

KARAKTERIZACIJA KOPOLIMEROV SEC IN SEC-MALS ASPARAGINSKE KISLINE IN LAKTIDA

SEC AND SEC-MALS CHARACTERIZATION OF COPOLYMERS OF ASPARTIC ACID AND LACTIDE

Maja Gričar, Ema Žagar, Andrej Kržan, Majda Žigon

Kemijski inštitut, Laboratorij za polimerno kemijo in tehnologijo, Hajdrihova 19, SI-1000 Ljubljana, Slovenija
majda.zigon@ki.si

Prejem rokopisa – received: 2006-02-20; sprejem za objavo – accepted for publication: 2006-07-18

Iz dimera mlečne kisline (LTD) in asparaginske kisline (Asp) smo sintetizirali amfifilne kopolimere poli(sukcinimid-*ko*-laktid), PLS, različne kemijske sestave (Asp:LTD=1/6 in 1/13) ter določili porazdelitev in povprečja molskih mas. Povprečja molskih mas PLS smo določili z izključitveno kromatografijo v povezavi z detektorjem na sipanje svetlobe pri več kotih (SEC-MALS) po optimizaciji eksperimentalnih pogojev analize. Ločevanje makromolekul je potekalo po mehanizmu ločevanja po velikosti brez sekundarnih mehanizmov, kot so npr. polielektrolitski učinek, asociacija polimera, adsorpcija polimera na polnilo kolone itd. Z dodatkom H₃PO₄ topilu *N,N*-dimetilacetamidu smo preprečili disociacijo karboksilnih skupin PLS, z dodatkom LiBr pa polarne in elektrostatske interakcije v verigi kopolimera ter med kopolimerom in polnilom kolone. Absolutna povprečja molskih mas so veliko višja od relativnih, določenih z izključitveno kromatografijo in umeritvijo s polistirenskimi standardi pri enakih eksperimentalnih pogojih kot pri SEC-MALS. Razlike med relativnimi in absolutnimi povprečji molskih mas smo pojasnili z razlikami v kemijski sestavi kopolimerov in PS-standardov ter posledično različnimi konformacijami v raztopini.

Ključne besede: poli(sukcinimid-*ko*-laktid), SEC-MALS, SEC, povprečja molskih mas, porazdelitev molskih mas

Amphiphilic copolymers of lactic acid dimmer and aspartic acid, poly(succinimide-*co*-lactide)s – PLS, with different chemical composition (Asp : Lac = 1/6 and 1/13), were synthesized and molar mass averages (MMA) and distributions (MMD) were determined. MMA and MMD of PLS were determined using size exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering photometer (SEC-MALS) under optimized experimental conditions. Molecules were separated according to size exclusion mechanism, whereas the secondary effects such as polyelectrolyte effect, polymer association, adsorption of the polymer to the column packing material, etc., were successfully prevented. We added H₃PO₄ to *N,N*-dimethylacetamide in order to suppress dissociation of PLS carboxylic groups, and LiBr to prevent electrostatic interactions between the macromolecular chain and between macromolecules and column packing material. The absolute MMAs were much higher than relative PS equivalents determined under the same experimental conditions as by SEC-MALS. The difference between relative and absolute MMA is discussed in relation to the difference in copolymer and polystyrene composition and conformation in solution.

Key words: poly(succinimide-*co*-lactide), SEC-MALS, SEC, molar mass averages, molar mass distribution

1 UVOD

Biorazgradljivi polimeri v zadnjem času pridobivajo na pomenu predvsem zato, ker so primerni za uporabo v medicinske namene, saj pri njihovi razgradnji nastajajo človeku neškodljivi produkti. Eden najbolj znanih biorazgradljivih polimerov je poli(mlečna kislina) PLA. Ta se uporablja v medicinske namene zaradi svojih bioresorpcijskih lastnosti in biološke kompatibilnosti s človeškim organizmom. Uporablja se npr. za kontrolirano doziranje farmacevtskih učinkovin, za kostne vstavke, umetna tkiva in resorpcijske šive. Za nekatere namene je PLA preveč hidrofobna in hitrost razpada prenizka. V takih primerih uporabljamo hidrofilne biorazgradljive polimere, katerih tipični predstavniki so poli(asparaginska kislina) PASP, poli(akrilna kislina) PA, itd. PASP razpada mnogo hitreje kot hidrofobna PLA. PASP nastane z odprtjem sukcinimidnih obročev poli(sukcinimida). To obliko sestavljajo hidrofilne asparaginske enote, topne v vodi¹⁻³. Izkazalo se je, da je za uporabo v medicinske namene zaradi boljše afinitete z različnimi vrstami farmacevtskih učinkovin oziroma tkiv pomembna tako hidrofilna kot tudi hidrofobna narava

materiala^{4,5}. Te lastnosti združujejo amfifilni polimeri, kot so npr. kopolimer asparaginske kisline (Asp) in laktida (LTD), poli(sukcinimid-*ko*-laktid)⁶ PLS, kopolimer γ -glutaminske kisline in laktida⁷ itd.

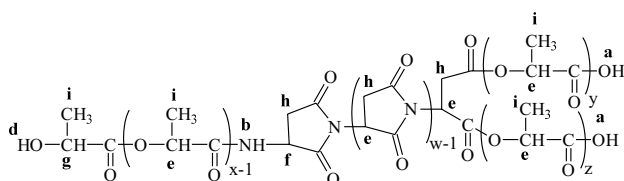
Zaradi statistične narave polimerizacije so polimeri zmesi različno velikih molekul in zato njihovo molsko maso lahko opredelimo le s povprečnimi vrednostmi. Poznanje celotne porazdelitve molskih mas in povprečij le-teh je pomembno za razumevanje biorazgradljivosti in njihovih fizikalnih, reoloških in mehanskih lastnosti⁸. Izključitvena kromatografija (SEC) omogoča določitev relativnih povprečij in porazdelitev molskih mas. Molekule se ločujejo v koloni z nosilcem z definirano velikostjo por glede na hidrodinamski volumen v izbranem topilu. Izključitvena kromatografija, sklopljena z detektorjem na sipanje svetlobe pri več kotih (SEC-MALS), omogoča določitev absolutnih povprečij in porazdelitev molskih mas^{9,10}.

PLS je amfifilen polimer, topen v polarnih topilih, kot sta *N,N*-dimetilformamid (DMF) ali *N,N*-dimetilacetamid (DMAc)^{6,11}. Vendar pa se makromolekule na kolonah z zamreženim polistirenskim polnilom in z uporabo polarnih eluentov, kot sta DMF ali DMAc, ne

ločujejo le po velikosti, ampak lahko pride med topljencem, topljencem in topilom ter med topljencem in polnilom kolone do številnih interakcij (asociacija, adsorpcija polimera na polnilo kolone, hidrofobne interakcije polimera s polnilom kolone) in polielektrolitskega učinka^{9-14,16-22}. Polielektrolitski učinek je značilen za polimere z ionskimi skupinami pri nizkih koncentracijah analita. Zaradi elektrostatskega odboja med enako nabitimi skupinami zavzame polimer v izbranem topilu bolj raztegnjeno konformacijo. Ker se zato hidrodinamski volumen molekule poveča, se le-ta eluira iz kolone hitreje, kot bi pričakovali glede na njeno molsko maso. Za zaščito nabejev na polimeru in polnilu topilu dodajamo enostavne elektrolite, npr. LiBr^{11,12,15}. Močna tendenca polarnih skupin polimera za tvorbo H-vezi vodi do asociacije molekul polimera in posledično do večjega hidrodinamskega volumna in s tem višjih izmerjenih relativnih molskih mas. Privlačne interakcije med polarnimi skupinami kopolimera in polnila kolone (H-vezi, dipolne interakcije) povzročijo adsorpcijo polimera na polnilo kolone, kar poveča elucijski volumen^{12,16,18,20,22,23}. Med hidrofobnim delom amfifilnega polimera in nepolarnim polnilom kolone lahko pride tudi do hidrofobnih interakcij^{13,14}. Za preprečitev zgoraj omenjenih interakcij topilu dodajamo enostavne elektrolite, kot so npr. LiBr, LiCl, NaBr, ipd.^{6,12,16-18,20-24}.

Namen našega dela je bil določiti absolutna in relativna povprečja molskih mas dveh kopolimerov PLS različne sestave (razmerje monomernih enot Asp : LTD = 1:6 in 1:13) ter z optimizacijo eksperimentalnih pogojev zagotoviti ločevanje makromolekul izključno po hidrodinamskem volumnu. Relativna povprečja molskih mas (MMA) in porazdelitve molskih mas (MMD) smo določili s SEC glede na polistirenske standarde, absolutne vrednosti pa s SEC-MALS.

Po navedbah v literaturi so porazdelitev in povprečja poli(sukcinimid-*ko*-laktid)a do sedaj določali le z relativno SEC in polistirensko umeritvijo z uporabo topila DMAc z dodatkom LiBr relativno na PS-standarde⁶. Kot prvi smo absolutna MMAs določili z uporabo SEC-MALS pri optimalnih eksperimentalnih pogojih za posamezni kopolimer in jih primerjali z relativnimi vrednostmi glede na PS-standarde. V delu podajamo možne razlage za zelo velike razlike med absolutnimi in relativnimi vrednostmi MMA.



Slika 1: Struktura poli(sukcinimid-*ko*-laktida)⁶

Figure 1: The structure of poly(succinimide-*co*-lactide)⁶

2 EKSPERIMENTALNI DEL

Materiali

Asparaginska kislina, Asp (98 %, Aldrich), laktid – ciklični dimer mlečne kisline, LTD (98 %, Aldrich), tetrahidrofuran, THF (vsebnost vode < 0,05 %, Merck), *N,N*-dimetilacetamid, DMAc (vsebnost vode ≤ 0,03 %, 99,8 %, Fluka), LiBr (99,995+ %, Aldrich), H₃PO₄ (85 %, Merck). Vse kemikalije so bile p. a.

Sinteza

V stekleno bučko s tremi vratovi, opremljeno z mehanskim mešalom in dovodom argona, smo zatehtali Asp (4,0 g; 0,03 mol) in LTD (10,8 g; 0,08 mol). Bučko smo ovili z aluminijevo folijo, jo prepihali in napolnili z argonom. Reakcijsko zmes smo segrevali 4 h pri 200 °C. Po 4 h smo znižali temperaturo na 160 °C in tlak do pribl. 200 mbar, da smo odstranili nastajajočo vodo in premaknili ravnotežje v smer nastanka produkta. Z mešanjem smo nadaljevali 20 h pri 160 °C in znižanem tlaku. Reakcijska raztopina je postala rjava in viskozna. Reakcijo smo ustavili z ohlajanjem reakcijske zmesi. Produkt smo raztopili v 15 mL THF in ga oborili s 600 mL destilirane vode ter pustili 3 dni, da se je v vodi raztopila nezreagirana Asp. Rumenorjav produkt smo sušili pri sobni temperaturi in znižanem tlaku⁶ (izkoristek sinteze 76 %).

Sestavo sintetiziranih kopolimerov oziroma razmerje Asp : LTD v PLS-1/6 in PLS-1/13 smo določili s ¹H NMR-spektroskopijo iz razmerja intenzitet resonanc metilenskega protona sukcinimida (h) in metilne skupine PLA (i)⁶. Struktura kopolimera PLS je prikazana na **sliki 1**.

Karakterizacija

Analize vzorcev SEC-MALS smo izvajali pri sobni temperaturi na tekočinskem kromatografu s črpalko Hewlett Packard 1100 Series, laserskim fotometrom Dawn-DSP s He-Ne laserjem (λ₀ = 633 nm) in interferometričnim refraktometrom Optilab-DSP, ki deluje pri isti valovni dolžini kot Dawn-DSP (Wyatt Technology Corp.). Uporabili smo kolono PLgel 3 μm Mixed-E dolžine 30 cm s predkolono ter topilo DMAc z dodatkom LiBr in H₃PO₄ s pretokom 0,8 mL/min. LiBr smo pred uporabo sušili 48 h pri 200 °C pri znižanem tlaku. Topila, ki smo jih uporabili za SEC, smo filtrirali skozi teflonski filter 0,2 μm (Millipore). Injicirali smo 1,0 × 10⁻³ g (koncentracija analita = 1,0 %). Izkoristek eluiranja vzorca iz kolone smo izračunali z upoštevanjem vrednosti dn/dc in znane mase injiciranja. Kromatograme smo obdelali s programom Astra 4.50 (Wyatt Technology Corp.).

Analize SEC smo izvajali pri sobni temperaturi na tekočinskem kromatografu Perkin Elmer LC-200 s črpalko Hewlett Packard 1100 Series in diferenčnim refraktometrom (DRI) Agilent 1100 Series. Pogoji analiz

posameznih vzorcev so bili enaki kot pri SEC-MALS. Koncentracija vzorca je bila ca. 1 %, injicirali smo od 20–100 μL . Povprečja molskih mas smo izračunali iz umeritvene krivulje za polistirenske standarde v območju molskih mas 4000 g/mol in 20400 g/mol.

Vrednosti dn/dc za kopolimere smo določili v topilu z optimalno sestavo za posamezni vzorec, določeno s SEC-MALS, z diferenčnim refraktometrom Optilab-DSP (Wyatt Technology, Corp.). Meritve so potekale v DMAc z dodatkom LiBr in H_3PO_4 (0,01 M – 0,1 M) pri pretoku 0,2 mL/min, 2-mililitrski zanki, valovni dolžini 633 nm in temperaturi detektorja 25 °C. Vrednosti dn/dc smo izračunali z uporabo programa DNDC 5.00 (Wyatt Technology, Corp.).

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Pri metodi SEC-MALS uporabljamo zaporedno vezana dva detektorja, laserski fotometer, ki meri sipanje svetlobe molekul polimera v raztopini pri več kotih in koncentracijski detektor – diferenčni refraktometer. Zvezo med intenziteto sipane svetlobe in masnim povprečjem molske mase \bar{M}_w podaja naslednja enačba^{9,10}:

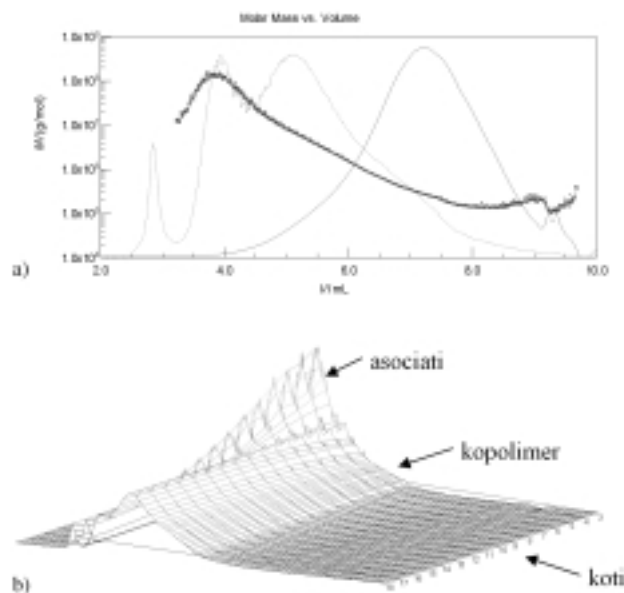
$$\frac{i_{\Theta}}{I_0} = \frac{2\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 (1 + \cos^2 \Theta)}{\lambda^4 r^2 N_A} cM \quad (1)$$

kjer je i_{Θ}/I_0 razmerje intenzitet sipane in vpadne svetlobe, dn/dc inkrement lomnega količnika, n_0 lomni količnik topila, c koncentracija polimera, M molska masa, λ valovna dolžina vpadne svetlobe v določenem mediju, r razdalja od molekule, ki sipa, do detektorja, Θ kot sipanja in N_A Avogadrovo število.

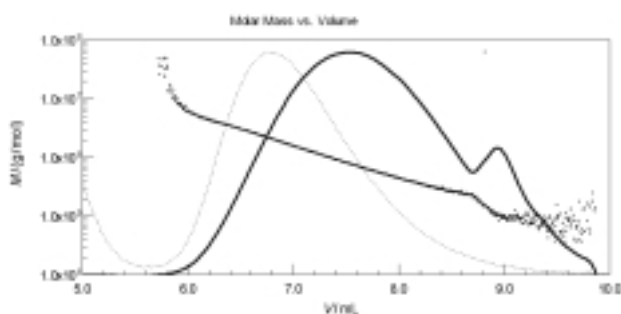
PLS je topen v polarnih topilih, kot sta DMF ali DMAc. V DMAc je porazdelitev molskih mas vzorca PLS-1/13, izmerjena z diferenčnim refraktometrom, monomodalna oz. ima en vrh, odziv laserskega detektorja pa kaže multimodalno porazdelitev molskih mas (slika 2a). Zato se krivulji kromatograma RI in LS(90°) istega vzorca ne prekrivata. Ker je detektor LS bolj občutljiv za frakcije polimera z visokimi molskimi masami, je krivulja LS(90°) pomaknjena k manjšim elucijskim volumnom v primerjavi s krivuljo RI. Odziv RI-detektorja je namreč sorazmeren koncentraciji PLS v topilu, odziv laserskega fotometra pa produktu koncentracije in molske mase polimera (cM). Intenzivni vrhovi laserskega detektorja pri nizkih elucijskih volumnih oziroma visokih molskih masah nakazujejo prisotnost asociatov. Asociacijo verig polimera potrjuje 3D-dia-gram (slika 2b), kjer intenziteta LS-signala narašča s padajočim kotom sipanja, kar potrjuje prisotnost zvrsti z visoko molsko maso^{9,10,16}. Do asociacije med verigami polimera najverjetneje pride zaradi H-vezi med estrskimi skupinami laktidnih enot in amidnimi skupinami sukcinimidnih enot kopolimera. Asociacija je lahko tudi posledica elektrostatskih interakcij med dvofunkcionalnimi ionskimi nečistočami, ki nastanejo pri razpadu DMAc^{12,15} in polarnimi skupinami laktidnih in sukcini-

midnih enot^{11,15}. Posledica asociacije molekul so večji hidrodinamski volumen polimera in previsoka povprečja molskih mas. Intenziteta LS-signala neasociiranega polimera pri elucijskem volumnu ca. 7 mL je neodvisna od kota sipanja, kar je značilnost manjših makromolekul. Izkoristek elucije vzorca iz kolone 98–100 % dokazuje, da se vzorec na koloni ne zadržuje.

Da bi preprečili asociacijo polimera, smo topilu DMAc dodali elektrolit LiBr. LiBr z DMAc tvori kompleks s sestavo $[(\text{DMAc})_n\text{Li}]^+\text{Br}^-$. Zaradi ionskih dipolarnih interakcij se ioni Li^+ koordinirajo z negativnimi karbonilnimi kisikovimi atomi amidnih skupin, ioni Br^- pa s pozitivnimi dušikovimi atomi amidnih skupin DMAc²⁵. Nastali kompleks interagira s kopolimerom in polnilom kolone in s tem ščiti naboje na verigi kopolimera in polnila kolone¹⁶. Dodatek LiBr vpliva tudi na ionsko moč eluenta. Če je ionska moč mobilne faze previsoka, prihaja do hidrofobnih interakcij med laktidnimi enotami kopolimera in nepolarnim polnilom kolone, predvsem pri kopolimeru PLS-1/13 z višjim deležem laktidnih enot^{13,14}. Zato je pri optimizaciji mobilne faze potreben kompromis¹⁸. Da bi bila ionska moč eluenta čim nižja, smo zmanjšali koncentracijo LiBr in dodali H_3PO_4 , ki pomakne ravnotežje disociacije karboksilne skupine v smeri nedisociirane oblike. Zaradi razlik v sestavi obeh kopolimerov oz. deležev LTD in Asp smo mobilno fazo optimirali za vsak kopolimer posebej, tako da smo spreminjali koncentracijo elek-

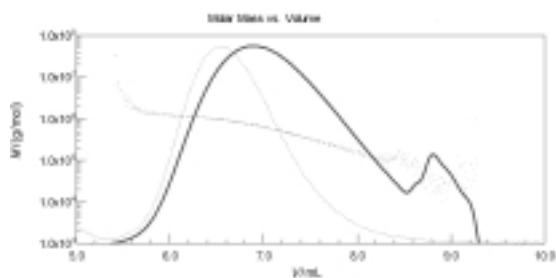


Slika 2: a) SEC-MALS-kromatogram PLS-1/13 v DMAc in porazdelitev molske mase v odvisnosti od elucijskega volumna, — DRI odziv, ---- LS (90°) odziv, $\bar{M}_w = 1,63 \times 10^6$ g/mol, $\bar{M}_n = 2,67 \times 10^5$ g/mol, PDI = 6,1, izkoristek elucije vzorca iz kolone 100 %; b) LS-krivulje PAL-1/13 pri različnih kotih sipanja (3–18) v DMAc
Figure 2: a) SEC-MALS chromatogram of PLS-1/13 in DMAc and molar mass vs. elution volume, — DRI response, ---- LS response, $\bar{M}_w = 1.63 \times 10^6$ g/mol, $\bar{M}_n = 2.67 \times 10^5$ g/mol, PDI = 6.1, mass recovery 100 %; b) the LS curves of PLS-1/13 at different scattering angles (marked 3–18) in DMAc.



Slika 3: SEC-MALS-kromatogram PLS-1/13 v 0,01 M LiBr, 0,01 M H₃PO₄/DMAc in porazdelitev molske mase v odvisnosti od elucijskega volumna, — DRI odziv, ---- LS (90°) odziv, $\bar{M}_w = 4,26 \times 10^5$ g/mol, $\bar{M}_n = 1,04 \times 10^5$ g/mol, PDI = 2,4, izkoristek elucije vzorca iz kolone 100 %

Figure 3: SEC-MALS chromatogram of PLS-1/13 in 0.01 M LiBr, 0.01 M H₃PO₄/DMAc and molar mass vs. elution volume, — DRI response, ---- LS (90°) response, $\bar{M}_w = 4.26 \times 10^5$ g/mol, $\bar{M}_n = 1.04 \times 10^5$ g/mol, PDI = 2.4, mass recovery 100 %



Slika 4: SEC-MALS-kromatogram PLS-1/6 v 0,1 M LiBr, 0,1 M H₃PO₄/DMAc in porazdelitev molske mase v odvisnosti od elucijskega volumna, — RI odziv, ---- LS (90°) odziv, $\bar{M}_w = 5,42 \times 10^5$ g/mol, $\bar{M}_n = 1,73 \times 10^5$ g/mol, PDI = 3,1, izkoristek elucije vzorca iz kolone 100 %

Figure 4: SEC-MALS chromatogram of PLS-1/6 in 0.1 M LiBr, 0.1 M H₃PO₄/DMAc, — RI response, ---- LS (90°) response, $\bar{M}_w = 5.42 \times 10^5$ g/mol, $\bar{M}_n = 1.73 \times 10^5$ g/mol, PDI = 3.1, mass recovery 100 %

trolitov v območju od 0,01 M do 0,1 M LiBr in H₃PO₄/DMAc.

Optimalna sestava mobilne faze za kopolimer PLS-1/13 je bila 0,01 M LiBr in H₃PO₄ v DMAc (**slika 3**), za kopolimer PLS-1/6, ki ima višji delež asparaginskih enot v primerjavi s PLS-1/13, pa je bila 0,1 M

LiBr in H₃PO₄ v DMAc (**slika 4**). Za preprečitev asociacije kopolimera s H-vezmi in sekundarnih mehanizmov ločevanja je bila za kopolimer PLS-1/6 potrebna višja ionska moč eluenta. Vzorec se ni zadrževal na koloni, saj je bil izkoristek elucije vzorca iz kolone 100 %.

V literaturi je opisana določitev povprečij in porazdelitve molskih mas (MMA in MMD) PLS s konvencionalno SEC s polistirenskimi standardi⁶, čeprav polistiren zaradi razlik v strukturi v primerjavi s PLS ni najprimernejši standard za določitev MMA in MMD kopolimerov PLS²³. Izmerjena MMA vzorcev PLS s podobno sestavo⁶ so bila malo višja kot MMA naših vzorcev, vendar pa precej nižja od absolutnih vrednosti MMA.

Primerjava relativnih in absolutnih povprečij obeh kopolimerov (**tabela 1**) je pokazala, da sta relativno masno povprečje (\bar{M}_w) in relativno številčno povprečje (\bar{M}_n) vzorcev PLS-1/6 in PLS-1/13 za en do dva reda velikosti manjša kot absolutne vrednosti. Vzrok za tako velike razlike med relativnimi in absolutnimi MMA ne moremo pripisati samo razlikam v kemijski sestavi PS-standardov in PLS-vzorcev, ampak tudi bolj kompaktni konformaciji PLS-kopolimerov v primerjavi s PS-standardi enake molske mase. Vzrok je lahko tudi razvejena struktura kopolimera. V nasprotju s termodinamsko dobrim topilom, v katerem polimer zavzame konformacijo naključnega klobčiča, zavzame kopolimer PLS v polarnem DMAc, ki je boljše topilo za polarne asparaginske enote kot za nepolarne laktidne enote, bolj kompaktno konformacijo (kroglica). Nepolarne laktidne enote molekule so v takem primeru obdane s polarnimi asparaginskimi enotami. Razlika med relativnimi in absolutnimi MAA je večja pri kopolimeru PLS-1/13 z višjim deležem laktidnih enot zaradi močnih intramolekulskih interakcij med laktidnimi enotami, kar vodi do bolj kompaktne konformacije kopolimera v raztopini in posledično do manjšega hidrodinamskega volumna in nižjih molskih mas.

Primerjava absolutnih in relativnih povprečij molskih mas kopolimerov PLS dokazuje, da je hidrodinamski volumen PLS v izbranem topilu odvisen ne le od velikosti makromolekul in njihove sestave, ampak tudi od vrste interakcij in njihove intenzitete.

Tabela 1: Primerjava rezultatov SEC in SEC-MALS za PLS-1/13 v 0,01 M LiBr, 0,01 M H₃PO₄/DMAc in PLS-1/6 v 0,1 M LiBr in H₃PO₄ v DMAc. \bar{M}_w – masno povprečje molske mase, \bar{M}_n – številčno povprečje molske mase, \bar{M}_w/\bar{M}_n – indeks polidisperznosti (PDI), $k = [\bar{M}_w$ ali \bar{M}_n (absolutna)]/ [\bar{M}_w ali \bar{M}_n (relativna)]

Table 1: A comparison of SEC and SEC-MALS results for PLS-1/13 in 0.01 M LiBr, 0.01 M H₃PO₄/DMAc and PLS-1/6 in 0.1 M LiBr and H₃PO₄ in DMAc. \bar{M}_w – weight average molar mass, \bar{M}_n – number average molar mass, \bar{M}_w/\bar{M}_n – polydispersity index (PDI), $k = [\bar{M}_w$ or \bar{M}_n (absolute)]/ [\bar{M}_w or \bar{M}_n (relative)]

Povprečja molskih mas in PDI	PLS-1/13			PLS-1/6		
	SEC-MALS	SEC	k	SEC-MALS	SEC	k
\bar{M}_w (g/mol)	$1,04 \times 10^6$	9560	109	$5,42 \times 10^5$	12200	44
\bar{M}_n (g/mol)	$4,26 \times 10^5$	6300	68	$1,73 \times 10^5$	7700	22
\bar{M}_w/\bar{M}_n	2,4	1,5	–	3,1	1,9	–

4 SKLEPI

Sintetizirali smo kopolimera asparaginske kisline Asp, in laktida LTD, poli(sukcinimid-*ko*-laktid) z razmerjem komonomerov Asp : LTD = 1/6 in 1/13. Določili smo povprečja in porazdelitve molskih mas z izključitveno kromatografijo v kombinaciji z detektorjem na sipanje svetlobe pri več kotih (SEC-MALS) in z izključitveno kromatografijo (SEC) relativno na polistirenske standarde. Po dostopnih literarnih podatkih je to prva analiza SEC-MALS PLS-kopolimerov. Za posamezno sestavo kopolimera je bila potrebna optimizacija mobilne faze, da smo dosegli ločitev molekul izključno po velikosti.

S primerjavo absolutnih in relativnih MMA smo ugotovili, da so absolutna MMA za en do dva reda velikosti višja od relativnih vrednosti. To smo pripisali razlikam v kemijski strukturi PS-standardov in PLS-kopolimerov ter bolj kompaktni konformaciji PLS-kopolimerov v topilih zaradi intramolekulskih hidrofobnih interakcij med laktidnimi enotami in razvejenja kopolimera. Razmerje absolutnih in relativnih MMA je bilo zaradi večjega deleža laktidnih enot dosti višje pri PLS-1/13 v primerjavi s PLS-1/6, kar smo pripisali bolj kompaktni konformaciji kroglice zaradi močnih hidrofobnih interakcij^{8,11}.

Čeprav na splošno velja, da imajo rezultati SEC-analiz za posamezne polimere primerjalno vrednost, pa smo na primeru amfifilnih kopolimerov asparaginske kisline in laktida pokazali, da so razlike v relativnih molskih masah kopolimerov različne sestave in strukture zelo velike in da lahko vodijo do napačnih sklepov. Temu se lahko izognemo le z uporabo metode SEC-MALS za določitev absolutnih povprečij in porazdelitev molskih mas.

Zahvala

Avtorji se zahvaljuje Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo ter Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za finančno podporo (program P2-0145, usposabljanje mlade raziskovalke M. G.).

5 LITERATURA

- ¹ K. Matsubara, T. Nakato, M. Tomida, End Group and Irregular Structure Analysis in Thermally Prepared Sodium Polyaspartate by ¹H and ¹³C NMR Spectroscopy, *Macromolecules*, 31 (1998), 1466–1472
- ² T. Kakuchi, Relationship between Structure and Properties of Poly(aspartic acid)s, *Macromolecules*, 31 (1998), 2107–2113
- ³ E. W. Neuse, A. Perlwitz, S. Schmitt, Water soluble polyamides as potential drug carriers, II, *Angew. Makromol. Chem.*, 181 (1990), 153–170
- ⁴ M. Balkcom, B. Welt, K. Berger, Notes from the Packaging Laboratory: Polylactic Acid – An Exciting New Packaging Material, University of Florida, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences
- ⁵ A. Sodergard, M. Stolt, Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition, *Prog. Polym. Sci.*, 27 (2002), 1123
- ⁶ H. Shinoda, Y. Asou, A. Sutsugu, K. Tanaka, Synthesis and characterization of Amphiphilic Biodegradable Copolymer, Poly(aspartic acid-co-lactic acid), *Macromol. Biosci.*, 3 (2003), 34
- ⁷ H. Liang, C. Chen, S. Chen, A. R. Kulkarni, Y. Chiu, M. Chen, H. Sung, Paclitaxel-loaded poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a target drug delivery system for treatment of liver cancer, *Biomaterials*, 27 (2006), 2051–2059
- ⁸ A. R. Cooper, Molecular weight averages and distribution functions v Determination of Molecular Weight, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1989, 1–6
- ⁹ P. Kratochvil, Classical light scattering from polymer solutions, Polymer Science Library 5, Elsevier, Amsterdam, 1987
- ¹⁰ P. J. Wyatt, Light scattering and absolute characterization of macromolecules, review, *Anal. Chim. Acta*, 272 (1993), 1–40
- ¹¹ M. G. Styring, A.E. Hamielec, Determination of molecular weight distribution by gel permeation chromatography in: Determination of molecular weight, John Wiley&Sons, New York, 1989, 263–300
- ¹² H. G. Barth, Non size exclusion effects in high performance size exclusion chromatography in: Detection and data analysis in size exclusion chromatography, The Gildden Company, American Chemical Society, Washington, DC, 1987, 29–46
- ¹³ K. Štulik, V. Pacakova, M. Ticha, Review, Some potentials and drawbacks of contemporary size-exclusion chromatography, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 56 (2003), 1–13
- ¹⁴ I. V. Blagodatskikh, M. V. Sutkevich, N. L. Sitnikova, N. A. Churochkina, T. A. Pryakhina, O. E. Philippova, A. R. Khokhlov, Molecular mass characterization of polymers with strongly interacting groups using gel permeation chromatography-light scattering detection, *J. Chromatogr. A*, 976 (2002), 155–164
- ¹⁵ M. L. Dias, E. B. Mano, C. Azuma, Size exclusion behavior of polymers in amide solvents – III. Elution characteristics of acrylic polymers in N,N-dimethylacetamide, *Eur. Polym. J.*, 33 (1997), 559–564
- ¹⁶ E. Žagar, M. Žigon, Solution properties of carboxylated polyuretanes and related ionomers in polar solvents (DMF and LiBr/DMF), *Polymer*, 41 (2000), 3513–3521
- ¹⁷ E. Žagar, M. Žigon, T. Malavašič, Lastnosti razredčenih raztopin poliuretanskih ionomerov, *Kovine zlit. tehnol.*, 30 (1996) 1–2, 91–94
- ¹⁸ Y. Mukoyama, H. Sugitani, S. Mori, Effects of addition of lithium bromide and phosphoric acid in size exclusion chromatography of polyamide-imide and polyamic acid, *J. Appl. Polym. Sci.; Polym. Symp.*, 52 (1993), 183–191
- ¹⁹ N. Shimizu, T. Sakata, Elution behavior of polyamic acid and polyamide-imide in size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr.*, 588 (1991), 195–200
- ²⁰ T. Bikova, A. Treimanis, Problems of MMD analysis of cellulose by SEC using DMA/LiCl: A review, *Carbohydr. Polym.*, 48 (2002), 23–28
- ²¹ P. S. G. Krishnan, S. Veeramani, R. H. Vora, T. Chung, S. Uchimura, H. Sugitani, Molecular mass determination of polyamic acid ionic salt by size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A*, 977 (2002), 207–212
- ²² B. Wittgren, A. Welinder, B. Porsch, Molar mass characterization of cationic methacrylate-ethyl acrylate copolymers using size-exclusion chromatography with on line size-exclusion chromatography with online multi-angle light scattering and refractometric detection, *J. Chromatogr. A*, 1002 (2003), 101–109
- ²³ D. R. Scheuing, Size exclusion chromatography of polyelectrolytes in dimethylformamide, *J. Appl. Polym. Sci.*, 29 (1984), 2819–2828
- ²⁴ P. L. Dubin, S. Koontz, K. L. Wright, Substrate-Polymer Interactions in Liquid Exclusion Chromatography (GPC) in N,N-Dimethylformamide, *J. Polym. Sci.*, 15 (1977), 2047–2057
- ²⁵ B. Morgenstern, H.-W. Kammer, Solvation in Cellulose – LiCl-DMAc Solutions, *Trends Polym. Sci.*, 4 (1996) 87–92