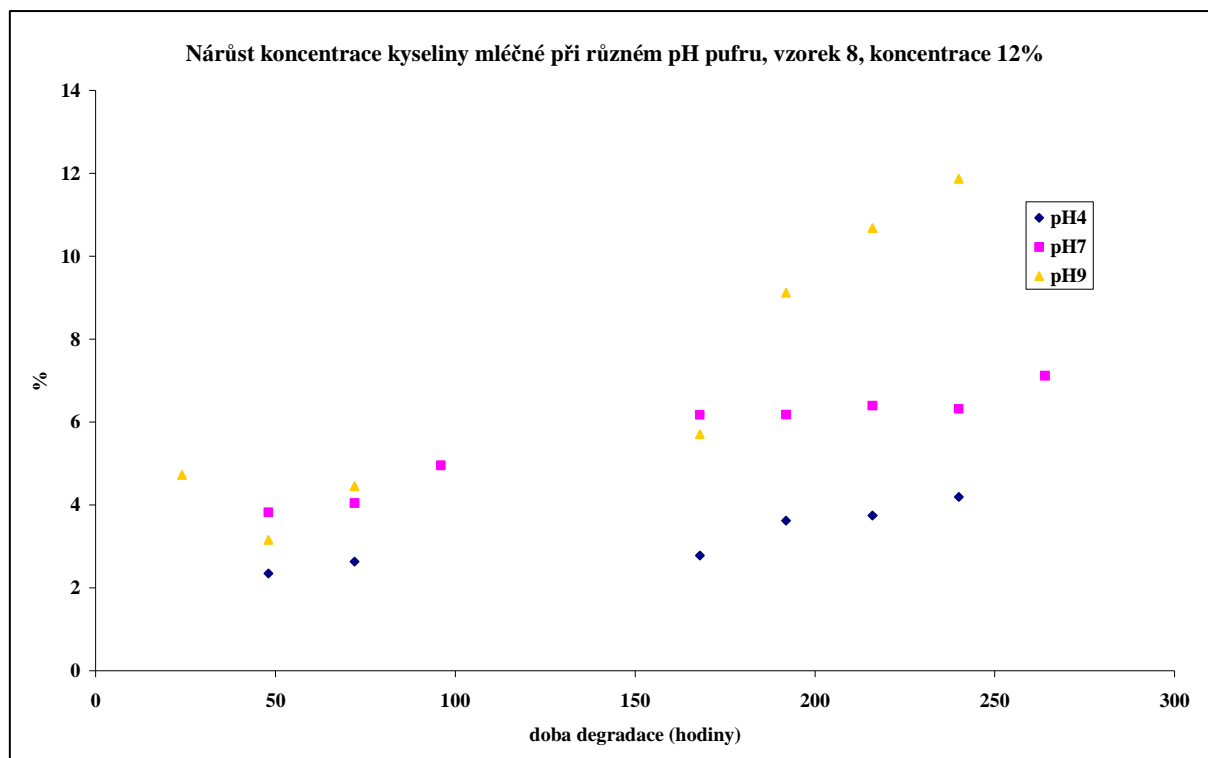
Graf 12: Porovnání průběhu degradace (nárůst kyseliny mléčné v pufru) v závislosti na pH; vzorek 17, koncentrace 16 %



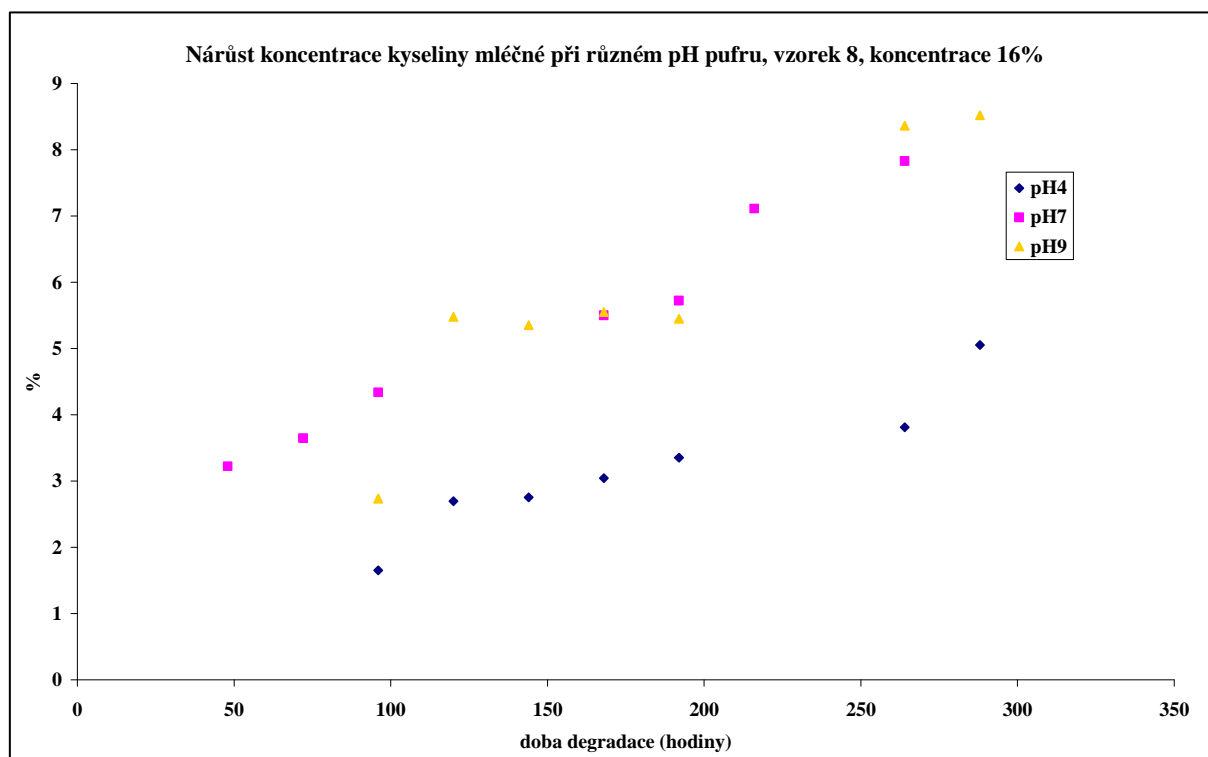
Graf 13: Porovnání průběhu degradace (nárůst kyseliny mléčné v pufru) v závislosti na pH; vzorek 17, koncentrace 20 %



Graf 14: Porovnání průběhu degradace (nárůst kyseliny mléčné v pufru) v závislosti na pH; vzorek 17, koncentrace 24 %



Graf 15: Porovnání průběhu degradace (nárůst kyseliny mléčné v pufru) v závislosti na pH; vzorek 8, koncentrace 12 %



Graf 16: Porovnání průběhu degradace (nárůst kyseliny mléčné v pufru) v závislosti na pH; vzorek 8, koncentrace 16 %

6 ZÁVĚR

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

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

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

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

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

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

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

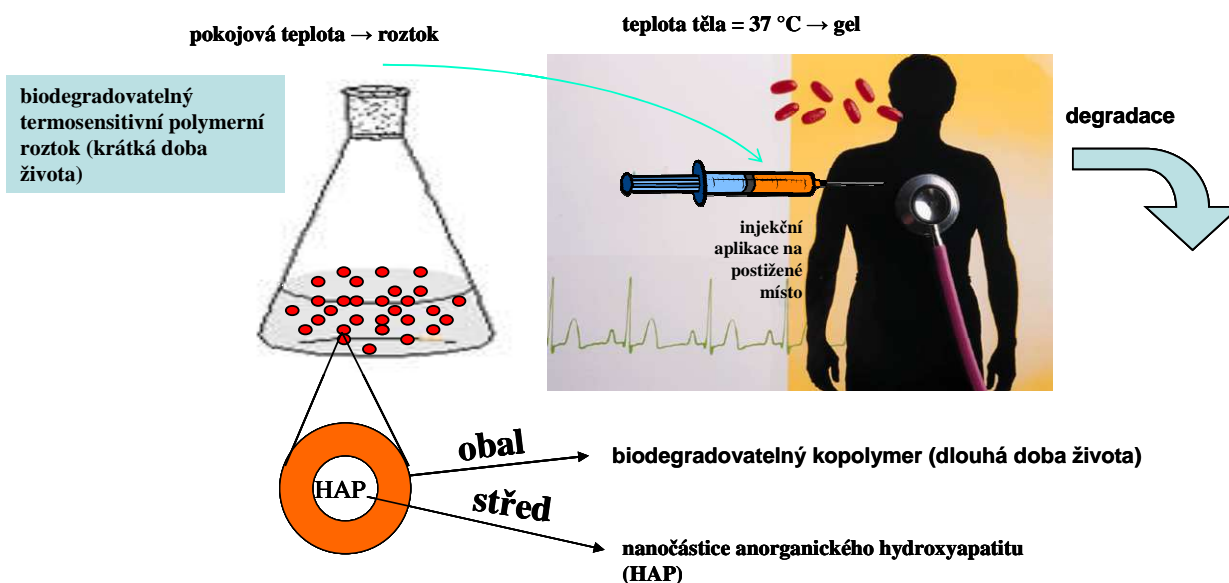
Poslední zkoumanou oblastí bylo degradační chování kopolymeru bez ITA při různém pH (hodnoty pH byly 4,0, 7,4, 9,0). Jak bylo prokázáno, hodnota pH měla na rychlost degradace podstatný vliv. Se zvyšující se hodnotou pH se rychlost degradace zvyšovala. To platilo především pro kopolymer s poměrem PLGA/PEG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

7 POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam
ABA	blokový kopolymer hydrofobní-hydrofilní-hydrofobní
BAB	blokový kopolymer hydrofilní-hydrofobní-hydrofilní
CGC	kritická koncentrace gelovatění
CGT	kritická teplota gelovatění
CMC	kritická micelární koncentrace
GA	kyselina glykolová
GPC	gelová permeační chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
ITA	kyselina itakonová
ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA	blokový kopolymer modifikovaný kyselinou itakonovou
LA	kyselina mléčná
LCST	dolní kritická teplota
M_n	průměrná číselná molekulová hmotnost
M_w	průměrná váhová molekulová hmotnost
M_z	z-průměrná molekulová hmotnost
PEG	poly(ethylenglykol)
PGA	poly(glykolová kyselina)
PLA	poly(mléčná kyselina)
PLGA	blokový kopolymer poly(mléčné kyseliny) a poly(glykolové kyseliny)
PLGA-PEG-PLGA	blokový kopolymer
UCST	horní kritická teplota

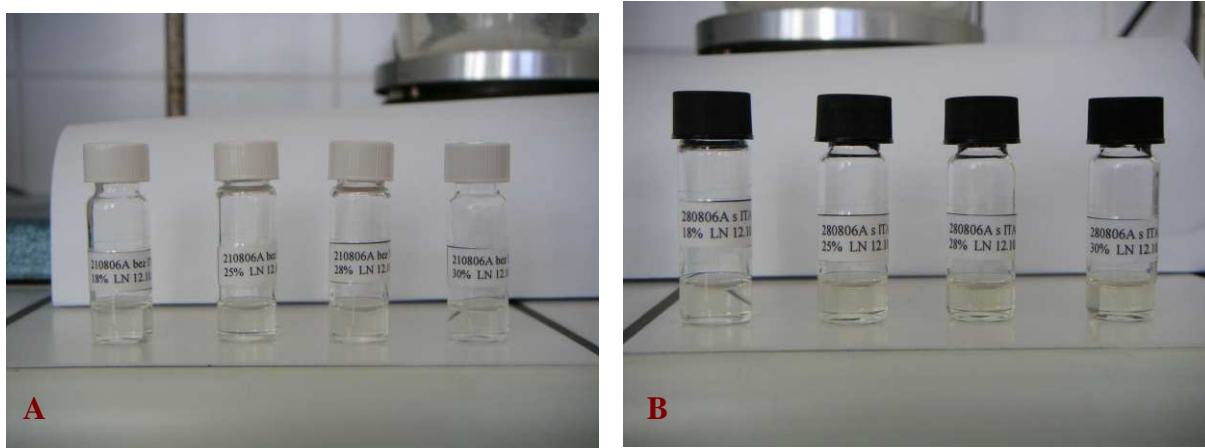
8 PŘÍLOHY

8.1 Schéma použití zkoumaných kopolymerů



Obr. 24: Schematické znázornění předpokládaného použití blokových kopolymerů PLGA-PEG-PLGA a ITA-PLGA-PEG-PLGA-ITA pro léčbu zlomenin

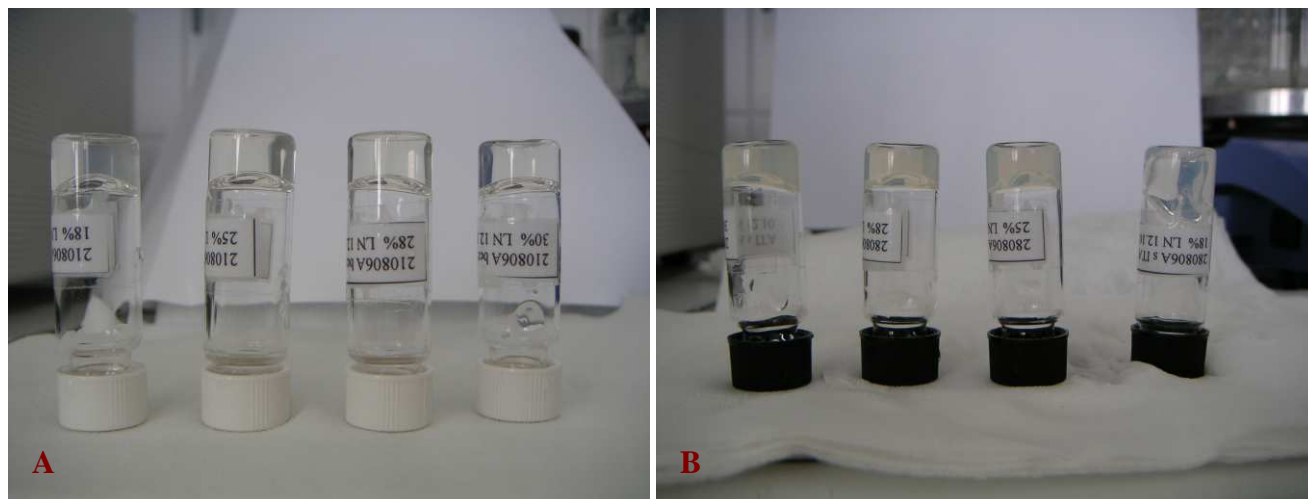
8.2 Fotografie připravených roztoků vzorků pro sestavování sol-gel diagramu



Obr. 25: Připravené roztoky kopolymeru pro stanovení sol-gel přechodů (A – bez ITA, B – s ITA)

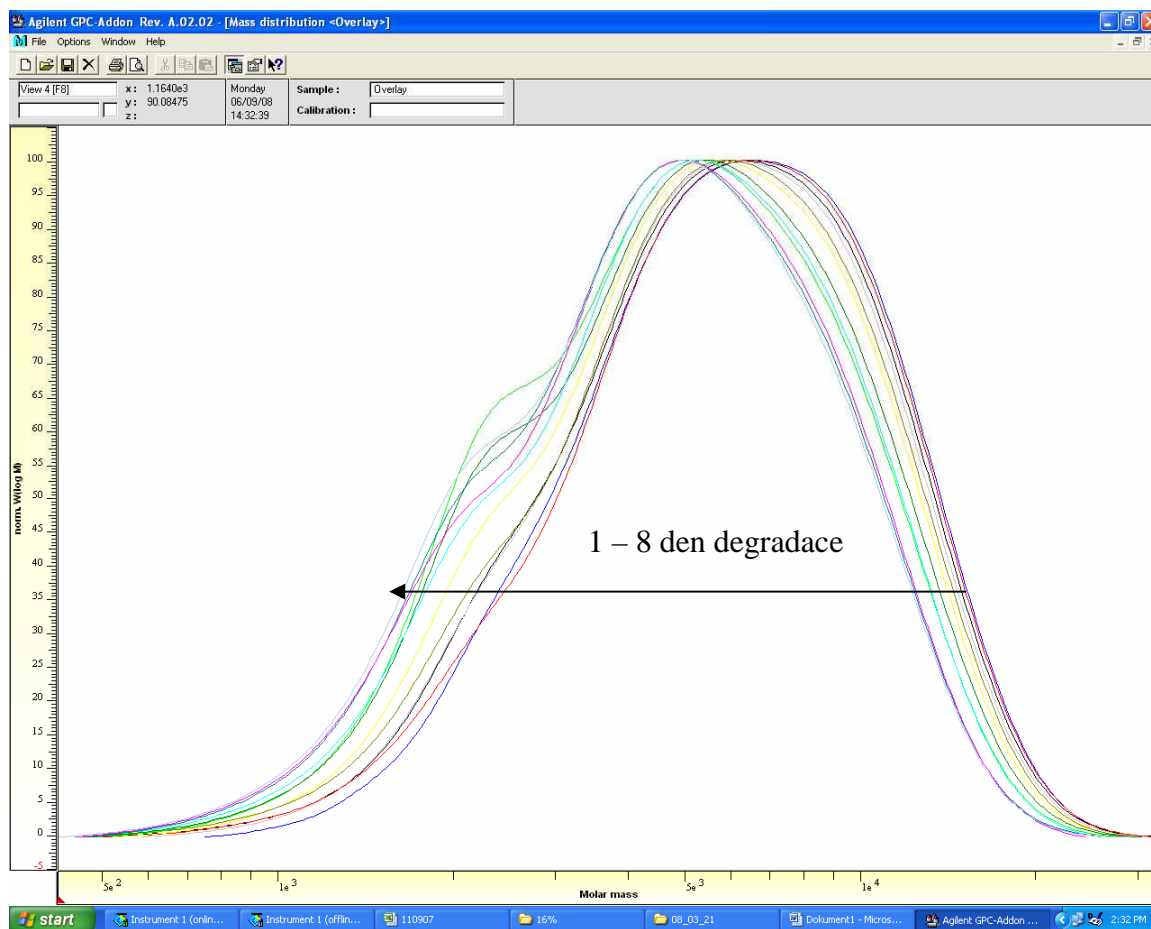


Obr. 26: Vodní lázeň pro měření sol-gel přechodů



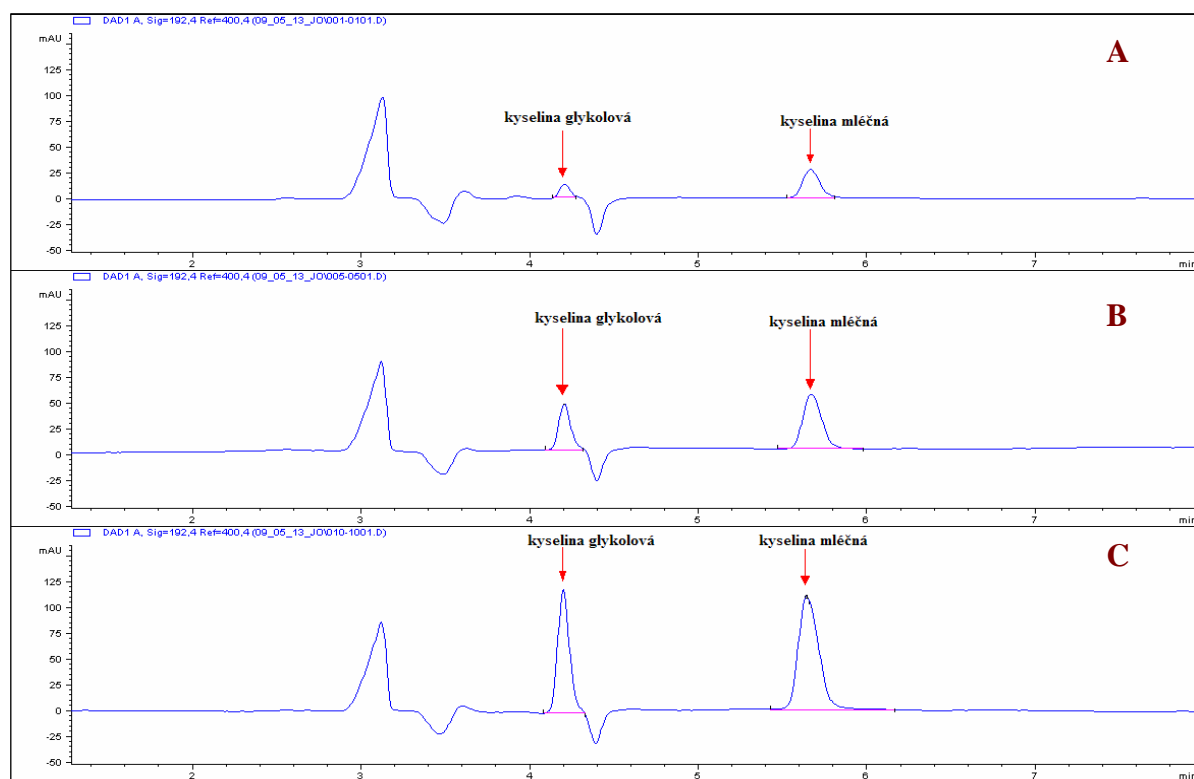
Obr. 27: Vzorky různé koncentrace vytáhnuté při teplotě 37 °C z vodní lázně; A – vzorek bez ITA všechny koncentrace (18 – 30 %) ve formě gelu, B – vzorek s ITA koncentrace 25 – 30 % ve formě gelu, koncentrace 18 % ve formě roztoku

8.3 Změna distribuce molekulové hmotnosti (z GPC) v závislosti na době degradace

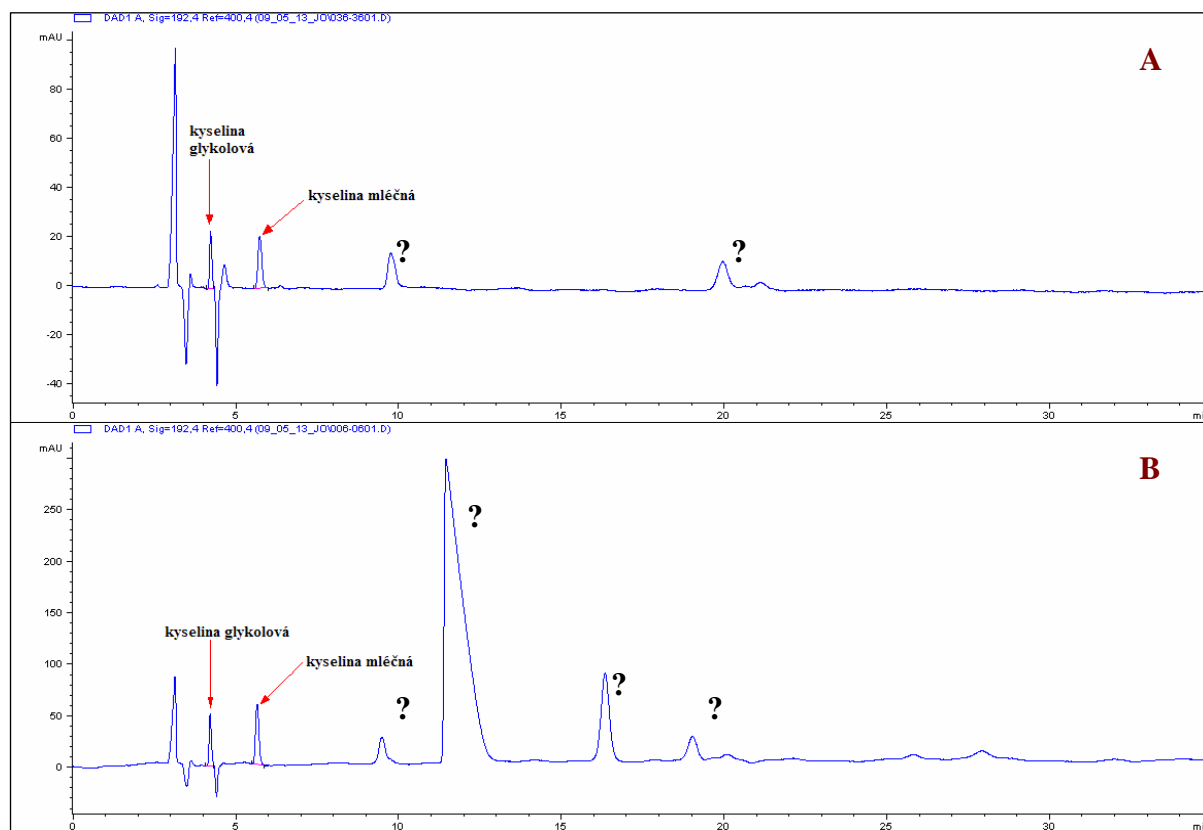


Obr. 28: Měření molekulové hmotnosti vzorku 6 (8 dní degradace); závislost distribuční funkce na molekulové hmotnosti; s rostoucí dobou degradace dochází k posunu píků k nižším molekulovým hmotnostem a ke změně tvaru píků (směr šipky)

8.4 HPLC analýza roztoku pufru po degradaci



Obr. 29: Chromatogramy vzorku 5 (24 %) po degradaci, nárůst velikosti píků kyseliny glykolové a mléčné, A – 1 den, B – 3 den, C – 11 den



Obr. 30: Chromatogram vzorku 6 a 7 (20 %) po degradaci; A – bez ITA, B – s ITA

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. Gunatillake, P.A. and Adhikari, R.: Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials* 2003, vol. 5, no., p. 1-16. ISSN 1473-2262.
2. Vadgama, P.: *Surfaces and interfaces for biomaterials*. 1st ed, Cambridge: Woodhead Publishing Limited. 2005. p. 802. ISBN 1-85573-930-5.
3. Kim, S.W., Bae, Y.H., and Okano, T.: Hydrogels - Swelling, Drug Loading, and Release. *Pharmaceutical Research*, 1992, vol. 9, no. 3, p. 283-290. ISSN 0724-8741.
4. Galaev, I.Y. and Mattiasson, B.: 'Smart' polymers and what they could do in biotechnology and medicine. *Trends in Biotechnology*, 1999, vol. 17, no. 8, p. 335-340. ISSN 0167-7799.
5. Chandra, R. and Rustgi, R.: Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 1998, vol. 23, no. 7, p. 1273-1335. ISSN 0079-6700.
6. Peterkova, P. and Lapcik, L.: Collagen - Properties, modifications and applications. *Chemické Listy*, 2000, vol. 94, no. 6, p. 371-379. ISSN 0009-2770.
7. Kwak, J., De Capua, A., Locardi, E., and Goodman, M.: TREN (tris(2-aminoethyl)amine): An effective scaffold for the assembly of triple helical collagen mimetic structures. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, vol. 124, no. 47, p. 14085-14091. ISSN 0002-7863.
8. wikipedie: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Collagentriplehelix.png>. [cit. 5. 5. 2010],
9. Friess, W.: Collagen - biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, vol. 45, no. 2, p. 113-136. ISSN 0939-6411.
10. Fathima, N.N., Bose, M.C., Rao, J.R., and Nair, B.U.: Stabilization of type I collagen against collagenases (type I) and thermal degradation using iron complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, vol. 100, no. 11, p. 1774-1780. ISSN 0162-0134.
11. Kozlov, P.V. and Burdygina, G.I.: The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Polymer*, 1983, vol. 24, no. 6, p. 651-666. ISSN 0032-3861.
12. Rokhade, A.P., Agnihotri, S.A., Patil, S.A., Mallikarjuna, N.N., Kulkarni, P.V., and Aminabhavi, T.M.: Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. *Carbohydrate Polymers*, 2006, vol. 65, no. 3, p. 243-252. ISSN 0144-8617.
13. Pillai, C.K.S., Paul, W., and Sharma, C.P.: Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 2009, vol. 34, no. 7, p. 641-678. ISSN 0079-6700.
14. Ravi Kumar, M.N.V.: A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 2000, vol. 46, no. 1, p. 1-27. ISSN 1381-5148.
15. Chitkara, D., Shikanov, A., Kumar, N., and Domb, A.J.: Biodegradable injectable in situ depot-forming drug delivery systems. *Macromolecular Bioscience*, 2006, vol. 6, no. 12, p. 977-990. ISSN 1616-5187.
16. Rinaudo, M.: Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 2006, vol. 31, no. 7, p. 603-632. ISSN 0079-6700.
17. Béguin, P. and Aubert, J.-P.: The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, vol. 13, no. 1, p. 25-58. issn 0168-6445.
18. Griffith, L.G.: Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, 2000, vol. 48, no. 1, p. 263-277. ISSN 1359-6454.

19. Gilding, D.K. and Reed, A.M.: Biodegradable Polymers for Use in Surgery - Poly(Ethylene Oxide) Poly(Ethylene-Terephthalate) (Peo-Pet) Copolymers . *Polymer*, 1979, vol. 20, no. 12, p. 1454-1458. ISSN 0032-3861.
20. Li, S.M.: Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, vol. 48, no. 3, p. 342-353. ISSN 0021-9304.
21. Martina, M. and Hutmacher, D.W.: Biodegradable polymers applied in tissue engineering research: a review. *Polymer International*, 2007, vol. 56, no. 2, p. 145-157. ISSN 0959-8103.
22. Fox, S.A.: A New Type of Surgical Peg. *American Journal of Ophthalmology*, 1946, vol. 29, no. 5, p. 586-587. ISSN 0002-9394.
23. Kinahan, I.M. and Smyth, M.R.: High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Peg-600 in Human Urine. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications*, 1991, vol. 565, no. 1-2, p. 297-307. ISSN 0378-4347.
24. Fruijtier-Polloth, C.: Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology*, 2005, vol. 214, no. 1-2, p. 1-38. ISSN 0300-483X.
25. Litchfield, J.H., *Lactic Acid, Microbially Produced*, in *Encyclopedia of Microbiology*, S. Moselio, 2009, Academic Press: Oxford. p. 362-372.
26. Summer, K., *Toxicological Evaluation of the Incorporation of Polymers and Copolymers Based on L- and D-Lactide and Glycolide*, in *Boehringer Ingelheim KG*. 1993, Boehringer Ingelheim KG. p. 31.
27. CICAD: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad45.htm>, [cit. 20. 5. 2010]
28. de Jong, S.J., Arias, E.R., Rijkers, D.T.S., van Nostrum, C.F., Kettenes-van den Bosch, J.J., and Hennink, W.E.: New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): participation of the alcohol terminus. *Polymer*, 2001, vol. 42, no. 7, p. 2795-2802. ISSN 0032-3861.
29. van Nostrum, C.F., Veldhuis, T.F.J., Bos, G.W., and Hennink, W.E.: Hydrolytic degradation of oligo(lactic acid): a kinetic and mechanistic study. *Polymer*, 2004, vol. 45, no. 20, p. 6779-6787. ISSN 0032-3861.
30. Shih, C.: Chain-End Scission in Acid-Catalyzed Hydrolysis of Poly(D,L-Lactide) in Solution. *Journal of Controlled Release*, 1995, vol. 34, no. 1, p. 9-15. ISSN 0168-3659.
31. Forcino, R.G. and Jonnalagadda, S.: The effect of fabrication methods on the mechanical and thermal properties of poly(lactide-co-glycolide) scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, vol. 104, no. 2, p. 944-949. ISSN 0021-8995.
32. Giunchedi, P., Conti, B., Scalia, S., and Conte, U.: In vitro degradation study of polyester microspheres by a new HPLC method for monomer release determination. *Journal of Controlled Release*, 1998, vol. 56, no. 1-3, p. 53-62. ISSN 0168-3659.
33. Witt, C., Mader, K., and Kissel, T.: The degradation, swelling and erosion properties of biodegradable implants prepared by extrusion or compression moulding of poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers. *Biomaterials*, 2000, vol. 21, no. 9, p. 931-938. ISSN 0142-9612.
34. Dunne, M., Corrigan, O.I., and Ramtoola, Z.: Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*, 2000, vol. 21, no. 16, p. 1659-1668. ISSN 0142-9612.
35. Grayson, A.C.R., Cima, M.J., and Langer, R.: Size and temperature effects on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 14, p. 2137-2145. ISSN 0142-9612.

36. Schliecker, G., Schmidt, C., Fuchs, S., Wombacher, R., and Kissel, T.: Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, vol. 266, no. 1-2, p. 39-49. ISSN 0378-5173.
37. von Burkersroda, F., Gref, R., and Gopferich, A.: Erosion of biodegradable block copolymers made of poly(D,L-lactic acid) and poly(ethylene glycol). *Biomaterials*, 1997, vol. 18, no. 24, p. 1599-1607. ISSN 0142-9612.
38. Grizzi, I., Garreau, H., Li, S., and Vert, M.: Hydrolytic Degradation of Devices Based on Poly(DL-Lactic Acid) Size-Dependence. *Biomaterials*, 1995, vol. 16, no. 4, p. 305-311. ISSN 0142-9612.
39. von Burkersroda, F., Schedl, L., and Gopferich, A.: Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*, 2002, vol. 23, no. 21, p. 4221-4231. ISSN 0142-9612.
40. Deng, M., Zhou, J., Chen, G., Burkley, D., Xu, Y., Jamiolkowski, D., and Barbolt, T.: Effect of load and temperature on in vitro degradation of poly(glycolide-co-L-lactide) multifilament braids. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 20, p. 4327-4336. ISSN 0142-9612.
41. Park, T.G.: Degradation of Poly(D,L-Lactic Acid) Microspheres - Effect of Molecular-Weight. *Journal of Controlled Release*, 1994, vol. 30, no. 2, p. 161-173. ISSN 0168-3659.
42. Park, T.G.: Degradation of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microspheres - Effect of Copolymer Composition. *Biomaterials*, 1995, vol. 16, no. 15, p. 1123-1130. ISSN 0142-9612.
43. Schliecker, G., Schmidt, C., Fuchs, S., and Kissel, T.: Characterization of a homologous series of D,L-lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro. *Biomaterials*, 2003, vol. 24, no. 21, p. 3835-3844. ISSN 0142-9612.
44. Sanabria-DeLong, N., Agrawal, S.K., Bhatia, S.R., and Tew, G.N.: Controlling hydrogel properties by crystallization of hydrophobic domains. *Macromolecules*, 2006, vol. 39, no. 4, p. 1308-1310. ISSN 0024-9297.
45. Bala, I., Hariharan, S., and Kumar, M.: PLGA nanoparticles in drug delivery: The state of the art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2004, vol. 21, no. 5, p. 387-422. ISSN 0743-4863.
46. Gilding, D.K. and Reed, A.M.: Biodegradable Polymers for Use in Surgery - Polyglycolic-Poly(Actic Acid) Homopolymers and Copolymers .1. *Polymer*, 1979, vol. 20, no. 12, p. 1459-1464. ISSN 0032-3861.
47. Hoffman, A.S.: Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, no. 1, p. 3-12. ISSN 0169-409X.
48. Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., and Ichikawa, H.: Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, vol. 50, no. 1, p. 27-46. ISSN 0939-6411.
49. Russ, T., Brenn, R., and Geoghegan, M.: Equilibrium swelling of polystyrene networks by linear polystyrene. *Macromolecules*, 2003, vol. 36, no. 1, p. 127-141. ISSN 0024-9297.
50. Jeong, B. and Gutowska, A.: Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 2002, vol. 20, no. 7, p. 305-311. ISSN 0167-7799.
51. Qiu, Y. and Park, K.: Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, vol. 53, no. 3, p. 321-339. ISSN 0169-409X.

52. Gutowska, A., Jeong, B., and Jasionowski, M.: Injectable gels for tissue engineering. *Anatomical Record*, 2001, vol. 263, no. 4, p. 342-349. ISSN 0003-276X.
53. Jeong, B., Kim, S.W., and Bae, Y.H.: Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, no. 1, p. 37-51. issn 0169-409X.
54. He, C., Kim, S.W., and Lee, D.S.: In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2008, vol. 127, no. 3, p. 189-207. ISSN 0168-3659.
55. Jagur-Grodzinski, J.: Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. *Polymers for Advanced Technologies*, 2010, vol. 21, no. 1, p. 27-47. ISSN 1099-1581.
56. Willke, T. and Vorlop, K.D.: Biotechnological production of itaconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, vol. 56, no. 3-4, p. 289-295. issn 0175-7598.
57. Tomic, S.L., Suljovrujic, E.H., and Filipovic, J.M.: Biocompatible and bioadhesive hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate, monofunctional poly(alkylene glycol)s and itaconic acid. *Polymer Bulletin*, 2006, vol. 57, no. 5, p. 691-702. ISSN 0170-0839.
58. Chen, K.S., Ku, Y.A., Lin, H.R., Yan, T.R., Sheu, D.C., Chen, T.M., and Lin, F.H.: Preparation and characterization of pH sensitive poly(N-vinyl-2-pyrrolidone/itaconic acid) copolymer hydrogels. *Materials Chemistry and Physics*, 2005, vol. 91, no. 2-3, p. 484-489. ISSN 0254-0584.
59. Krusic, M.K. and Filipovic, J.: Copolymer hydrogels based on N-isopropylacrylamide and itaconic acid. *Polymer*, 2006, vol. 47, no. 1, p. 148-155. ISSN 0032-3861.
60. Caykara, T., Ozyurek, C., and Kantoglu, O.: Investigation of thermal behavior of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-itaconic acid) networks. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, vol. 103, no. 3, p. 1602-1607. ISSN 0021-8995.
61. West, J.L. and Hubbell, J.A.: Photopolymerized Hydrogel Materials for Drug-Delivery Applications. *Reactive Polymers*, 1995, vol. 25, no. 2-3, p. 139-147. ISSN 0923-1137.
62. Wei, H., He, J., Sun, L.-g., Zhu, K., and Feng, Z.-g.: Gel formation and photopolymerization during supramolecular self-assemblies of [alpha]-CDs with LA-PEG-LA copolymer end-capped with methacryloyl groups. *European Polymer Journal*, 2005, vol. 41, no. 5, p. 948-957.
63. Sawahata, K., Hara, M., Yasunaga, H., and Osada, Y.: Electrically Controlled Drug Delivery System Using Polyelectrolyte Gels. *Journal of Controlled Release*, 1990, vol. 14, no. 3, p. 253-262. ISSN 0168-3659.
64. Sunil A. Agnihotri, Raghavendra, V., Nadagouda, N.K., Padmakar, V.M., and Aminabhavi, K.T.M.: Electrically modulated transport of diclofenac salts through hydrogels of sodium alginate, carbopol, and their blend polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 2005, vol. 96, no. 2, p. 301-311. ISSN 1097-4628.
65. Hatefi, A. and Amsden, B.: Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 2002, vol. 80, no. 1-3, p. 9-28. ISSN 0168-3659.
66. Westhaus, E. and Messersmith, P.B.: Triggered release of calcium from lipid vesicles: a bioinspired strategy for rapid gelation of polysaccharide and protein hydrogels. *Biomaterials*, 2001, vol. 22, no. 5, p. 453-462. ISSN 0142-9612.
67. Li, J., Ni, X.P., and Leong, K.W.: Injectable drug-delivery systems based on supramolecular hydrogels formed by poly(ethylene oxide) and alpha-cyclodextrin. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, vol. 65A, no. 2, p. 196-202. ISSN 0021-9304.

68. Kissel, T., Li, Y.X., and Unger, F.: ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, no. 1, p. 99-134. ISSN 0169-409X.
69. Bae, S.J., Suh, J.M., Sohn, Y.S., Bae, Y.H., Kim, S.W., and Jeong, B.: Thermogelling poly(caprolactone-b-ethylene glycol-b-caprolactone) aqueous solutions. *Macromolecules*, 2005, vol. 38, no. 12, p. 5260-5265. ISSN 0024-9297.
70. Bae, S.J., Joo, M.K., Jeong, Y., Kim, S.W., Lee, W.K., Sohn, Y.S., and Jeong, B.: Gelation behavior of poly(ethylene glycol) and polycaprolactone triblock and multiblock copolymer aqueous solutions. *Macromolecules*, 2006, vol. 39, no. 14, p. 4873-4879. ISSN 0024-9297.
71. Jeong, B., Bae, Y.H., and Kim, S.W.: Biodegradable thermosensitive micelles of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 1999, vol. 16, no. 1-4, p. 185-193. ISSN 0927-7765.
72. Jeong, B., Bae, Y.H., and Kim, S.W.: Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions. *Macromolecules*, 1999, vol. 32, no. 21, p. 7064-7069. ISSN 0024-9297.
73. Jeong, B., Choi, Y.K., Bae, Y.H., Zentner, G., and Kim, S.W.: New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 1999, vol. 62, no. 1-2, p. 109-114. ISSN 0168-3659.
74. Jeong, B., Kibbey, M.R., Birnbaum, J.C., Won, Y.Y., and Gutowska, A.: Thermogelling biodegradable polymers with hydrophilic backbones: PEG-g-PLGA. *Macromolecules*, 2000, vol. 33, no. 22, p. 8317-8322. ISSN 0024-9297.
75. Jeong, B., Bae, Y.H., and Kim, S.W.: In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, vol. 50, no. 2, p. 171-177. ISSN 0021-9304.
76. Jeong, B. and Gutowska, A.: Biodegradable thermoreversible hydrogel and their biomedical applications. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2001, vol. 222, no., p. U315-U315. ISSN 0065-7727.
77. Jeong, B., Wang, L.Q., and Gutowska, A.: Biodegradable thermoreversible gelling PLGA-g-PEG copolymers. *Chemical Communications*, 2001, vol. no. 16, p. 1516-1517. ISSN 1359-7345.
78. Jeong, B., Windisch, C.F., Park, M.J., Sohn, Y.S., Gutowska, A., and Char, K.: Phase transition of the PLGA-g-PEG copolymer aqueous solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, 2003, vol. 107, no. 37, p. 10032-10039. ISSN 1520-6106.
79. Zentner, G.M., Rathi, R., Shih, C., McRea, J.C., Seo, M.H., Oh, H., Rhee, B.G., Mestecky, J., Moldoveanu, Z., Morgan, M., and Weitman, S.: Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs. *Journal of Controlled Release*, 2001, vol. 72, no. 1-3, p. 203-215. ISSN 0168-3659.
80. Yu, L., Chang, G.T., Zhang, H., and Ding, J.D.: Temperature-induced spontaneous sol-gel transitions of poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) triblock copolymers and their end-capped derivatives in water. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 2007, vol. 45, no. 6, p. 1122-1133. ISSN 0887-624X.
81. Jeong, J.H., Lim, D.W., Han, D.K., and Park, T.G.: Synthesis, characterization and protein adsorption behaviors of PLGA/PEG di-block co-polymer blend films. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2000, vol. 18, no. 3-4, p. 371-379. ISSN 0927-7765.
82. Shim, M.S., Lee, H.T., Shim, W.S., Park, I., Lee, H., Chang, T., Kim, S.W., and Lee, D.S.: Poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly (D,L-lactic acid-co-glycolic acid) triblock copolymer and thermoreversible phase transition

- in water. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, vol. 61, no. 2, p. 188-196. ISSN 0021-9304.
83. Lee, D.S., Shim, M.S., Kim, S.W., Lee, H., Park, I., and Chang, T.Y.: Novel thermoreversible gelation of biodegradable PLGA-block-PEO-block-PLGA triblock copolymers in aqueous solution. *Macromolecular Rapid Communications*, 2001, vol. 22, no. 8, p. 587-592. ISSN 1022-1336.
 84. Fujiwara, T., Mukose, T., Yamaoka, T., Yamane, H., Sakurai, S., and Kimura, Y.: Novel thermo-responsive formation of a hydrogel by stereo-complexation between PLLA-PEG-PLLA and PDLA-PEG-PDLA block copolymers. *Macromolecular Bioscience*, 2001, vol. 1, no. 5, p. 204-208. ISSN 1616-5187.
 85. Meyer, V.R.: *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 2004, Chichester: John Wiley & Sons. 338. ISBN 0-471-98373-X.
 86. Kromidas, S.: *More Practical Problem Solving in HPLC*. 2005, Darmstadt: Wiley-VCH Verlag GmbH. 294. ISBN 3-527-31113-0.
 87. Marcato, B., Paganetto, G., Ferrara, G., and Cecchin, G.: High-performance liquid chromatographic determination of some of the hydrolytic decomposition products of poly(alpha-hydroxyacid)s. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 1996, vol. 682, no. 1, p. 147-156. ISSN 0378-4347.
 88. Ding, A.G. and Schwendeman, S.P.: Determination of water-soluble acid distribution in poly(lactide-co-glycolide). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, vol. 93, no. 2, p. 322-331. ISSN 0022-3549.
 89. Wu, C.-s.: *Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques*. second ed. Chromatographic Science Series, ed. C.-s. Wu. Vol. 91. 2004, New York: Marcel Dekker. 694. ISBN 0-8247-4710-0.
 90. Pasch, H. and Trathnigg, B.: *HPLC of Polymers*, ed. Glöckner. 1998, Heidelberg: Springer-Verlag. isbn 3-540-61689-6.
 91. Lee, J., Bae, Y.H., Sohn, Y.S., and Jeong, B.: Thermogelling aqueous solutions of alternating multiblock copolymers of poly(L-lactic acid) and poly(ethylene glycol). *Biomacromolecules*, 2006, vol. 7, no. 6, p. 1729-1734. ISSN 1525-7797.
 92. Li, F., Li, S.M., and Vert, M.: Synthesis and rheological properties of polylactide/poly(ethylene glycol) multiblock copolymers. *Macromolecular Bioscience*, 2005, vol. 5, no. 11, p. 1125-1131. ISSN 1616-5187.
 93. Payro, E.R. and Llacuna, J.L.: Rheological characterization of the gel point in sol-gel transition. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2006, vol. 352, no. 21-22, p. 2220-2225. ISSN 0022-3093.
 94. Suming Li, A.E.G.E.D.: Rheology and Drug Release Properties of Bioresorbable Hydrogels Prepared from Polylactide/Poly(ethylene glycol) Block Copolymers. *Macromolecular Symposia*, 2005, vol. 222, no. 1, p. 23-36. ISSN 1521-3900.
 95. Vermonden, T., Besseling, N.A.M., van Steenberg, M.J., and Hennink, W.E.: Rheological studies of thermosensitive triblock copolymer hydrogels. *Langmuir*, 2006, vol. 22, no. 24, p. 10180-10184. ISSN 0743-7463.
 96. Li, S.M. and McCarthy, S.: Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide). *Biomaterials*, 1999, vol. 20, no. 1, p. 35-44. ISSN 0142-9612.
 97. Wu, L.B. and Ding, J.D.: In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 2004, vol. 25, no. 27, p. 5821-5830. ISSN 0142-9612.
 98. Jeong, B., Bae, Y.H., and Kim, S.W.: Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *Journal of Controlled Release*, 2000, vol. 63, no. 1-2, p. 155-163. ISSN 0168-3659.

99. Li, X.H., Deng, X.M., Yuan, M.L., Xiong, C.D., Huang, Z.T., Zhang, Y.H., and Jia, W.X.: In vitro degradation and release profiles of poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped proteins. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000, vol. 78, no. 1, p. 140-148. ISSN 0021-8995.
100. Holy, C.E., Dang, S.M., Davies, J.E., and Shoichet, M.S.: In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials*, 1999, vol. 20, no. 13, p. 1177-1185. ISSN 0142-9612.
101. Proikakis, C.S., Mamouzelos, N.J., Tarantili, P.A., and Andreopoulos, A.G.: Swelling and hydrolytic degradation of poly(D,L-lactic acid) in aqueous solutions. *Polymer Degradation and Stability*, 2006, vol. 91, no. 3, p. 614-619. ISSN 0141-3910.

II. STANOVENÍ OBSAHU POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ V SALÁMU

1 OBSAH

1	OBSAH	78
2	ÚVOD	80
2.1	TOXIKOLOGIE	81
2.2	EKVIVALENTNÍ FAKTOR TOXICITY (TEF)	82
2.2.1	<i>Metabolismus PAU</i>	85
2.3	VÝSKYT PAU V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ	89
2.3.1	<i>Ovzduší</i>	89
2.3.2	<i>Voda</i>	90
2.3.3	<i>Půda</i>	91
2.4	VÝSKYT PAU V POTRAVINÁCH	91
2.5	TECHNOLOGIE VÝROBY TRVANLIVÝCH FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ	92
2.5.1	<i>Míchání díla</i>	92
2.5.2	<i>Narážení díla</i>	92
2.5.3	<i>Zrání a fermentace</i>	93
3	ANALÝZA PAU	94
3.1	VZORKOVÁNÍ	94
3.1.1	<i>Aktivní vzorkování</i>	94
3.1.2	<i>Pasivní vzorkování</i>	94
3.2	EXTRAKCE A PŘEČIŠTĚNÍ VZORKU	95
3.2.1	<i>Extrakční metody</i>	95
3.2.2	<i>Clean-up</i>	96
3.3	METODY ANALÝZY	100
3.3.1	<i>Kapalinová chromatografie</i>	100
3.3.2	<i>Plynová chromatografie</i>	101
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	106
4.1	MATERIÁL, CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	106
4.1.1	<i>Přístroje a zařízení</i>	106
4.1.2	<i>Standardy a chemikálie</i>	106
4.1.2.1	<i>Příprava kalibračních roztoků</i>	106
4.1.2.2	<i>Směs PAU Mix 45</i>	106
4.1.2.3	<i>Směs D-PAU</i>	106
4.2	ODBĚR A ÚPRAVA VZORKU	106
4.2.1	<i>Extrakce tuku</i>	107
4.2.2	<i>Přečištění vzorku pomocí GPC (odstranění tuku)</i>	107
4.2.2.1	<i>Nastavení GPC</i>	107
4.2.3	<i>Odpaření chloroformu a převedení vzorku do isooktanu</i>	107
4.2.4	<i>Analýza přečištěného vzorku na GC × GC–TOF–MS</i>	108
4.2.4.1	<i>Nastavení GC × GC–TOF–MS</i>	108
4.2.4.2	<i>Seznam sledovaných analytů</i>	109
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	110
5.1	PŘEČIŠTĚNÍ VZORKU POMOCÍ GPC	110

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

5.2	OPTIMALIZACE GC × GC PODMÍNEK.....	110
5.2.1	<i>Analýza v 1D GC</i>	110
5.2.2	<i>Analýza ve 2D GC</i>	110
5.3	KALIBRACE.....	113
5.3.1	<i>Limity detekce a kvantifikace</i>	114
5.4	URČENÍ VÝTĚŽNOSTI ANALYTICKÉHO STANOVENÍ PAU V SALÁMU.....	115
5.4.1	<i>Stanovení výtěžnosti PAU</i>	115
5.4.2	<i>Výtěžnosti při použití undekanu a přepočet na deuterované standardy</i>	116
5.5	VÝSLEDKY STANOVENÍ PAU VE VZORCÍCH SALÁMU.....	118
5.5.1	<i>Legislativa upravující limity PAU v potravinách</i>	118
5.5.2	<i>Průměrná expozice PAU potravinami v evropských zemích podle EFSA (2008)</i>	119
5.5.3	<i>Výsledky</i>	119
6	ZÁVĚR	125
7	POUŽITÉ ZKRATKY	126
8	PŘÍLOHY	128
8.1	<i>ODBĚR VZORKŮ</i>	128
8.2	<i>OBSAH TUKU V JEDNOTLIVÝCH VZORCÍCH</i>	129
8.3	<i>SOUHRNNÉ TABULKY STANOVENÝCH KONCENTRACÍ VE VŠECH ANALYZOVANÝCH VZORCÍCH</i>	130
9	POUŽITÁ LITERATURA	142

2 ÚVOD

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) tvoří velkou skupinu organických sloučenin obsahujících dva nebo více kondenzovaných aromatických kruhů. K uvolňování PAU dochází nejen antropogenní činností člověka, ale také během přirozených procesů probíhajících v přírodě (Tab. 1:). PAU vznikají během nedokonalého spalování, pyrolýzou organických látek, během průmyslových procesů a přirozeným zuhelnatováním organické hmoty (uhlí). Skupina PAU zahrnuje stovky sloučenin, přičemž některým je věnována velká pozornost, a to především pro jejich již prokázané karcinogenní účinky.

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou poměrně chemicky stabilní látky (díky konjugovanému systému π -elektronů). Probíhají na nich substituční nebo adiční reakce, při nichž často dochází ke vzniku nasycených sloučenin při zachování cyklu. Většina PAU podléhá fotooxidaci, která je také nejdůležitější reakcí vhodnou pro odstraňování PAU z atmosféry. Nejčastější reakcí je vznik *endo*-peroxidů, které dále přechází na chinony. Fotooxidační reakce PAU adsorbovaných na částicích probíhají mnohem rychleji, než volných PAU (plynná fáze, roztok). Možné substituční deriváty PAU, jako jsou např. nitro- a chlor-deriváty, vykazují často větší karcinogenní aktivitu než samotné PAU.

Tab. 1: Možné zdroje PAU v životním prostředí

Antropogenní zdroje
<i>průmyslové zdroje</i>
výroba tepelné a elektrické energie
spalování fosilních paliv
zpracování ropy
odpadní voda
potravinářské technologie
<i>neprůmyslové zdroje</i>
požáry lesů, stepí, prérií
volné hoření odpadů
spalování odpadů ve spalovnách
domácí topeniště
cigaretový kouř
Neantropogenní zdroje
<i>geologické</i>
uhlí
ropa
sedimentované horniny
minerály (curtizit, idrialit, ...)
vulkanická činnost
<i>biologické</i>
biochemická syntéza makrofyty a mikroorganismy

Na základě svých fyzikálně-chemických vlastností jsou PAU různě distribuovány do složek životního prostředí. Mezi jejich nejdůležitější vlastnosti patří rozpustnost ve vodě, K_{ow} , tlak nasycených par, dále hydrofobicita a lipofilita. Obecně platí, že se zvyšujícím se počtem kruhu ve sloučenině se snižuje rozpustnost ve vodě, klesá těkavost a zvyšuje se lipofilita.

PAU můžeme v životním prostředí najít téměř všude, v ovzduší, ve vodách, půdách a v organismech. Z hlediska expozice jsou pro nekuřáky hlavním zdrojem PAU inhalace kouře a také příjem potravou. Ostatní cesty, jako příjem pitnou vodou a průnik přes pokožku, jsou pouze minoritní. Expozice PAU obsažených ve vzduchu může nastat ve vnitřním i venkovním prostředí. Ve venkovním prostředí je koncentrace PAU v ovzduší značně ovlivněna průmyslovými podniky vyskytujícími se v dané lokalitě.

Potraviny mohou být kontaminovány PAU dvěma cestami. Jednak je to příjem PAU z okolního životního prostředí (voda, půda, vzduch), ale především je to tepelná úprava

aplikovaná při kulinářské přípravě jídla. PAU vznikají při tepelných procesech, jakými jsou grilování, pražení, smažení nebo uzení. Rizikové potraviny jsou zejména ty, které se dostávají

do přímého kontaktu se zplodinami hoření; látky obsažené v kouři se na ně mohou přímo vázat.

2.1 Toxikologie

Jak již bylo konstatováno, PAU se vyskytují ve všech složkách životního prostředí; vznikají při velkém množství různých procesů, ať již přírodními nebo antropogenními. Dostupná data z toxikologických testů prováděná na zvířatech dokumentují významné účinky některých PAU, které mohou být imunotoxické, genotoxické, karcinogenní a toxické pro reprodukci [1]. Klasifikace PAU vychází především z jejich karcinogenních účinků [2].

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

Podle dokumentu IPCS (International Programme on Chemical Safety) [3] bylo na základě informací o výskytu a toxicitě vybráno 33 individuálních PAU, které je nutné sledovat (Tab. 3:). Podle nových informací o genotoxicitě, karcinogenitě a mutagenitě bylo komisí SCF v roce 2002 [4] z těchto 33 PAU vybráno 15 prioritních PAU, u kterých je nutné sledovat jejich výskyt v potravinách. Prioritní EU PAH se v některých případech liší od prioritních PAH podle U.S. EPA (16 EPA PAH) (Tab. 4:). Podle zpráv IPCS a SCF vydaných v roce 2005, vyhodnotila expertní komise JECFA 13 PAH (z 15 PAU podle SCF) jako jasně karcinogenních a genotoxických, výjimka zůstala, stejně jako podle SCF, pro benzo(*ghi*)perylene a cyklopenta[*cd*]pyren. Navíc JECFA doporučila sledovat také výskyt benzo(*c*)fluorenu v potravinách, protože podle testů na krysách přispívá k tvorbě nádorů na plicích. Na základě tohoto doporučení byla definována skupina 16 prioritních PAU podle Evropské unie (15+1 EU PAH).

V Tab. 4: je uvedena klasifikace PAU podle seznamu IARC z roku 2010 [2]. Kromě karcinogenních účinků vykazuje řada PAU i hematologické, imunologické, reprodukční účinky a některé z nich jsou navíc genotoxické. Mezi nejvíce studované PAU patří benzo(*a*)pyren, který je jako jediný klasifikován jako karcinogenní pro člověka (klasifikace 1).

2.2 Ekvivalentní faktor toxicity (TEF)

Protože se PAHs v prostředí vyskytují vždy jako komplexní směsi (Σ PAHs), vychází se ze zjednodušeného předpokladu o podobnosti toxického účinku chemicky příbuzných látek jedné skupiny (analog faktorů ekvivalentní toxicity pro PCB a dioxiny). Tento model faktoru ekvivalentní toxicity (TEF) kalkuluje s aditivním efektem daných komponent a vyjádřením tohoto účinku jako ekvivalentního množství benzo(*a*) pyrenu:

$$TEQ = \sum W_{PAHi} \cdot TEF_i,$$

kde W_{PAHi} je obsah příslušného PAH a TEF_i je ekvivalentní faktor toxicity pro příslušný PAH.

Tab. 2: Hodnoty TEF pro některé PAU [5]

Sloučenina	TEF	Sloučenina	TEF
benzo(<i>a</i>)pyren	1	chrysen	0,01
dibenz(<i>a,h</i>)anthracen	1	acenaftilen	0,01
benz(<i>a</i>)anthracen	0,1	fluoranthen	0,01
benzo(<i>b</i>)fluoranthen	0,1	acenaften	0,001
benzo(<i>k</i>)fluoranthen	0,1	fenanthren	0,001
indeno(1,2,3- <i>cd</i>)pyren	0,1	pyren	0,001

Odborná skupina CONTAM Panel (The EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) zkoumala, jestli ekvivalentní faktor toxicity (TEF) je použitelný pro charakterizaci rizika pro směs PAU v potravinách. Došla k závěru, že použití TEF není vědecky opodstatněné, protože není dostatek dat z orálních testů karcinogenity pro individuální PAU, dále je rozdílný přístup k provádění těchto testů a ukazuje se malá predikce karcinogenního potenciálu směsi PAU založená na současně používaných hodnotách TEF. Přesto závěr skupiny CONTAM je, že charakterizace rizika by měla být založena na PAU, pro které jsou dostupná data o jejich karcinogenitě, jako je BaP a další vybrané PAU, tj. BaA, BbF, BkF, BghiP, CHR, DBahA, IcdP. Podle skupiny CONTAM je těchto 8 PAU, ať už individuálně nebo v různé kombinaci, momentálně jedinými možnými indikátory karcinogenních účinků PAU v potravinách.

Kromě sumy PAU8, jsou zjišťovány také sumy BaP, CHR, BaA, BbF (PAU4) a BaP a CHR (PAU2); mezi těmito skupinami vybraných PAU je velmi dobrá korelace jejich výskytu v dané potravine.

Tab. 3: Polycyklické aromatické uhlovodíky uvedené v dokumentu IPCS [3]

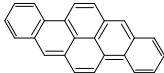
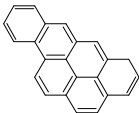
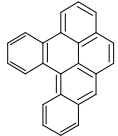
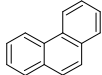
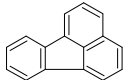
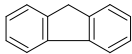
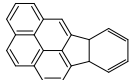
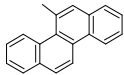


Běžný název	CAS název	CAS č.	Zkratka
acenaften	acenaphthylene	83-32-9	AC
acenaftylen	acenaphthylene, 1,2-dihydro-	208-96-8	ACL
anthratren	dibenzo[<i>def,mno</i>]chrysene	191-26-4	ATR
anthracen	anthracene	120-12-7	AN
benz(<i>a</i>)anthracen	benz[<i>a</i>]anthracen	56-55-3	BaA
benzo(<i>a</i>)fluoren	11 H-benzo[<i>a</i>]fluorene	238-84-6	BaFL
benzo(<i>b</i>)fluoren	11 H-benzo[<i>b</i>]fluorene	243-17-4	BbFL
benzo(<i>b</i>)fluoranthren	benz[<i>e</i>]acephenanthrylene	205-99-2	BbF
benzo(<i>ghi</i>)fluoranthren	benzo[<i>ghi</i>]fluoranthene	203-12-3	BghiF
benzo(<i>j</i>)fluoranthren	benzo[<i>j</i>]fluoranthene	205-82-3	BjF
benzo(<i>k</i>)fluoranthren	benzo[<i>k</i>]fluoranthene	207-08-9	BkF
benzo(<i>ghi</i>)perylene	benzo[<i>ghi</i>]perylene	191-24-2	BghiP
benzo(<i>c</i>)fenanthren	benzo[<i>c</i>]phenanthrene	195-19-7	BcPH
benzo(<i>a</i>)pyren	benzo[<i>a</i>]pyrene	50-32-8	BaP
benzo(<i>e</i>)pyren	benzo[<i>e</i>]pyrene	192-97-2	BeP
chrysen	chrysene	218-01-9	CHR
koronen	coronene	191-07-1	COR
cyklopenta(<i>cd</i>)pyren	cyclopenta[<i>cd</i>]pyrene	27208-37-3	CPP
dibenz(<i>a,h</i>)anthracen	dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	53-70-3	DBahA
dibenzo(<i>a,e</i>)pyren	naphtho[1,2,3,4- <i>d,e,f</i>]chrysene	192-65-4	DBaeP
dibenzo(<i>a,h</i>)pyren	dibenzo[<i>b,de,f</i>]chrysene	189-64-0	DBahP
dibenzo(<i>a,i</i>)pyren	dibenzo[<i>rst</i>]pentaphene	189-55-9	DBaiP
dibenzo(<i>a,l</i>)pyren	dibenzo[<i>def,p</i>]chrysene	191-30-0	DBalP
fluoranthren	fluoranthene	206-44-0	F
fluoren	9H-fluorene	86-73-7	FL
indeno(1,2,3- <i>cd</i>)pyren	indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	193-39-5	IP
5-methylchrysen	chrysene, 5-methyl-	3697-24-3	5-MCH
1-methylfenanthren	phenanthrene, 1-methyl-	832-69-9	1-MPH
naphthalen	naphthalene	91-20-3	NA
perylene	perylene	198-55-0	PE
fenanthren	phenanthrene	85-01-8	PHE
pyren	pyrene	129-00-0	PY
trifenylen	triphenylene	217-59-4	TRI

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 4: Seznam prioritních PAU podle US EPA a EU

Název	Priorita podle EU/EPA	Molekulová hmotnost	Karcinogenita (IARC, 2010)	Struktura
benzo(<i>a</i>)pyren	EPA, EU	252,32	1	
acenaften	EPA	154,21	3	
acenaftylen	EPA	152,12	-	
anthracen	EPA	178,23	3	
benz(<i>a</i>)anthracen	EPA, EU	228,29	2B	
benzo(<i>b</i>)fluoranthen	EPA, EU	252,32	2B	
benzo(<i>j</i>)fluoranthen	EU	252,32	2B	
benzo(<i>k</i>)fluoranthen	EPA, EU	252,32	2B	
benzo(<i>c</i>)fluoren	EU	216,28	3	
benzo(<i>ghi</i>)perylen	EPA, EU	276,34	3	
chrysen	EPA, EU	228,29	2B	
cyklopenta(<i>c,d</i>)pyren	EU	228,29	2A	
dibenz(<i>a,h</i>)anthracen	EPA, EU	278,35	2A	
dibenzo(<i>a,e</i>)pyren	EU	302,37	3	

Pokračování Tab.: 4

Název	Priorita podle EU/EPA	Molekulová hmotnost	Karcinogenita (IARC, 2010)	Struktura
dibenzo(<i>a,h</i>)pyren	EU	302,37	2B	
dibenzo(<i>a,i</i>)pyren	EU	302,37	2B	
dibenzo(<i>a,l</i>)pyren	EU	302,37	2A	
fenanthren	EPA	178,23	3	
fluoranthen	EPA	202,26	3	
fluoren	EPA	166,22	3	
indeno(1,2,3- <i>cd</i>)pyren	EPA, EU	276,34	2B	
5-methylchrysen	EU	242,32	2B	
nafthalen	EPA	128,17	2B	
pyren	EPA	202,26	3	

Klasifikace karcinogenních látek podle IARC:

- 1 – Látky (směsi) karcinogenní pro člověka
- 2A – Látky (směsi) pravděpodobně karcinogenní pro člověka
- 2B – Látky (směsi) s možným karcinogenním účinkem
- 3 – Látky (směsi), jejichž karcinogenitu pro člověka nelze klasifikovat (důkazy karcinogenity nejsou dostatečné)
- 4 – Látky (směsi), které pravděpodobně nevykazují karcinogenní účinek vůči člověku

2.2.1 Metabolismus PAU

Jak už bylo zmíněno, expozice člověka PAU se uskutečňuje především přes ovzduší a potraviny. V těle se PAU nekumulují příliš dlouho, avšak i přesto dochází k jejich metabolizaci. K metabolismu dochází ve všech tkáních. Metabolická dráha a enzymy, které se

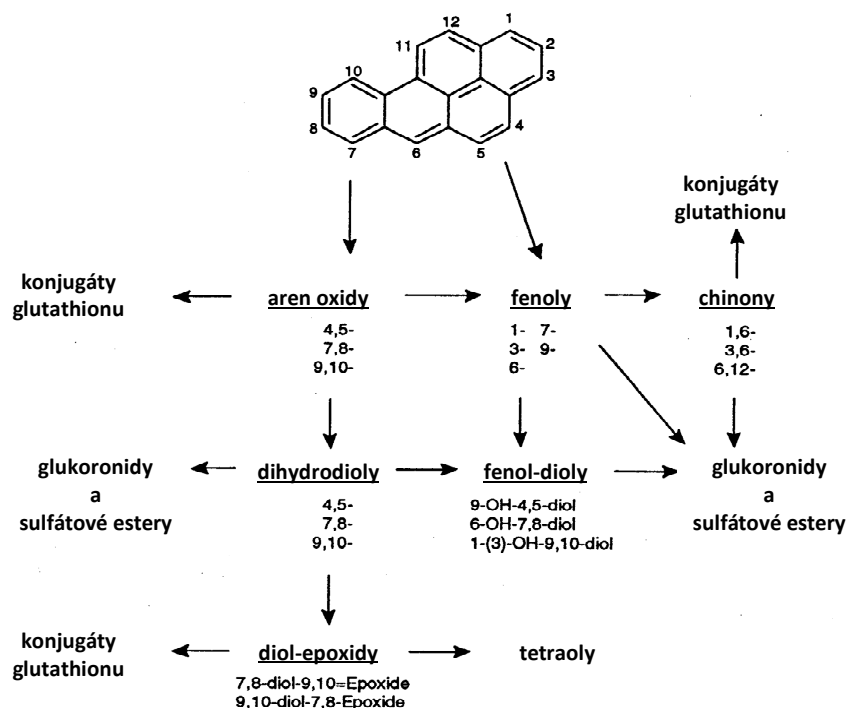
jí účastní, jsou závislé na typu tkáně. Vznikají sloučeniny rozpustné ve vodě, které mohou být vyloučeny z těla. Bohužel však také dochází k metabolické aktivaci PAU a vzniklé produkty mají mutagenní a karcinogenní účinky [6].

V současné době jsou známé tři hlavní cesty metabolické aktivace PAU a některé další specifické minoritní postupy [7]. Odborníky byla jako cesta s dominantním mechanismem akceptována teorie „oblasti zálivu“, kde dochází k tvorbě dihydrodiol epoxidů [8]. Druhou cestou je vznik radikál kationtů pomocí jedno-elektronové oxidace katalyzované peroxidásami cytochromu P450 [7]. Třetí metabolická aktivace PAU zahrnuje vznik *ortho*-chinonů, který je katalyzován dihydrodiol dehydrogenásami [9].

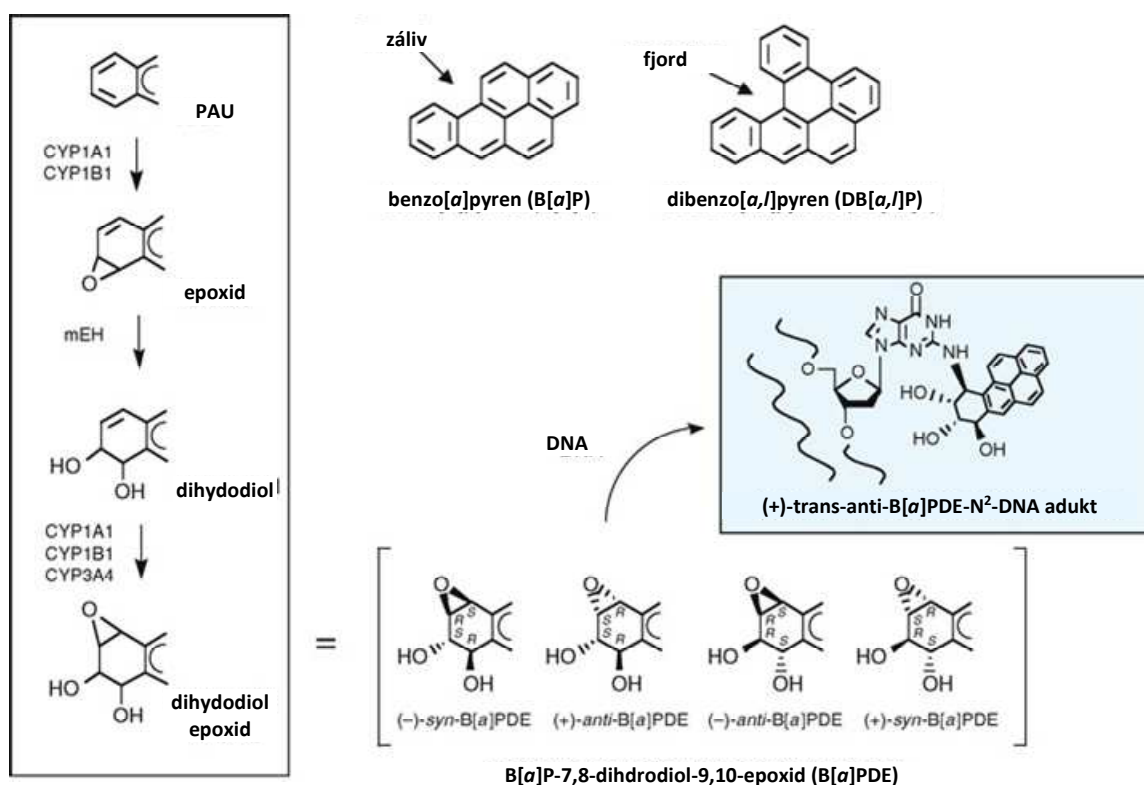
Oblast zálivu

Tato metabolická cesta PAU byla popsána již v několika publikacích [7-8]. Dochází k ní u PAU v oblasti zálivu nebo fjordu, kde se uskutečňuje tvorba stericky bráněných diol-epoxidů. V procesech metabolické aktivace vznikají stereoizomery. Teorie zálivu zahrnuje tři enzymaticky řízené reakce: první reakce je oxidace dvojné vazby, katalyzovaná enzymy cytochromu P450 (CYP), na nestabilní oxidy; druhá reakce je hydrolyza aren oxidů mikrosomální epoxid-hydrolásou (EH) za vzniku *trans*-diolů; třetí reakci představuje druhá CYP-katalyzovaná oxidace dvojných vazeb sousedících se skupinami –OH za vzniku diol-epoxidů. Vzniklé zálivové nebo fjordové diol-epoxydy jsou elektrofilní sloučeniny schopné se vázat na DNA. Metabolity vznikající působením CYP a EH jsou vysoce stereoselektivní. V dříve provedených a popsaných studiích bylo zjištěno, že obdobně jsou metabolizovány BaP, CH, 5-MCH, PHE, BcPH, BaA a DBaP [7].

Na obrázku je schematicky znázorněná metabolická aktivace BaP, která je modelem i pro ostatní PAU.



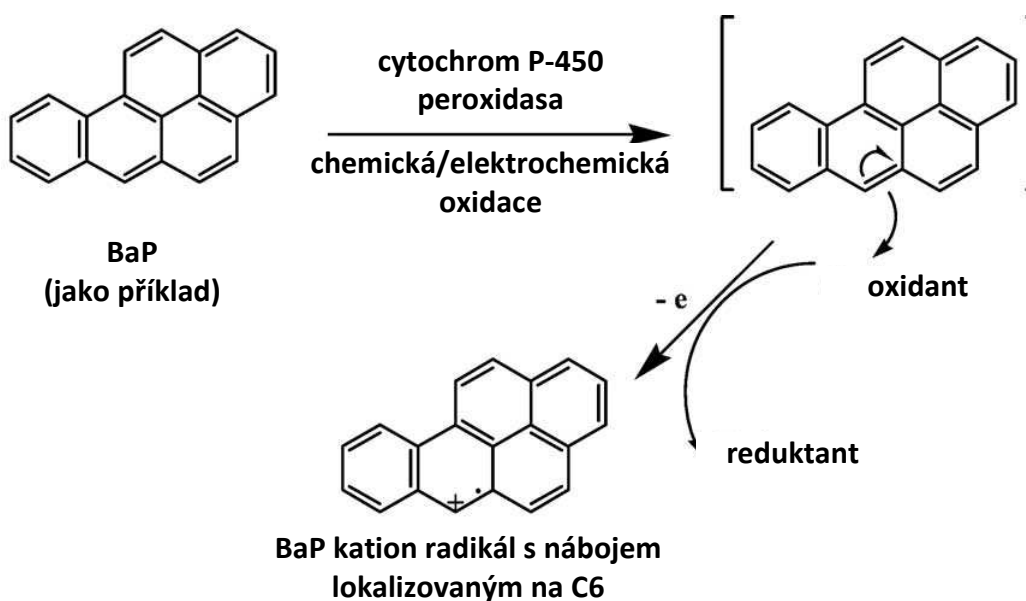
Obr. 1: Schéma metabolické aktivace benzo(a)pyrenu [7]



Obr. 2: Metabolická aktivace BaP a tvorba aduktu s DNA [6]

Tvorba kationt radikálu

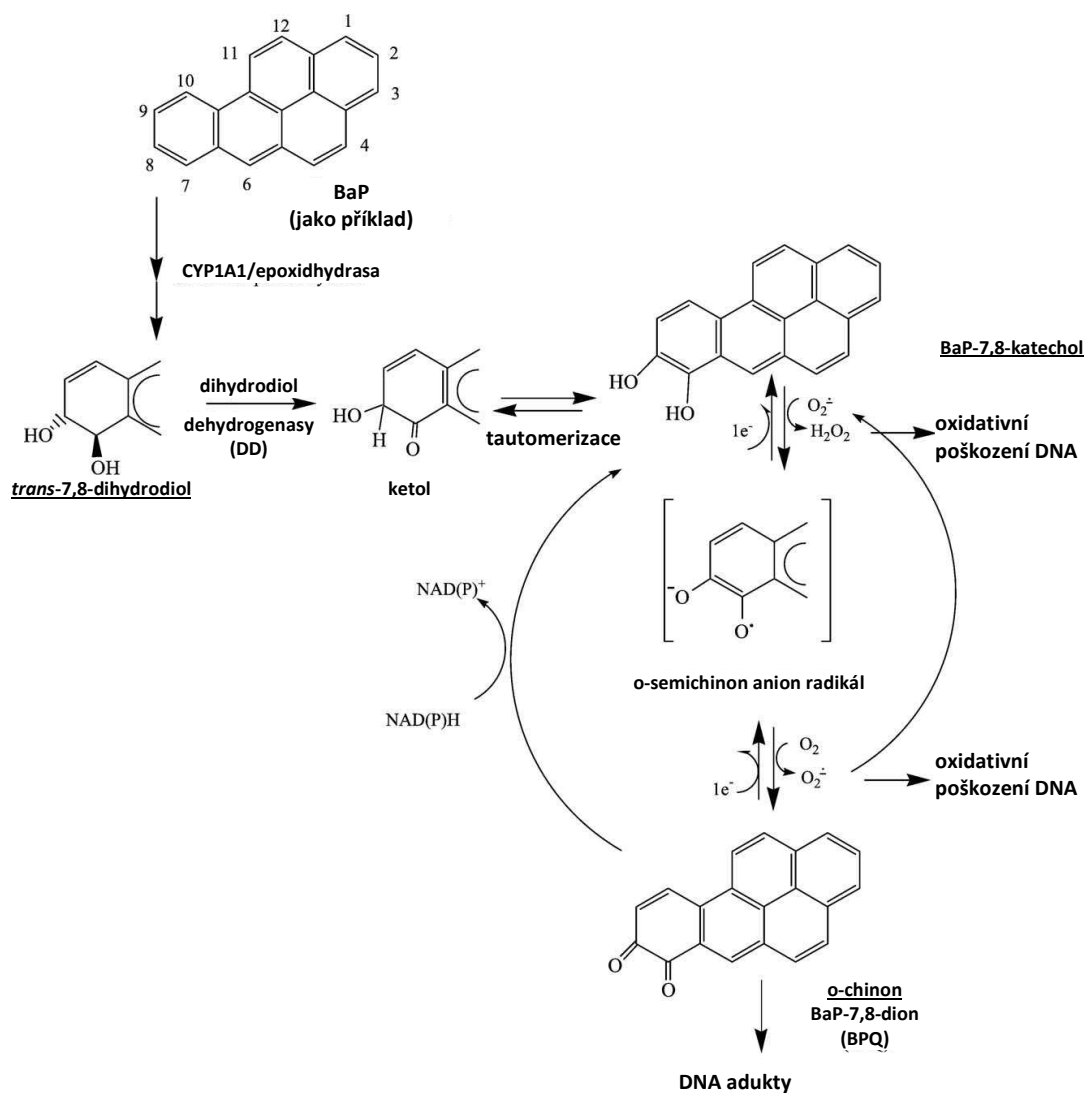
Odstraněním jednoho elektronu z konjugovaného π -systému molekuly PAU vzniká kationt radikál. Kationt radikály jsou silně elektrofilní a mohou interagovat s nukleofilními centry v buněčných makromolekulách (např. DNA). Vznik tohoto kationt radikálu je oxidační proces katalyzovaný peroxidásami P450.



Obr. 3: Vznik radikál kationtu BaP [7]

Aktivace přes PAU-orto-chinony

Za třetí cestu metabolické aktivace je považována tvorba *o*-chinonů. Ty vznikají za katalýzy P450 dihydrodiol dehydrogenázy (DD) oxidací diolů (non-K region diolů). Mechanismus závislý na oxidaci NADP^+ zahrnuje počáteční vznik ketolu, který samovolně přechází na formu katecholu. Nestabilní katechol je za přítomnosti enzymu DD oxidován na *o*-chinon. Tento mechanismus býval dříve považován za důležitou cestu odbourávání a vylučování PAU z organismu. Důvodem bylo to, že *o*-chinony vykazují silnou reaktivitu s buněčnými thioley, glutathiony a cysteinem, přičemž dochází k tvorbě ve vodě rozpustných konjugátů. Dnes už je tvorba chinonů spíš považována za cestu aktivace PAU, protože byla prokázána jejich vysoká reaktivita jako akceptorů pro Michaelovu reakci, které potom tvoří stabilní adukty s DNA [7, 9-10]. Metabolity PAU jsou vyloučeny z těla močí, žlučí a výkaly.



Obr. 4: Vznik *o*-chinonů (jako jedna z metabolických aktivací PAU) [7]

2.3 Výskyt PAU v životním prostředí

Primární cestou šíření PAU je ovzduší, do kterého se tato xenobiotika dostávají v největším množství. PAU vznikají během nedokonalého spalování a pyrolýzy fosilních paliv nebo dřeva [11]. Z průmyslových zdrojů jsou největším znečišťovatelem podniky na zpracování ropy, uhlí a na výrobu a zpracování oceli [12]. Dalšími zdroji PAU mohou být ropné skvrny, průsaky ropy, doprava nebo přirozený vznik během diagenese [13-14]. PAU jsou rovněž přítomny v asfaltu; některé z nich jsou používány v lékařství nebo při výrobě barviv, plastů nebo pesticidů. Při vzniku PAU přírodními procesy hrají velkou roli meteorologické podmínky (vítr, teplota) a typ paliva (vlhkost, zelené nebo suché dřevo, atd.).

Z ovzduší se potom PAU mokrou a suchou depozicí dostávají do ostatních složek životního prostředí [15].

2.3.1 Ovzduší

PAU se v ovzduší vyskytují v plynné fázi nebo adsorbované na částicích. Obecně lze říci, že PAU se dvěma nebo třemi kruhy jsou převážně v plynné fázi, PAU se čtyřmi kruhy se vyskytují v plynné fázi i na částicích a PAU s pěti a více kruhy jsou vázané především na částicích (Tab. 5:) [16]. Doba setrvání a transportní vzdálenost PAU je závislá na velikosti částic, na které jsou sorbovány, a na klimatických podmínkách [12, 17]. Asi 90 – 95 % PAU je adsorbováno na částicích o velikosti menší než 3,3 μm . Částice s průměrem 0,1 – 3,0 μm zůstávají v ovzduší několik dnů a déle, takže mohou být transportovány i na dlouhé vzdálenosti [18]. Při rozkladu PAU adsorbovaných na atmosferických částicích hraje nejdůležitější roli fotodegradace [19]. Mnoho PAU, jako např. BaP, jsou rychle degradovány působením UV záření.

Prostřednictvím některých studií byly ověřovány možné rozdíly mezi složením směsi PAU (liší se poměry jednotlivých sloučenin), a to v závislosti na typu zdroje [12, 20-21]. Procentuální zastoupení PAU s různým počtem kruhů a vypočítané poměry vybraných PAU bývají používány k určení typu emisního zdroje. Nicméně je nutné se na získané výsledky dívat obezřetně, protože může docházet k emisím z více rozdílných zdrojů a také ke specifickým atmosférickým reakcím (ozon nebo oxidy dusíku), což potom ovlivňuje složení směsi PAU [12]. Vypočítané poměry nemusí odpovídat skutečnému původu.

Tab. 5: Distribuce některých PAU v ovzduší [12]

PAU	Plynná fáze, částice
acenaften	plynná fáze
acenaftylen	plynná fáze
anthracen	plynná fáze, částice
fenanthren	plynná fáze, částice
pyren	plynná fáze, částice
fluoranthren	plynná fáze, částice
benz(<i>a</i>)anthracen	částice
chrysen	částice
benzo(<i>b</i>)fluoranthren	částice
benzo(<i>j</i>)fluoranthren	částice
benzo(<i>k</i>)fluoranthren	částice
benzo(<i>a</i>)pyren	částice
benzo(<i>e</i>)pyren	částice
dibenz(<i>a,h</i>)anthracen	částice
benzo(<i>ghi</i>)perylene	částice
indeno(1,2,3- <i>cd</i>)pyren	částice

2.3.2 Voda

PAU jsou semivolatilní sloučeniny, jejichž rozpustnost ve vodě je nízká a klesá se zvyšující se molekulovou hmotností (s počtem kruhů). Proto se PAU ve vodě vyskytují pouze v nízkých koncentracích a jsou převážně sorbované na pevných částicích a v sedimentech [22].

PAU se dostávají do povrchových vod především z ovzduší (suchou a mokrou depozicí); kromě toho jsou obsaženy v odpadních vodách (městských a průmyslových) a rovněž kontaminují vodu prostřednictvím různých havárií a úniků (těžba ropy, dopravní nehody, atd.) [23]. Do městských odpadních vod se PAU dostávají splachem z dopravních komunikací, z parkovišť, střech a jiných větších ploch, na kterých se usazují prachové částice. PAU jsou ve vysokých koncentracích přítomny také v průmyslových odpadních vodách pocházejících z výroby chemikálií (rozpouštědla, barviva, lubrikanty, insekticidy, aj.), ze zpracování ropy a uhlí, z výroby železa a oceli a z dalších průmyslových odvětví. V podzemních vodách se PAU vyskytují pouze v nízkých koncentracích, v porovnání s vodami povrchovými. Je to způsobeno přirozenou filtrací přes horninové podloží, po které PAU zůstávají sorbované v půdě. Ke zvýšení koncentrací dochází většinou pouze za mimořádných situací kontaminací pocházejících z povrchových zdrojů (havárie, povodně) [23]. PAU se mohou vyskytovat i v pitné vodě. Vyhláška č. 252/2004 Sb. stanovuje nejvyšší mezní hodnotu pro benzo(*a*)pyren

na $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a sumu PAU (benzo(*b*)fluoranthen, benzo(*k*)fluoranthen, benzo(*ghi*)perylene, indeno(1,2,3-*cd*)pyren) na $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [24].

PAU sorbované na částicích se usazují v sedimentech povrchových vod a moří, kde jsou silně vázané. Sedimenty tak tvoří jakési zásobníky a PAU z nich mohou být znovu uvolněny do okolní vody. U škeblí a ústřicí (mlži), které přefiltrují velké množství vody, může docházet ke kumulaci PAU, protože nejsou schopny účinně metabolizovat všechny PAU. Jejich čištění v čisté vodě už významně nesnižuje hladinu PAU v organismu. Ve většině organismů dochází k přirozené biotransformaci a nedochází k významnému bioobohacování ve vodním ekosystému. Biokoncentrační faktory jsou v rozmezí 10 – 10 000, a to v závislosti na druhu a typu PAU.

2.3.3 Půda

PAU se do půdy dostávají především z ovzduší (mokrú, suchá depozice) nebo z odpadních vod. Vyskytují se v ní zejména sorbované na půdních částicích. PAU s nižší molekulovou hmotností mohou být částečně rozpuštěny i v půdním roztoku. V půdě je nejdůležitějším mechanismem degradace mikrobiální degradace. Mikrobiálně jsou degradovány PAU s nízkou (naftalen) i vysokou molekulovou hmotností (koronen). Celá řada bakterií nebo hub (*Fungi*) disponují také metabolickými cestami vedoucími k degradaci PAU. Ne všechny druhy bakterií a hub jsou schopné degradovat všechny PAU; metabolické dráhy jsou většinou omezené jenom na některé PAU [25]. Problém se vyskytuje převážně u výše molekulárních PAU. Ty mohou být degradovány přes tzv. kometabolismus, který je definován jako nespecifická enzymatická reakce se substrátem, strukturně podobným primárnímu substrátu. Při degradaci vznikají metabolity, který jsou mnohem rozpustnější ve vodě než původní PAU, většinou jsou však také mnohem toxičtější. U nižších PAU (2–3 kruhy) je poločas rozkladu převážně dny, u vyšších PAU měsíce až roky [26].

2.4 Výskyt PAU v potravinách

Rostliny sloužící jako suroviny pro výrobu potravin mohou být kontaminovány PAU z ovzduší (suchá a mokrá depozice), dále příjmem živin z půdy nebo vznikají při endogenní syntéze. Dnes je za hlavní antropogenní zdroj PAU v potravinách považována depozice z ovzduší [27]. K vyšší výskytům PAU samozřejmě dochází v oblastech s rozvinutým průmyslem nebo v oblastech blízko dopravních komunikací. K expozici živočichů dochází především vodou, ovzduším a potravou. PAU se více kumulují u vodních živočichů, především pak u mořských bezobratlých (mlži, plži) [28].

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

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

K exogenní kontaminaci potravin PAU dochází takovým způsobem, že potravina přichází do styku se zplodinami hoření; to platí zejména pro grilování, přímé sušení, pražení a uzení. Pokud jsou použity vhodné technologické postupy, je množství PAU, které se dostanou do

styku s potravinou minimální, v porovnání s množstvím PAU, které jsou již obsaženy ve složkách životního prostředí.

Při grilování nebo opékání jídla nad dřevěným uhlím nebo přímo v ohni rovněž vznikají PAU. Při přímém kontaktu se zdrojem tepla dochází v masě k pyrolýze tuků a takto jsou přímo generovány PAU. Jestliže maso není v přímém kontaktu (mřížka grilu), kape tuk na uhlí nebo do ohně a opět mohou vznikat PAU, které se zpětně, a to spolu s kouřem, dostávají k potravě. Při vertikálním grilování je kontaminace nižší než při klasickém horizontálním grilování [29]. Tvorbu PAU při grilování významně snižuje tepelná předúprava nebo zabalení masa do hliníkové fólie [30].

Uzení masných výrobků je rovněž deklarováno jako častý zdroj PAU v potravinách. Koncentrace PAU jsou v tomto případě významně závislé na spouště faktů, jakými jsou např. druh použitého dřeva, teplota, přístup kyslíku, typ udící komory a doba uzení [31-32]. Obecně lze říci, že uzení v malých domácích udírnách je převážně zdrojem vyšších koncentrací PAU, v porovnání s moderními udírcími komorami používanými ve výrobních podnicích [33]. Kromě přímého uzení kouřem se používají také kouřová aroma (liquid smoke flavorings).

2.5 Technologie výroby trvanlivých fermentovaných masných výrobků

Trvanlivé masné výrobky dělíme podle vyhlášky č. 326/2001 Sb. [34] na fermentované a tepelně opracované. Trvanlivé fermentované masné výrobky (TFMV) jsou definovány podle vyhlášky č. 326/2001 Sb. jako výrobky tepelně neopracované, určené k přímé spotřebě, u kterých v průběhu fermentace, zrání, sušení a uzení za definovaných podmínek došlo ke snížení aktivity vody na hodnotu a_w max. 0,93, s minimální dobou trvanlivosti 21 dní při teplotě + 20 °C. Do této skupiny masných výrobků patří i salám Poličan.

2.5.1 Míchání díla

TFMV vyžaduje dokonalé vypracování díla s mozaikou se zřetelným oddělením částic tuku a svalové tkáně (masa). Základním předpokladem pro splnění tohoto požadavku je zpracování hlavní suroviny, zejména vepřového sádla, případně tučných ořezů, v mraženém stavu. Nejčastěji se zpracovává mražené vepřové maso a sádlo, podíl hovězího masa se přidává v čerstvém stavu. Maso je dostatečně pevné a umožňuje hladký řez jen při teplotách od -1 až do 0 °C. Při mělnění dochází k zahřívání suroviny [35].

Druhým předpokladem je dokonalý technický stav mělnících strojů, tj. kutru a řezaček. Podle počtu zpracovaných dávek je nutné měnit nože i několikrát denně. V našich podmínkách se zpracovává dílo pro trvanlivé salámy převážně v kutrech.

Hodnota pH díla bezprostředně po zamíchání je určena především hodnotou pH masa a tuku. Obvykle se pohybuje v rozmezí hodnot 5,7 – 5,9. Zpracováním sádla s přídatkem dusitanové solí směsi a dalších látek se snižuje vodní aktivita díla a_w na hodnotu 0,96. Hodnoty pH pod 6,0 a a_w 0,96 v díle jsou nutné pro optimální rozvoj bakterií mléčného kvašení, a tím pro zdárný průběh zrání [36].

2.5.2 Narážení díla

Při narážení díla do obalového střeva má být dílo ještě v mraženém stavu, neboť je zapotřebí zabránit roztírání tuku při výstupu z plnicího stroje. Je-li však teplota příliš nízká, vzájemné spojení částic díla je po rozmražení velmi slabé a nevytvoří se dostatečně pevná konzistence výrobku. Optimální teplota díla při narážení je okolo 1 °C. Dílo se plní pomocí tzv. narážeček. Po naplnění je každé střevo uzavřeno sponou zpravidla na automatech [36].

2.5.3 Zrání a fermentace

Naplněná obalová střeva jsou navěšena na udírenské vozy a dopravena do klimatizovaných prostor (komor).

Před nastavením teploty a vlhkosti vzduchu v komorách, a to na hodnoty odpovídající počáteční fázi zrání, je nutné vyrovnat teplotní rozdíl mezi dílem naraženým do obalového střeva a vnějším prostředím. Toto teplotní vyrovnání je nezbytné, protože činnost fermentačních bakterií je optimální při teplotách kolem + 25 °C (vyšší teploty nejsou přípustné vzhledem k možnému rozvoji patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů). Vyrovnání má trvat 2 – 6 hodin podle průměru obalového střeva. Musí být co nejrychlejší (teplota + 25 °C) a musí se uskutečnit při co nejnižší relativní vlhkosti vzduchu (RVV) – pod 60 % [35].

V klimatizovaných komorách probíhá zrání podle předem stanoveného režimu. Kromě teploty vzduchu a RVV je důležité věnovat pozornost také rychlosti proudění vzduchu, která je nutná pro rovnoměrné sušení a zakouření výrobku při jeho uzení. Zrání trvanlivých fermentovaných salámů je plynulý proces, při jeho řízení se vychází z technologických postupů, zkušeností a druhu výrobku.

Níže je uveden příklad procesu zrání rozdělený na tři období (fáze) [35]:

První fáze trvá 2 – 4 dny. Teplota vzduchu v komorách je nastavena na max. 25 °C v první den zrání, poté pozvolna klesá až na 22 °C, RVV je v rozmezí 90 – 94 %, rychlost proudění vzduchu 0,5 – 0,8 m·sec⁻¹. Hodnota pH dýla klesá na 5,0– 5,6, vodní aktivita se snižuje z 0,96 na přibližně 0,94. Během tohoto období probíhají v díle biochemické pochody umožňující vybarvení výrobku.

Druhá fáze trvá 5 – 10 dní. Teplota vzduchu postupně klesá z 22 na 18 °C, RVV se snižuje z 90 % na 80 %, rychlost proudění vzduchu je v intervalu 0,2 – 0,5 m·s⁻¹. Hodnoty pH dosahují v díle 4,8 – 5,0, vodní aktivita se pohybuje v rozmezí 0,93 – 0,95.

Třetí fáze probíhá již za teplot kolem 15 °C, rozpětí RVV je 70 – 80 %, proudění vzduchu je již minimální, a to 0,05 – 0,1 m·s⁻¹. Vodní aktivita klesá pod hodnotu 0,93.

V České republice se vyrábí většina trvanlivých fermentovaných salámů jako uzené produkty. Pouze několik výrobců se orientuje i na salámy s povrchovou plísní.

Pokud se výrobky udí, děje se tak rovněž v klimatizovaných komorách, které se označují jako udírenské nebo zakuřovací komory. Kouř o maximální teplotě 25 °C se získává ve vyvíječích z bukových štěpek nebo pilin a potrubím je přiváděn do jednotlivých komor. Uzení trvá zpravidla 7 – 8 dní, poté již probíhá pouze zrání a sušení výrobků, a to buď ve stejných komorách, případně se salámy převážejí do tzv. zracích komor, rovněž klimatizovaných. Udírenský kouř aromatizuje výrobek a podílí se na jeho povrchovém vybarvení. Látky obsažené v kouři mají také antioxidační účinek projevující se na povrchových vrstvách salámu. Karbonylové sloučeniny a fenoly, které jsou přítomné v kouři, stabilizují obalové střevo a inhibují růst plísní, kvasinek, případně dalších mikroorganismů na jeho povrchu [36]

3 ANALÝZA PAU

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

3.1 Vzorkování

3.1.1 Aktivní vzorkování

Vzorkování ovzduší

V ovzduší se mohou PAU vyskytovat v plynné fázi nebo sorbované na pevných poléťavých částicích (popř. v aerosolových kapénkách). Pro záchyt PAU se používá velkoobjemových vzorkovačů vzduchu s kontrolovatelným průtokem plynu, které jsou osazeny filtry potřebnými pro oddělení pevných částic a plynu. Pro zachycení částic se používají především mikroporézní filtry ze skleněných vláken potažených teflonem. Podle zvolené velikosti lze od sebe oddělit různé velikosti částic. Pro záchyt plynných PAU se využívají polyuretanové pěny. Spolu s PAU dochází k odběru i dalších látek, a proto je dále nutná extrakce a přečištění před vlastní analýzou [17, 37].

Vzorkování vody a sedimentů

Při vzorkování vody se používají tmavé skleněné čisté vzorkovnice, aby bylo zaručeno, že nebude docházet k fotodegradaci PAU. Odebraná voda musí být do zahájení analýzy skladována při teplotě 4 °C. V případě, že voda obsahuje zákal, je nutné vodu před analýzou zfiltrovat.

Při vzorkování sedimentů se odebere jeho potřebné množství, které je umístěno do plastové nebo skleněné zásobní láhve. Sediment musí být před dalším použitím vysušen (pozor na ztráty těkavějších analytů). V případě nutnosti je možné pomocí sondy odebírat i hloubkové profily sedimentu (popř. půdy) ke stanovení výskytu PAU v jednotlivých vrstvách [38].

3.1.2 Pasivní vzorkování

Kromě metod aktivního vzorkování mohou být aplikovány také pasivní vzorkovače. Jejich výhodou je možnost použití při velmi nízkých koncentracích analytů, pro které by při klasickém vzorkování muselo být odebírané množství vzorku obrovské; tento typ vzorkování lze doporučit rovněž při déle probíhajícím monitoringu, při kterém mohou být zachyceny i nepatrné výkyvy v koncentracích. Dosud získané poznatky o využití tohoto typu vzorkování prokázaly, že tento způsob lze doporučit pro sledování biodostupných forem analytů. Pasivní vzorkovače se používají pro vzorkování vzduchu, vody, půdy i sedimentů [39]. Mezi nejběžněji používané pasivní vzorkovače patří SPMD (Semi-permeable Membrane Device) [40]. K vzorkování vodných roztoků lze použít i SBSE [41].

3.2 Extrakce a přečištění vzorku

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

V poslední době převládá při stanovení těchto analytů snaha spojit krok extrakce a přečištění v jeden. K tomuto účelu se dá použít SPE při extrakci xenobiotik ze vzorků vody [42]. Použijeme-li jako vhodný extrakční postup PLE, je možné nasypat sorbent do extrakční patrony a k přečištění dojde už při extrakci [43]. Tím se ušetří čas a vyřadí se jeden krok z úpravy vzorku.

3.2.1 Extrakční metody

Jednou ze základních požadovaných technik při analýze potravin je alkalická hydrolýza (saponifikace) methanolickým roztokem KOH, která v závislosti na typu vzorku trvá 2 – 4 hodiny [44-46]. Po hydrolýze ještě následuje extrakce uvolněných PAU do organického rozpouštědla a nezbytné oddělení fází (v dělicí nálevce, centrifuze).

Pro pevné vzorky (sediment, půda, potraviny) se jako základní srovnávací metoda aplikuje Soxhletova extrakce. Je to kontinuální extrakční metoda, při níž se používá speciální skleněná aparatura. Extrahovaný pevný vzorek je umístěn nejčastěji do papírové patrony uprostřed aparatury; do prostoru patrony se opakovaně dostává rozpouštědlo a dochází k extrakci. Velkou výhodou Soxhletovy extrakce je velmi dobrá výtěžnost, nevýhodou je časová náročnost. Pro rychlejší extrakci je používán systém Soxtec.

Mezi dnes nejpoužívanější extrakční metody patří extrakce rozpouštědlem podporovaná tlakem (ASE, PLE, PSE, PFE). Při zvýšeném tlaku zůstává rozpouštědlo v kapalném stavu a má lepší extrakční vlastnosti. Také extrahované analyty mají větší difúzní koeficient. Zvýšení tlaku umožňuje použití rozpouštědel v kapalném stavu (pod jejich bodem varu). PLE je velmi účinná, časově méně náročná a snižuje spotřebu rozpouštědel; přístroje pro extrakci jsou však více finančně nákladné. Do extrakční patrony je možné přidat sorbent k přímému čištění extraktu [47]. Pro vzorky nestálé při vyšší teplotě není možné použít ASE; u této metody může dojít při snížení teploty při výstupu extraktu k jeho precipitaci.

Mikrovlny mohou být použity pro zahřívání materiálu (vzorek, rozpouštědlo) na základě absorpce záření a odvedení získané energie ve formě tepla. Při mikrovlnné extrakci (MAE) je vzorek umístěn do extrakčních patron (teflon); ke vzorku je přidáno rozpouštědlo a patrony jsou umístěny v ochranném obalu do mikrovlnné pece. K extrakci je možné používat řízenou teplotu nebo výkon po danou dobu. Nutné je použít polární rozpouštědla (voda, methanol,

acetonitril, aceton, které mohou být i ve směsi s nepolárními rozpouštědly), která jsou schopna absorbovat mikrovlnné záření. MAE může být v provedení pro extrakci za atmosférického tlaku v otevřených nádobách nebo za zvýšeného tlaku (obdobně k ASE) v uzavřených nádobách. Velkou výhodou je možné zpracování série vzorků v jednom extrakčním kroku najednou a menší spotřeba rozpouštědel; nevýhodou je především cena a také využitelnost extrakce, která je závislá na typu matrice [48].

Pro extrakci pevných vzorků se rovněž využívá jednoduchá metoda extrakce podporovaná ultrazvukem. Díky ultrazvuku se rozpouštědlo lépe dostává do pórů pevného materiálu. Výhodou metody je její rychlost, jednoduchost a malá pořizovací cena, mezi nevýhody patří větší množství extraktu a nutnost filtrace.

Superkritická fluidní extrakce (SFE) používá jako extrakčního činidla tekutinu v nadkritickém stavu (kritická teplota T_c a kritický tlak p_c jsou typické pro každou sloučeninu). Typické je její použití pro extrakci pevných vzorků, kde mohou být analyty hluboko zakomponovány do matrice; jsou silně vázány na povrchu matrice nebo enkapsulovány v organických vzorcích, atd. Nejčastěji je pro extrakci používán CO_2 ($T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$, $p_c = 72,9 \text{ atm.}$). Vlastnosti nadkritické tekutiny (hustota, viskozita, difúzní koeficient) jsou mezi kapalinou a plynem. Nejdůležitější vlastností svědčící pro použití této extrakce je její solvatační schopnost. Celý proces extrakce se skládá z hlavních kroků – extrakce vzorku nadkritickou kapalinou, expanze kapaliny a oddělení (sorpce) rozpuštěných látek, znovu rozpuštění analytů ve vhodném rozpouštědle. Všechny operace probíhají v jednom přístroji, není potřeba žádné další externí manipulace se vzorkem, což je výhodou vzhledem k možným ztrátám analytů. Nevýhodou je určitě pořizovací cena extraktorů. SFE může být přímo spojena s SFC (superkritická fluidní chromatografie) nebo s HPLC [49].

Pro extrakci kapalných vzorků jsou používány nejen extrakce kapalina-kapalina (jednoduchá, levná, velké objemy extraktů), ale především extrakce pevnou fází (SPE). SPE je jednoduchá metoda, kde podle volby stacionární a mobilní fáze můžeme lehce ovlivnit typ extrahovaných analytů. Pro přímou extrakci PAU se používají především fáze C18. Výhodou extrakce je přečištění a zakoncentrování v jednom kroku, dále možnost automatizace, případně extrakce většího množství vzorků najednou. U vzorků s větším množstvím pevných částic je nutná filtrace, jinak by došlo k zanesení a ucpání SPE kolonek. U některých látek je možná sorpce na povrch kolonek [50].

3.2.2 Clean-up

Po extrakci je ve většině případů nezbytné přečištění extraktu (odstranění nežádoucích koextrahovaných látek). K tomuto účelu je doporučováno několik vhodných metod.

Moderní a rychlá metoda, která může být automatizována, je gelová permeační chromatografie (GPC), kde dochází k dělení molekul na základě jejich velikosti. Pokud zvolíme správnou stacionární fázi, lze GPC použít pro odstranění různých koextrahovaných látek. Pro další analýzu se odebírá frakce, ve které jsou přítomny hledané analyty. Pro odstranění tuků se nejčastěji používá stacionární fáze Bio-Beads S-X3 [5, 46, 51], dále pak Sephadex LH20 (na bázi hydroxypropyldextranu). Jako mobilní fáze se v tomto případě používá směs n-hexanu a ethylacetátu, dichlormethan nebo chloroform. V některých případech jsou i po přečištění GPC přítomny v extraktu lipidy; v případě, že by rušily při stanovení, musí být vzorek ještě dočištěn (např. SPE nebo kolonovou chromatografií). Výhodou GPC je její možná automatizace.

Kolonová adsorpční chromatografie se využívá pro odstranění tuku, ale i dalších koextrahovaných polárních látek. Běžně používanými sorbenty jsou silikagel, florisil nebo alumina. V některých publikacích je uváděno používání sorbentů částečně deaktivovaných vodou [43, 46]. Nevýhodou je špatná automatizace, avšak výhodou je možnost variabilně měnit množství použité stacionární fáze a zvýšit sorpční kapacitu kolonky.

Extrakce na tuhou fázi (SPE) pracuje na stejném principu (adsorpční chromatografie). Většinou se používá komerčně připravených kolonek a extrakce bývá automatizována. Používané stacionární fáze mohou být nejen silikagel, florisil, alumina, ale i polymer polystyren-divinylbenzen (PS-DVB) [47], CN/SiOH [5].

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 6: Přehled používaných metod pro stanovení PAU v různých maticích

Extrakční technika	Clean-up	Další popis	Materiál	Analýza
ASE	GPC	BioBeads SX-3, cyklohexan:ethylacetát 1:1	čaj, káva [46]	GC/HRMS
	GPC + SPE	Bio-Beads SX3, cyklohexan:athylacetát 1:1; + SPE ASPEC Xli (silikagel), cyklohexan	hovězí a vepřová šunka [51]	GC/HRMS
	GPC+SPE	Bio-Beads SX3, cyklohexan:athylacetát 1:1 + SPE (silikagel), cyklohexan	čokoláda [52]	GC/HRMS
	GPC	BioBeads SX-3, cyklohexan:ethylacetát 1:1	masné výrobky [51]	GC/HRMS
	SPE	hex:DCM	rašelina [53]	HPLC
	SPE+sorbent v extrakční patroně přečištění zároveň při extrakci, silikagel	Envi Chrom, cyklohexan:ethanol 1:1 hexan:dichlormethan 8,5:1,5	vzorky potravin a olejů [47] vepřové sádlo, ryby [43]	GC-MS/MS GC/MS
ultrazvuk	-	n-hexan	půda [54]	GC/MS
	-	toluen	dehet [55]	GC/MS
	-	hexan	toastový chléb [56]	HPLC
	SPE	n-hexan, Sep-Pak C18	vzorky španělských salámů [57]	HPLC
	kolonová chromatografie	Florisil, n-hexan:DCM 6:4 Sep-Pack Plus Silica, n-hexan	slávky [58] dětské potraviny (cereálie, sušené mléko) [59]	fluorimetr (celkové PAU) HPLC
MAE	SPE	cyklohexan	ryby, kraby, mlži [60]	HPLC
	GPC (SPE, saponifikace)	Envirosep ABC, MF – dichlormethan (porovnání více typů přečištění)	rybí játra, ústřice, štítozubec [61]	GC/MS

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Pokračování *Tab. 6*

Extrakční technika	Clean-up	Další popis	Materiál	Analýza
saponifikace	SPE	silikagel, cyklohexan	čaj, káva [46]	GC/HRMS
	SPE	Extrelut, dichlormethan	grilované maso [29]	HPLC
	SPE	Strata, Isolute, 5% MTBE v cyklohexanu	uzené maso a ryby [62]	HRGC/MS
SPE	(LC-18, ENVI-18)	DCM	voda [63]	GC/FID
	ENVI-18	?	rozpustná káva [44]	GC/MS
	EnvirElut	?	hadí kůže [64]	GC/MS
SFE	pouze ředění	vyzkoušeno také PLE, MAE	kontaminovaná půda [65]	GC/FID
	LLE	extrakce subkritickou voda, po té extrakce do DCM	sediment, půda [66]	GC/MS
soxhlet	SPE	alumina, ethylacetát	sediment [42]	GC/HRMS
SBSE	-	ACN:voda 8:2	vzorek mátového čaje [41]	HPLC

3.3 Metody analýzy

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

3.3.1 Kapalinová chromatografie

Metoda kapalinové chromatografie ve spojení s fluorescenčním detektorem je standardní metodou pro analýzu PAU. Spektrofotometrické vlastnosti PAU jsou velmi významné při jejich analýze pomocí HPLC. Kromě typických absorpčních spekter mají PAU i schopnost fluoreskovat. Pokud použijeme fluorescenční detektor, je možné získat detekční limity na požadované hodnotě $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Fluorescenční detektor je také více selektivní než detektor UV-VIS. Abych využily všech výhod fluorescence, je zapotřebí pro jednotlivé PAU zvolit správnou excitační a emisní vlnovou délku. Při vlastní analýze je dnes možné nastavit na detektoru časový program změny excitační a emisní vlnové délky podle retenčních časů daných sloučenin.

Výhodné je propojení dvou detektorů, a to DAD a FLD. Změřené absorpční spektrum umožní porovnáním s knihovnou spekter identifikovat PAU a použít tuto informaci pro confirmaci. U DAD platí řádově vyšší detekční limity než u FLD a tento detektor není tak selektivní. U PAU, které nefluoreskují, je signál z DAD využit i pro kvantifikaci.

Při analýze PAU se využívá reverzní chromatografie. Mobilní fází je ve většině případů acetonitril a voda. Při gradientové eluci roste obsah ACN až na 100 %. Analytické kolony jsou na bázi silikagelu modifikovaného oktadecylovými řetězci. Typicky používaná délka kolony je 25 cm, ID 4,6 mm a velikostí částic 5 nebo 3 μm . U kolon s průměrem 4,6 mm je možné nastříknout i několik desítek μl . To je výhodné pro snižování detekčních limitů.

Tab. 7: Příklady nastavení vlnových délek při analýze PAU HPLC/FLD

Sloučenina	Excitační vlnová délka (nm)	Emisní vlnová délka (nm)
<i>Rey-Salgeiro a spol.[53].</i>		
F	284	464
PHE	334	377
BaA, CHR	274	414
BbF, BkF	300	446
BaP	296	406
DBahA	393	453
BghiP, IP	300	470
<i>Lorenzo a spol. [57]</i>		
NA	270	340
AC, FL	270	340
PHE	254	375
AN, F	260	420
PY, BaA, CHR	254	390
BbF, BkF, BaP, DBahA, BghiP	260	420
IP	293	498

Pokračování **Tab. 7**

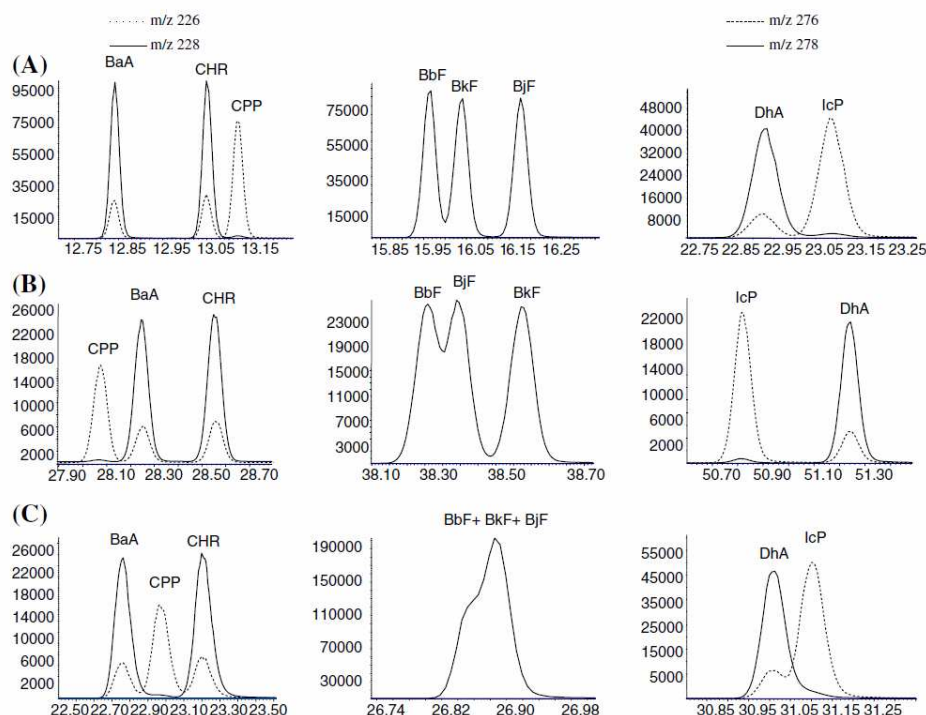
<i>Zhang a spol. [60]</i>		
FL	210	310
PHE	210	310
AN	210	310
PY, F	248	382
BaA, CHR	268	382
BbF, BkF, BaP, DBahA, BghiP	286	410

3.3.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je dnes již dominantní analytickou koncovkou při analýze PAU. Je vhodná pro analýzu vzorků ze životního prostředí i potravin. Její pozitivní vlastnosti ve srovnání s LC jsou větší selektivita, rozlišení a citlivost. Při analýze komplexních vzorků je výhodou mnohem větší kapacita píků používaných kapilárních kolon. K detekci se téměř výhradně využívá hmotnostní spektrometrie [67]. Pro stanovení PAU lze využít i plynovou chromatografii ve spojení s plamenově-ionizačním detektorem [65].

Vylepšení GC metod jako jsou velkoobjemový nástřik, termální desorpce, rychlá GC, GC×GC, aj. dále snižují detekční limity a rozšiřují oblasti použitelnosti metod [67].

Hlavním problémem při chromatografické separaci je koeluce některých analytů, které jsou navíc charakterizovány stejnou molekulovou hmotností, popř. hmotnostním spektrem. Důležité je proto u GC metody výběr vhodné stacionární fáze pro separaci PAU. Nejčastěji používané stacionární fáze jsou methyl a fenyl substituované polysiloxany. Některé patentově chráněné fáze se specifickou selektivitou (např. DB-XLB) jsou přímo doporučovány pro separaci PAU. PAU, u kterých dochází na jedné koloně ke koeluci, mohou být při použití jiné stacionární fáze dostatečně rozděleny. Pro separaci jsou problémovými analyty, u kterých dochází ke koeluci, zejména BaA, CHR a CPP; BbF, BkF a BjF; DBahA a IP [68]. Pro stanovení 16 EPA PAH jsou běžně doporučovány kapilární kolony s mírně polární stacionární fází methylpolysiloxan s 5 % fenylu. Rozměry obvykle používaných kolon jsou 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm. Kolony pro rychlou chromatografii jsou kratší s menším průměrem, typický je rozměr 10m × 0,1 mm × 0,1 μm. Pro analýzu PAU prioritních podle EU je požadované rozdělení látek dosaženo především na kolonách se stacionární fází 50 % fenyl methylpolysiloxan [67-70].



Obr. 5: Chromatografická separace kritických píků na rozdílných stacionárních fázích za stejných teplotních podmínek (A) DB-17MS (60 m × 0,25 mm ID; 0,25 μm), (B) DB-5MS (60 m × 0,25 mm ID; 0,25 μm), (C) Optima® δ-6 (30 m × 0,25 mm ID; 0,25 μm) [68]

GC–MS

Po separaci PAU plynovou chromatografií se k detekci převážně používá hmotnostní spektrometrie s kvadrupólovým analyzátelem a elektronovou ionizací (EI). PAU poskytují intenzivní molekulární ionty a hmotnostní spektra s malou fragmentací. Ke kvantifikaci se používá SIM (selective ions monitoring), který umožňuje stanovit sloučeniny na potřebných detekčních limitech. V oblasti ultrastopové analýzy není mód SCAN dostačující. Při těchto měřeních je potom nevýhodou ztráta informace o hmotnostním spektru jednotlivých píků (odpovídajících sledovaným analytům). Zachování spektrální informace umožňuje hmotnostní spektrometr s analyzátelem doby letu (TOF-MS) [67, 71-72].

GC–HRMS a rychlá GC

Pro stanovení PAU se s výhodou aplikuje metoda rychlé chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením. Autoři Zienhals a spol. [46] využili tuto metodu pro stanovení PAU prioritních podle EU v čaji. Optimalizovaná metoda byla zkrácena z 72 min (GC–MS) na pouhých 25 min. Využití hmotnostní spektrometrie je výhodné pro identifikaci a kvantifikaci PAU ve velmi komplexních maticích (potraviny, ŽP), kde přesná molekulová hmotnost může pomoci při správné identifikaci sloučenin.

GC-MS/MS

Pro stanovení PAU lze využít i spojení plynové chromatografie a trojitého kvadrupólu (GC–QqQ–MS/MS). Výhodou tohoto způsobu detekce je velká selektivita trojitého kvadrupólu. Díky tomu mohou být vynechány některé kroky při úpravě vzorku a dosaženo tak menších ztrát analytů [54]. B. Veyrand a spol. [47] ve své práci zaměřené na analýzu PAU ve

vzorcích ryb porovnávali metodu HRMS, MS/MS a jednoduché MS. Pro daný případ analýzy BaP v rybách bylo jednoduché MS nedostačující, v případě ostatních dvou metod byly výsledky srovnatelné. Z ekonomických a technických důvodů byla metoda MS/MS vyhodnocena jako nejvhodnější.

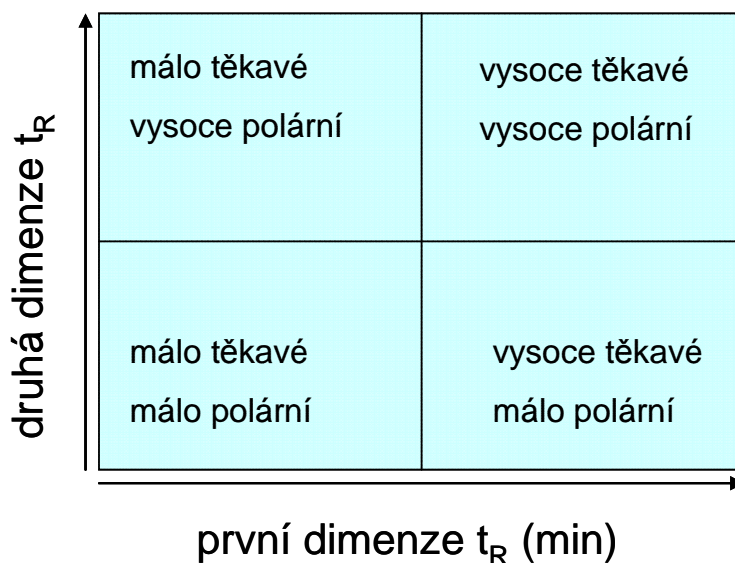
Tab. 8: Podmínky pro analýzu GC-MS/MS [54]

Sloučenina	Prekurzorový ion (m/z)	Produktový ion (m/z)
NA	128	78, 102, 127
ACL	152	126, 150, 151
AC	153	126, 152
FL	165	139, 165
PHE	178	152, 176, 177
F	202	174, 200, 201
PY	202	174, 200, 201
BaA	228	200, 224, 226
CPP	226	223, 224, 225
CHR	228	200, 224, 226
5-MCH	242	226, 239, 241
BbF, BjF, BkF	252	224, 249, 250
BaP	252	224, 249, 251
IP, DBahA	276	273, 274, 275
BghiP	276	273, 274, 275
DBalP	302	300, 301, 302
DBaeP	302	300, 301, 302
DBaiP	302	300, 301, 302
DBahP	302	299, 300, 302

GC × GC–TOF–MS

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

Princip multidímenzionální plynové chromatografie je znám už téměř 50 let [73]. V roce 1991 byla publikována práce Liu a Phillipse [74], ve které bylo představeno nové řešení dvojdímenzionální plynové chromatografie využívající termálního desorpčního modulátoru. Principem této GC × GC je spojení dvou kapilárních kolon s rozdílnou stacionární fází a jinými rozměry. Vzorek separovaný na primární koloně je poté separovaný na nezávislé sekundární koloně. Celý analyzovaný vzorek je separován na obou kolonách, které mají odlišnou selektivitu. „Nástřik“ z primární kolony na sekundární se děje s využitím modulátoru, který zamražením a opětovným zahřátím postupně dávkuje vzorek z primární kolony na kolonu sekundární. Každá sloučenina je charakterizována dvěma retenčními časy. Výhodou metody je větší kapacita píků v porovnání s běžnou GC, zvýšení poměru signál-šum, získání strukturovaného 2D chromatogramu. K využití všech výhod získaných použitím 2D GC (GC × GC) je nutné mít vhodný detektor, který je schopný rychlého sběru dat (50 Hz a více). Ve spojení s 2D GC se dnes využívá především TOF–MS, ale také FID a ECD [75].



Obr. 6: Princip separace látek v systému GC \times GC

Kolony

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

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

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál, chemikálie a přístroje

4.1.1 Přístroje a zařízení

- soxhletův extraktor Soxtec (Büchi, Švýcarsko)
- kapalinový chromatograf Agilent 1 100 Series s UV detektorem (izokratické čerpadlo, odplyňovač mobilní fáze, automatický dávkovač, UV detektor, sběrač frakcí) (Agilent, USA), kolona Bio-Beads S-X3, 8×500 mm (Tessek, Česká republika)
- rotační vakuová odparka s vodní lázní Rotavapor R-200 (Büchi, Švýcarsko)
- plynový chromatograf Agilent 6890 N (Agilent, USA)
- hmotnostní spektrometr Pegasus IVD, (Leco, USA)
- odpařovací zařízení (Labicom, Česká republika)

4.1.2 Standardy a chemikálie

- chloroform (SupraSolv, Merck, Německo)
- undekan (for GC, Sigma Aldrich, USA)
- isooktan (SupraSolv, Merck, Německo)
- diethylether (SupraSolv, Merck, Německo)
- síran sodný bezvodý, p.a.; žíhaný při 600°C, 5 hodin (Merck, Německo)
- směsný standard PAH Mix 9 (16 EPA PAU) v cyklohexanu, koncentrace 100 ng·μl⁻¹ (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Německo)
- směsný standard deuterovaných PAU PAH Mix 24 deuterated, koncentrace 10 ng·μl⁻¹

4.1.2.1 Příprava kalibračních roztoků

4.1.2.2 Směs PAU Mix 45

Z původního roztoku standardu PAH Mix 9 o koncentraci 100 ng·μl⁻¹ byly postupným ředěním isooktanem připraveny roztoky o koncentracích 1 000, 100, 50, 20, 15, 10, 5 a 1 ng·ml⁻¹. Pro sestavení kalibračních křivek byly použity roztoky v rozmezí 1 – 50 ng·ml⁻¹.

4.1.2.3 Směs D-PAU

Z původního roztoku standardu PAH Mix 24 o koncentraci 10 ng·μl⁻¹ byly postupným ředěním isooktanem připraveny roztoky o koncentracích 1 000, 100, 50, 20, 15, 10, 5 a 1 ng·ml⁻¹. Pro sestavení kalibračních křivek byly použity roztoky 1 – 50 ng·ml⁻¹.

Přídavek vnitřního standardu do vzorku tuku rozpuštěného v isooktanu byl 5 μl standardu o koncentraci 1 ng·μl⁻¹.

4.2 Odběr a úprava vzorku

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

Tab. 9: Seznam odebraných vzorků

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

4.2.1 Extrakce tuku

Ze zhomogenizovaného vzorku bylo naváženo asi 1 – 2 g, s přesností na 0,0001 g. Vzorek se následně dehydratoval pomocí bezvodého síranu sodného. Takto připravená sypká směs byla kvantitativně převedena do extrakční patry. Extrakce probíhala kontinuálně šest hodin v extraktoru Soxtec. Jako extrakční činidlo byl použit diethylether. Po extrakci bylo rozpouštědlo odpařeno a zvážil se vyextrahovaný tuk. Obsah tuku v % byl vypočítán pro všechny vzorky. Vyextrahovaný tuk byl převeden do vialek a uložen v chladničce do dalšího zpracování.

4.2.2 Přečištění vzorku pomocí GPC (odstranění tuku)

Přibližně 0,5 g tuku bylo naváženo s přesností 0,0001 g do vialek. K tuku byl přidán chloroform do objemu 1 ml. K takto připraveným vzorkům byly přidány 3 μ l směšného standardu D-PAU.

Vzorek byl přečištěn pomocí GPC. Bylo nadávkováno 4krát 100 μ l tuku rozpuštěného v chloroformu. Použitou kolonou byla kolona Bio-Beads S-X3. Sbírala se frakce od 20. do 35. minuty, která byla stanovena podle testovacího nástřiku rozpuštěného vepřového sádla a standardu PAU. Frakce ze všech čtyř nástřiků byly spojeny a převedeny do odpařovací baňky.

4.2.2.1 Nastavení GPC

- mobilní fáze: chloroform, 0,6 ml·min⁻¹
- detektor: UV, 254 nm
- sbíraná frakce: 20 – 35 min

4.2.3 Odpaření chloroformu a převedení vzorku do isooktanu

Odpařování vzorku bylo rozděleno na dvě fáze, a to především z důvodu analýzy těkavějších PAU a omezení jejich případných ztrát. Nejdříve byl vzorek částečně zahuštěn na rotační vakuové odparce (asi 1 ml). Vzorek byl následně převeden do vialky a bylo k němu přidáno 20 μ l undekanu. Vzorek byl poté zahuštěn pod proudem dusíku (zůstal pouze undekan) a bylo k němu přidáno 30 μ l isooktanu. Tato směs byla kvantitativně převedena do

skleněné vložky (insertu), která byla umístěna do vialky. Vzorek byl analyzován pomocí GC × GC–TOF-MS.

4.2.4 Analýza přečištěného vzorku na GC × GC–TOF-MS

Přečištěné vzorky ve vialkách byly analyzovány pomocí dvojdimenzionální plynové chromatografie. Stanovení obsahu PAU bylo prováděno pomocí externích kalibračních křivek pro jednotlivé PAU a vnitřních deuterovaných standardů, které byly ke vzorku přidávány před přečištěním GPC. Pravidelně byla prováděna kontrola kalibračních křivek.

4.2.4.1 Nastavení GC × GC–TOF–MS

- *primární kolona: Rxi-5SilMS (30 m × 0,25 mm ID; 0,25 μm)*
- *sekundární kolona: BPX-50*
- *GC metoda:*
 - *nástřik: 1 μl, 290 °C, bez děliče toku*
 - *nosný plyn: He, 1 ml·min⁻¹*
 - *teplota transfer line: 280 °C*
 - *teplotní program prim. kolona: počáteční teplota 50 °C, konstantní 1 min; pak 10 °C/min do 220 °C; a 5 °C/min do 320°C, konstantní 6 min*
 - *teplotní program sek. kolona: počáteční teplota 50 °C, konstantní 1 min; pak 10 °C/min do 240 °C; a 5 °C/min do 340°C, konstantní 6 min*
 - *modulátor: separační doba 4 s (modulační perioda, second dimension separation time), horký pulz 0,8 s (hot pulse), studený pulz 1,2 s (cool time).*

- *MS metoda:*
 - *rychlost sběru dat: 100 sp/s*
 - *EI 70 eV, napětí na detektoru 1900 V*
 - *rozsah m/z: 30 – 500*
 - *teplota iontového zdroje: 250 °C*

4.2.4.2 Seznam sledovaných analytů

V následujících tabulkách jsou prezentovány sledované PAU a hodnoty m/z, vybrané pro kalibrace.

Tab. 10: Seznam sledovaných PAH podle US EPA a jejich hodnoty m/z, které byly použity pro kvantifikaci.

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

Tab. 11: Seznam deuterovaných PAU použitých jako vnitřní standard a jejich hodnoty m/z, které byly použity pro kvantifikaci.

Sloučenina	m/z
Naftalen – D8	136
Acenaften – D10	162
Anthracen – D10	188
Chrysen – D12	240
Perylen – D12	264

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Přečištění vzorku pomocí GPC

K přečištění vzorku tuku byla použita gelová permeační chromatografie. Na systému, který je dostupný na našem pracovišti, je možné aplikovat maximální nastříkovaný objem 100 μl . Aby bylo možné dosáhnout dostatečných LOD a LOQ, byl každý vzorek o objemu 100 μl nastříknut 4krát. Frakce, která byla odebírána, byla určena podle testovacích vzorků vepřového sádla rozpuštěných v chloroformu (0,5 g v 1 ml) a podle použitého standardu PAU (1 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

5.2 Optimalizace GC \times GC podmínek

Pro analýzu PAU byly optimalizovány separační podmínky ve 2D chromatografii. Bylo zvoleno klasické uspořádání primární a sekundární kolony, tzn., že jako primární byla zvolena nepolární kolona Rxi-5SilMS (30 m \times 0,25 mm ID; 0,25 μm) a jako sekundární středně polární kolona DB17-MS (1,21 m \times 0,1 mm ID; 0,1 μm). Nejdříve byla optimalizována separace v 1D GC a poté ve 2D GC; vše bylo nejdříve prováděno se standardem PAU o koncentraci 50 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a vzorkem tuku s přídatkem standardu PAU.

5.2.1 Analýza v 1D GC

Teplota nástřikového prostoru byla nastavena na teplotu 290°C, bez děliče toku. Vzhledem k dostatečnému rozdělení dvojic píků fenanthren – anthracen, benz(*a*)anthracen – chrysen a benzo(*b*)fluoranthren – benzo(*k*)fluoranthren byl nastaven od 220 °C pouze pomalý nárůst teploty, a to 5°C za minutu. Celková doba analýzy byla 44 minut.

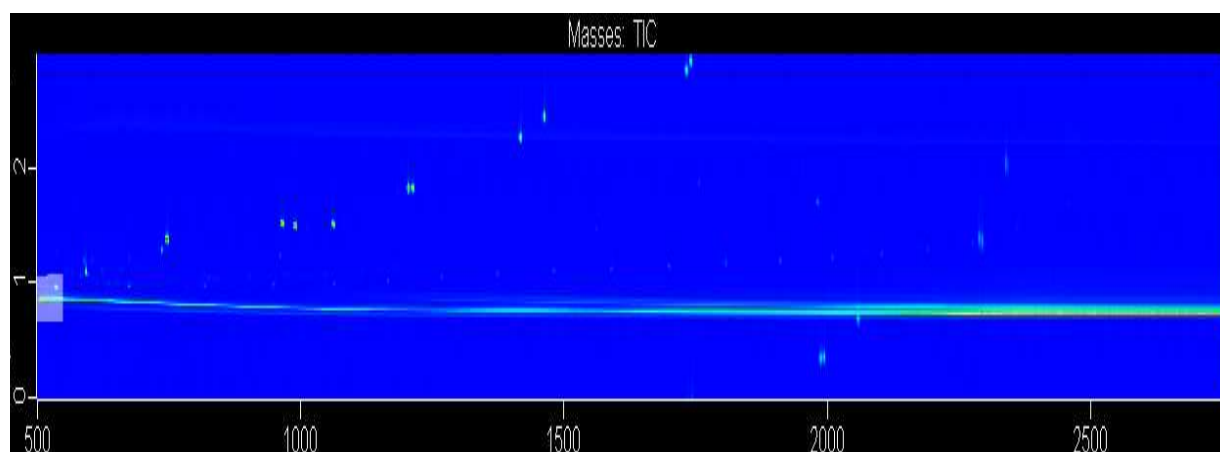
5.2.2 Analýza ve 2D GC

Pro analýzu ve 2D GC byla optimalizována separační doba druhé dimenze, délka horkého a studeného pulzu a také teplotní offset na sekundární koloně. Pro optimalizaci byl použit standard o koncentraci PAU 100 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Při analýze ve druhé dimenzi (modulační perioda) byla nejdříve použita doba separace 3s. Na chromatogramu je zřetelně vidět (Obr. 8:), že pík chrysenu je rozdělen na dvě části (detekována rozhraní 3,0 a 0,1 s) a pík benzo(*a*)pyrenu má retenční čas v retenčním čase krvácení kolony (bleed) a rozpouštědla. Tato separace nebyla dostačující.

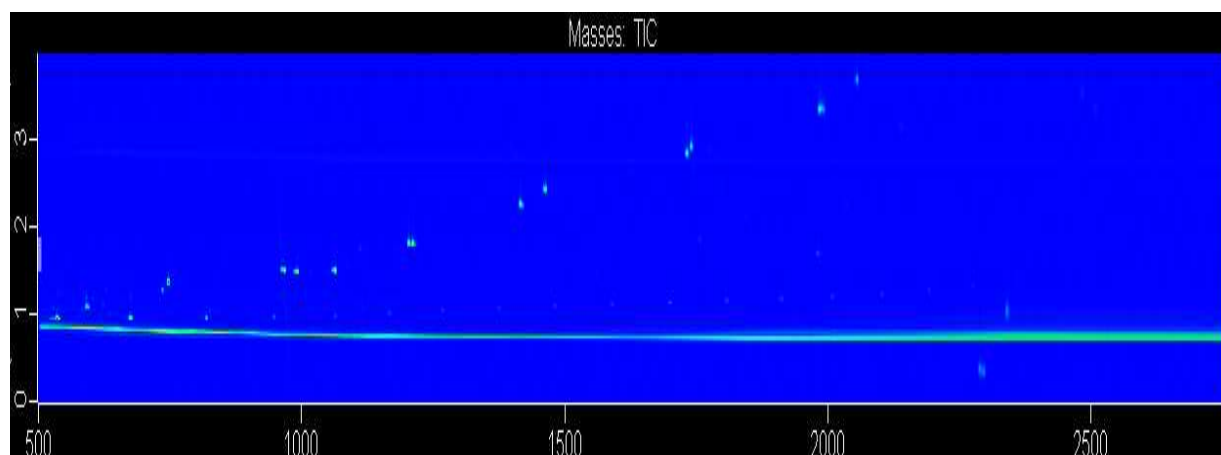
Tab. 12: Podmínky analýzy ve 2D GC, modulační perioda 3 s

Teplota nástřiku	290 °C
Napětí detektoru	1900 V
EI	70 eV
Sběr dat	100 sp/s
Teplotní program na primární koloně	počáteční teplota 50 °C, konstantní 1 min 10 °C/min do 220 °C 5 °C/min do 320 °C, konstantní 6 min
Teplotní program na sekundární koloně (offset + 20 °C)	počáteční teplota 70 °C, konstantní 1 min 10 °C/min do 240 °C 5 °C/min do 340 °C, konstantní 6 min teplota + 30 °C
Modulátor	modulační perioda 3 s (second dimension separation time) horký pulz 0,6 s (hot pulse) studený pulz 0,9 s (cool time)


Obr. 8: Chromatogram standardu PAU ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) změřený při separační době na sekundární koloně 3 s

Při následném měření byla proto modulační perioda prodloužena na 4 s, horký pulz byl 0,8 s a studený pulz 1,2 s (Obr. 9:). Ostatní parametry zůstaly nezměněny. Retenční časy piků benzo(*ghi*)perylenu a dibenz(*a,h*)anthracenu (asi 0,3 s) zůstaly sice menší než retenční čas patřící k látkám z krvácení kolony, ale ani jeden nezasahuje přímo do této oblasti, a proto nebyl při vyhodnocování žádný problém.

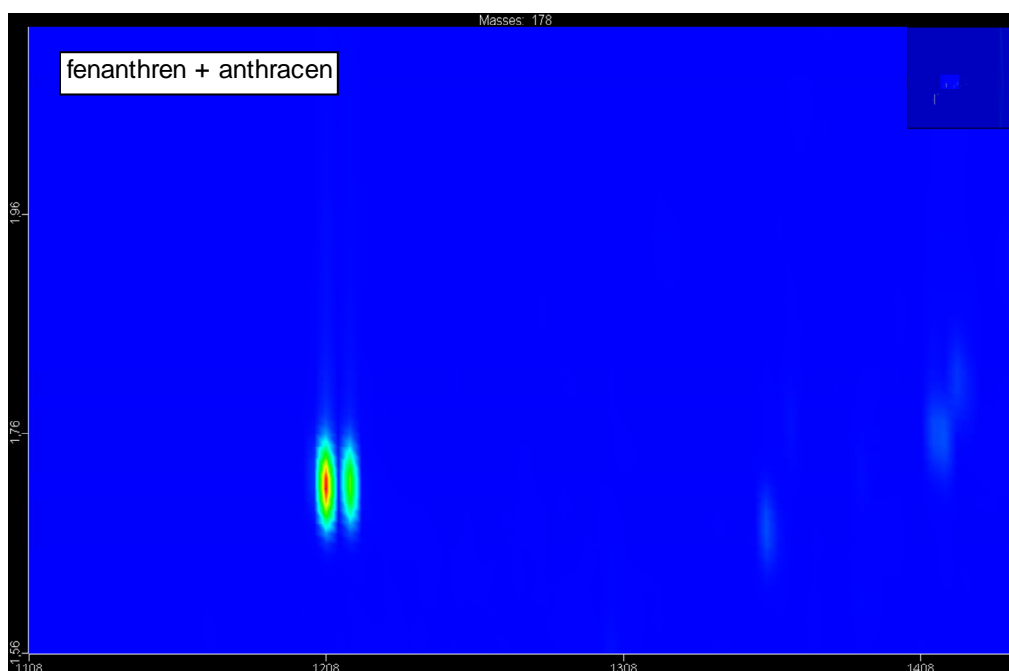
Při nastavení separační doby 4 s ve druhé dimenzi byly ještě testovány další změny, a to offset na sekundární koloně + 10 °C, + 30 °C a změny horkého pulzu na 1 s resp. 0,5 s, a studeného pulzu na 1 s, resp. 1,5 s. Optimální separace bylo dosaženo při podmínkách uvedených v Tab. 13:.



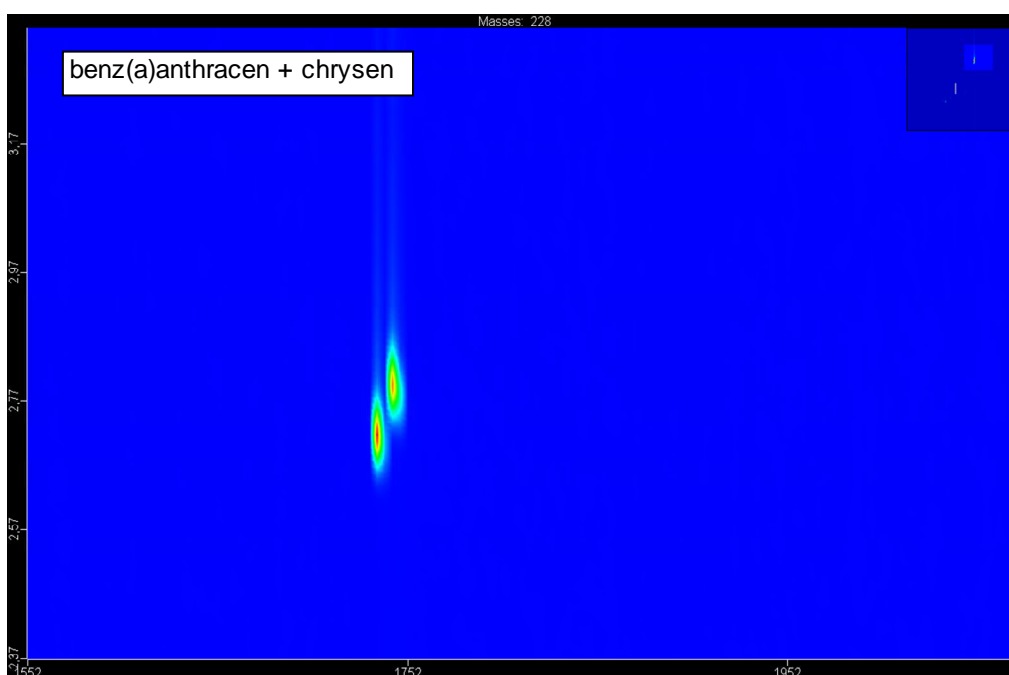
Obr. 9: Chromatogram standardu PAU ($100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) změřený při separační době na sekundární koloně 4 s

Tab. 13: Optimalizované podmínky analýzy ve 2D GC použité pro analýzu PAU v salámech

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



Obr. 10: Separace píků fenanthrenu a anthracenu na m/z 178



Obr. 11: Separace píků benz(a)anthracenu a chrysenu na hodnotě m/z 228

5.3 Kalibrace

Připravená sada kalibrační roztoků (viz. 4.1.2.1) byla proměřena optimalizovanou metodou pro stanovení PAU. Byly vyneseny lineární závislosti plochy píku na koncentraci.

Tab. 14: Hodnoty směrnice, úseku a korelačního koeficientu kalibračních závislostí jednotlivých D-PAU

<i>Sloučenina</i>	<i>Směrnice</i>	<i>Úsek</i>	<i>Korelační koeficient</i>
Naftalen – D8	11034	-855	0,999
Acenaften – D10	4994	2189	0,999
Anthracen – D10	4300	913	0,999
Chrysen – D12	3360	624	0,997
Perylen – D12	2339	292	0,993

Tab. 15: Hodnoty směrnice, úseku a korelačního koeficientu kalibračních závislostí jednotlivých PAU

<i>Sloučenina</i>	<i>Směrnice</i>	<i>Úsek</i>	<i>Korelační koeficient</i>
Naftalen	29480	3392	0,996
Acenaftylen	16381	7182	0,997
Acenaften	11625	5375	0,997
Fluoren	9702	2193	0,997
Fenanthren	12915	3760	0,996
Anthracen	11010	5515	0,997
Fluoranthren	10297	1797	0,997
Pyren	10871	455	0,998
Benz(<i>a</i>)anthracen	6149	-499	0,992
Chrysen	6508	-400	0,998
Benzo(<i>b</i>)fluoranthren	5395	583	0,996
Benzo(<i>k</i>)fluoranthren	4982	782	0,995
Benzo(<i>a</i>)pyren	4312	625	0,993
Benzo(<i>ghi</i>)perylene	4074	342	0,992
Dibenz(<i>a,h</i>)anthracen	2153	670	0,995
Indeno(1,2,3- <i>cd</i>)pyren	4051	378	0,998

5.3.1 Limity detekce a kvantifikace

Pro výpočet limitu detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly použity vztahy běžně používané pro tento účel u chromatografických metod. Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Mez detekce byla vyjádřena jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie. Výška šumu byla odečítána ve 20 vzorcích na dané hodnotě m/z.

$$\text{LOD} = \frac{3 \times h_s}{m_n} \times c_n \quad (\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1})$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times h_s}{m_n} \times c_n \quad (\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1})$$

h_n výška šumu

c_n koncentrace nejnižšího kalibračního bodu

m_n výška píku kalibračního bodu s nejnižší koncentrací

Takto získané hodnoty LOD a LOQ byly přepočítány na konečné koncentrace PAU ve vzorku salámu $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Tab. 16: Limity detekce a kvantifikace pro sledované PAU v $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ salámu

Sloučenina	LOD ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Naftalen	0,034	0,150
Acenaftylen	0,068	0,226
Acenaften	0,086	0,286
Fluoren	0,064	0,213
Fenanthren	0,028	0,139
Anthracen	0,045	0,151
Fluoranthren	0,047	0,155
Pyren	0,048	0,160
Benz(a)anthracen	0,064	0,212
Chrysen	0,057	0,190
Benzo(b)fluoranthren	0,066	0,221
Benzo(k)fluoranthren	0,042	0,185
Benzo(a)pyren	0,071	0,237
Benzo(ghi)perylene	0,148	0,501
Dibenz(a,h)anthracen	0,142	0,487
Indeno(1,2,3-cd)pyren	0,153	0,511

5.4 Určení výtěžnosti analytického stanovení PAU v salámu

5.4.1 Stanovení výtěžnosti PAU

Výtěžnost metody v procentech byla zjišťována na třech koncentračních hladinách: 5, 10, 20 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ (0,625, 1,250 a 2,5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ salámu). Ke vzorku vepřového tuku byly přidány standardy PAU v potřebné koncentraci. Se vzorky byl proveden stejný postup přečištění a analýzy jako se vzorky salámů, pouze ke vzorku před závěrečným odpařováním pod proudem dusíku nebyl přidán undekan. Bylo analyzováno vždy 10 modelových vzorků. Výsledky jsou

uvedeny v Tab. 17: U naftalenu, který je nejtěkavější, se pohybovaly hodnoty výtěžnosti pod 10 %. Dále byly hodnoty výtěžnosti pod 50 % zjištěny ještě u acenaftylenu a acenaftenu.

Tab. 17: Hodnoty výtěžností (%) 16 PAU na třech koncentračních hladinách (0,625, 1,250 a 2,500 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) bez přídavku undekanu, $n = 10$

Sloučenina	2,500		1,250		0,625	
	výtěžnost	RSD %	výtěžnost	RSD %	výtěžnost	RSD %
Naftalen	12,6	10,9	8,3	12,5	6,2	12,7
Acenaftylen	37,3	9,0	32,5	8,6	38,2	10,2
Acenaften	50,8	5,3	49,2	6,1	48,1	5,8
Fluoren	81,7	7,3	77,5	6,7	76,3	6,1
Fenanthren	70,9	8,4	71,4	7,8	76,2	8,0
Anthracen	76,1	7,1	74,3	6,5	78,1	6,5
Fluoranthren	82,2	6,8	77,5	7,0	79,3	6,6
Pyren	78,3	5,7	76,2	6,1	76,5	6,3
Benz(a)anthracen	83,0	6,4	83,2	6,1	80,7	7,7
Chrysen	82,3	6,1	79,7	7,4	80,8	6,9
Benzo(b)fluoranthren	103,1	7,4	92,4	7,2	94,4	6,5
Benzo(k)fluoranthren	64,2	7,4	61,4	8,0	68,2	6,8
Benzo(a)pyren	69,4	7,9	68,7	6,8	72,6	6,1
Benzo(ghi)perylen	73,1	6,7	74,2	5,8	73,9	5,9
Dibenz(a,h)anthracen	98,4	7,9	85,5	5,4	86,4	5,2
Indeno(1,2,3-cd)pyren	74,4	6,5	73,7	7,1	74,1	6,9

5.4.2 Výtěžnosti při použití undekanu a přepočítání na deuterované standardy

Podle výsledků výtěžnosti pro těkavější analyty bylo zvoleno použití undekanu jako „keeperu“. Dále bylo ke vzorkům, a to ještě před GPC, přidáno 3 μl směsi D-PAU. Po zahuštění vzorku na vakuové rotační odparce bylo ke vzorku přidáno 25 μl undekanu. Teprve potom byly vzorky odpařeny pod proudem dusíku a byly doplněny 30 μl isooktanu. Kromě toho ke vzorkům, rovněž před GPC, přidáno 5 μl , resp. 10 μl směsi D-PAU ($c = 1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), aby výsledná koncentrace odpovídala koncentraci pro danou hladinu výtěžnosti (1,250, resp. 0,625 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Pro koncentraci 2,5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ už nebyly výtěžnosti stanovovány. Při přídavku undekanu se výtěžnosti těkavých PAU výrazně zvýšily (naftalen, acenaftylen, acenaften). Pro další PAU již nebylo zvýšení tak výrazné. Relativní směrodatné odchylky byly nižší než při odpařování bez undekanu. Při použití vnitřních standardů pro přepočítání koncentrací bylo dosaženo výtěžností nad 90 %. Tento poslední postup byl použit pro analýzu všech vzorků salámu (přídavek undekanu a použití vnitřního standardu). Přídavek směsi D-PAU byl 0,625 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Tab. 18: Hodnoty výtěžností (%) 16 PAU na koncentrační hladině $1,250 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ s přidavkem undekanu a s přidavkem undekanu a přepočtem přes vnitřní standard, $n = 10$

Sloučenina	1,250 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$			
	undekan		undekan + přepočet D-PAU	
	výtěžnost	RSD %	výtěžnost	RSD %
Naftalen	57,2	6,5	85,3	3,9
Acenaftylen	68,7	5,8	94,1	3,6
Acenaften	66,3	5,1	97,3	3,2
Fluoren	76,2	3,9	98,5	3,1
Fenanthren	73,6	3,6	103,4	3,5
Anthracen	75,4	3,4	97,8	3,1
Fluoranthen	74,3	3,8	99,2	2,8
Pyren	78,0	4,2	94,2	3,0
Benz(a)anthracen	83,1	4,3	97,4	3,7
Chrysen	80,2	4,0	99,7	2,8
Benzo(b)fluoranthen	91,5	5,2	104,2	3,6
Benzo(k)fluoranthen	75,3	5,6	99,3	3,7
Benzo(a)pyren	78,7	5,8	97,8	3,2
Benzo(ghi)perylene	75,1	5,3	95,7	2,9
Dibenz(a,h)anthracen	85,5	4,8	97,6	3,3
Indeno(1,2,3-cd)pyren	76,3	4,9	101,9	3,4

Tab. 19: Hodnoty výtěžností (%) 16 PAU na koncentrační hladině $0,625 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ s přidavkem undekanu a s přidavkem undekanu a přepočtem přes vnitřní standard, $n = 10$

Sloučenina	0,625 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$			
	undekan		undekan + přepočet D-PAU	
	výtěžnost	RSD %	výtěžnost	RSD %
Naftalen	58,3	6,1	90,7	4,1
Acenaftylen	71,6	5,4	96,4	3,5
Acenaften	75,6	4,8	97,1	3,7
Fluoren	85,3	4,1	97,2	2,9
Fenanthren	87,2	4,3	105,2	3,2
Anthracen	89,2	3,9	98,2	3,5
Fluoranthen	90,1	3,8	101,5	2,8
Pyren	88,7	3,9	95,4	3,2
Benz(a)anthracen	87,3	3,9	98,3	3,6
Chrysen	91,1	3,7	103,2	3,1
Benzo(b)fluoranthen	94,8	5,2	99,0	3,2
Benzo(k)fluoranthen	76,8	5,1	97,2	3,4
Benzo(a)pyren	73,6	5,1	96,3	3,7
Benzo(ghi)perylene	74,1	5,0	95,6	3,6
Dibenz(a,h)anthracen	85,7	4,6	94,3	3,6
Indeno(1,2,3-cd)pyren	76,1	4,8	98,3	3,2

5.5 Výsledky stanovení PAU ve vzorcích salámu

Do následujících tabulek a grafů jsou shrnuty výsledky stanovení PAU ve 120 vzorcích salámu Poličan, které byly odebírány ze tří komor po 10 vzorcích ve čtyřech odběrech. Celkové výsledky analýz všech 120 vzorků jsou prezentovány v tabulkách v přílohách.

V níže uvedených grafech jsou shrnuty výsledky všech analyzovaných vzorků. Uvedené koncentrace jsou celkové koncentrace PAU kvantifikované v každém vzorku. V Tab. 20: je znovu pro přehlednost uveden seznam a popis odebraných vzorků.

Tab. 20: Seznam odebraných vzorků

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

5.5.1 Legislativa upravující limity PAU v potravinách

V legislativě České Republiky upravuje výskyt PAU v potravinách Příloha č. 3 k vyhlášce Ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb. ve znění pozdějších předpisů, kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků [77].

Pod pojmem polycyklické aromatické uhlovodíky se rozumí benzo(*a*)anthracen, benzo(*b*)fluoranthén, benzo(*k*)fluoranthén, chrysen, dibenzo(*ah*)anthracen, benzo(*a*)pyren, indeno(1,2,3-*cd*)pyren, dibenzo(*a,i*)pyren, dibenzo(*a,h*)pyren. Přípustné množství je pro jednotlivé látky stanoveno jednotlivě. Celkový obsah vyjmenovaných látek v potravině nesmí překročit desetinásobek přípustného množství.

V roce 2005 bylo vydáno doporučení Komise č.108/2005 o dalším zjišťování obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v některých potravinách [78]. Dále je v evropské legislativě v platnosti nařízení Komise č. 1881/2006, kterým stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách [79]. Maximální limit pro benzo(*a*)pyren v uzeninách a uzených výrobcích je 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Rovněž je v platnosti Nařízení komise č. 333/2007, kterým se stanoví metody vzorkování a analýzy pro oficiální kontrolu hladin olova, kadmia, rtuti, anorganického cínu, 3-MCPD a benzo(*a*)pyrenu v potravinách [80].

Tab. 21: Příпустné množství jednotlivých PAU v různých potravinách [77]

Potravina	PM (mg·kg ⁻¹) (5/2)*
masné výroby, uzené ryby	0,003
káva pražená	0,002
obilí	0,002
ryby	0,001
ovoce	0,002
zelenina listová	0,002
tuky	0,002
látky určené k aromatizaci	0,001
nápoj, pivo, víno, čaj	0,0005
lihoviny	0,001

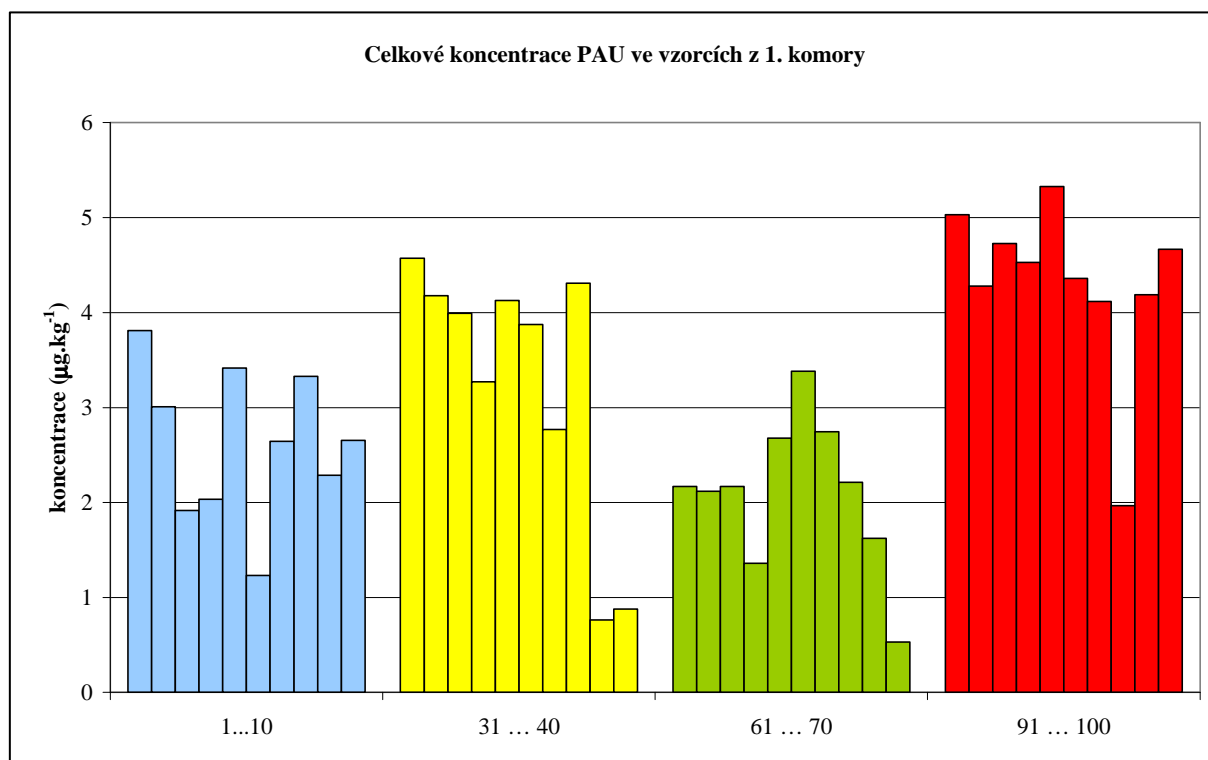
5.5.2 Průměrná expozice PAU potravinami v evropských zemích podle EFSA (2008)

V materiálu EFSA jsou uvedeny zjištěné průměrné koncentrace PAU, které člověk přijme potravou. Data jsou stanovena pro střední a vysoko příjmovou skupinu konzumentů a hodnoty jsou následující: pro benzo(a) pyren 235 ng·den⁻¹ (3,9 ng·kg⁻¹ za den), resp. 389 ng·den⁻¹ (6,5 ng·kg⁻¹ za den); pro PAU2 641 ng·den⁻¹ (10,7 ng·kg⁻¹ za den), resp. 1077 ng·den⁻¹ (18 ng·kg⁻¹ za den); pro PAU4 1168 ng·den⁻¹ (19,5 ng·kg⁻¹ za den), resp. 2068 ng·den⁻¹ (34,5 ng·kg⁻¹ za den); pro PAU8 1729 ng·den⁻¹ (28,8 ng·kg⁻¹ za den), resp. 3078 ng·den⁻¹ (51,3 ng·kg⁻¹ za den). Dva největší příspěvky do celkového příjmu PAU potravou mají cereálie a cereální výrobky a mořské plody a výrobky z nich [18].

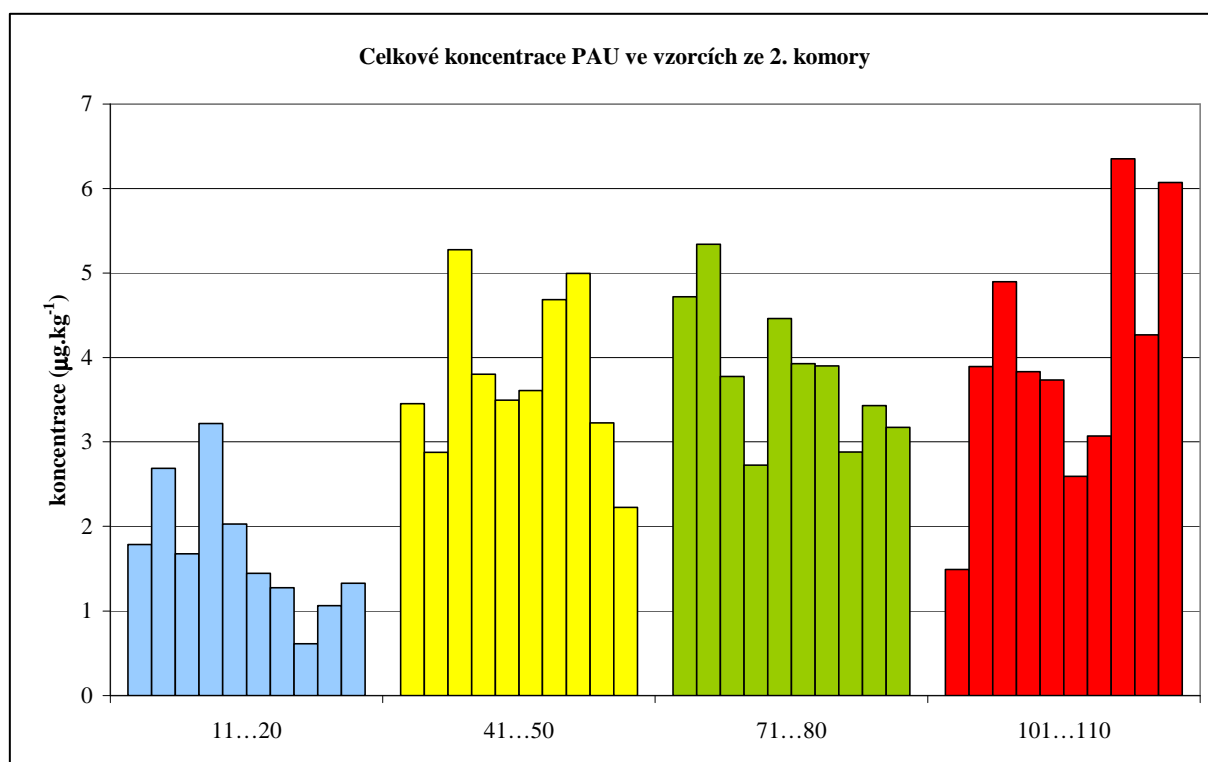
5.5.3 Výsledky

Při porovnání celkových koncentrací PAU (Σ PAU) ve vzorcích a jejich průměrných hodnot zjištěných v rámci této studie není viditelný výrazný rozdíl mezi jednotlivými komorami (starší a dva nové typy). Obsah PAU v salámu po zavěšení do komor před zakouřením byl ve všech třech komorách nejnižší. Po zakouření se Σ PAU zvýšila, avšak ne výrazným způsobem. Během zrání a sušení se Σ PAU už nezvyšovala. Hodnoty PAU z posledního odběru (2.1. 2008) vzorků před balením do ochranného obalu a před distribucí nepřesahovaly povolené limity. Jejich koncentrace byla podobná jako v předchozích odběrech. Pokud se týče počtu nalezených PAU, bylo identifikováno největší množství individuálních PAU, avšak hodnoty koncentrací se pohybovaly převážně pod LOD nebo LOQ a v celkové hodnotě PAU ve vzorcích se tyto nálezy nijak neprojevily. V grafech Graf 1: až Graf 3: a v Tab. 22: jsou shrnuty všechny konkrétní Σ PAU v jednotlivých odběrech pro daný typ zakuřovací a zrací komory.

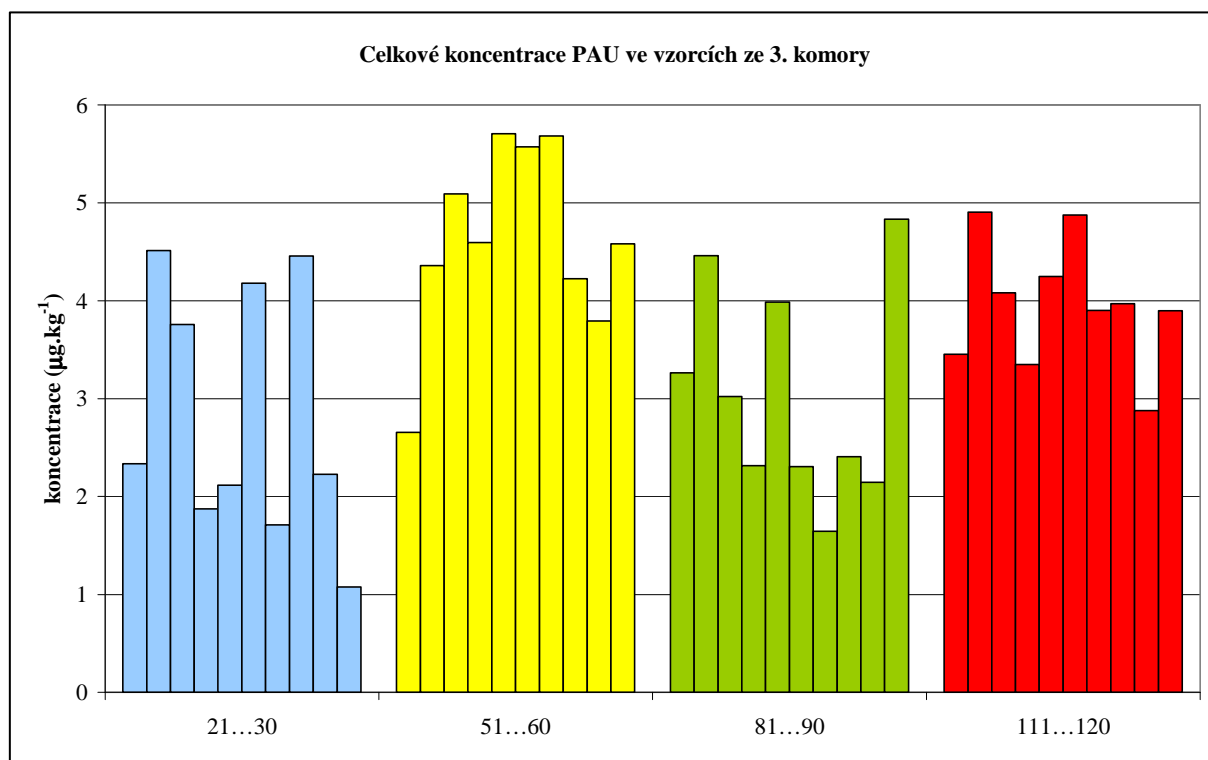
Ve srovnání s výsledky analýz prezentovaných v publikacích [45, 57, 62] jsou zjištěné hodnoty PAU v Poličanu nižší. Z publikací jednoznačně vyplývá, že výskyt PAU je výrazně spojen s metodou úpravy potravin, kde přímé uzení (nebo grilování) má za následek vyšší koncentrace PAU v těchto potravinách, než průmyslová výroba potravin [51].



Graf 1: Porovnání celkových koncentrací PAU ve všech 40 vzorcích salámů odebraných v 1. komoře, ale v různých termínech odběru; modrá – 21.11. 2007, žlutá – 28.11. 2007, zelená – 19.12. 2007, červená – 2.1. 2008.



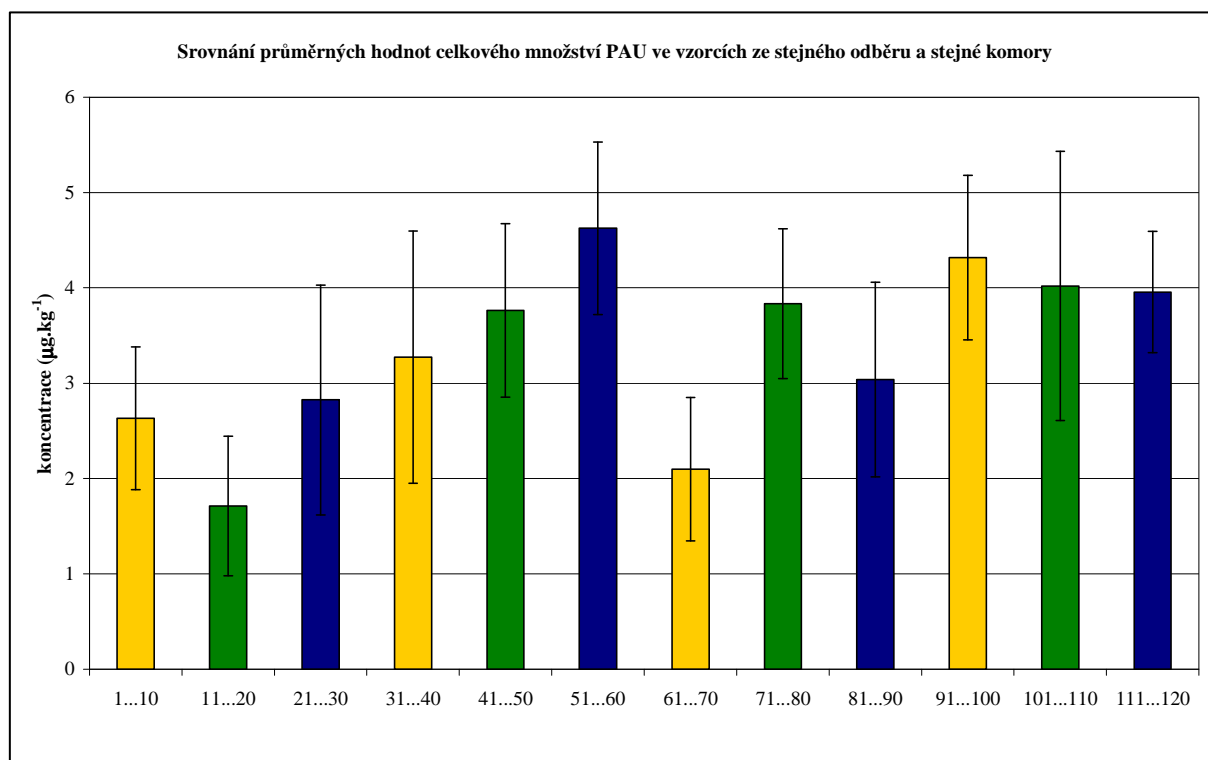
Graf 2: Porovnání celkových koncentrací PAU ve všech 40 vzorcích salámů odebraných ve 2. komoře, ale v různých termínech odběru; modrá – 21.11. 2007, žlutá – 28.11. 2007, zelená – 19.12. 2007, červená – 2.1. 2008.



Graf 3: Porovnání celkových koncentrací PAU ve všech 40 vzorcích salámů odebraných ve 3. komoře, ale v různých termínech odběru, modrá – 21.11. 2007, žlutá – 28.11. 2007, zelená – 19.12. 2007, červená – 2.1. 2008.

Tab. 22: Průměrné hodnoty celkových koncentrací PAU v sadě vzorků po 10

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



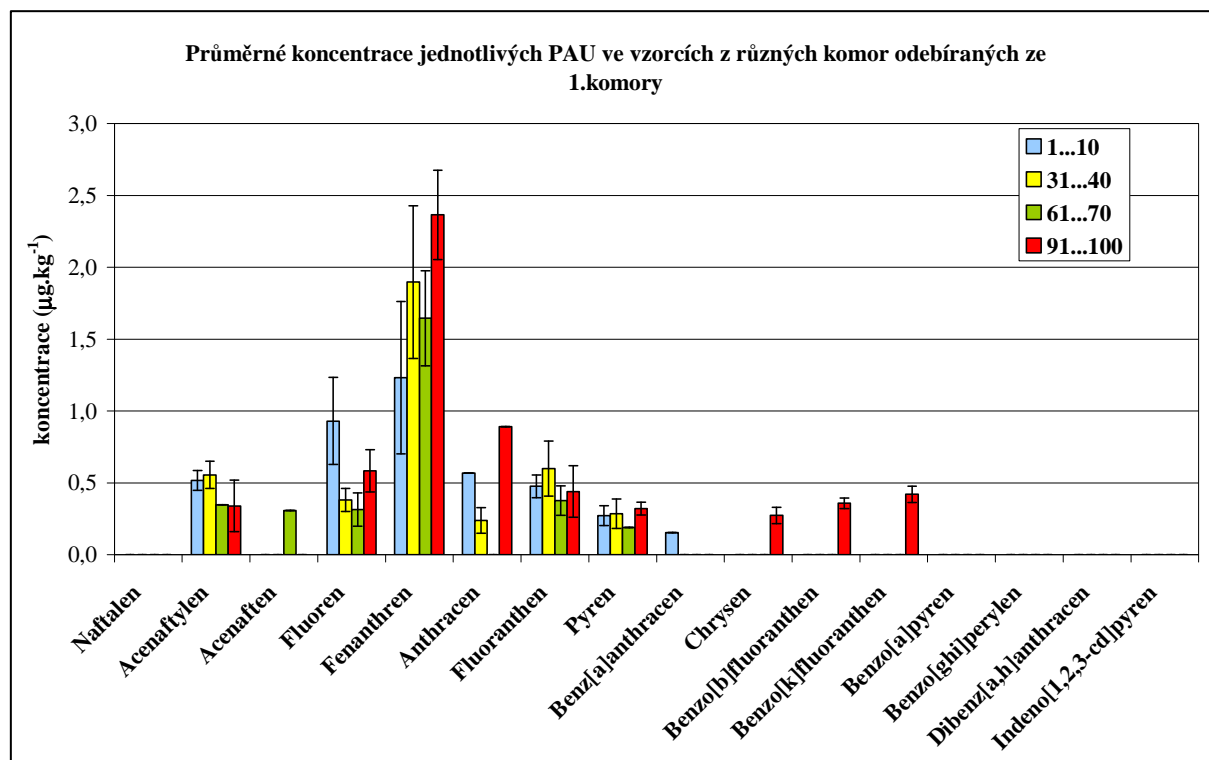
Graf 4: Průměrné hodnoty celkových koncentrací PAU ve vzorcích; žlutá – 1. komora, zelená – 2. komora, modrá – 3. komora. Chybové úsečky jsou směrodatné odchylky pro 10 stanovení.

V následujících grafech jsou shrnuty průměrné koncentrace jednotlivých PAU ve vzorcích po skupinách, daných jejich místem a datem odběru. Jako chybové úsečky byly vyneseny směrodatné odchylky. U stanovení bez směrodatné odchylky byla tato látka nalezena pouze v jediném případě. Všechny výsledky jsou shrnuty v tabulkách (Tab. 24: – Tab. 35: v příloze). Zde jsou uvedeny i nálezy pod LOD nebo LOQ, které nejsou samozřejmě zahrnuty do průměrů.

Ve všech analyzovaných vzorcích nebyl překročen limit pro PAU v mase a masných výrobcích, který je pro vybrané PAU $0,003 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a pro jejich sumu $0,03 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [77]. PAU, které se podle české vyhlášky i evropských směrnic mají v potravinách sledovat, byly ve vzorcích nalezeny pouze v několika případech a v koncentracích nepřesahující dané limity. V žádném případě nebyly tyto PAU detekovány ve všech 10 vzorcích, patřících do stejné odběrové skupiny. Proto není možné provést porovnání korelací mezi PAU₂, PAU₄ a PAU₈ (viz. kap.2.2).

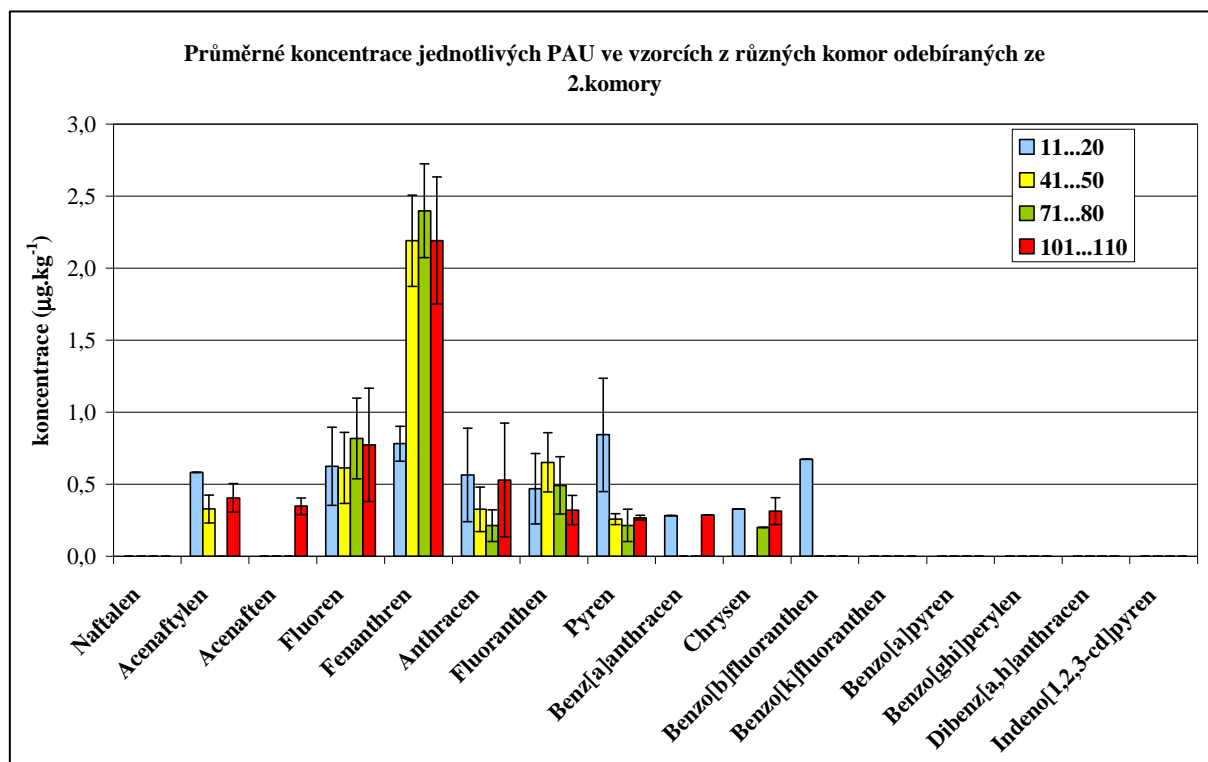
Nejvyšší koncentrace byly nalezeny pro fenantren, který byl identifikován a kvantifikován téměř ve všech vzorcích. Jeho koncentrace je největším příspěvkem do celkové koncentrace PAU ve vzorcích. Tato koncentrace byla více než dvojnásobná, v porovnání s individuálními koncentracemi dalších PAU. Fluoren se také vyskytoval téměř ve všech vzorcích, ale v nižší koncentraci než fenantren (fenantren okolo $2,0$ až $2,7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a fluoren okolo $0,8$ až $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). V publikaci od M. Lorenza a spol. [57] byly analyzovány dva druhy tradičních španělských (Androlla a Botillo) salámů. V rámci této studie byly také ve všech analyzovaných vzorcích také zjištěny největší koncentrace fenantrenu. Koncentrace BaP nepřekročily limit stanovený EU. V rozsáhlé práci pojednávající o příjmu PAU potravou v Katalánsku, v rámci které byly analyzovány stejné PAU jako v naší studii, bylo rovněž

potvrzeno, že nejvyšší koncentrace byly prokázány u fenantrenu a pyrenu, a to bez ohledu na typ potravin [81]. Z rozsáhlé publikace o dietárním příjmu PAU ve Švédsku, v rámci které bylo porovnáváno velké množství uzeného masa a ryb také vyplývá, že nejnižší koncentrace PAU (pod limity EU) jsou při průmyslové výrobě (uzení, zakouření) potravin [62]. Podle zpráv Státní zemědělské a potravinářské inspekce z roku 2008 nebyl v testovaných uzených masných výrobcích (20 vzorků) nalezen BaP [82].

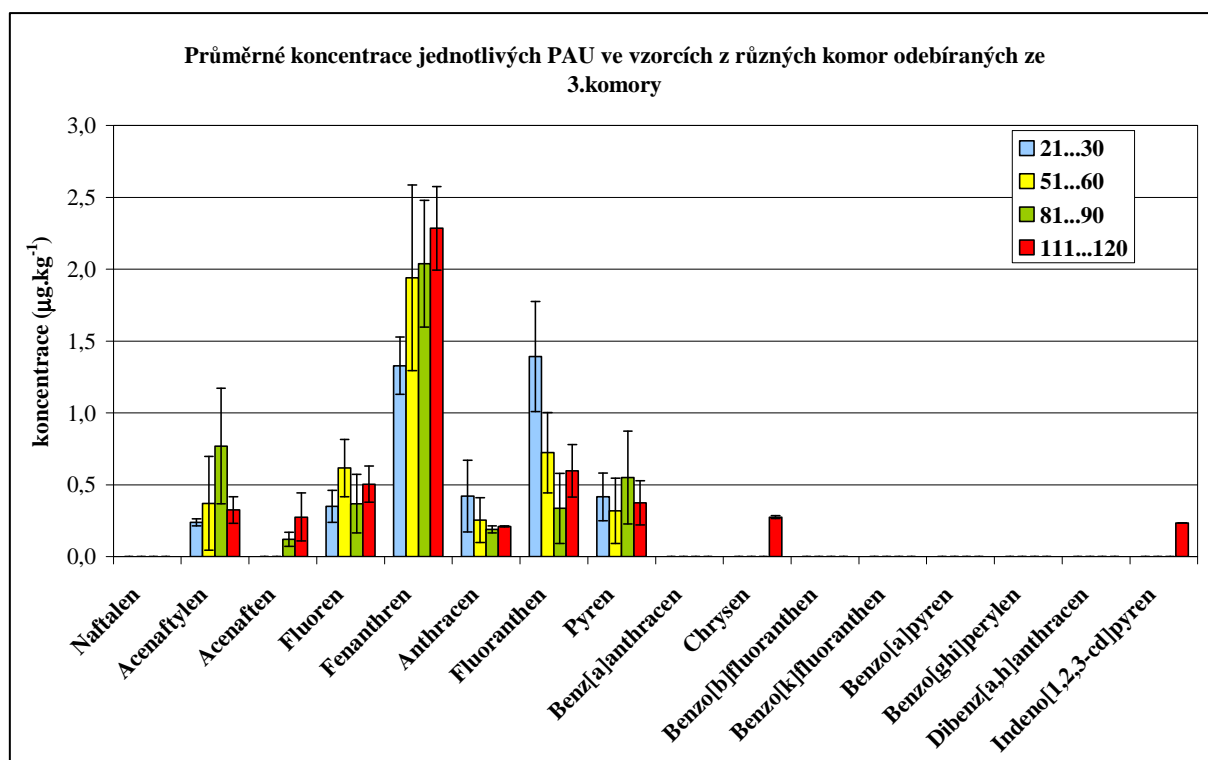


Graf 5: Průměrné hodnoty koncentrací jednotlivých PAU ve vzorcích z 1. komory; modrá – 21.11. 2007, žlutá – 28.11. 2007, zelená – 19.12. 2007, červená – 2.1. 2008. Chybové úsečky jsou směrodatné odchylky průměru.

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu



Graf 6: Průměrné hodnoty koncentrací jednotlivých PAU ve vzorcích ze 2. komory; modrá – 21.11. 2007, žlutá – 28.11. 2007, zelená – 19.12. 2007, červená – 2.1. 2008. Chybové úsečky jsou směrodatné odchylky průměru.



Graf 7: Průměrné hodnoty koncentrací jednotlivých PAU ve vzorcích ze 3. komory; modrá – 21.11. 2007, žlutá – 28.11. 2007, zelená – 19.12. 2007, červená – 2.1. 2008. Chybové úsečky jsou směrodatné odchylky průměru.

6 ZÁVĚR

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

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

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

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že v žádném ze 120 vzorků salámu nebyly překročeny limity stanovené platnou českou a evropskou legislativou. Nejvyšších koncentrací dosahoval fenanthren (až $2,7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), dále fluoren a pyren (oba do $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). PAU od molekulové hmotnosti $228 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (benzo(a)anthracen) se ve vzorcích vyskytovaly pouze vyjíměčně.

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

7 POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam
1-MPH	1-methylfenathren
2D GC (GC×GC)	dvojdímenzionální plynová chromatografie
5-MCH	5-methylchrysen
AC	acenaften
ACL	acenaftýlen
ACN	acetonitril
AN	anthracen
ASE	extrakce rozpuštědlem za zvýšeného tlaku
ATR	anthratren
BaA	benz(<i>a</i>)anthracen
BaFL	benzo(<i>a</i>)fluoren
BaP	benzo(<i>a</i>)pyren
BbF	benzo(<i>b</i>)fluoranthen
BbFL	benzo(<i>b</i>)fluoren
BcPH	benzo(<i>c</i>)fenanthren
BeP	benzo(<i>e</i>)pyren
BghiF	benzo(<i>ghi</i>)fluoranthen
BghiP	benzo(<i>ghi</i>)perýlen
BjF	benzo(<i>j</i>)fluoranthen
BkF	benzo(<i>k</i>)fluoranthen
COR	koronen
CPP	cyklopenta(<i>cd</i>)pyren
CYP	cytochrom P450
DAD	detektor s diodovým polem
DBaeP	dibenzo(<i>a,e</i>)pyren
DBahA	dibenz(<i>a,h</i>)anthracen
DBahP	dibenzo(<i>a,h</i>)pyren
DBaiP	dibenzo(<i>a,i</i>)pyren
DBalP	dibenzo(<i>a,l</i>)pyren
DCM	dichlormethan
DD	dihydrodiol dehydrogenáza
DNA	deoxyribonukleósa
D-PAU	deuterované polycyklické aromatické uhlovodíky
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EH	epoxid hydroláza
EU	Evropská unie
F	fluoranthen
FID	plamenově-ionizační detektor
FL	fluoren
FLD	fluorescenční detektor

zkratka	význam
GC	plynová chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
HPLC	vysoce-účinná kapalinová chromatografie
HRMS	vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie
CHR	chrysen
IARC	International Agency for Research Cancer
ID	vnitřní průměr
IP	indeno(1,2,3- <i>cd</i>)pyren
IPCS	International Programme on Chemical Safety
JECFA	The Joint FAO/WHO Expert Comitee on Food Additives
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MAE	mikrovlná extrakce
MS	hmotnostní spektrometrie
MTBE	methyl-tercbutyl ether
NA	naftalen
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PE	perylene
PHE	fenanthren
PLE	extrakce rozpuštědlem za zvýšeného tlaku
PY	pyren
RSD	relativní směrodatná odchylka
SBSE	přímá extrakce na tuhou fázi v kapalném vzorku
SCF	The Scientific Comitee on Food
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SFE	superkritická fluidní extrakce
SPE	extrakce tuhou fází
SPMD	polopropustná membrána pro pasvní vzorkování
SPME	mikroextrakce na tuhou fázi
TEF	ekvivalentní faktor toxicity
TFMV	trvale fermentované masné výrobky
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOF	analyzátor doby letu
TRI	trifenylen
US EPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organisation

8 PŘÍLOHY

8.1 Odběr vzorků



Obr. 12: Průběh vzorkování v závodu KMOTR Kroměříž.



Obr. 13: Vzorky salámu Poličan zavěšené ve zracích komorách

8.2 Obsah tuku v jednotlivých vzorcích

Tab. 23: Procentuální obsah tuku stanovený ve všech analyzovaných vzorcích salámu

číslo vzorku	tuk (%)	číslo vzorku	tuk (%)	číslo vzorku	tuk (%)
1	31,89	41	40,66	81	35,81
2	33,08	42	40,01	82	37,38
3	31,50	43	39,29	83	37,25
4	32,61	44	40,39	84	39,07
5	33,15	45	40,46	85	38,07
6	36,82	46	39,93	86	34,99
7	33,66	47	37,76	87	38,92
8	39,68	48	41,16	88	35,66
9	32,42	49	35,84	89	39,99
10	33,83	50	40,92	90	41,97
11	36,48	51	40,99	91	39,21
12	35,62	52	41,65	92	38,04
13	38,99	53	40,44	93	39,52
14	39,45	54	39,52	94	39,76
15	33,43	55	41,37	95	39,55
16	32,75	56	42,65	96	38,56
17	30,28	57	42,85	97	39,22
18	30,41	58	34,54	98	39,15
19	32,12	59	40,71	99	39,01
20	32,48	60	41,26	100	39,05
21	34,64	61	39,46	101	42,01
22	34,34	62	39,05	102	42,96
23	35,54	63	38,97	103	42,29
24	37,48	64	39,79	104	42,52
25	37,49	65	40,99	105	42,34
26	36,94	66	39,99	106	42,05
27	37,94	67	40,34	107	42,64
28	36,05	68	38,60	108	43,01
29	31,25	69	41,32	109	42,92
30	33,11	70	39,73	110	43,80
31	37,82	71	44,33	111	34,27
32	38,50	72	43,29	112	37,87
33	39,17	73	41,83	113	36,24
34	39,11	74	42,30	114	35,81
35	40,01	75	42,17	115	35,16
36	40,44	76	43,91	116	37,45
37	41,76	77	45,64	117	36,17
38	35,80	78	44,80	118	35,76
39	39,38	79	43,97	119	37,61
40	40,53	80	41,80	120	33,70

8.3 Souhrnné tabulky stanovených koncentrací ve všech analyzovaných vzorcích

Tab. 24: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan z 1. komory, odběr 21.11. 2007. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	průměr	s
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	0,463	0,500	nd	0,536	0,623	0,451	0,514	0,403	0,534	0,621	0,516	0,069
Acenaften	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Fuoren	1,242	1,204	0,308	nd	0,636	nd	0,811	1,055	1,025	1,154	0,929	0,303
Fenanthren	1,237	1,305	0,571	1,498	2,156	nd	1,320	1,445	0,324	nd	1,232	0,530
Anthracen	nd	nd	0,568	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,568	0,000
Fluoranthen	0,631	< LOQ	0,467	nd	nd	0,415	nd	0,425	0,402	0,512	0,475	0,079
Pyren	0,238	nd	< LOQ	< LOQ	nd	0,210	nd	< LOQ	< LOQ	0,368	0,272	0,069
Benz(a)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	0,153	nd	nd	nd	nd	0,153	0
Chrysen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(b)fluoranthen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(k)fluoranthen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(ghi)perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
suma	3,811	3,009	1,914	2,034	3,415	1,229	2,645	3,328	2,285	2,655	2,633	0,748

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 25: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan ze 2. komory, odběr 21.11. 2007. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	průměr	s
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	nd	nd	nd	0,583	nd	nd	nd	< LOQ	nd	nd	0,583	0
Acenaften	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Fluoren	< LOQ	nd	nd	0,640	0,235	< LOD	< LOQ	nd	< LOQ	1,000	0,625	0,271
Fenanthren	nd	0,755	0,714	1,074	0,694	0,844	0,746	0,612	0,816	nd	0,782	0,122
Anthracen	1,093	nd	nd	0,273	nd	nd	< LOQ	nd	nd	0,328	0,565	0,324
Fluoranthren	0,331	0,607	0,963	0,037	0,427	0,603	0,532	nd	0,249	nd	0,469	0,245
Pyren	0,362	1,324	nd	nd	nd	< LOQ	nd	nd	nd	nd	0,843	0,393
Benz(a)anthracen	nd	nd	nd	0,283	nd	nd	nd	< LOQ	nd	< LOQ	0,283	0
Chrysen	nd	nd	nd	0,329	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,329	0
Benzo(b)fluoranthren	nd	nd	nd	< LOQ	0,674	nd	< LOQ	nd	nd	< LOD	0,674	0
Benzo(k)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(a)pyren	nd	< LOQ	nd	< LOD	< LOD	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(ghi)perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
suma	1,786	2,686	1,677	3,219	2,030	1,447	1,278	0,612	1,065	1,328	1,713	0,698

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 26: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan ze 3. komory, odběr 21.11. 2007. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	průměr	s
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	nd	0,230	< LOD	nd	nd	0,275	nd	0,209	nd	nd	0,238	0,024
Acenaften	nd	< LOQ	nd	nd	< LOQ	nd	nd	0,322	< LOD	< LOQ	-	-
Fluoren	0,572	0,235	< LOD	0,285	< LOQ	0,268	nd	0,388	< LOQ	nd	0,350	0,112
Fenanthren	nd	1,579	1,676	1,328	1,132	1,445	1,421	1,130	1,230	1,010	1,328	0,199
Anthracen	0,708	nd	0,775	0,262	nd	nd	0,289	< LOD	< LOQ	0,067	0,420	0,250
Fluoranthren	1,055	1,887	1,307	nd	0,985	1,805	nd	1,837	0,873	nd	1,393	0,382
Pyren	nd	0,581	< LOQ	< LOQ	nd	0,385	nd	0,572	0,124	nd	0,416	0,166
Benz(a)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Chrysen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(b)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(k)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(ghi)perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
suma	2,335	4,512	3,758	1,875	2,117	4,178	1,710	4,458	2,227	1,077	2,825	1,149

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 27: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan z 1. komory, odběr 28.11. 2007. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	průměr	s
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	0,735	0,612	0,547	0,482	0,569	0,382	nd	0,561	< LOQ	nd	0,555	0,094
Acenaften	< LOQ	< LOQ	nd	nd	< LOQ	< LOQ	nd	< LOQ	nd	nd	-	-
Fluoren	0,238	0,351	0,436	0,284	0,523	0,431	0,415	0,365	< LOD	< LOQ	0,380	0,080
Fenanthren	1,973	2,126	1,985	2,267	2,258	2,364	2,005	2,352	0,761	0,877	1,897	0,531
Anthracen	0,249	0,154	0,421	< LOQ	0,2	< LOQ	< LOQ	0,167	< LOD	nd	0,238	0,089
Fluoranthren	0,925	0,736	0,603	0,238	0,576	0,697	0,349	0,661	< LOQ	< LOQ	0,598	0,192
Pyren	0,452	0,198	nd	< LOQ	nd	< LOQ	nd	0,203	nd	nd	0,284	0,103
Benz(a)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Chrysen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	< LOD	-	-
Benzo(b)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	< LOQ	-	-
Benzo(k)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(ghi)perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
suma	4,572	4,177	3,992	3,271	4,126	3,874	2,769	4,309	0,761	0,877	3,273	1,261

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 28: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan ze 2. komory, odběr 28.11. 2007. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	průměr	s
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,257	0,234	< LOQ	0,291	0,529	nd	0,330	0,328	0,096
Acenaften	< LOD	< LOQ	nd	< LOQ	< LOQ	nd	nd	0,269	< LOD	nd	-	-
Fluoren	0,439	0,347	1,312	0,658	0,486	0,623	0,744	0,453	0,582	0,491	0,614	0,246
Fenanthren	2,361	1,995	2,638	2,312	2,149	2,351	2,330	2,465	1,898	1,406	2,191	0,317
Anthracen	0,184	< LOQ	0,607	< LOQ	0,187	< LOQ	0,325	< LOD	< LOQ	< LOQ	0,326	0,154
Fluoranthren	0,472	0,326	0,718	0,574	0,439	0,634	0,992	0,975	0,745	< LOQ	0,653	0,206
Pyren	nd	0,210	nd	< LOQ	nd	< LOQ	nd	0,304	< LOQ	nd	0,257	0,038
Benz(a)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Chrysen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(b)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(k)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(ghi)perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
suma	3,456	2,878	5,275	3,801	3,495	3,608	4,682	4,995	3,225	2,227	3,764	0,867

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 29: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan ze 3. komory, odběr 28.11. 2007. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	průměr	s
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	0,338	0,637	1,151	0,512	0,563	1,163	1,058	< LOQ	0,236	0,632	0,370	0,326
Acenaften	nd	nd	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	nd	nd	nd	< LOQ	-	-
Fluoren	0,458	0,494	0,696	0,841	1,041	0,406	0,554	< LOQ	0,431	0,621	0,616	0,200
Fenanthren	0,532	1,396	1,378	1,268	2,443	2,427	2,261	2,693	1,984	1,489	1,941	0,646
Anthracen	0,387	0,427	0,373	0,521	0,721	0,243	0,342	nd	0,684	0,620	0,254	0,156
Fluoranthren	0,632	0,989	1,492	1,015	0,936	0,728	0,822	0,579	0,457	1,005	0,723	0,279
Pyren	0,310	0,415	nd	0,438	nd	0,603	0,645	0,952	nd	0,215	0,319	0,228
Benz(a)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Chrysen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(b)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(k)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(ghi)perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
suma	2,657	4,358	5,090	4,595	5,704	5,570	5,682	4,224	3,792	4,582	4,625	0,905

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 30: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan z 1. komory, odběr 19.12. 2007. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	průměr	s
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	0,348	nd	< LOD	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,348	0
Acenaften	< LOQ	nd	< LOD	nd	0,307	< LOD	< LOQ	nd	nd	nd	0,307	0
Fluoren	< LOD	< LOD	0,232	< LOQ	0,258	0,542	0,239	0,297	< LOQ	nd	0,314	0,116
Fenanthren	1,522	1,692	1,522	1,123	1,777	2,277	1,982	1,660	1,254	nd	1,645	0,331
Anthracen	< LOQ	< LOQ	< LOQ	nd	< LOD	< LOQ	< LOQ	< LOD	< LOQ	nd	-	-
Fluoranthren	0,299	0,425	0,415	0,237	0,336	0,562	0,525	0,255	0,368	0,340	0,376	0,102
Pyren	nd	nd	nd	nd	nd	< LOD	nd	nd	nd	0,189	0,189	0
Benz(a)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Chrysen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(b)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(k)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(ghi)perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
suma	2,169	2,117	2,169	1,360	2,678	3,381	2,746	2,212	1,622	0,529	2,098	0,752

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 31: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan ze 2. komory, odběr 19.12. 2007. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	průměr	s
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaften	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Fluoren	1,282	1,210	0,857	0,676	1,010	0,728	0,417	< LOQ	0,622	0,561	0,818	0,279
Fenanthren	2,657	2,577	2,126	1,778	2,646	2,638	2,611	2,696	2,369	1,897	2,400	0,326
Anthracen	0,157	0,190	0,429	0,064	0,207	nd	nd	nd	nd	0,231	0,213	0,110
Fluoranthren	0,586	0,902	0,364	0,209	0,596	0,561	0,496	< LOQ	0,229	0,482	0,492	0,200
Pyren	0,035	0,262	nd	nd	< LOQ	< LOD	0,379	0,187	0,208	nd	0,214	0,112
Benz(a)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Chrysen	nd	0,200	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,200	0
Benzo(b)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(k)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(ghi)perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
suma	4,717	5,341	3,776	2,727	4,459	3,927	3,903	2,883	3,428	3,171	3,833	0,787

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 32: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan ze 3. komory, odběr 19.12. 2007. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	průměr	s
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	0,775	1,647	0,388	0,766	0,807	0,684	< LOQ	0,312	nd	nd	0,768	0,402
Acenaften	nd	nd	nd	0,108	0,132	nd	nd	0,052	nd	0,187	0,120	0,048
Fluoren	nd	0,200	nd	< LOQ	nd	< LOQ	nd	0,248	< LOQ	0,654	0,367	0,204
Fenanthren	2,490	2,389	2,634	1,440	2,440	1,463	1,645	1,632	1,932	2,322	2,039	0,441
Anthracen	nd	< LOQ	nd	< LOQ	nd	< LOQ	nd	0,164	0,213	< LOQ	0,189	0,024
Fluoranthen	nd	< LOQ	nd	nd	0,169	0,158	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,681	0,336	0,244
Pyren	< LOQ	0,224	< LOQ	nd	0,437	< LOQ	nd	nd	nd	0,990	0,550	0,323
Benz(a)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Chrysen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(b)fluoranthen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(k)fluoranthen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(ghi)perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
suma	3,265	4,460	3,022	2,314	3,985	2,305	1,645	2,408	2,145	4,834	3,038	1,019

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 33: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan z 1. komory, odběr 2.1. 2008. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	průměr	smodch
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	0,142	0,156	0,362	nd	0,397	0,198	0,650	0,140	0,452	0,555	0,339	0,180
Acenaften	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Fluoren	0,684	0,594	0,612	0,894	0,649	0,364	0,432	< LOQ	0,483	0,536	0,583	0,147
Fenanthren	2,597	2,321	2,257	2,216	2,512	2,364	2,293	1,620	2,831	2,636	2,365	0,310
Anthracen	< LOD	< LOQ	< LOQ	0,891	< LOQ	nd	< LOQ	< LOD	< LOQ	< LOQ	0,891	0,000
Fluoranthen	0,647	0,584	0,632	0,169	0,692	0,298	0,361	0,207	0,421	0,378	0,439	0,180
Pyren	0,305	0,300	0,289	0,357	0,360	nd	0,382	nd	nd	0,247	0,320	0,044
Benz(a)anthracen	< LOQ	< LOQ	< LOQ	nd	< LOQ	< LOQ	nd	nd	< LOD	nd	-	-
Chrysen	0,275	nd	0,212	nd	0,242	0,362	nd	nd	nd	< LOQ	0,273	0,056
Benzo(b)fluoranthen	0,381	0,321	0,362	nd	nd	0,409	nd	nd	nd	0,313	0,357	0,036
Benzo(k)fluoranthen	nd	nd	nd	nd	0,477	0,363	nd	nd	nd	nd	0,420	0,057
Benzo(a)pyren	nd	nd	< LOD	nd	< LOD	< LOD	nd	nd	nd	< LOD	-	-
Benzo(ghi)perylen	< LOD	nd	nd	nd	< LOD	< LOD	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	< LOD	nd	nd	nd	< LOD	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	nd	< LOD	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
suma	5,031	4,276	4,726	4,527	5,329	4,358	4,118	1,967	4,187	4,665	4,318	0,863

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 34: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan ze 2. komory, odběr 2.1. 2008. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	průměr	s
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	< LOQ	0,520	0,265	0,574	0,367	< LOQ	< LOQ	0,392	0,367	0,348	0,405	0,098
Acenaften	nd	nd	0,317	< LOD	nd	nd	< LOQ	0,429	nd	0,298	0,348	0,058
Fluoren	0,420	0,886	0,825	0,737	0,837	0,265	0,687	0,697	0,564	1,817	0,774	0,394
Fenanthren	1,070	2,323	2,784	2,330	1,936	2,029	2,134	2,537	2,316	2,467	2,193	0,442
Anthracen	< LOQ	< LOQ	0,235	< LOQ	0,235	nd	nd	1,290	0,358	0,531	0,530	0,395
Fluoranthen	nd	0,164	0,469	0,192	0,358	0,298	nd	< LOQ	0,368	0,399	0,321	0,102
Pyren	nd	nd	< LOQ	nd	nd	nd	0,251	0,285	nd	< LOD	0,268	0,017
Benz(a)anthracen	nd	nd	nd	nd	< LOQ	nd	nd	0,287	nd	nd	0,287	-
Chrysen	nd	nd	nd	nd	< LOQ	nd	nd	0,436	0,294	0,210	0,313	0,093
Benzo(b)fluoranthen	nd	nd	nd	nd	< LOD	nd	nd	< LOQ	< LOQ	< LOD	-	-
Benzo(k)fluoranthen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	< LOD	nd	nd	< LOD	nd	< LOQ	-	-
Benzo(ghi)perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	< LOD	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
suma	1,490	3,893	4,895	3,833	3,733	2,592	3,072	6,353	4,267	6,070	4,020	1,412

II. Stanovení obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v salámu

Tab. 35: Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) PAU stanovené ve vzorcích salámu Poličan ze 3. komory, odběr 2.1. 2008. < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	průměr	s
Naftalen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Acenaftylen	< LOQ	0,365	< LOQ	< LOQ	0,455	0,242	0,234	nd	< LOQ	< LOQ	0,324	0,092
Acenaften	0,142	0,530	0,111	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	0,318	< LOQ	< LOQ	0,275	0,167
Fluoren	0,512	0,488	0,514	0,304	< LOD	0,773	0,532	0,574	0,487	0,347	0,503	0,126
Fenanthren	1,951	2,302	2,222	2,310	3,004	2,273	2,129	2,390	1,879	2,393	2,285	0,291
Anthracen	0,213	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,207	0,210	0,003
Fluoranthren	0,636	0,548	0,784	0,506	0,592	0,725	0,458	0,249	0,512	0,950	0,596	0,183
Pyren	< LOQ	0,673	0,450	0,229	0,197	0,366	0,264	0,438	nd	nd	0,374	0,153
Benz(a)anthracen	nd	nd	nd	< LOQ	nd	< LOQ	< LOQ	nd	< LOD	nd	-	-
Chrysen	nd	nd	nd	nd	nd	0,265	0,284	nd	nd	nd	0,275	0,009
Benzo(b)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	< LOQ	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(k)fluoranthren	nd	nd	nd	nd	nd	< LOQ	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(a)pyren	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Benzo(ghi)perylen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Dibenz(a,h)anthracen	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyren	nd	nd	nd	< LOD	nd	0,233	nd	nd	nd	nd	0,233	0
suma	3,454	4,906	4,081	3,349	4,248	4,877	3,901	3,969	2,878	3,897	3,956	0,603

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, *Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. dostupné z >
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69-p.pdf> [cit. 20.5. 2010]
2. *Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*, in IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. 2010: Lyon, France. vol. 92. p. 868.
3. International Programme on Chemical Safety: *Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. World Health Organisation. 1998. Geneva.
4. European commission, Health and Consumer Protection Directorate-general Commmission, *Opinion of the Scientific Commitee on Food on the risk to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food*. SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final. 2002. Brussels, Belgium.
5. Jira, W.: A GC/MS method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked meat products and liquid smokes. *European Food Research and Technology*, 2004, vol. 218, no. 2, p. 208-212. ISSN 1438-2377.
6. Mahadevan, B. and Luch, A.: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. in Encyclopedia of Cancer*. 2nd Edition, Schwab M. Editor. 2009. p. 2388-2391. Heidelberg Germany. ISBN 978-3-540-36847-2
7. Xue, W. and Warshawsky, D.: Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, vol. 206, no. 1, p. 73-93. ISSN 0041-008X.
8. Harvey, R.G.: *Polycyclic aromatic hydrocarbons: Chemistry and carcinogenity*. 1991, Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press. 405. ISBN 0-521-364-582.
9. Penning, T.M., *Aldo-Keto Reductases and Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon o-Quinones*, in *Methods in Enzymology*, S. Helmut and P. Lester, Editors. 2004, Academic Press. p. 31-67. ISBN 0076-6879
10. Penning, T.: Metabolic activation of PAHs by aldo-keto reductases. *Toxicology Letters*, 2010, vol. 196, no. 1, p. S10-S10. ISSN 0378-4274.
11. Callen, M., Hall, S., Mastral, A.M., Garcia, T., Ross, A., and Bartle, K.D.: PAH presence in oils and tars from coal-tyre coprocessing. *Fuel Processing Technology*, 2000, vol. 62, no. 1, p. 53-63. ISSN 0378-3820.
12. Ravindra, K., Sokhi, R., and Van Grieken, R.: Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 2008, vol. 42, no. 13, p. 2895-2921. ISSN 1352-2310.
13. de Abrantes, R., Vicente de Assunção, J., Pesquero, C.R., Bruns, R.E., and Nóbrega, R.P.: Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons from gasohol and ethanol vehicles. *Atmospheric Environment*, 2009, vol. 43, no. 3, p. 648-654. ISSN 1352-2310.
14. Khalili, N.R., Scheff, P.A., and Holsen, T.M.: PAH source fingerprints for coke ovens, diesel and, gasoline engines, highway tunnels, and wood combustion emissions. *Atmospheric Environment*, 1995, vol. 29, no. 4, p. 533-542. ISSN 1352-2310.
15. Golomb, D., Barry, E., Fisher, G., Varanusupakul, P., Koleda, M., and Rooney, T.: Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons near New England coastal waters. *Atmospheric Environment*, 2001, vol. 35, no. 36, p. 6245-6258. ISSN 1352-2310.

16. Sheu, H.-L., Lee, W.-J., Lin, S.J., Fang, G.-C., Chang, H.-C., and You, W.-C.: Particle-bound PAH content in ambient air. *Environmental Pollution*, 1997, vol. 96, no. 3, p. 369-382. ISSN 0269-7491.
17. Callén, M.S., de la Cruz, M.T., López, J.M., and Mastral, A.M.: PAH in airborne particulate matter.: Carcinogenic character of PM10 samples and assessment of the energy generation impact. *Fuel Processing Technology*, In Press, Corrected Proof, ISSN 0378-3820.
18. Scientific Opinion of the Panel Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *The EFSA Journal*, 2008, vol. no. 724, p. 1-114.
19. Nielsen, T., Jørgensen, H.E., Larsen, J.C., and Poulsen, M.: City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: occurrence, sources and health effects. *Science of the Total Environment*, 1996, vol. 189-190, no., p. 41-49. ISSN 0048-9697.
20. Ravindra, K., Wauters, E., and Van Grieken, R.: Variation in particulate PAHs levels and their relation with the transboundary movement of the air masses. *Science of The Total Environment*, 2008, vol. 396, no. 2-3, p. 100-110. ISSN 0048-9697.
21. Yang, H.-H., Lee, W.-J., Chen, S.-J., and Lai, S.-O.: PAH emission from various industrial stacks. *Journal of Hazardous Materials*, 1998, vol. 60, no. 2, p. 159-174. ISSN 0304-3894.
22. Miller, J.S. and Olejnik, D.: Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Water Research*, 2001, vol. 35, no. 1, p. 233-243. ISSN 0043-1354.
23. Manoli, E. and Samara, C.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1999, vol. 18, no. 6, p. 417-428. ISSN 0165-9936.
24. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb. ve znění pozdějších předpisů, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontrol pitné vody.
25. Zhang, X.-X., Cheng, S.-P., Zhu, C.-J., and Sun, S.-L.: Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors. *Pedosphere*, 2006, vol. 16, no. 5, p. 555-565. ISSN 1002-0160.
26. Cerniglia, C.E.: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 1993, vol. 4, no. 3, p. 331-338. ISSN 0958-1669.
27. Phillips, D.H.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 1999, vol. 443, no. 1-2, p. 139-147. ISSN 1383-5718.
28. D'Adamo, R., Pelosi, S., Trotta, P., and Sansone, G.: Bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Marine Chemistry*, 1997, vol. 56, no. 1-2, p. 45-49. ISSN 0304-4203.
29. Farhadian, A., Jinap, S., Abas, F., and Sakar, Z.I.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. *Food Control*, 2010, vol. 21, no. 5, p. 606-610. ISSN 0956-7135.
30. Farhadian, A., Jinap, S., Hanifah, H.N., and Zaidul, I.S.: Effects of meat preheating and wrapping on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled meat. *Food Chemistry*, vol. In Press, Accepted Manuscript, ISSN 0308-8146.
31. Simko, P.: Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat foods and liquid smoke flavorings. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005, vol. 49, no. 7, p. 637-647. ISSN 1613-4125.

32. Stumpe-Viksna, I., Bartkevics, V., Kukare, A., and Morozovs, A.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chemistry*, 2008, vol. 110, no. 3, p. 794-797. ISSN 0308-8146.
33. Suchanova, M., Hajslova, J., Tomaniova, M., Kocourek, V., and Babicka, L.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, vol. 88, no. 8, p. 1307-1317. ISSN 0022-5142.
34. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 326/2001 Sb. ve znění pozdějších předpisů, o potravinách a tabákových a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich.
35. Steinhauser, L. and kolektiv: *Produkce masa*. 2000: LAST. 464. ISBN 80-900260-7-9.
36. Kopřiva, V., Matyáš, Z., Steinhauserová, I., and ČSZM, k.č.v.s.: *Zásady správné výrobní a hygienické praxe pro masnou technologii*. 2002, Brno.
37. Dimashki, M., Harrad, S., and Harrison, R.M.: Measurements of nitro-PAH in the atmospheres of two cities. *Atmospheric Environment*, 2000, vol. 34, no. 15, p. 2459-2469. ISSN 1352-2310.
38. Franců, E., Schwarzbauer, J., Lána, R., Nývlt, D., and Nehyba, S.: Historical Changes in Levels of Organic Pollutants in Sediment Cores from Brno Reservoir, Czech Republic. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2010, vol. 209, no. 1, p. 81-91.
39. Seethapathy, S., Górecki, T., and Li, X.: Passive sampling in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 2008, vol. 1184, no. 1-2, p. 234-253. ISSN 0021-9673.
40. Petty, J.D., Orazio, C.E., Huckins, J.N., Gale, R.W., Lebo, J.A., Meadows, J.C., Echols, K.R., and Cranor, W.L.: Considerations involved with the use of semipermeable membrane devices for monitoring environmental contaminants. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 879, no. 1, p. 83-95. ISSN 0021-9673.
41. Zuin, V.G., Montero, L., Bauer, C., and Popp, P.: Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1091, no. 1-2, p. 2-10. ISSN 0021-9673.
42. Martinez, E., Gros, M., Lacorte, S., and Barceló, D.: Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1047, no. 2, p. 181-188. ISSN 0021-9673.
43. Lund, M., Duedahl-Olesen, L., and Christensen, J.H.: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked fish using pressurized liquid extraction with integrated fat removal. *Talanta*, 2009, vol. 79, no. 1, p. 10-15. ISSN 0039-9140.
44. Orecchio, S., Ciotti, V.P., and Culotta, L.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC-MS, profile, levels and sources. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, vol. 47, no. 4, p. 819-826. ISSN 0278-6915.
45. Simko, P.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2002, vol. 770, no. 1-2, p. 3-18. ISSN 1570-0232.
46. Ziegenhals, K., Jira, W., and Speer, K.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in various types of tea. *European Food Research and Technology*, 2008, vol. 228, no. 1, p. 83-91. ISSN 1438-2377.
47. Veyrand, B., Brosseau, A., Sarcher, L., Varlet, V., Monteau, F., Marchand, P., Andre, F., and Le Bizec, B.: Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1149, no. 2, p. 333-344. ISSN 0021-9673.

48. Dean, J.R., *Methods for Environmental Trace Analysis*. Analytical Techniques in the Sciences, ed. D.J. Ando. 2003, John Wiley and Sons Ltd: Chichester, England. p. 265. ISBN 0-470-84422-1.
49. Moldoveanu S. C., David. V.: *Sample preparation in chromatography*. 1st ed. Journal of Chromatography Library. Vol. 65. 2002, Elsevier: Amsterdam. 942. ISBN 0-444-503-943.
50. Simpson, N.J.K., *Solid-Phase Extraction*. Marcel Dekker, Inc.: New York, USA. 2000, p. 505. ISBN 0-8247-0021-X.
51. Djinic, J., Popovic, A., and Jira, W.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in traditional and industrial smoked beef and pork ham from Serbia. *European Food Research and Technology*, 2008, vol. 227, no. 4, p. 1191-1198. ISSN 1438-2377.
52. Ziegenhals, K., Speer, K., and Jira, W.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in chocolate on the German market. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2009, vol. 4, no. 2, p. 128-135. ISSN 1661-5751.
53. Rey-Salgueiro, L., Pontevedra-Pombal, X., Álvarez-Casas, M., Martínez-Carballo, E., García-Falcón, M.S., and Simal-Gándara, J.: Comparative performance of extraction strategies for polycyclic aromatic hydrocarbons in peats. *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216, no. 27, p. 5235-5241. ISSN 0021-9673.
54. Barco-Bonilla, N., Vidal, J.L.M., Frenich, A.G., and Romero-Gonzalez, R.: Comparison of ultrasonic and pressurized liquid extraction for the analysis of polycyclic aromatic compounds in soil samples by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2009, vol. 78, no. 1, p. 156-164. ISSN 0039-9140.
55. Afanasov, I.M., Kepman, A.V., Morozov, V.A., Seleznev, A.N., and Avdeev, V.V.: Determination of polyaromatic hydrocarbons in coal tar pitch. *Journal of Analytical Chemistry*, 2009, vol. 64, no. 4, p. 361-365. ISSN 1061-9348.
56. Rey-Salgueiro, L., Garcia-Falcon, M.S., Martinez-Carballo, E., and Simal-Gandara, J.: Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chemistry*, 2008, vol. 108, no. 2, p. 607-615. ISSN 0308-8146.
57. Lorenzo, J.M., Purriños, L., Fontán, M.C.G., and Franco, D.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Spanish traditional smoked sausage varieties: "Androlla" and "Botillo". *Meat Science*, vol. In Press, Accepted Manuscript, ISSN 0309-1740.
58. Rodríguez-Sanmartín, P., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, A., and Bermejo-Barrera, P.: Ultrasound-assisted solvent extraction of total polycyclic aromatic hydrocarbons from mussels followed by spectrofluorimetric determination. *Talanta*, 2005, vol. 66, no. 3, p. 683-690. ISSN 0039-9140.
59. Rey-Salgueiro, L., Martínez-Carballo, E., García-Falcón, M.S., González-Barreiro, C., and Simal-Gándara, J.: Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods. *Food Chemistry*, 2009, vol. 115, no. 3, p. 814-819. ISSN 0308-8146.
60. Zhang, H., Xue, M., and Dai, Z.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by HPLC-fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, In Press, Accepted Manuscript, ISSN 0889-1575.
61. Navarro, P., Cortazar, E., Bartolomé, L., Deusto, M., Raposo, J.C., Zuloaga, O., Arana, G., and Etxebarria, N.: Comparison of solid phase extraction, saponification and gel permeation chromatography for the clean-up of microwave-assisted biological extracts in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1128, no. 1-2, p. 10-16. ISSN 0021-9673.

62. Wretling, S., Eriksson, A., Eskhult, G.A., and Larsson, B.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, vol. 23, no. 3, p. 264-272. ISSN 0889-1575.
63. Kanchanamayoon W., T.N.: Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples by Solid Phase Extraction and Gas Chromatography. *World Journal of Chemistry*, 2008, vol. 3, no. 2, p. 51-54. ISSN 1817-3128.
64. Jones, D.E., Magnin-Bissel, G., and Holladay, S.D.: Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in the shed skins of corn snakes (*Elaphe guttata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, vol. 72, no. 7, p. 2033-2035. ISSN 0147-6513.
65. Saim, N.a., Dean, J.R., Abdullah, M.P., and Zakaria, Z.: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 1997, vol. 791, no. 1-2, p. 361-366. ISSN 0021-9673.
66. Latawiec, A.E. and Reid, B.J.: Sequential extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons using subcritical water. *Chemosphere*, 2010, vol. 78, no. 8, p. 1042-1048. ISSN 0045-6535.
67. Poster, D.L., Schantz, M.M., Sander, L.C., and Wise, S.A.: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, vol. 386, no. 4, p. 859-881. ISSN 1618-2642.
68. Gomez-Ruiz, J.A. and Wenzl, T.: Evaluation of gas chromatography columns for the analysis of the 15+1 EU-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, vol. 393, no. 6-7, p. 1697-1707. ISSN 1618-2642.
69. Bordajandi, L.R., Dabrio, M., Ulberth, F., and Emons, H.: Optimisation of the GC-MS conditions for the determination of the 15 EU foodstuff priority polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Separation Science*, 2008, vol. 31, no. 10, p. 1769-1778. ISSN 1615-9306.
70. Ziegenhals, K., Hubschmann, H.J., Speer, K., and Jira, W.: Fast-GC/HRMS to quantify the EU priority PAH. *Journal of Separation Science*, 2008, vol. 31, no. 10, p. 1779-1786. ISSN 1615-9306.
71. Koester, C.J. and Moulik, A.: Trends in environmental analysis. *Analytical Chemistry*, 2005, vol. 77, no. 12, p. 3737-3754. ISSN 0003-2700.
72. Schnelle-Kreis, J., Welthagen, W., Sklorz, M., and Zimmermann, R.: Application of direct thermal desorption gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry for analysis of organic compounds in ambient aerosol particles. *Journal of Separation Science*, 2005, vol. 28, no. 14, p. 1648-1657. ISSN 1615-9306.
73. Mondello L., Lewis. A.C., Bartle K. D.: *Multidimensional Chromatography*. 1st ed. 2002, John Wiley and Sons Ltd.: Chichester, UK. ISBN 9780471988694
74. Liu, Z.Y. and Phillips, J.B.: Comprehensive 2-dimensional gas-chromatography using an on-column thermal modulator interface. *Journal of Chromatographic Science*, 1991, vol. 29, no. 6, p. 227-231. ISSN 0021-9665.
75. Ryan, D. and Marriott, P.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, vol. 376, no. 3, p. 295-297. ISSN 1618-2642.
76. Leco, TOF MS Aplikace, firemní prezentace dostupná na CD, [listopad 2009].
77. Příloha č. 3 k vyhlášce Ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb. ve znění pozdějších předpisů, kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost

- jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků.
78. Nařízení Komise č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách.
 79. Doporučení Komise č.108/2005 o dalším zjišťování obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v některých potravinách.
 80. Nařízení Komise č. 333/2007, kterým se stanoví metody vzorkování a analýzy pro oficiální kontrolu hladin olova, kadmia, rtuti, anorganického cínu, 3-MCPD a benzo(a)pyrenu v potravinách.
 81. Martorell, I., Perelló, G., Martí-Cid, R., Castell, V., Llobet, J.M., and Domingo, J.L.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: Temporal trend. *Environment International*, 2010, vol. 36, no. 5, p. 424-432. ISSN 0160-4120.
 82. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. *Zpráva o výsledcích plánované kontroly cizorodých látek v potravinách v roce 2008*. dostupné z www.szpi.gov.cz/ViewFile.aspx?docid=1022891. [cit. 20.12. 2010]

ŽIVOTOPIS

Osobní údaje

Jméno a příjmení, titul: Ludmila Mravcová, Ing. (roz. Nová)
Datum narození: 25.6. 1981
Stav: vdaná
Adresa: Voříškova 2
62300 Brno
E-mail: mravcova@fch.vutbr.cz

Vzdělání

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

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

Ostatní školní aktivity

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

Účast v projektech

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

Znalosti

Jazykové znalosti:

Angličtina - aktivní

Počítačové znalosti

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

Další dovednosti:

Řidičský průkaz sk. B

SEZNAM PUBLIKACÍ

Impaktované publikace

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

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

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

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

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

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

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

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

Ostatní vybrané publikace (příspěvky na konferencích a seminářích)

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

Nová, L.; Vávrová, M.; Čáslavský, J.; Vojtová, L.: Optimization of LC method for the characterization of biocompatible polymers degradation products. In *The 6th european*

meeting on environmental chemistry. 1. Belgrade, The Serbian Chemical Society. 2005. p. 310 - 310. ISBN 86-7132-024-3.

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

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

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

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

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

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

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

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

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