

Vývoj metody pro řízení molekulové hmotnosti selektivně oxidovaných polysacharidů

Filip Latečka

Bakalářská práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Filip Latečka**
Osobní číslo: **T18059**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Vývoj metody pro řízení molekulové hmotnosti selektivně oxidovaných polysacharidů**

Zásady pro vypracování

Selektivně oxidované polysacharidy jsou vynikajícími nosiči protinádorových léčiv na bázi platiny. Množství přenášeného léčiva, rychlost jeho uvolňování ale také biologické vlastnosti a další farmakokinetické parametry jsou přímo závislé na stupni oxidace a délce polymerního řetězce, které lze modifikovat během syntézy. Náplní bakalářské práce proto bude kromě zpracování literární rešerše na téma polysacharidy a jejich deriváty jako nosiče léčiv také optimalizace syntézy selektivně oxidovaných polysacharidů (celulóza, dextrin, dextran) za účelem získání materiálu o definované délce řetězce a studium vlivu těchto parametrů na kinetiku uvolňování protinádorových léčiv na bázi platiny.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

L. Münster, M. Fojtů, Z. Capáková, T. Vaculovič, M. Tvrdoňová, I. Kuřitka, M. Masařík, J. Vícha, *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 1623-1634.

Münster, L.; Vícha, J.; Klofáč, J.; Masař, M.; Kucharczyk, P.; Kuřitka, I. Stability and Aging of Solubilized Dialdehyde Cellulose. *Cellulose* **2017**, *24* (7), 2753-2766.

Sirviö, J. A.; Liimatainen, H.; Visanko, M.; Niinimäki, J. Optimization of Dicarboxylic Acid Cellulose Synthesis: Reaction Stoichiometry and Role of Hypochlorite Scavengers. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *114*, 73-77.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jan Vícha, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **1. února 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **21. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Jana Navrátilová, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 1. dubna 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se věnuje modifikaci polysacharidů, konkrétně celulózy, dextrinu a dextransu, pro jejich případné využití jako nosičů léčiv. Práce se zaměřuje na studium jejich regioselektivních oxidací a hlavně na vývoj metody pro řízení molární hmotnosti těchto derivátů. U jednotlivých polysacharidů byl proto zkoumán vliv reakčních podmínek oxidace a přídavku kyseliny amidosulfonové na jejich molární hmotnost. Zatímco v případě celulózy a dextrinu docházelo k sulfonačně-indukovanému štěpení glykosidických vazeb ihned po přidání kyseliny amidosulfonové, u dextransu bylo nutno zařadit tzv. pre-sulfonační krok. Ve všech případech bylo ale nakonec možné pomocí úpravy reakčních podmínek řídit štěpení polysacharidových řetězců v poměrně širokém rozsahu. Nakonec bylo studováno uvolňování léčiva (diammin-dichloroplatnatého komplexu) z dextransového nosiče s rozdílnými molárními hmotnostmi s různým množstvím navázaného léčiva.

Klíčová slova: polysacharidy, celulóza, dextrin, dextrans, nosič léčiv, regioselektivní oxidace, štěpení glykosidických vazeb, kyselina amidosulfonová, diammin-dichloroplatnatý komplex

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on modification of polysaccharides, namely cellulose, dextrin and dextran, for their eventual utilization in drug delivery. The work focuses on a study of their regioselective oxidations and mainly on a development of method for controlling a molecular weight of these derivatives. Therefore, an influence of reaction conditions and an addition of sulfamic acid on molecular weight was studied for individual polysaccharides. In case of cellulose and dextrin, there was a sulfonation-induced scission of glycosidic bonds immediately after the addition of the sulfamic acid, whereas in the case of dextran it was necessary to include so-called pre-sulfonation step. However, it was eventually possible to control the scission of polysaccharide chains in a relatively wide range by adjusting the reaction conditions in all cases. In the end, a release of a cis-diamminedichloroplatinum(II) drug from a dextran carrier was studied with respect to the different molecular weights of the carrier and various amounts of the bound drug.

Keywords: polysaccharides, cellulose, dextrin, dextran, drug delivery, regioselective oxidation, scission of glycosidic bonds, sulfamic acid, cis-diamminedichloroplatinum(II)

Chtěl bych mnohokrát poděkovat mému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Janu Víchovi, Ph.D. za odborné vedení, velikou trpělivost, morální podporu, cenné rady do života a vynaložený čas, který mi věnoval při psaní této práce. Také bych velmi rád poděkoval Ing. Lukáši Münsterovi, Ph.D. za jeho pomoc nejen při psaní bakalářské práce, ale také v laboratorním prostředí, za velmi cenné informace, trpělivost a věcné připomínky. Rovněž bych rád poděkoval Ing. Monice Muchové a Ing. Alžbětě Vávrové za pomoc, rady a asistenci v laboratořích. Děkuji také doc. Ing. et Ing. Ivu Kuřitkovi, Ph.D. et Ph.D. za jeho nasměrování v mém životě a všem z Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně za báječná léta během studií. Nakonec chci poděkovat mé rodině a přátelům za nesmírnou trpělivost a morální podporu při psaní této práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Obsah

ÚVOD	8
I. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1 POLYSACHARIDY	10
1.1 CELULÓZA	11
1.1.1 <i>Struktura a vlastnosti</i>	11
1.1.2 <i>Deriváty</i>	14
1.2 DEXTRIN	16
1.2.1 <i>Struktura a vlastnosti</i>	16
1.2.2 <i>Deriváty</i>	17
1.3 DEXTRAN	17
1.3.1 <i>Struktura a vlastnosti</i>	17
1.3.2 <i>Deriváty</i>	18
2 SELEKTIVNÍ OXIDACE POLYSACHARIDŮ	19
2.1 REGIOSELEKTIVNÍ OXIDACE CELULÓZY	21
2.2 REGIOSELEKTIVNÍ OXIDACE DEXTRINU	23
2.3 REGIOSELEKTIVNÍ OXIDACE DEXTRANU	24
2.4 ŘÍZENÍ MOLÁRNÍ HMOTNOSTI SELEKTIVNĚ OXIDOVANÝCH POLYSACHARIDŮ	26
3 MOLÁRNÍ HMOTNOST A METODA XRF.....	27
3.1 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE (GPC)	30
3.2 RENTGENOVĚ-FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIE (XRF)	30
4 CÍL PRÁCE	32
II. PRAKTICKÁ ČÁST	33
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
5.1 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE	34
5.2 OXIDACE CELULÓZY A STUDIUM MECHANISMU ŠTĚPENÍ B(1→4) GLYKOSIDICKÉ VAZBY	35
5.3 VLIV REAKČNÍCH PODMÍNEK NA OXIDACI POLYSACHARIDŮ SE SULFONAČNĚ-INDUKOVANÝM ŠTĚPENÍM GLYKOSIDICKÝCH VAZEB.....	36
5.4 PŘÍPRAVA CIS-PT-DEXTRAN KONJUGÁTU.....	38
6 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
6.1 VLIV H ₂ SO ₄ A SAMAC NA \bar{M}_w DCC.....	39
6.2 VLIV SAMAC NA \bar{M}_w 2,3-DIKARBOXYPOLYSACHARIDŮ	42
6.3 VLIV PRE-SULFONACE NA \bar{M}_w DCDXA	46
6.4 UVOLŇOVÁNÍ CIS-PT Z DCDXA.....	47
ZÁVĚR.....	51
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	55
SEZNAM OBRÁZKŮ	58
SEZNAM TABULEK	60

ÚVOD

V současnosti dochází ke stále intenzivnějšímu využívání materiálů z trvale udržitelných zdrojů, které jsou zároveň šetrné k životnímu prostředí. Jedny z nich jsou polysacharidy, které nacházejí uplatnění v řadě odvětví. Díky tvorbě vláken se polysacharidy využívají v textilním průmyslu nebo v papírenství. Biokompatibilní a biodegradabilní polysacharidy se používají v potravinářském nebo ve farmaceutickém průmyslu. Biomedicínské aplikace polysacharidů jsou velmi rozsáhlé, od obvazových materiálů až po léčiva. Polysacharidy je také možné modifikovat funkčními skupinami vhodnými pro navázání léčiv, například oxidací hydroxylových skupin na karboxylové s následným využitím jako nosiče protinádorových léčiv. Pro dosažení co nejlepších výsledků by takový nosič měl mít nízkou toxicitu, říditelnou rychlost uvolňování léčiva a měl by být schopen vázat vysoké množství léčiva. Tyto vlastnosti můžeme ovlivňovat hlavně pomocí dvou klíčových parametrů – stupněm oxidace a molární hmotností polysacharidů. V této práci jsem se zaměřil na vývoj metody pro řízení molární hmotnosti u třech selektivně oxidovaných polysacharidů. Jedná se o celulózu, dextrin a dextran.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYSACHARIDY

Polysacharidy jsou nejzastoupenější biopolymery na Zemi. Jedná se o dlouhé polymerní řetězce složené z monosacharidů spojených glykosidickými vazbami. Řetězce mohou být lineární nebo rozvětvené. Nejvíce zastoupené typy monosacharidů se nazývají pyranózy a furanózy. Pyranózová jednotka se skládá z šesti uhlíků a zaujímá řadu konformací, mezi nejčastější patří židličková a vaničková konformace. Nejznámějším zástupcem pyranóz je glukóza. Furanózová jednotka má pět uhlíků a nachází se nejčastěji ve vaničkové konformaci. Typickým příkladem je ribóza. Polysacharidy můžeme také rozdělit dle složení jednotlivých monomerů. Pokud se základní strukturní jednotky v polysacharidu liší, pak jim říkáme heteropolysacharidy, jsou-li stejné, jedná se o homopolysacharidy [1].

Glykosidická vazba mezi monomery polysacharidů je tvořena kyslíkem, jenž vytváří kovalentní vazbu s uhlíky dvou sousedních monomerů. Vzniká kondenzační reakcí, kdy při spojení n -monosacharidů vzniká n -molekul vody. Při zvyšování teploty může docházet k narušení této vazby, což má za následek degradaci řetězců polysacharidu. Značení konkrétní glykosidické vazby se odvíjí od číslování uhlíků do ní zapojených a od prostorové orientace hydroxylové skupiny ($-OH$) na prvním (hemiacetalovém) uhlíku v zacyklené molekule monosacharidu. Pokud je tato $-OH$ skupina prostorově orientována pod rovinu molekuly, jedná se o α -glykosidickou vazbu. Při opačné orientaci $-OH$ skupiny se jedná o β -glykosidickou vazbu. Například celulóza je složena z D-anhydroglukopyranózových jednotek spojených β -(1 \rightarrow 4) glykosidickými vazbami. To znamená, že vazba je mezi prvním uhlíkem (C1) jedné monomerní jednotky a čtvrtým uhlíkem (C4') jednotky sousední, přičemž $-OH$ skupina na C1 je orientována nad rovinu molekuly. Pokud monomer nese jen dvě glykosidické vazby, řetězec polysacharidu je lineární. Při třech a více vazbách z jednoho monomeru je řetězec rozvětvený [1, 2].

Funkce polysacharidů v organismech je převážně stavební, zásobní a komunikační. Stavební polysacharidy tvoří například buněčné stěny rostlin. Udávají tak jejich tvar a udržují protoplast uvnitř buněk. Nejčastěji je v buněčných stěnách rostlin obsažena celulóza, hemicelulóza a pektin. Polysacharidy plnicí zásobní funkci jsou často větvené, štěpením jednotlivých vazeb a oxidací vzniklých monosacharidů se v organismu získává energie. U rostlin je nejčastější zásobní polysacharid škrob, u zvířat zase glykogen. Některé polysacharidy nepropouští vodu díky lineárním řetězcům, které tvoří krystality. To může vést k zadržování a ukládání vody v těle organismu např. rostlin. Polysacharidy sloužící

k buněčné komunikaci jsou nejčastěji konjugáty s lipidy nebo proteiny např. glykoproteiny, glykosidy nebo glykolipidy.

Polysacharidy mají široké využití v textilním (bavlna), papírenském a dřevozpracujícím průmyslu (výroba papíru). V potravinářství a kosmetice se využívají jako zahušťovadla, ztužovače a na výrobu různých hydrogelů. Ve farmaceutickém průmyslu jsou hojně využívány na výrobu obvazových materiálů nebo kultivačních médií [3, 4].

1.1 Celulóza

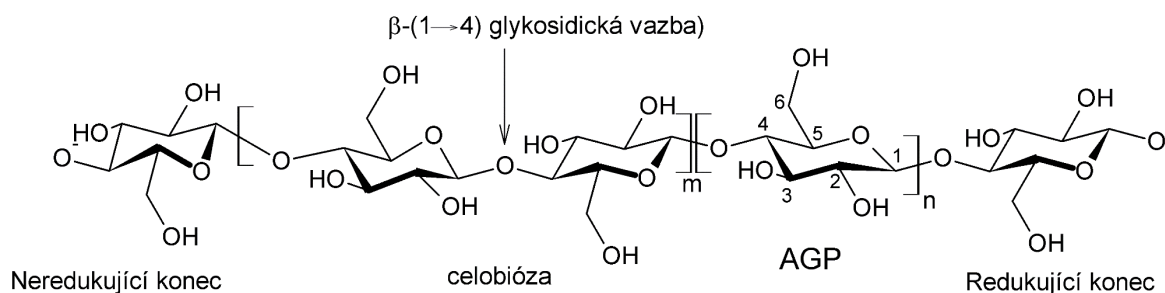
Celulóza je nejrozšířenější polysacharid na Zemi, jelikož je základním stavebním kamenem buněčných stěn zelených rostlin, některých řas a oomycet, které tvoří většinu organické hmoty na naší planetě. Dokonce ji obsahují i pláštěnci a některé bakterie ve svých ochranných pláštích. Průmyslově se celulóza získává zpracováváním dřevěné buničiny a bavlny. Pro medicínální a farmakologické účely se celulóza získává z bakterií např. rodu *Sarcina Ventriculi*. Bakteriální celulóza vyniká svou čistotou, vyšší hydrofilností a nízkou polydisperzitou, což jsou ideální vlastnosti pro výše zmíněná odvětví [5].

Celulóza je nerozpustná ve vodě díky dlouhým a lineárním řetězcům, jež jsou spojeny příčnými vodíkovými můstky. Většina savců ji nedokáže strávit kvůli absenci enzymu celulózy z třídy hydroláz. Tento enzym dokáže rozštěpit β -(1→4) glykosidickou vazbu řetězce celulózy, čímž rozloží tento polysacharid na D-glukózu. Nicméně příroda obdařila některé savce mikroorganismy schopné tento polysacharid strávit. Konkrétně u přežvýkavců se v jejich bachorech nachází prvoci z kmene nálevníků tzv. bachořci. Tyto mikroorganismy produkují enzym celulózu. Jedná se tak o symbiózu mezi těmito prvoky a přežvýkavci [6].

1.1.1 Struktura a vlastnosti

Celulóza je složena z D-anhydroglukopyranózových jednotek (AGP), spojených β -(1→4) glykosidickou vazbou (Obr. 1). Spojení dvou kondenzovaných D-glukóz pomocí β -(1→4) glykosidické vazby nazýváme celobióza (Obr. 1) β -(1→4) glykosidická vazba a odpudivost bočních –OH skupin vede ke vzniku lineárních řetězců s jednotkami v konformaci zig-zag (cik-cak). Linearita a uspořádání řetězce vede ke vzniku výše zmíněných vodíkových vazeb (H-můstky). Následkem toho vznikají krystality, které formují mikrofibrily. Ty se sdružují do vláken, která mají vysokou pevnost v tahu ve směru osy spletených mikrofibril. H-můstky vznikají mezi vodíkem –OH skupiny jednoho monomeru a kyslíkem –OH skupiny jiného. Jestliže dojde ke vzniku vodíkových vazeb na

stejném řetězci, jedná se o intramolekulární vodíkové vazby, pokud mezi dvěma řetězci, mluvíme o intermolekulárních silách. Právě díky nim je celulóza nerozpustná ve vodě.



Obrázek 1: Struktra řetězce celulózy složeného z jednotek celobiózy nebo AGP (uvedeno také číslování atomů uhlíku v jednotce). Dále redukující a neredukující konec řetězce a β-(1→4) glykosidická vazba [5].

Mnoho dalších vlastností celulózy je závislých na délce řetězců neboli stupni polymerace. Tento parametr můžeme definovat jako počet monomerů, zde konkrétně AGP, v jedné makromolekule. Stupeň polymerace je u celulózy velmi závislý na jejím původu (zdroji) a na metodě jejího získávání. Už při samotném získávání celulózy totiž dochází k redukci stupně polymerace. Například při zpracovávání dřeva na buničinu má vznikající regenerovaná celulóza relativně malý stupeň polymerace v porovnání s tou ve dřevě. Pro lepší představu rozsahu stupně polymerace u jednotlivých zdrojů celulózy slouží Tabulka 1.

Tabulka 1: Stupeň polymerace u vybraných zdrojů celulózy [5].

Zdroj	Stupeň polymerace [-]
Různé druhy dřeva	6000–10000
Buničina	500–2000
Bavlna	10000–20000
Řasy rodu <i>Valonia</i>	25000–44000
Bakteriální celulóza	4000–6000

Stupeň polymerace závisí přímo úměrně na molární hmotnosti polymeru, tedy při vyšším polymeračním stupni bude i vyšší molární hmotnost za předpokladu konstantní molekulové hmotnosti monomeru. Pokud je v látce větší rozsah polymeračního stupně, je zde i relativně větší rozsah molárních hmotností daného polymeru. Z Tabulky 1 je zřejmé, že rostlinná celulóza má vysoký rozsah stupně polymerace, tj. obsahuje řetězce různých délek. U bakterií je tento rozsah relativně malý oproti rostlinám, čehož se dnes hojně využívá právě ve farmacii.

Rozsah molárních hmotností daného polymeru charakterizuje veličina zvaná index neuniformity (polydisperzity) X . Říká nám, v jaké míře je uniformní nějaký polymerní systém. O této veličině je pojednáno více v Kapitole 3.

Z hlediska supramolekulární struktury celulóza tvoří čtyři různá polymorfni uspořádání (polymorfy) [5].

Typ I:

- Nejzastoupenější ve zdrojích přírodní celulózy.
- Dělíme jej na dva podtypy tzv. alomorfy.
- Alomorf I α :
 - Monoklinická mřížka, není stabilní. Přechází v I β .
 - U sladkovodních řas.
- Alomorf I β :
 - Triklinická mřížka, termodynamicky stabilnější.
 - Vyšší rostliny (bavlna).

Typ II:

- Termodynamicky stabilnější než typ I.
- Nelze jej převést na typ I.
- U celulózy, která byla regenerována, nebo prošla alkalickým zpracováním a následným vypíráním.

Typ III:

- Vzniká botnáním krystalů typu I a II pomocí roztoku amoniaku či aminů za bezvodého odvádění botnacího činidla.
- Dle typu krystalu před botnáním dělíme opět na alomorfy:
- Alomorf III I :
 - Nejběžnější.
- Alomorf III II :
 - Je spíše teoretický [5].

Typ IV:

- Vzniká žiháním celulózy typu III v glycerolu.

- Dělíme na dva alomorfy dle krystalu před žiháním.
- Alomorf IV_I:
- Z typu III_I, strukturně trochu podobný typu I.
- Alomorf IV_{II}:
- Z typu III_{II}, méně běžný.

S utvářením polymorfů souvisí krystalinita různých zdrojů celulózy. Největší zastoupení krystalické fáze je u přírodních celulóz, zejména u vyšších rostlin, řas i u živočichů (pláštěnci). Naopak celulóza zpracovaná lidmi je krystalická nejméně (Tab. 2)

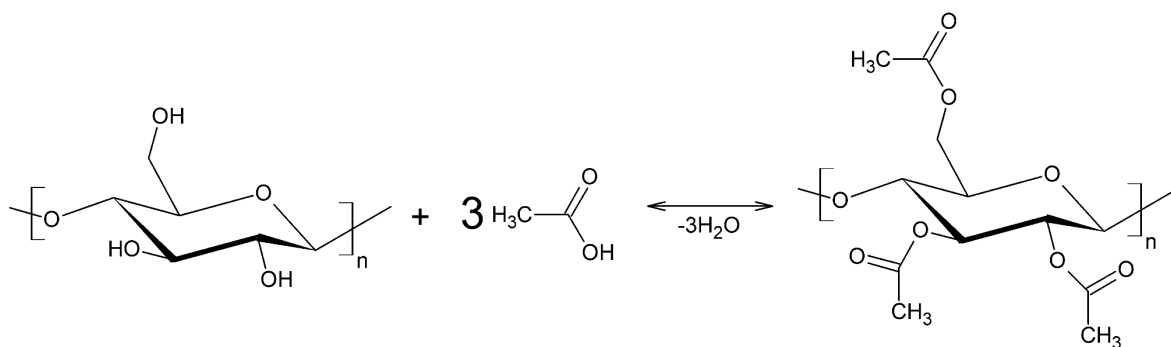
Tabulka 2: Krystalinita celulózy z různých zdrojů [5].

Zdroj celulózy	Krystalinita [%]
Vyšší rostliny	50–75
Zelené řasy rodu <i>Valonia</i>	90
Pláštěnci	80
Zpracovaná lidmi	25–40

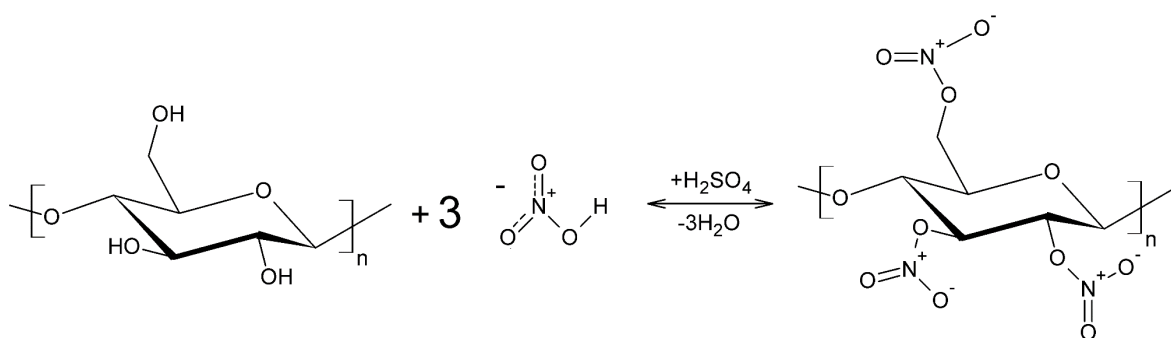
1.1.2 Deriváty

Hydroxylové skupiny v řetězci celulózy mohou být částečně nebo zcela modifikovány různými látkami. Reakcí těchto skupin získáme deriváty s mnohdy užitečnými vlastnostmi. Nejčastěji se reagující látky vážou na hydroxylovou skupinu pomocí esterové nebo etherové vazby.

Esterifikace celulózy může být provedena anorganickými nebo organickými kyselinami. Mezi nejpoužívanější organické kyseliny pro tuto reakci patří kyselina octová (Obr. 2). Vzniklý 2,3,6-triacetátcelulózy a obecně acetáty celulózy slouží k vytváření tenkých filmů. Dá se také zvláknovat, čehož se využívá v textilním průmyslu. U anorganických kyselin se jedná o kyselinu sírovou a dusičnou (Obr. 3). Vzniklý vysoce hořlavý 2,3,6-trinitrátcelulózy se využívá jako příměs do výbušnin. Rovněž byl po smíchání s kafrem využit na výrobu prvního syntetického termoplastu zvaného celuloid [7].

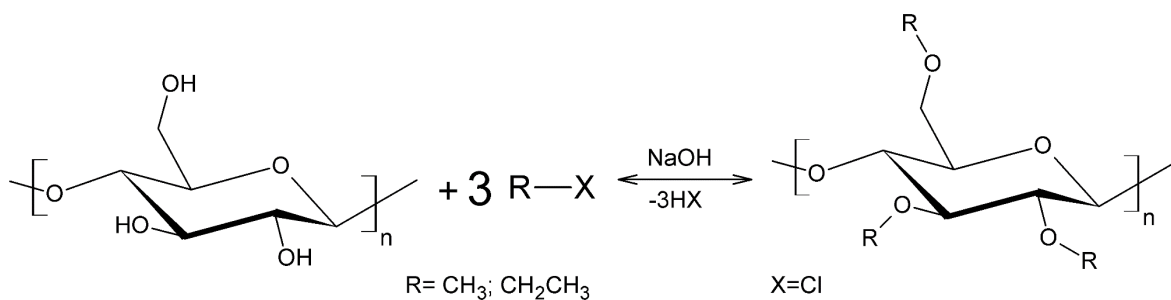


Obrázek 2: Reakce kyseliny octové s monomerem celulózy.



Obrázek 3: Nitrace celulózy.

Etherifikace u celulózy probíhá mechanismem tzv. Williamsovy etherové syntézy reakcí s alkylhalogenidem v silném alkalickém prostředí (Obr. 4) [5]. Tento derivát se používá jako přísada do jídla.



Obrázek 4: Reakce alkylhalogenidu a monomeru celulózy.

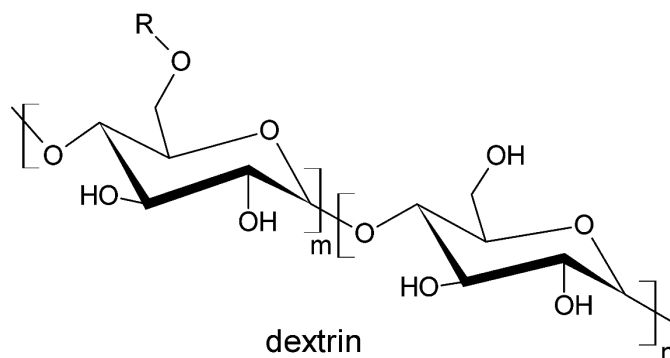
Celulózu lze také oxidovat na uhlících C2, C3 a C6 za vzniku aldehydických nebo karboxylových derivátů buď neselektivně anebo regioselektivně. Regioselektivní oxidace je detailně diskutována v Kapitole 2.

1.2 Dextrin

Dextrin se získává hydrolyzou škrobů (bramborový škrob) nebo glykogenu enzymem amylázou, která štěpí řetězce amylopektinu (složka škrobu) od neredukujících konců. Toto štěpení probíhá pouze do místa větvení amylopektinu [1]. Amyláza takto štěpí škrob v lidském těle za pomoci dalších, nejčastěji mechanických, procesů. Bakterie degradují škrob za vzniku cyklodextrinů. Dextrin lze také získat v laboratoři kyselou hydrolyzou škrobů za tepla. Dextriny vzniklé za procesu ohřívání se nazývají pyrodextriny a je možné se s nimi setkat v obyčejném pekařství. Pyrodextriny dodávají chuť, lesklost a barvu kůrce chleba. Dextrin je na rozdíl od celulózy zcela nebo částečně rozpustný ve vodě v závislosti na jeho molární hmotnosti. Používá se na výrobu vodou ředitelného lepidla, jako zahušťovadlo při tisku, pojivo v pyrotechnice a v potravinářství. Při nízké polydisperzitě se používá ve farmacii na výrobu hydrogelů [8].

1.2.1 Struktura a vlastnosti

Na rozdíl od celulózy je u dextrinu spojení mezi jednotlivými monomery D-anhydroglukopyranóz realizováno pomocí α -(1→4) a α -(1→6) glykosidických vazeb. Vzniká tak kaskádovitá struktura řetězce, kde převládají α -(1→4) glykosidické vazby, avšak procentuální zastoupení těchto vazeb se u každého typu dextrinu liší. Díky přítomnosti α -(1→6) glykosidických vazeb dochází k větvení některých řetězců dextrinu, kde se opět vážou monomerní jednotky pomocí α -(1→4) nebo α -(1→6) glykosidických vazeb (Obr. 5) [1]. Tyto struktury z velké části zabraňují vzniku intermolekulárních vodíkových vazeb, a tudíž i krystalizaci celého polymeru. Proto je dextrin ve vodě rozpustný. Lze ale také připravit semi-krystalický dextrin, kdy se v prvním kroku rozpuštěním tohoto polysacharidu, jeho zahřátím a gelací v pufru octanu sodného a azidu sodného získá gel. Ten se následně nechá ochladit a do reakční směsi se přidá isoamyláza. Gel se nechá inkubovat při zvýšené teplotě po dobu sedmi dnů. Dojde tak k odstěpení větví řetězců a dextrin zkrystalizuje [9].



Obrázek 5: Struktura dextrinu (m a n značí procentuální zastoupení glykosidických vazeb; R je postranní řetězec).

1.2.2 Deriváty

Oproti celulóze je dextrin využíván méně, proto je znám i menší počet derivátů. Dextrin obsahuje $-OH$ skupiny ve stejných pozicích pyranozových jednotek jako celulóza, čehož lze využít k esterifikaci nebo etherifikaci (Kap. 1.1.2). Monomer dextrinu můžeme modifikovat na uhlíku C2 molekulou vinyllesteru kyseliny akrylové (VA) při teplotě $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. V přítomnosti acetaldehydu dextrin-VA vytvoří hydrogel [8]. Dextrin lze modifikovat pomocí oxidace (Kap. 2).

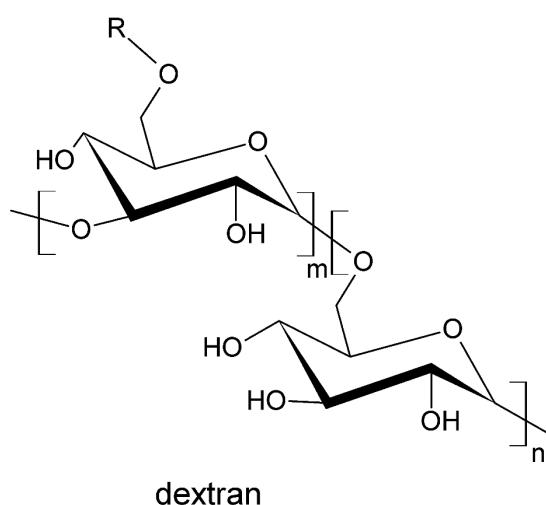
1.3 Dextran

Jedná se o větvený polysacharid, který vzniká převážně přeměnou sacharózy na větvený dextran v bakteriích. Nejznámější bakterie produkující dextran jsou rodu *Lactobacillaceae*, *Leuconostoc dextranicum* a *Streptobacterium dextranicum* [10, 11]. Dextran vytvořený bakteriemi je nazýván jako „přírodní dextran“. Struktura, distribuce molárních hmotností, větvení a délka řetězců závisí na původu tohoto polysacharidu. Dextran vzniká také při rafinaci sacharózy jako nežádoucí látka. Zvyšuje totiž viskozitu roztoku sacharózy a lepí se na stěny potrubí. Rozpouští se ve vodě, formamidu a dimethylsulfoxidu, avšak v alkoholu a acetonu nikoliv. Využívá se především ve zdravotnictví (lubrikant v očních kapkách nebo jako tzv. plazma expandér) [12], farmacii (výroba hydrogelů) a v laboratořích jako separační filtrační materiál (Sephadex).

1.3.1 Struktura a vlastnosti

Řetězec se skládá z α -D-glukózových jednotek spojených převážně α -(1 \rightarrow 6) a α -(1 \rightarrow 3) glykosidickými vazbami (Obr. 6). Může také obsahovat i α -(1 \rightarrow 2) a α -(1 \rightarrow 4) glykosidické vazby. Bakterie rodu *Leuconostoc mesenteroids* vytváří dextransy s 95%

zastoupením α -(1 \rightarrow 6) glykosidických vazeb a 5% zastoupením vazeb α -(1 \rightarrow 3) [10, 13]. Dextran může obsahovat i α -(1 \rightarrow 4) glykosidické vazby. Díky větvení vytváří amorfni strukturu a je dobře rozpustný ve vodě. Avšak obsahuje-li více než 43 % α -(1 \rightarrow 3) vazeb, stane se dextran nerozpustný ve vodě [14]. Přírodní dextran mívá molární hmotnost v rozsahu 10^7 – 10^8 Da a nabývá vysoké polydisperzity [10], nicméně jeho molární hmotnost lze snížit kyselou hydrolyzou nehlédě na povahu používané kyseliny.



Obrázek 6: Struktura dextranu (m a n značí procentuální zastoupení glykosidických vazeb; R je postranní řetězec dextranu).

1.3.2 Deriváty

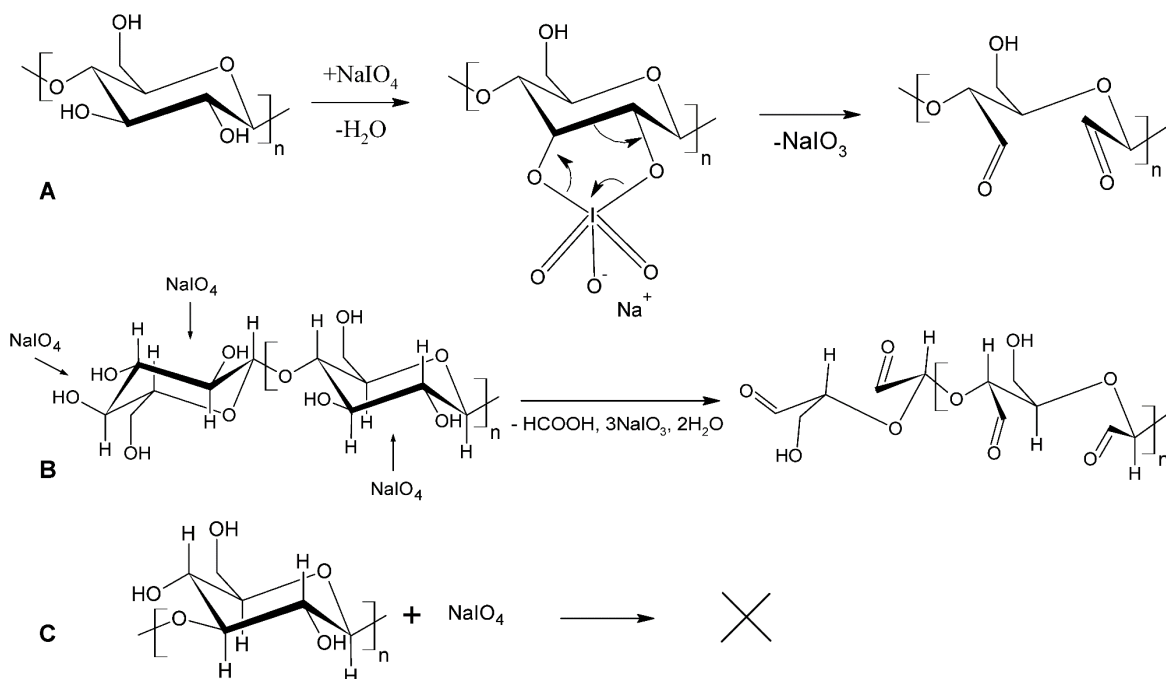
Také dextran obsahuje $-OH$ skupiny, které lze modifikovat pomocí esterifikace nebo etherifikace (Kap. 1.1.2). Mezi nejznámější deriváty patří karboxymethyldextran (CMD), který se připravuje reakcí dextranu a kyseliny chloroctové v zásaditém prostředí. Využívá se především v kosmetice jako přípravek na vlasy. Další známý derivát je dextran-metylmetakrylát, jenž vzniká roubováním dextranu metylmetakrylátem v roztoku kyseliny dusičné a dusičnanu amonno-ceričitém. Využívá se na výrobu čoček. Dextran lze modifikovat také oxidací (Kap. 2), čehož se využívá při výrobě hydrogelů [10, 14].

2 SELEKTIVNÍ OXIDACE POLYSACHARIDŮ

Oxidované polysacharidy se v současné době vzhledem ke svému přírodnímu původu a biodegradabilitě využívají ve zdravotnictví a farmacii. Jedná se také o velmi efektivní síťovadla pro hydrogely a o slibné nosiče léčiv [9, 10, 14–16]. Existují různé metody oxidací, lze je ale obecně rozdělit na neselektivní a selektivní. Při neselektivní oxidaci může docházet k reakci na –OH skupinách jakéhokoliv uhlíku v monomeru. Typickým příkladem je reakce kyseliny sírové a kyseliny dusičné s celulózou. Selektivní, nebo také regioselektivní oxidace, probíhá na přesně daných –OH skupinách monomeru. Nejčastěji se provádí pomocí (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyly (TEMPO) na –OH skupině šestého uhlíku (C6) [17], nebo pomocí jodistanu sodného (periodát) na –OH skupinách druhého a třetího uhlíků (C2 a C3), jsou-li ve struktuře polysacharidu přítomny [16, 18, 19]. Tato práce se podrobněji věnuje právě periodátové oxidaci.

Periodát se původně používal pro oxidaci vicinálních hydroxyderivátů uhlovodíků, kde byla tato reakce klíčová pro charakterizaci struktury komplexních uhlovodíků [19]. U polysacharidů reaguje periodát za absence světla s vicinálními –OH skupinami za vzniku aldehydických skupin (–CHO) a za současného rozštěpení vazby mezi uhlíky, na kterých k reakci došlo (Obr. 7). Oxidace tedy probíhá pouze pokud jsou v monomeru polysacharidu přítomny vicinální –OH skupiny ve vhodné vzájemné orientaci. Reakce probíhá nejrychleji při ekvatoriální – ekvatoriální pozici vicinálních –OH skupin nebo při pozici axiální – ekvatoriální. V pozici axiální – axiální oxidace neprobíhá, jelikož se molekula periodátu nemůže navázat na takto orientované vicinální –OH skupiny [19] (Obr. 7). Pokud polysacharid obsahuje jen jeden pár vhodných –OH skupin, je reakce vysoce regioselektivní. V případě přítomnosti více sousedících –OH skupin může docházet ke vzniku různých derivátů, typickým příkladem je dextran. Množství a pozice výše zmíněných skupin totiž souvisí s typem a počtem glykosidických vazeb, které se liší mezi různými polysacharidy. U celulózy, dextrinu a dextranu se vyskytují nejčastěji (1→4), (1→3) a (1→6) glykosidické vazby. Pokud polysacharid obsahuje (1→4) glykosidické vazby (celulóza), probíhá oxidace výlučně na C2 a C3 v monomerní jednotce polysacharidu s výjimkou koncových jednotek řetězců. Tento typ reakce je nejčastější a je zobrazen na Obrázku 7. Ostatním případům se věnujeme v následujících podkapitolách.

Stupeň oxidace je možné řídit během této primární oxidace polysacharidu pomocí změny reakčního času a koncentrace periodátu v reakční směsi [11].

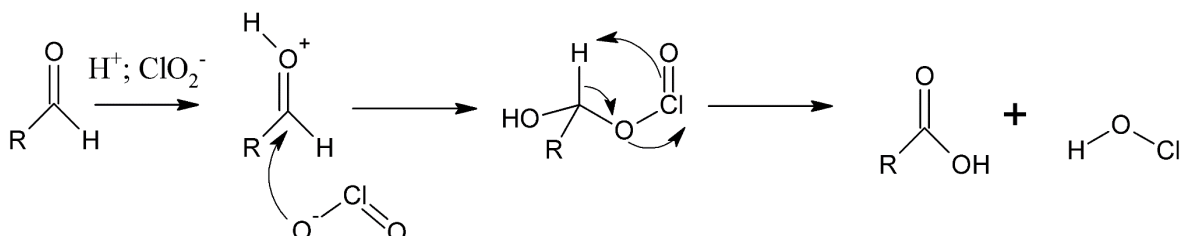


Obrázek 7: Mechanismus reakce molekuly periodátu a monomerní jednotky AGP. **A:** Obecný mechanismus reakce molekuly periodátu a monomerní jednotky AGP s β -(1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou (primární oxidace celulózy); **B:** Atak periodátu na $-\text{OH}$ skupiny C2 a C3, respektive C3 a C4 neredukujícího konce řetězce celulózy, kde dochází ke dvojité oxidaci a odštěpení kyseliny mravenčí. Dále na $-\text{OH}$ skupiny C2 a C3 monomerní jednotky AGP, kde dochází k primární oxidaci a štěpení vazby mezi C2 a C3; **C:** Periodát nereaguje s monomerní jednotkou spojenou β -(1 \rightarrow 3) glykosidickou vazbou kvůli absenci vicinálních $-\text{OH}$ skupin [5, 19].

Vzniklé dialdehydopolysacharidy jsou v roztoku velmi reaktivní. Přestože u krystalických polysacharidů dochází při oxidaci k rozrušení krystalické mřížky, aldehydy těchto polysacharidů nelze rozpustit ve vodě za mírných podmínek. Je to způsobeno tvorbou hemiacetalů, které propojují molekuly daného polysacharidu, a tak zvyšují jeho molární hmotnost. Tyto látky tudíž rozpustíme ve vodě pouze po zahřátí, při kterém se hemiacetalové vazby rozruší (solubilizace) [4]. Dialdehydopolysacharidy se využívají zejména jako síťovací činidla pro hydrogely, jejich aplikace je především v medicíně, textilním, chemickém a obalovém průmyslu [4].

Dialdehydy polysacharidů lze dále oxidovat na dikarboxylované polysacharidy. Při této tzv. sekundární oxidaci se $-\text{CHO}$ skupiny vzniklé z periodátové (primární) oxidace dále oxidují na karboxylové skupiny ($-\text{COOH}$) pomocí chloritanu sodného v kyselém prostředí za absence světla. Reakce začíná protonací aldehydického kyslíku, přičemž na něm vznikne kladný náboj, který je částečně kompenzován přesunem elektronové hustoty z aldehydického uhlíku. Na ten se pak může navázat molekula chloritanu přes atom kyslíku (nukleofilní adice). Následně dochází k eliminaci nekyselého vodíku z aldehydického uhlíku

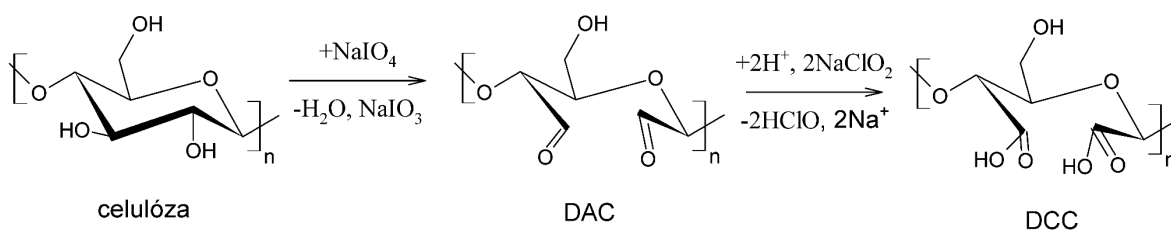
a jeho navázání na atom chlóru. Vzniklý chlornan se odštěpí za vzniku $-\text{COOH}$ skupiny na původně aldehydickém uhlíku (Obr. 8) [20]. Primární i sekundární oxidace jednotlivých polysacharidů mají svá specifika, jimiž se věnujeme v následujících kapitolách.



Obrázek 8: Mechanismus oxidace aldehydu NaClO_2 (princip sekundární oxidace) [20]

2.1 Regioselektivní oxidace celulózy

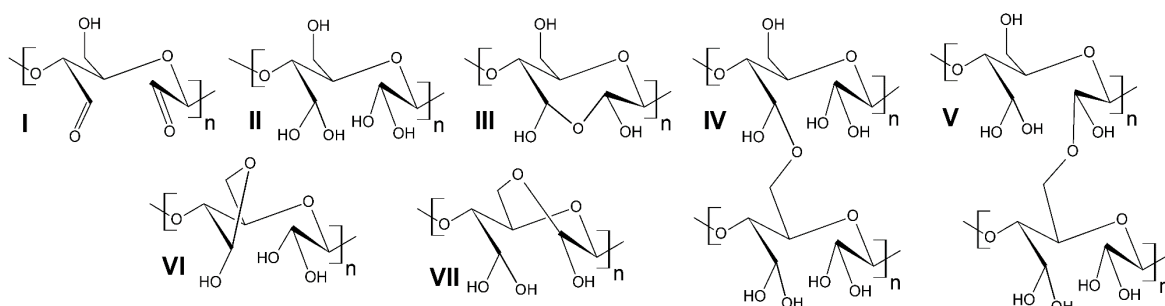
Celulóza obsahuje β -(1 \rightarrow 4) glykosidické vazby. Při primární oxidaci celulózy se molekula periodátu váže na vicinální $-\text{OH}$ skupiny v pozici C2 a C3 v monomerní jednotce řetězce a oxiduje je na $-\text{CHO}$ skupiny za současného přerušení vazby mezi nimi (Obr. 9). Jedinou výjimkou je oxidace na neredukujícím konci řetězce celulózy, kde dochází k oxidaci vicinálních $-\text{OH}$ skupin na C2, C3 a zároveň na C3, C4 a k odštěpení molekuly kyseliny mravenčí [18, 19, 21] (Obr. 7).



Obrázek 9: Primární a sekundární oxidace celulózy

Pro úplnou oxidaci celulózy na 2,3-dikarboxycelulózu (DCC) byl vyvinut následující postup [20]. Periodát se přidá k celulóze rozdispergované v demineralizované vodě v mírném molárním přebytku 1,2 : 1 (periodát : celulóza). Reakce je míchána konstantní rychlostí po dobu 72 *hod* při 30 °C za absence světla, aby nedošlo k degradaci periodátu, který je fotosenzitivní. Ukončení oxidační reakce se provádí přidávkou přebytku etylenglykolu do reakční směsi. Etylenglykol redukuje přebytečné jodistanové ionty až na

molekuly jódu. Výsledný produkt, 2,3-dialdehydcelulóza (DAC), je ve vodě nerozpustný, proto se přečišťuje opakovanou homogenizací a centrifugací kvůli odstranění přebytečného jódu sorbovaného na řetězcích DAC. Zbytky oxidačních činidel se odstraňují pomocí dialýzy. DAC lze rozpustit v demineralizované vodě solubilizací při teplotě 80 °C, avšak její stupeň oxidace musí být nad 75 % [22], jinak zůstává nerozpustná. Je to způsobeno hemiacetaly (Obr. 10), které vznikly díky vysoké reaktivitě DAC. V pevném stavu i v roztoku je DAC nestabilní a množství jejích –CHO skupin se v čase zmenšuje. Při solubilizaci dochází rovněž ke snížení polymeračního stupně o jednu desetinu, avšak vlastnosti klíčové pro potenciální aplikaci DAC (efektivní tvorba hydrogelů), zůstávají zachovány. Pokud je ale solubilizovaná DAC v roztoku uchovávána delší dobu (dva až čtyři týdny), dochází k její degradaci. Lze ji ovšem stabilizovat snížením pH roztoku na 3,5 [4]. DAC se využívá nejčastěji jako síťovací činidlo v gelech, které dále slouží jako materiál pro separaci molekul v chromatografii, nebo jako adsorbent těžkých kovů, iontů a proteinů [22].



Obrázek 10: Různé možné struktury DAC po primární oxidaci. **I:** dialdehyd; **II:** hydratovaný dialdehyd vznikající na začátku sekundární oxidace po okyselení reakční směsi; **III:** hemialdal; **IV a V:** intermolekulární hemiacetaly; **VI a VII:** intramolekulární hemiacetaly [4, 22].

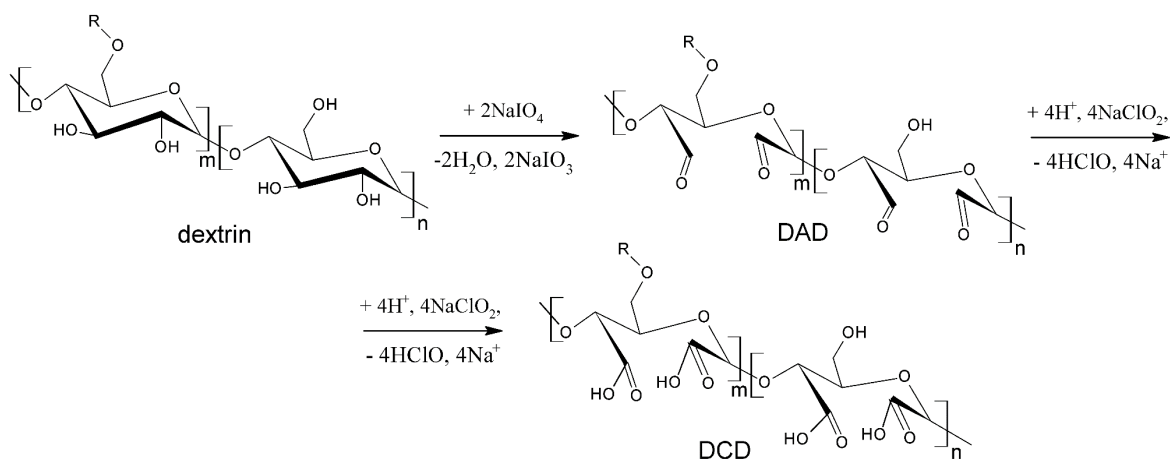
Hemiacetaly v řetězci DAC lze také eliminovat následnou sekundární oxidací. Ta se provádí se pomocí chloritanu sodného (NaClO₂) v kyselém prostředí (0,5M kyselina octová), kdy dochází k oxidaci –CHO skupin na uhlících C2 a C3 na –COOH skupiny (Obr. 9). Pro úplnou konverzi aldehydů na karboxyláty je vhodné použít molární poměr reaktantů 1 : 4 (–CHO skupiny DAC : NaClO₂), přičemž plně oxidovaná DAC obsahuje 12,5 mmol·g⁻¹ –CHO skupin. Optimální koncentrace chloritanu sodného je 0,5M [20]. Oxidace začíná po přidavku roztoku chloritanu sodného do směsi DAC a kyseliny octové. Pro dosažení vysoké konverze by měla reakce běžet při 30 °C a za absence světla alespoň po dobu 7 hod [11, 20] (Obr. 8). Oxidace se zastaví přidavkem roztoku hydroxidu sodného

na mírně zásadité pH a poté se reakční směs dialyzuje proti demineralizované vodě po dobu pěti dnů, během nichž se reakční směs zbaví všech nežádoucích solí. Následně se pH roztoku nastaví na 7,4 a výsledný produkt 2,3-dikarboxycelulóza (DCC) se získá lyofilizací.

2.2 Regioselektivní oxidace dextrinu

Dextrin obsahuje monomerní jednotky spojené α -(1 \rightarrow 4) a α -(1 \rightarrow 6) glykosidickými vazbami. Obdobně jako u celulózy dochází u dextrinu k reakci periodátu s vicinálními –OH skupinami na uhlících C2 a C3 (Obr. 7 a 11), a to i u jednotek spojených α -(1 \rightarrow 6) glykosidickými vazbami za vzniku –CHO skupin. Reakční podmínky (teplota, molární poměry reaktantů) a postup jsou obdobné jako u oxidace celulózy (Kap. 2.1), pouze doba reakce nutná pro kvantitativní oxidaci je pouze 8 hod [11, 20]. Důvodem je lepší rozpustnost dextrinu ve vodě a rozdílná krystalinita u celulózy a dextrinu, což má za následek rychlejší oxidaci dextrinu [20]. Výsledný produkt 2,3-dialdehydextrin (DAD) je na rozdíl od celulózy z velké části rozpustný ve vodě, proto jej lze přecistit dialýzou a filtrací, solubilizace není potřeba. Finální materiál se následně získá lyofilizací.

Sekundární oxidace dextrinu se opět provádí stejně jako u sekundární oxidace celulózy [20] (Kap. 2.1), kdy dojde k reakci NaClO_2 s –CHO skupinami za vzniku –COOH skupin (Obr. 11). Reakční směs se po reakci dialyzuje v demineralizované vodě v dialyzační membráně stejně jako u DCC. Dialýza zbaví reakční směs všech nežádoucích solí. Dialyzovaný produkt se nastaví na pH 7,4 a vysuší se lyofilizací. Výsledný produkt se nazývá 2,3-dikarboxydextrin (DCD).

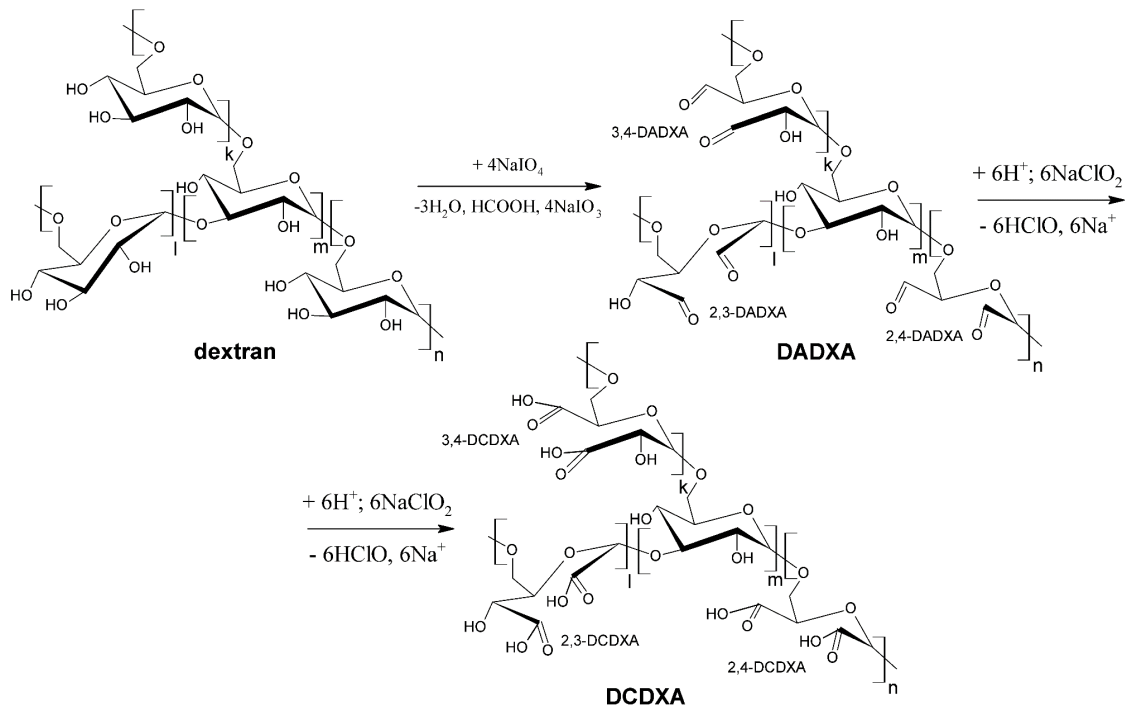


Obrázek 11: Primární a sekundární oxidace dextrinu

2.3 Regioselektivní oxidace dextranu

Dextran se od dextrinu i celulózy liší dominantním podílem α -(1 \rightarrow 6) glykosidických vazeb a přítomností α -(1 \rightarrow 3) větvení, a tudíž zejména přítomností trojice –OH skupin na sousedních uhlících C2, C3 a C4. Může tak docházet ke dvojité oxidaci na uhlíku C3 během primární oxidace obdobně jako u neredukujícího konce řetězce jiných polysacharidů (Obr. 7), nebo může oxidace probíhat pouze na uhlících C3 a C4, či jako u celulózy na C2 a C3. Naopak na monomerních jednotkách spojených α -(1 \rightarrow 3) glykosidickými vazbami oxidace neprobíhá vůbec, protože neobsahují žádné vicinální –OH skupiny (Obr. 7 a 12). Během primární oxidace opět reaguje periodát s –OH skupinami dextranu za vzniku –CHO skupin a reakce běží za stejných podmínek jako primární oxidace dextrinu (viz výše), pouze doba reakce je zkrácena na 4 *hod* s ohledem na úplnou rozpustnost dextranu [11]. Výsledný produkt obsahuje oxidované jednotky – 3,4-dialdehydextran, 2,3-dialdehydextran a 2,4-dialdehydextran. Pro účely této práce je tento produkt značen jen jako DADXA. Pro odstranění nečistot se provádí dialýza a filtrace stejně jako u dextrinu, výsledný DADXA získáme lyofilizací.

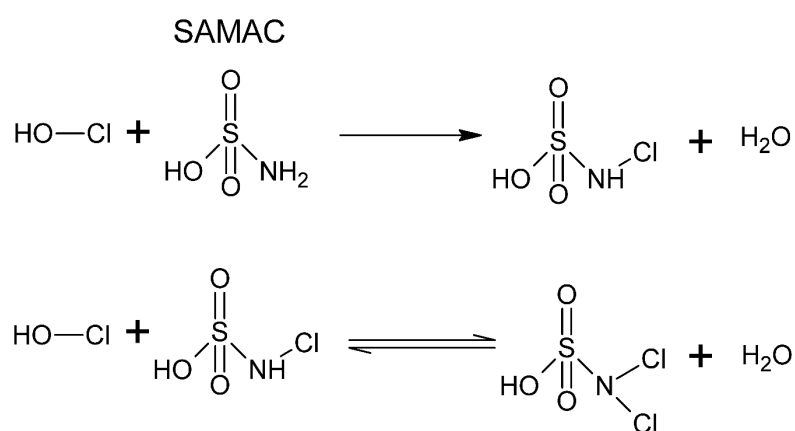
Sekundární oxidace dextranu také probíhá stejně jako u dextrinu a celulózy (stejně reakční podmínky a postupy). Chloritan reaguje s –CHO skupinami za vzniku –COOH skupin (Obr. 12). Oxidace se zastaví přidávkem roztoku hydroxidu sodného při nastavení na mírně zásadité pH. Následuje opět proces dialýzy reakční směsi v demineralizované vodě v dialyzační membráně. Dialyzovaný produkt lze zbavit přebytečné vody ve vakuové odparce. Poté se nastaví pH 7,4 a lyofilizuje. Výsledný produkt obsahuje, podobně jako DADXA, 3,4-dikarboxydextran, 2,3-dikarboxydextran a 2,4-dikarboxydextran (společně značeny jako DCDXA).



Obrázek 12: Primární a sekundární oxidace dextransu.

2.4 Řízení molární hmotnosti selektivně oxidovaných polysacharidů

Během studia sekundární oxidace celulózy si Münster et al. [15] povšimli poklesu molární hmotnosti tohoto polysacharidu po přidavku kyseliny amidosulfonové (SAMAC). Normálně se tato látka využívá na odstranění nežádoucích chlorných sloučenin z roztoků, zejména tedy kyseliny chlorné (Obr. 13), která vzniká během sekundární oxidace (Kap. 2). Funguje tedy jako tzv. scavenger, který na sebe tuto látku váže a brání tak její nežádoucí reakci (neselektivní oxidaci) s materiálem [15, 20].



Obrázek 13: Reakce kyseliny amidosulfonové (SAMAC) a kyseliny chlorné ve dvou fázích

Autoři si také povšimli, že změna molární hmotnosti závisí na množství SAMAC v reakční směsi, čehož lze využít k přípravě DCC o různých molárních hmotnostech [15]. Takto modifikovaná DCC byla využita jako nosič protinádorové látky zvané diammin-dichloroplatnatý komplex (cis-Pt), u kterého bylo zjištěno, že molární hmotnost DCC má vliv na farmaceutické a biologické vlastnosti tohoto materiálu. Ovlivňuje například rychlost uvolňování léčiva, ale také ovlivňuje efektivitu neseného léčiva vůči různým nádorovým liniím [11, 15].

Pokud tedy lze řídit molární hmotnost oxidované celulózy pomocí SAMAC, můžeme tento proces vyzkoušet i u ostatních polysacharidů, například u dextrinu a dextransu, což je náplní této práce.

3 MOLÁRNÍ HMOTNOST A METODA XRF

Molární hmotnost je fyzikální veličinou, jež udává hmotnost jednoho molu látky, jednotkou je $kg \cdot mol^{-1}$. Biologové využívají jednotku Da ($1 Da = 1 g \cdot mol^{-1}$) nebo kDa ($1 kDa = 1 kg \cdot mol^{-1}$). U polymerů se jedná o jednu z nejdůležitějších veličin charakterizujících daný polymerní systém. Distribuce jednotlivých makromolekul v polymerním systému je různá (neuniformní), protože se makromolekuly polymeru liší svou délkou a stupněm polymerace, proto bývá uváděna střední hodnota molární hmotnosti. Pokud by systém obsahoval makromolekuly o téže délce řetězce, byl by uniformní. Takovéto uniformní polymerní systémy můžeme najít v přírodě např. jako proteiny. Jedná-li se o makromolekuly se stejným chemickým složením a různou molární hmotností, nazýváme je polymerhomology [23–25].

Vzhledem k neuniformitě polymerního systému se k popisu molární hmotnosti polymerů nejčastěji používají tři typy střední molární hmotnosti:

1) Číselný střed molárních hmotností \bar{M}_n [24, 25]:

- Výsledná hodnota se blíží k molárním hmotnostem kratších řetězců v polymerním systému oproti hmotnostního středu molárních hmotností, což je způsobeno polynomem prvního stupně ve jmenovateli definovaného vztahu (Rov. 1.0). Jedná se tak o početní průměr molárních hmotností makromolekul.

$$\bar{M}_n = \sum_i x_i \cdot M_i = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i \cdot M_i}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i} = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} m_i}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i} \quad (1.0)$$

x_i ...Molární zlomek makromolekul i-té frakce [-]
 M_i ...Molární hmotnost makromolekul i-té frakce [$kg \cdot mol^{-1}$]
 n_i ...Látkové množství makromolekul i-té frakce [mol]
 m_i ...Hmotnost makromolekul i-té frakce [kg]

- Lze vypočítat také pomocí číselně středního polymeračního stupně \bar{P}_n [25]:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i \cdot P_i}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i} \cdot M_0 = \bar{P}_n \cdot M_0 \quad (1.1)$$

n_i ...Látkové množství makromolekul i-té frakce [mol]
 P_i ...Polymerační stupeň makromolekul i-té frakce [-]
 M_0 ...Molární hmotnost monomerní jednotky polymeru [$kg \cdot mol^{-1}$]

2) Hmotnostní střed molárních hmotností \bar{M}_w [24, 25]:

- Výsledná hodnota se blíží k molárním hmotnostem delších řetězců v polymerním systému. Je to důsledkem druhého stupně polynomu molární hmotnosti i -té frakce v čitateli (Rov. 1.2). Zde se jedná o hmotnostní průměr molárních hmotností makromolekul.

$$\bar{M}_w = \sum_i w_i \cdot M_i = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} m_i \cdot M_i}{\sum_{i=1}^{\infty} m_i} = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i \cdot M_i^2}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i \cdot M_i} \quad (1.2)$$

w_i ...Hmotnostní zlomek makromolekul i -té frakce [-]

M_i ...Molární hmotnost makromolekul i -té frakce [$\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$]

m_i ...Hmotnost makromolekul i -té frakce [kg]

n_i ...Látkové množství makromolekul i -té frakce [mol]

- Podobně jako u číselného středu molárních hmotností lze hmotnostní střed molárních hmotností vypočítat pomocí hmotnostně středního polymeračního stupně \bar{P}_w [25]:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i \cdot P_i^2}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i \cdot P_i} \cdot M_0 = \bar{P}_w \cdot M_0 \quad (1.3)$$

n_i ...Látkové množství makromolekul i -té frakce [mol]

P_i ...Polymerační stupeň makromolekul i -té frakce [-]

M_0 ...Molární hmotnost monomerní jednotky polymeru [$\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$]

3) Velikostní střed molárních hmotností \bar{M}_z [25]:

- Velikost hodnoty této veličiny je více ovlivněna delšími řetězci, respektive jejich vyšší molární hmotností v polymerním systému, než hodnota hmotnostního středu molárních hmotností. Důvodem je opět vyšší mocnina ve jmenovateli daného vztahu této veličiny (Rov. 1.4).

$$\bar{M}_z = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} w_i \cdot M_i^2}{\sum_{i=1}^{\infty} w_i \cdot M_i} = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i \cdot M_i^3}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i \cdot M_i^2} \quad (1.4)$$

w_i ...Hmotnostní zlomek makromolekul i -té frakce [-]

M_i ...Molární hmotnost makromolekul i -té frakce [$\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$]

n_i ...Látkové množství makromolekul i -té frakce [mol]

Vzhledem k definicím Rovnic 1.0–1.4 lze porovnat velikosti jednotlivých středů molárních hmotností takto: $\bar{M}_n < \bar{M}_w < \bar{M}_z$.

Neuniformitu polymerního systému definujeme podle indexu neuniformity X (dříve index polydisperzity) [23, 24]:

$$X = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} \quad (1.5)$$

\bar{M}_w ...Hmotnostní střed molárních hmotností [$\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$]
 \bar{M}_n ...Číselný střed molárních hmotností [$\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$]

- Pro index neuniformity platí: $X \geq 1$. $X < 1$ být nikdy nemůže, jelikož platí $\bar{M}_n < \bar{M}_w$. Pokud $X = 1$, pak je polymerní systém uniformní (v systému jsou pouze makromolekuly o stejné molární hmotnosti). Pokud $X > 1$, pak je systém neuniformní.

Metod pro stanovení středních molárních hmotností je celá řada [23, 25]. Nejčastěji se stanovuje hmotnostní a číselný střed molárních hmotností:

1) Metody pro stanovení \bar{M}_n :

- Metoda koncových skupin
- Kryoskopie
- Ebulioskopie
- Hmotnostní spektroskopie
- Membránová osmometrie
- Chromatografie

2) Metody pro stanovení \bar{M}_w :

- Metoda rozptylu světla
- Metoda sedimentační
- Chromatografie

V této práci se na stanovení molární hmotnosti využilo chromatografické metody, přesněji gelové permeační chromatografie.

3.1 Gelová permeační chromatografie (GPC)

Je metoda pro stanovení středních molárních hmotností a jiných charakteristických parametrů polymerního systému. Nazývá se také molekulová vylučovací chromatografie. Princip této metody spočívá v separaci makromolekul ve formě polymerních klubek díky jejich rozdílné velikosti, respektive rozdílnému gyračnímu poloměru.

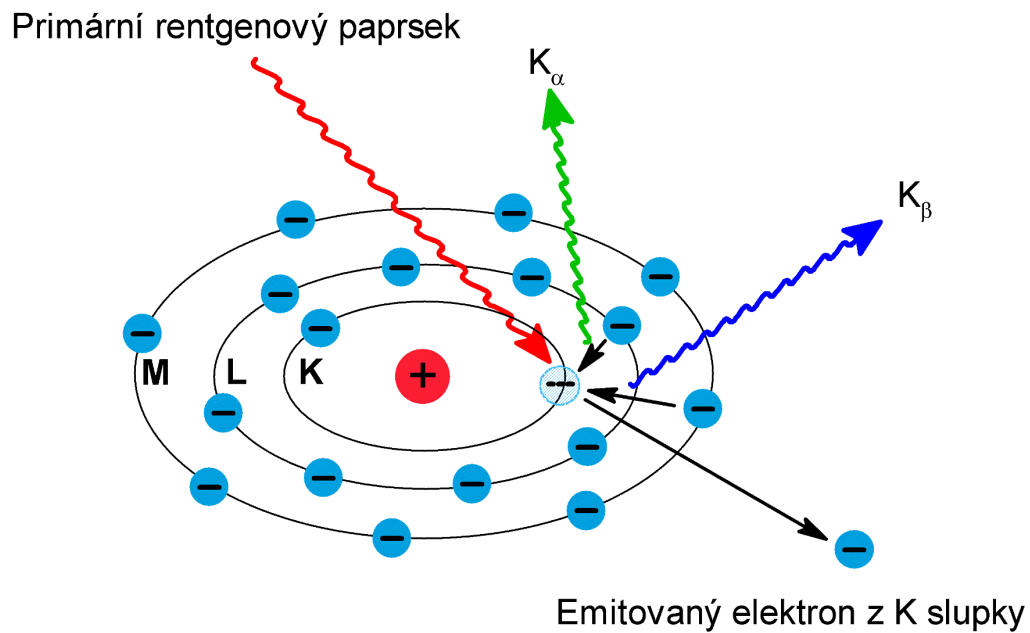
Prostor, ve kterém probíhá separace, se nazývá kolona. Obsahuje mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze se skládá z vhodného rozpouštědla pro daný polymer, který protéká mezi částicemi gelu. Stacionární fáze je to samé rozpouštědlo uchycené v pórech gelu. Mobilní fáze protéká skrze póry gelu a unáší s sebou polymerní klubka. Na začátku měření je polymerní systém injektován do kolony jako směs frakcí makromolekul o různých délkách, respektive různých molárních hmotnostech. Mobilní fáze unáší tyto makromolekuly ve formě klubek přes póry gelu, kde se makromolekuly zachytávají. Frakce menších makromolekul se v pórech uchytí snadněji a zůstávají v nich delší dobu. Naopak frakce větších makromolekul se do póru nedostanou a jsou vyloučeny z kolony jako první. Postupně se z pórů stacionární fáze vymývají také frakce menších makromolekul a také opouští kolonu. Na konci kolony je umístěn detektor, který zaznamenává závislost retenčního času na koncentraci polymeru. Retenční čas nám udává dobu, kdy se v koloně separuje daná frakce polymeru.

Pomocí metody gelové permeační chromatografie získáme relativní středy molární hmotnosti a hmotnostní distribuce pro daný polymer. Pro správné hodnoty absolutních středů molárních hmotností je důležité použít vhodné standardy pro daný polymer [23, 25].

3.2 Rentgenově-fluorescenční spektrometrie (XRF)

Tato analytická nedestruktivní metoda slouží ke zjištění atomárního složení vzorku (kvalitativní analýza) a zastoupení daných atomů v prvku (kvantitativní analýza). Principem této metody je ozáření zkušebního vzorku (látky) rentgenovým zářením, přičemž dochází k excitaci jednoho nebo více elektronů z hluboko ležících elektronových vrstev tzv. core orbitalů. Excitovaný elektron opouští elektronovou vrstvu a jiný elektron z vyšší elektronové vrstvy zaujímá jeho místo. Dochází tak k deexcitaci elektronu z vyšší elektronové vrstvy, což je doprovázeno vyzářením charakteristické energie (fotonu) pro danou deexcitaci (Obr. 14). Například K_{α} je charakteristické záření vyprodukované z deexcitace elektronu z L vrstvy do K slupky pro daný atom. Záření je analyzováno pomocí spektrometru a výsledkem měření vzorku je charakteristické energetické spektrum, kde dané signály

charakteristického tvaru (angl. „peaks“) odpovídají vyzářené energii z deexcitace určitých elektronů. Z intenzity signálu a kalibrační křivky, kterou získáme měřením definovaných množství zkoumaného analytu, lze provést kvantitativní analýzu zkoumaného vzorku [26, 27].



Obrázek 14: Schéma principu rentgenové fluorescenční metody (XRF). K, L, M představují tři elektronové vrstvy (slupky) v atomu. Množství elektronů v M vrstvě je pouze demonstrativní, skutečný počet se liší. K_{α} a K_{β} jsou rentgenová fluorescenční záření odpovídající deexcitaci elektronu z L vrstvy do K vrstvy, respektive z M vrstvy do K vrstvy [26, 27].

4 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je zjištění vlivu kyseliny amidosulfonové na hmotnostní střed molárních hmotností u selektivně oxidovaných polysacharidů, konkrétně celulózy, dextrinu a dextranu. Práce popisuje základní chemismus a postup primární i sekundární oxidace těchto polysacharidů, dále mechanismus štěpení $\beta(1\rightarrow4)$, $\alpha(1\rightarrow4)$ a $\alpha(1\rightarrow6)$ glykosidických vazeb, včetně optimalizace parametrů pro řízení molární hmotnosti celulózy, dextrinu a dextranu. Změna hmotnostního středu molárních hmotností má zásadní vliv na biologické vlastnosti materiálů připravených pomocí těchto látek, zejména hydrogelů a nosičů protirakovinových léčiv, jako jsou rychlost uvolňování léčiva, maximální množství navázaného léčiva a efektivita léčiva. Součástí práce proto je také studie uvolňování diammin-dichloroplatnatého komplexu z modifikovaného dextranu, na kterých byl demonstrován vliv změny molární hmotnosti.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část se věnuje přípravě modifikovaných polysacharidů (DCC, DCD, DCDXA) a zároveň je zde popsán postup reakce sulfonačně-indukovaného štěpení glykosidických vazeb standardní metodou a pomocí pre-sulfonace. Na závěr je ukázán vliv změny \bar{M}_w na uvolňování diammin-dichloroplatnatého komplexu (cis-Pt) z DCDXA.

5.1 Materiály a přístroje

Pro regioselektivní oxidaci byla použita celulóza SigmaCell typ 20 ($\bar{M}_w = 76 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, $X = 4,7$), dextrin z kukuřičného škrobu typ I ($\bar{M}_w = 52 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, $X = 2,3$) a dextran z bakterií *Leuconostoc Spp.* ($\bar{M}_w = 106 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, $X = 5,59$) (Sigma Aldrich Co.). Kromě výše zmíněných polysacharidů byl použit v primární oxidaci jodistan sodný (NaIO_4) a ethylenglykol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$) (Penta, Česká republika). Sekundární oxidace byla provedena pomocí dialdehydpolysacharidů připravených primární oxidací, chloritanu sodného (NaClO_2 , 80 %), kyseliny octové (CH_3COOH , $\geq 99,8$ %), kyseliny amidosulfonové (H_3NSO_3 , SAMAC, 99,3 %) (Sigma Aldrich, Co.) a kyseliny sírové (H_2SO_3 , 96 %; Penta, Česká republika). Pro nastavování pH byl použit hydroxid sodný (NaOH , ≥ 98 %; Lachner, Česká republika) a kyselina chlorovodíková (HCl , 35 %; Penta, Česká republika). Na dialýzu rozpustných produktů regioselektivní oxidace byly použity dialyzační membrány schopné zachytit látky o molární hmotnosti nad $14 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ (MWCO z angl. „Molecular Weight Cut off“; Sigma Aldrich Co.). Filtrace produktů probíhala přes $0,22\mu\text{m}$ filtry. Na přípravu cis-Pt–DCDXA (konjugát) byl použit DCDXA připravený dle Kapitoly 5.3 a cis-Pt, který byl připraven z tetrachloroplatnatanu draselného ($\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$; Alfa Aesar, 98 %). Dialýza konjugátu byla provedena dialyzační membránou s MWCO $3,5 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Thermo Fischer) a na rozpuštění konjugátu byl použit fosfátem pufovaný solný roztok o pH 7,4 (Phosphate-buffered Saline, PBS 7,4; Invitrogen, USA). Všechny chemikálie použité v reakcích byly analyticky čisté, pokud není uvedeno jinak, a nebyly dále čištěny. Během experimentu byla využita demineralizovaná voda ($0,06 \mu\text{S}$).

Mechanická homogenizace, sedimentace a přečištění nerozpustného DAC byly prováděny pomocí homogenizéru WiseTis HD-15 (Witeg, Německo) a laboratorní odstředivky Thermo Scientific Multifuge X3 (Thermo Fisher, Švédsko). Odpaření přebytečné vody v produktech bylo provedeno v rotační vakuové odparce Heidolph LABROTA a vysušení konečných produktů pomocí lyofilizátoru CoolSafe 110-4 PRO. Molární hmotnosti byly zjištěny pomocí chromatografu Waters HPLC DIGITAL Breeze

(Waters, USA), který obsahoval detektor indexu lomu Waters 2414 (teplota driftové trubice = 60 °C), Tosoh TSK gel GMPW_{XL} a kolonu (300 mm x 7,8 mm x 13 μm, teplota kolony = 30 °C). Mobilní fáze byla tvořena roztokem dusičnanu sodného (NaNO₃, 99,8 %; Lachner, Česká republika) a dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄·12H₂O, 99,6 %; VWR, Česká republika) [28]. Pro kalibraci GPC metody byla použita kalibrační souprava z polysacharidu pullulanu SAC-10 (Agilent Technologies, Inc.) v rozmezí \bar{M}_w (342–805 000) g·mol⁻¹. Pro studium mechanismu sulfonačně-indukovaného štěpení byl použit FT-IR spektrometr Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) [29]. Obsah cis-Pt v konjugátu byl stanoven rentgenovou fluorescenční spektrometrií pomocí Quant'X EDX-XRF analyzátoru (Thermo Scientific, USA) [30] za použití kalibračních standardů, které byly připraveny rozpuštěním známého množství cis-Pt v PBS 7,4 (Invitrogen, USA).

5.2 Oxidace celulózy a studium mechanismu štěpení β(1→4) glykosidické vazby

V první fázi byla provedena primární oxidace celulózy. Pro dosažení nejvyššího stupně oxidace (viz Kap. 2.1) byl zvolen molární poměr reaktantů na 1,2 : 1 (NaIO₄ : polysacharid), tedy na 10 g celulózy bylo použito 16,5 g periodátu. Celkový reakční objem činil 500 ml, přičemž polysacharid byl napřed dispergován pouze v objemu o velikosti 300 ml (celulóza je nerozpustná). Zbývajících 200 ml bylo použito na rozpuštění periodátu a jeho převedení do reakční směsi. Krystalky periodátu by totiž vytvářely při rozpouštění v reakční směsi v daném místě silné oxidační prostředí, které by mohlo vést k nežádoucím produktům, čemuž se předcházelo jeho rozpuštěním před přidáním do reakční směsi. Reakční směs byla míchána rychlostí 300 ot·min⁻¹ v ethylenglykolové lázni při teplotě 30 °C a za absence světla, protože rozpuštěný periodát je velmi fotosenzitivní. Reakční doba primární oxidace celulózy byla pro dosažení nejvyššího stupně oxidace stanovena na 72 hod [11]. Reakce byla zastavena přebytkem ethylenglykolu a výsledný produkt 2,3-dialdehydcelulóza byl přečištěn. Nerozpustná DAC byla opakovaně centrifugována a mechanicky homogenizována pro odstranění přebytečného jódu. U takto přečištěné DAC byla zjištěna její hmotnostní koncentrace v suspenzi. Takto připravená zcela oxidovaná DAC obsahovala 12,5 mmol·g⁻¹ -CHO skupin v polymerních řetězcích na základě stanovení pomocí oximační reakce [20, 31].

V další fázi byla provedena modifikovaná sekundární oxidace DAC, jejíž součástí bylo sulfonačně-indukované štěpení β(1→4) glykosidické vazby. Pro studium mechanismu

štěpení byly vytvořeny dvě série vzorků, na kterých byl zkoumán vliv přídavku SAMAC a H_2SO_4 během sekundární oxidace. Cílem bylo zjistit, zda se jedná jen o kyselou hydrolyzu, nebo je mechanismus složitější (viz Kapitola 6.1). Pro obě série byl molární poměr $-\text{CHO} : \text{NaClO}_2$ nastaven na 1 : 4, přičemž látková koncentrace NaClO_2 v reakční směsi byla 1M. Dále byla použita CH_3COOH na okyselení dispergované DAC, její koncentrace v reakční směsi byla vždy 0,5M. Reakční směs byla doplněna vodou na objem potřebný pro dosažení požadovaných koncentrací látek. V první sérii se nejdříve v částečném reakčním objemu dispergovala DAC, bylo přidáno dané množství CH_3COOH , následně byla v různých množstvích přidána SAMAC dle molárního poměru 0; 0,125; 0,25; 0,5; a 1 mol na 1 mol $-\text{CHO}$ skupin DAC. Nakonec byl přidán NaClO_2 , čímž začala sekundární oxidace (reakční směs zežloutla kvůli obsahu vyvíjení Cl_2). V druhé sérii byla posloupnost kroků stejná jako u první série, jen se místo SAMAC použila H_2SO_4 . Její množství do reakční směsi bylo zvoleno tak, aby hodnota pH reakční směsi byla stejná jako u jednotlivých molárních poměrů SAMAC : $-\text{CHO}$. Reakce obou sérií probíhaly za míchání $300 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ a absence světla při $30 \text{ }^\circ\text{C}$, přičemž obě trvaly 7 hod, tj. dobu nutnou k úplné oxidaci celulózy. Oxidace byla zastavena přídavkem 10M NaOH a nastavením reakční směsi na mírně zásadité pH. Produkty obou sérií (DCC) byly jednotlivě dialyzovány pomocí dialyzační membrány v 5 dm^3 vody po dobu pěti dnů, přičemž difuzát byl měněn dvakrát za den. Objem dialyzátů bylo nutné zredukovat na rotační vakuové odparce, následně pomocí zředěného NaOH nastavit na pH 7,4 a zfiltrvat. Výsledné produkty ve formě sodné soli byly získány lyofilizací. Výtěžky z obou sérií byly téměř kvantitativní a odpovídaly hodnotám nad 90 %. Pomocí GPC analýzy byly charakterizovány \bar{M}_w vzniklých DCC z obou sérií a jsou diskutovány v Kapitole 6.1.

5.3 Vliv reakčních podmínek na oxidaci polysacharidů se sulfonačně-indukovaným štěpením glykosidických vazeb

Jako polysacharidy se zde rozumí celulóza, dextrin a dextrans. Opět byla nejdříve provedena primární oxidace těchto polysacharidů, přičemž postup, reakční podmínky, molární poměry a množství reaktantů byly stejné jako v Kapitole 5.2. U dextrinu byla optimální doba primární oxidace zkrácena na 8 hod [11] a jeho částečně rozpustný výsledný produkt DAD byl přečištěn pomocí dialyzační membrány v 5 dm^3 vody po dobu 48 hod. Jeho difuzát byl vyměňován za čistou vodu dvakrát za den. 2,3-dialdehydextrin byl poté přefiltrován a získán lyofilizací. Doba primární oxidace dextransu byla nastavena na 4 hod

[11]. Dextran v množství 5 g se nechal rozpustit za laboratorní teploty v částečném reakčním objemu (150 ml) po dobu 1 hod a následně byl smíchán s 8,25 g NaIO₄ v 250 ml vody. Zastavení oxidace, přečištění a získání produktu DADXA bylo stejné jako u dextrinu. Zatímco u dextrinu bylo, stejně jako předtím u celulózy, dosaženo téměř 100% konverze vicinálních –OH skupin na –CHO skupiny na uhlících C2 a C3 [20] (12,5 mmol·g⁻¹), u dextranu bylo díky obsahu monomerních jednotek spojených α-(1→3) glykosidickými vazbami (Kap. 2.3) dosaženo 85% konverze –OH skupin na –CHO skupiny. Protože je ale průměrná molární hmotnost oxidovaného dextranu nižší než u dextrinu v důsledku dvojité oxidace některých jednotek a s tím spojené eliminace uhlíku C3, výsledný obsah aldehydických skupin v DADXA (12,1 mmol·g⁻¹) je podobný jako u DAC a DAD. Ve všech případech proto byly nastaveny shodné reakční podmínky sekundární oxidace.

Během sekundární oxidace dialdehydpolysacharidů byl studován vliv rostoucího množství SAMAC na \bar{M}_w výsledných produktů v kombinaci s měnící se reakční dobou sekundární oxidace a molární koncentrací NaClO₂. U každého dialdehydpolysacharidu byly vytvořeny 3 série vzorků, přičemž byl u všech dodržen molární poměr reaktantů 1 : 4 (–CHO : NaClO₂) a koncentrace CH₃COOH byla vždy 0,5M. Vzorky se lišily množstvím SAMAC odpovídajícím molárnímu poměru 0; 0,125; 0,25; 0,5; a 1 mol SAMAC na 1 mol –CHO skupin. U DAC byla v první sérii reakční doba sekundární oxidace nastavena na 7 hod a látková koncentrace NaClO₂ v reakční směsi byla 1M. V druhé sérii zůstala reakční doba stejná, ale koncentrace oxidačního činidla byla 0,5M. Ve třetí sérii se snížila reakční doba na 3,5 hod a koncentrace NaClO₂ byla 1M. U DAD byly u sérií parametry stejné jako u DAC, pouze u třetí série byla látková koncentrace oxidačního činidla snížena na 0,5M. U DADXA byly reakční časy ve všech sériích stejné jako u DAC, jen látkové koncentrace NaClO₂ v reakční směsi se lišily: v první sérii 0,5M, ve druhé 0,2M a ve třetí 0,5M, aby byla potlačena případná nežádoucí degradace dextranu.

Obecný postup byl následující: V částečném reakčním objemu byly rozpuštěny (dispergovány) v rámci jednotlivých sérií dialdehydpolysacharidy, k nim bylo přidáno dané množství CH₃COOH, aby bylo dosaženo požadované koncentrace (0,5M). Poté byla v různých množstvích přidána SAMAC následně i NaClO₂, čímž začala sekundární oxidace (reakční směs zežloutla kvůli obsahu Cl₂). Reakce probíhaly za míchání 300 ot·min⁻¹ při 30 °C za absence světla. Sekundární oxidace byly ukončeny u všech sérií DAC, DAD a DADXA nastavením reakčních směsí na mírně zásaditou pH hodnotu. Výsledné produkty DCC, DCD a DCDXA byly získány stejným postupem jako v Kapitole 5.2 ve

formě sodných solí. Výtěžky u všech sérií byly díky lyofilizaci opět téměř kvantitativní a odpovídaly hodnotám nad 90 %. Pomocí GPC analýzy byly zjištěny \bar{M}_w vzniklých dikarboxypolysacharidů ze všech sérií a jsou diskutovány v Kapitole 6.2.

Pro sekundární oxidaci DADXA byla vyvinuta také modifikovaná metoda spočívající ve využití tzv. pre-sulfonace. Ta se liší tím, že po okyselení rozpuštěného DADXA byla napřed přidána SAMAC a až po určitém čase (0; 0,5; 1; 2; 4; 6 *hod*) bylo přidáno oxidační činidlo NaClO₂. Molární poměr reaktantů –CHO skupin a NaClO₂, koncentrace CH₃COOH zůstaly stále stejné jako u sekundární oxidace DADXA standardní metodou sulfonačně-indukovaného štěpení při 0,5M koncentraci oxidačního činidla (viz výše). Množství SAMAC pro jednotlivé body v sérii bylo dáno molárním poměrem 1 : 0,5 (–CHO : SAMAC), přičemž látková koncentrace SAMAC v reakční směsi byla 0,0625M. Sekundární oxidace byla zastavena 5M roztokem NaOH nastavením reakční směsi na mírně zásadité pH. Následoval proces dialýzy až po získání DCDXA a jeho charakterizace stejně jako u DCC v Kapitole 5.2. Výtěžky byly opět ve všech případech nad 90 %.

5.4 Příprava cis-Pt–dextran konjugátu

Pro přípravu konjugátu DCDXA (nosič) s cis-Pt byly vybrány materiály o \bar{M}_w ($13 \pm 0,7$) $kg \cdot mol^{-1}$ a ($183 \pm 5,5$) $kg \cdot mol^{-1}$. U jednotlivých molárních hmotností byla vytvořena série tří hmotnostních poměrů cis-Pt : DCDXA (2 : 10, 5 : 10 a 8 : 10), což odpovídá 15 $hmot.$ %, 30 $hmot.$ % a 45 $hmot.$ % cis-Pt. Příprava konjugátů spočívala ve smíchání cis-Pt (2 $mg \cdot cm^{-3}$) a DCDXA (4 $mg \cdot cm^{-3}$) rozpuštěných ve vodě za laboratorní teploty. Reakční směs byla jemně třepána po dobu 72 *hod* za nepřístupu světla. Po uplynutí reakční doby byla provedena dialýza reakční směsi proti vodě po dobu 4 *hod* kvůli odstranění nezreagovaného cis-Pt, dialyzát byl poté přefiltrován a výsledný produkt byl získán lyofilizací. Ve všech případech byla efektivita navázání cis-Pt v DCDXA okolo 90 %, což bylo stanoveno pomocí metody XRF.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Vliv H_2SO_4 a SAMAC na \bar{M}_w DCC

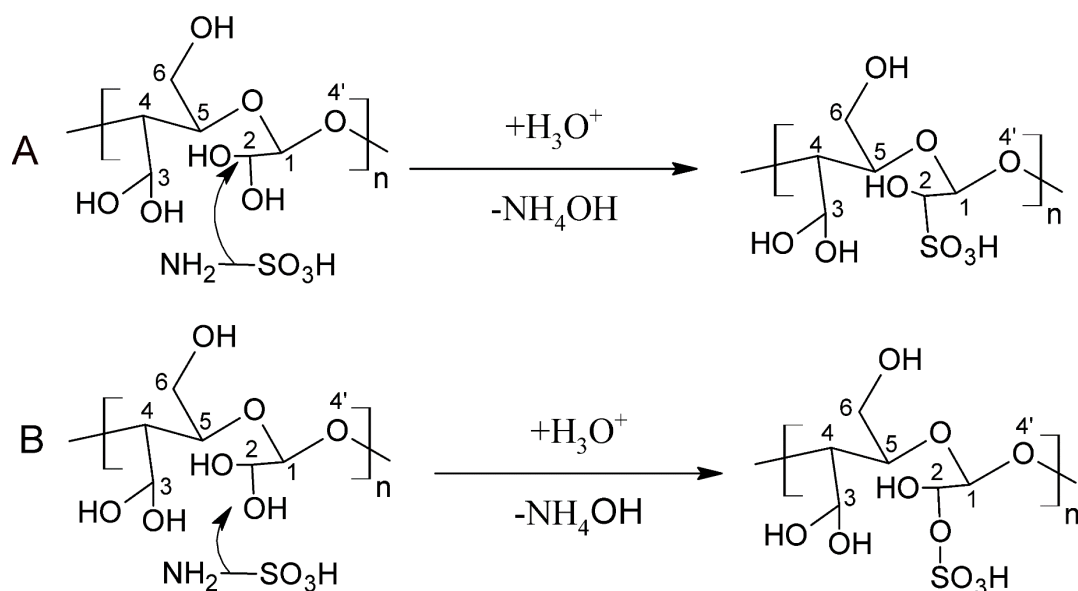
Jak bylo uvedeno v Kapitole 2.4, po přidavku SAMAC během sekundární oxidace DAC byl sledován pokles \bar{M}_w DCC [15], ovšem nebylo jasné, zdali nedochází pouze ke kyselé hydrolyze $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidické vazby DAC kvůli přidavku kyseliny. Proto byly napřed připraveny a zkoumány dvě série vzorků s přidavkem SAMAC nebo H_2SO_4 těsně před sekundární oxidací (Kap. 5.2). V Tabulce 3 jsou uvedeny výsledky experimentu, který sledoval vliv SAMAC a H_2SO_4 na snižování \bar{M}_w během sekundární oxidace DAC. Z tabulky lze vidět, že pokles \bar{M}_w ($74,8\text{--}29,8 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) byl sledován pouze u série s přidavkem SAMAC (1 : 0–1 : 1; –CHO : SAMAC). Značení vzorků je analogické k rostoucímu molárnímu poměru –CHO : SAMAC (DCC_0–DCC_1). Série s SAMAC vykazuje s jejím rostoucím množstvím také mírný pokles neuniformity (1,95–1,65), která se ustaluje při vyšších koncentracích SAMAC.

Pokud by byl mechanismus reakce štěpení výše zmíněné glykosidické vazby opravdu pouze záležitostí kyselé hydrolyzy, pak by s rostoucím množstvím H_2SO_4 (snižování hodnoty pH v rozsahu 2,3–0,9) měl být pozorovatelný aspoň mírný pokles \bar{M}_w DCC obdobně jako u série s SAMAC. Jednotlivé vzorky v sérii s kyselinou sírovou měly ale téměř stejné \bar{M}_w ($74,8\text{--}75,6 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) bez ohledu na její rostoucí množství (snižování hodnoty pH). Zároveň i index neuniformity zůstává ve všech bodech stejný ($X = 1,76 \pm 0,02$), což poukazuje na fakt, že pouhou kyselou hydrolyzou reakce neprobíhá. Je zajímavé, že i při velmi nízkém pH v sérii s H_2SO_4 nedochází k poklesu \bar{M}_w . Přitom byla u celulózy již dříve rychlost kyselé hydrolyzy vazeb korelována se silou přidané kyseliny (pKa) [20]. Na základě výsledků se pozornost tedy přesunula na fakt, že molekula SAMAC je daleko lepší sulfonační činidlo, než je molekula H_2SO_4 . Nejpravděpodobnějším cílem sulfonační reakce jsou potom reaktivní –CHO skupiny vzniklé během primární oxidace polysacharidu.

Tabulka 3: Výsledky a podmínky přípravy DCC za použití SAMAC nebo H₂SO₄ [20]. Značení vzorků udává rostoucí množství přidané SAMAC vůči aldehydickým skupinám (-CHO : SAMAC je molární poměr aldehydických skupin v DCC vůči SAMAC; pH je hodnota pH nastavená v reakční směsi; \bar{M}_w je hmotnostní střed molárních hmotností; X je stupeň neuniformity (polydisperzity).

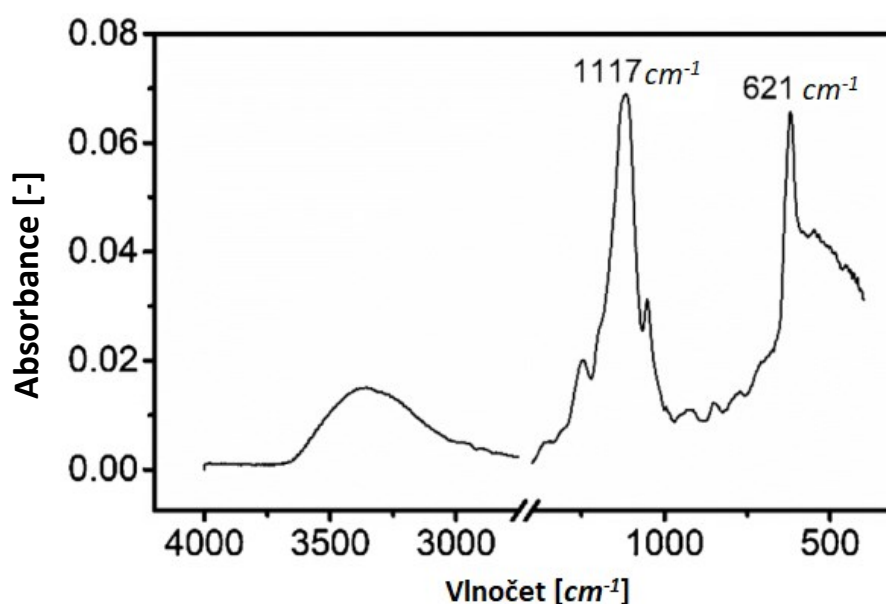
Značení vzorků	SAMAC				H ₂ SO ₄		
	-CHO : SAMAC [-]	pH [-]	$\bar{M}_w \pm \sigma_{\bar{M}_w}$ [kg·mol ⁻¹]	X [-]	pH [-]	$\bar{M}_w \pm \sigma_{\bar{M}_w}$ [kg·mol ⁻¹]	X [-]
DCC-0	1 : 0	2,3 ± 0,1	74,8 ± 0,3	1,95 ± 0,01	2,3 ± 0,1	74,8 ± 0,3	1,77 ± 0,01
DCC-0,125	1 : 0,125	1,6 ± 0,1	71,4 ± 0,2	1,95 ± 0,01	1,6 ± 0,1	75,1 ± 0,2	1,75 ± 0,01
DCC-0,25	1 : 0,25	1,4 ± 0,1	21,1 ± 0,1	1,65 ± 0,01	1,4 ± 0,1	74,9 ± 0,2	1,74 ± 0,01
DCC-0,5	1 : 0,5	1,1 ± 0,1	20,2 ± 0,1	1,65 ± 0,01	1,1 ± 0,1	75,7 ± 0,2	1,78 ± 0,01
DCC-1	1 : 1	0,9 ± 0,1	29,8 ± 0,1	1,65 ± 0,01	0,9 ± 0,1	75,6 ± 0,3	1,75 ± 0,01

Jsou zde dvě možnosti, jak by reakce zahrnující sulfonaci aldehydické skupiny mohla probíhat. V prvním případě by mohla molekula SAMAC reagovat přímo s aldehydickým uhlíkem, např. C2, přičemž by zároveň došlo k eliminaci molekuly vody z geminálních hydroxylových skupin (dvě -OH skupiny na jednom uhlíku, Obr. 15 A). Druhou možností by byl vznik DAC esteru kyseliny sírové, kdy by docházelo k ataku geminální -OH skupiny hydratované formy DAC molekulou SAMACU (Obr. 15 B), tj. nedochází k eliminaci vody.



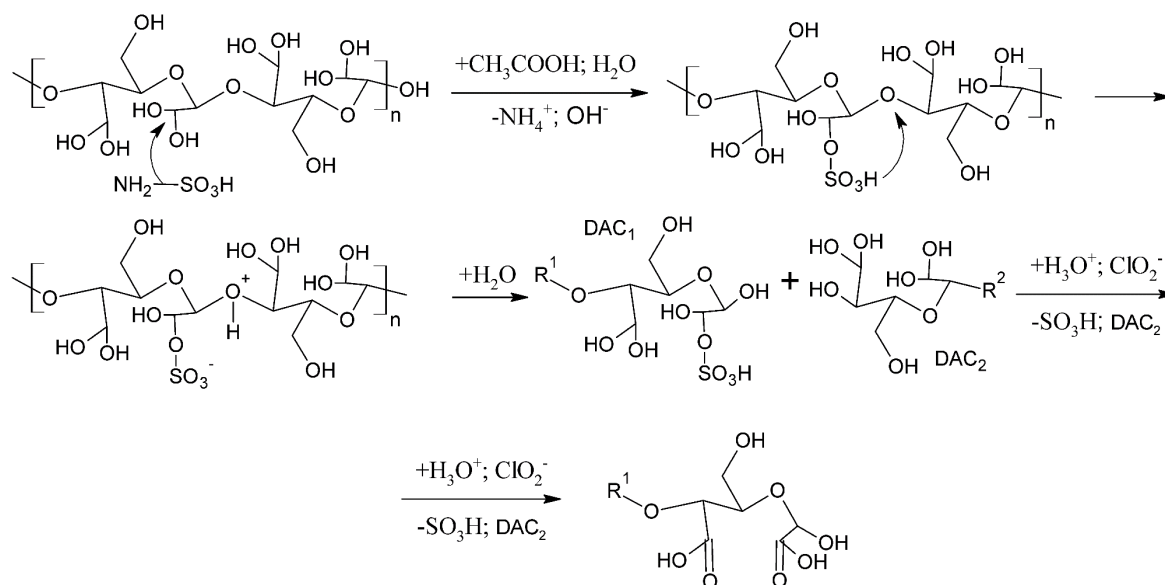
Obrázek 15: Schéma možných reakcí SAMAC s hydratovaným DAC. Arabské číslice vyjadřují pořadí uhlíků v monomeru DAC. Značení 4' je pro kyslík v β(1→4) glykosidické vazbě.

Aby bylo možné rozlišit, o který z těchto mechanismů se jedná, byla využita infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR). Po odečtení spekter DCC připraveného bez SAMAC a DCC modifikovaného prostřednictvím SAMAC ve výsledných FT-IR spektrech (Obr. 16) nebyly zaznamenány vazby síry a uhlíku (S–C). Naopak byly pozorovány pouze vazby mezi sírou a kyslíkem (S–O a O=S=O), což podporuje druhou variantu mechanismu [20].



Obrázek 16: Rozdíl FT-IR spekter DCC připraveného pomocí SAMAC v molárním poměru 1 : 1 (–CHO : SAMAC) a spektra DCC připraveného bez SAMAC. Pásky při 1117 cm^{-1} a 621 cm^{-1} odpovídají vibracím vazeb S–O, respektive O=S=O [20].

Celkový předpokládaný reakční mechanismus sulfonačně-indukovaného štěpení glykosidické vazby je uveden níže (Obr 17). Vychází z předpokladu, že jelikož sekundární oxidace probíhá ve vodném prostředí, –CHO skupiny se nacházejí v hydratované formě a aldehydicke uhlíky obsahují geminální –OH skupiny. V kyselém prostředí (CH_3COOH) se z molekuly SAMAC může odštěpit amonný kation a vzniklý aniont HSO_3^- může vytvořit S–O vazbu na geminální –OH skupině. Estericky vázaná sulfonová skupina (– SO_3H) je tak v optimální pozici, aby došlo k protonaci kyslíku v glykosidické vazbě a vzniku oxoniového kationtu, který velmi snadno hydrolyzuje. Tímto dojde k rozštěpení 1→4 glykosidické vazby. Následně je poté – SO_3H skupina eliminována z polysacharidu během sekundární oxidace působením chloritanu (ClO_2^-), který oxiduje –CHO skupiny na –COOH skupiny (Obr 17).



Obrázek 17: Předpokládaný mechanismus sulfonačně-indukovaného štěpení [20]

6.2 Vliv SAMAC na \bar{M}_w 2,3-dikarboxypolysacharidů

Jak již bylo zmíněno v kapitole výše (Kap. 6.1), vliv klasické kyselé hydrolyzy na štěpení 1→4 glykosidických vazeb pomocí snižování pH lze vyloučit a byl navržen alternativní reakční mechanismus. Nicméně tento experiment byl prováděn pouze u sekundární oxidace DAC, který obsahuje pouze β-(1→4) glykosidické vazby. Bylo tedy nutné vyzkoušet vliv SAMAC na řízení \bar{M}_w i u jiných polysacharidů a zároveň otestovat vliv dalších parametrů reakce na molární hmotnost produktů (reakční doba sekundární oxidace a látková koncentrace NaClO_2 v reakční směsi). Proto byly provedeny tři série sekundárních oxidací u DAC, DAD a DADXA, jak je popsáno v Kapitole 5.3. Výsledné molární hmotnosti v jednotlivých sériích dikarboxypolysacharidů zjištěných metodou GPC jsou zaznačeny v Tabulce 4. Označení vzorků se skládá ze zkratky daného dikarboxypolysacharidu, horního indexu (značí reakční dobu sekundární oxidace v *hod*) a dolního indexu (značí látkovou koncentraci NaClO_2 v reakční směsi v $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3} = M$). Posloupnost názvu vzorků v tabulce udává také posloupnost sérií popsaných výše (série 1–3).

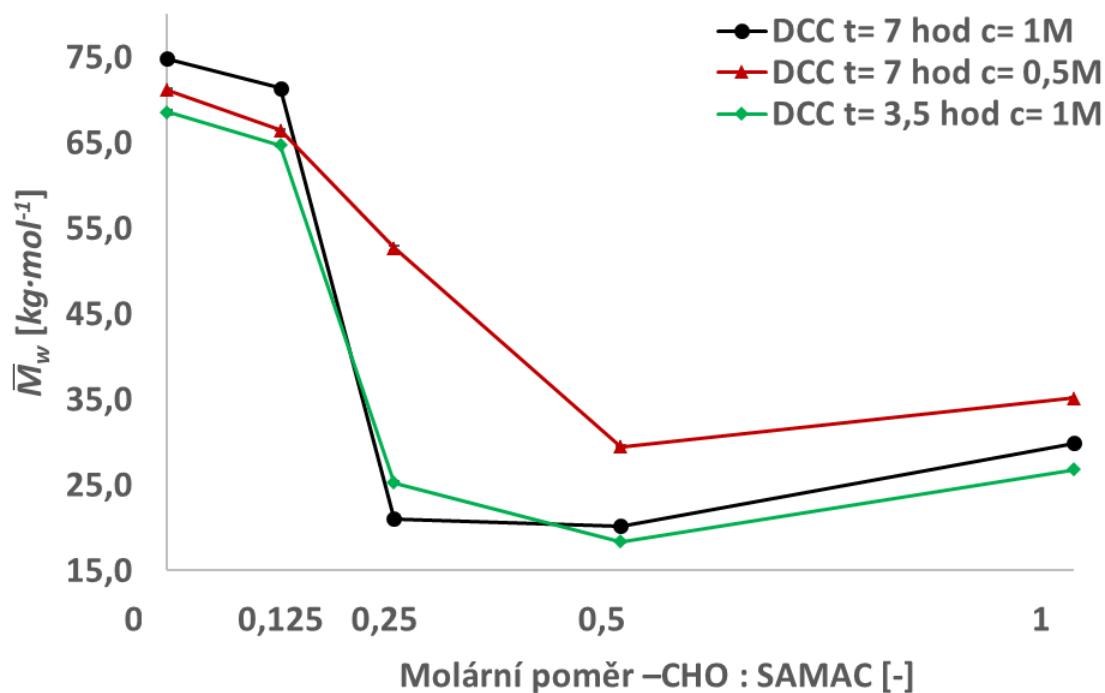
Tabulka 4: Přehled naměřených hmotnostních středů molárních hmotností \bar{M}_w a jejich směrodatných odchylek $\widehat{\sigma}_{\bar{M}_w}$ u DCC, DCD a DCDXA pro daný molární poměr –CHO skupin : SAMAC (V horním indexu je reakční doba v *hod* a v dolním je konečná koncentrace NaClO₂ v reakční směsi v *mol·dm⁻³* neboli *M*).

–CHO : SAMAC		1 : 0	1 : 0,125	1 : 0,25	1 : 0,5	1 : 1
$\bar{M}_w \pm \widehat{\sigma}_{\bar{M}_w}$ [kg·mol ⁻¹]	DCC ₁ ⁷	74,8 ± 0,3	71,4 ± 0,2	21,1 ± 0,1	20,2 ± 0,1	29,8 ± 0,1
	DCC _{0,5} ⁷	71,2 ± 0,1	66,5 ± 0,1	52,7 ± 0,3	29,5 ± 0,1	35,2 ± 0,1
	DCC ₁ ^{3,5}	68,6 ± 0,3	64,7 ± 0,1	25,3 ± 0,1	18,4 ± 0,1	26,8 ± 0,1
	DCD ₁ ⁷	42,8 ± 0,9	22,6 ± 0,1	19,3 ± 0,1	15,3 ± 0,1	21,0 ± 0,1
	DCD _{0,5} ⁷	52,8 ± 0,1	49,1 ± 0,2	41,9 ± 0,1	38,1 ± 0,1	39,1 ± 0,1
	DCD _{0,5} ^{3,5}	55,0 ± 0,1	53,8 ± 0,1	50,8 ± 0,1	44,7 ± 0,1	38,7 ± 0,1
	DCDXA _{0,5} ⁷	179,3 ± 0,2	172,6 ± 0,3	166,0 ± 0,1	151,4 ± 0,4	145,0 ± 0,2
	DCDXA _{0,2} ⁷	165,9 ± 0,1	158,9 ± 0,2	160,3 ± 0,1	161,2 ± 0,2	157,6 ± 0,2
	DCDXA _{0,5} ^{3,5}	179,4 ± 0,1	167,5 ± 0,1	168,3 ± 0,1	156,5 ± 0,1	154,9 ± 0,1

Data z Tabulky 4 jsou pro lepší představu vyobrazena také v grafech (Obr. 18–20), na kterých lze vidět závislost hmotnostního středu molárních hmotností \bar{M}_w jednotlivých dikarboxypolysacharidů na molárním poměru –CHO skupin vůči SAMAC (číselné hodnoty na ose x odpovídají pouze molárnímu množství SAMAC, molární množství –CHO skupin je vždy rovno jedné). Směrodatné odchylky měření jsou s ohledem na zobrazovaný rozsah molárních hmotností malé a v jednotlivých grafech téměř nejsou vidět. Proto jsou pro lepší přehlednost zaznačeny také v Tabulce 4. Jediná pozorovatelná odchylka v grafech je v prvním bodě první série u DCD₁⁷ (Obr. 19)

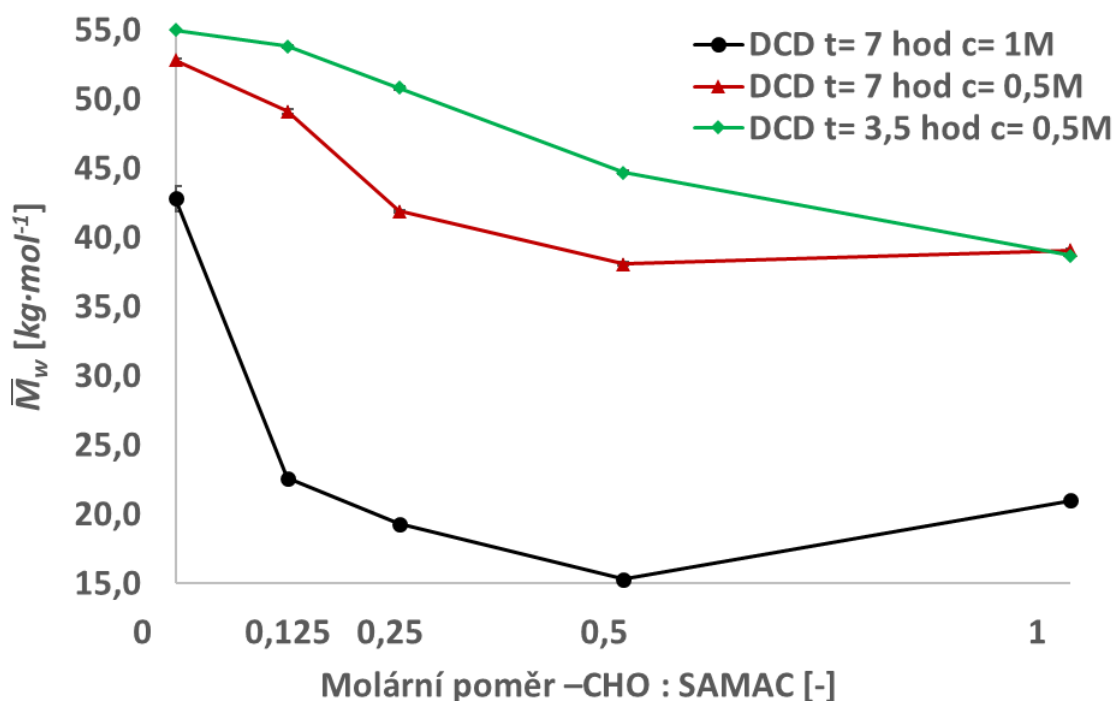
U DCC dochází s rostoucím obsahem SAMAC vůči –CHO skupinám ke snižování \bar{M}_w ve všech sériích až o 75 %, jak můžeme vidět na Obrázku 18 a v Tabulce 4. Pouze u posledního molárního poměru 1 : 1 se objevuje nárůst \bar{M}_w , což může být způsobeno vyšší efektivitou oxidační reakce v nižším pH a tím rychlejší eliminací –SO₃H skupin z aldehydů. Zřejmě také dochází k rychlejšímu vzniku chlornanů, které reagují s SAMAC a nepřímou zabraňují sulfonaci.

Při 0,5M látkové koncentraci oxidačního činidla lze pozorovat nejpomalejší snižování molární hmotnosti DCC ze všech sérií (DCC_{0,5}⁷). Při vyšší látkové koncentraci NaClO₂ (DCC₁⁷, DCC₁^{3,5}) lze vidět u molárního poměru –CHO skupin vůči SAMAC mezi hodnotami 0,125 a 0,25 prudký pokles molární hmotnosti. To může znamenat, že při vyšších koncentracích oxidačního činidla (nižší hodnota pH) dochází k degradaci oxidovaného materiálu. Naopak reakční doba na snižování molární hmotnosti DCC má jen malý vliv.



Obrázek 18: Závislost hmotnostního středu molárních hmotností \bar{M}_w na molárním poměru -CHO skupin 2,3-dialdehydcelulózy (DAC) ku SAMAC v reakční směsi při různých reakčních podmínkách (různá koncentrace NaClO_2 v reakční směsi, reakční doba) u DCC [20].

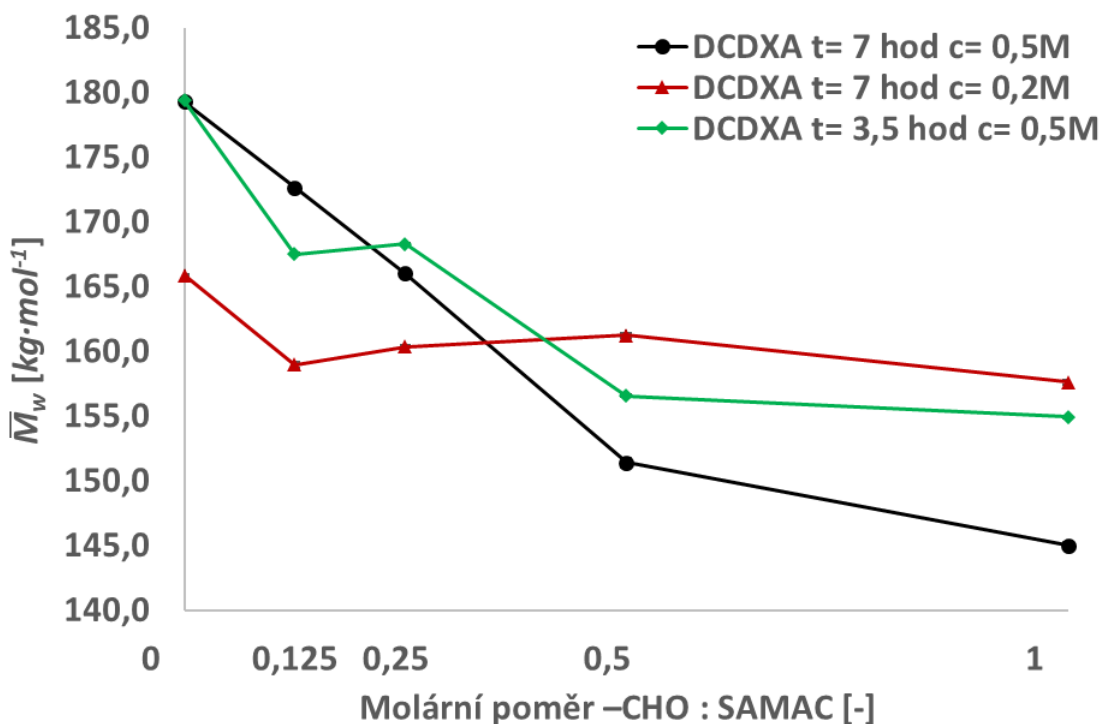
Podobnou závislost, tj. snížení \bar{M}_w s rostoucí koncentrací SAMAC, pozorujeme také u DCD (Obr. 19, Tab. 4). Zase má největší vliv koncentrace oxidačního činidla NaClO_2 v reakční směsi. Ovšem na rozdíl od celulózy dochází u DCD₁⁷, tj. při koncentraci NaClO_2 1M, ke snížení \bar{M}_w v porovnání s ostatními sériemi už při reakci, která neobsahuje SAMAC. Zároveň u hodnoty 0,125 molárního poměru -CHO skupin vůči SAMAC dochází k náhlému poklesu \bar{M}_w až o 50 % a zřejmě tedy dochází k degradaci vzorku při dané koncentraci oxidačního činidla. Po snížení koncentrace NaClO_2 na 0,5M (DCD_{0,5}⁷, DCD_{0,5}^{3,5}) dochází jen k pozvolnému snižování molární hmotnosti se zvyšujícím množstvím SAMAC. Reakční doba sekundární oxidace má na molární hmotnosti také jistý vliv, ovšem daleko menší než koncentrace oxidačního činidla. Při zvyšování množství SAMAC v reakční směsi obsahující 0,5M oxidační činidlo dochází až ke 40% snížení \bar{M}_w u DCD jak po 3,5 hod, tak i po 7 hod reakce (DCD_{0,5}⁷, DCD_{0,5}^{3,5}). Toto snížení je oproti DCC menší, což by mohlo být způsobeno obsahem $\alpha(1\rightarrow6)$ glykosidických vazeb v DCD. To by mohlo znamenat, že sulfonačně-indukované štěpení je efektivní pouze u (1 \rightarrow 4) glykosidických vazeb. Proto byl zkoumán vliv tohoto štěpení na dextranu, který (1 \rightarrow 4) vazby neobsahuje.



Obrázek 19: Závislost hmotnostního středu molárních hmotností \bar{M}_w na molárním poměru -CHO skupin 2,3-dialdehydextrinu (DAD) ku SAMAC v reakční směsi při různých reakčních podmínkách (různá koncentrace NaClO_2 v reakční směsi, reakční doba) u DCD [20].

Jelikož u celulózy (DCC_1^7 , $\text{DCC}_1^{3,5}$), a obzvláště u dextransu (DCD_1^7), se jevila 1M koncentrace oxidačního činidla jako destruktivní pro vzorky, byly u dextransu použity pouze nízké koncentrace NaClO_2 – 0,5M a 0,2M (vzorky $\text{DCDXA}_{0,5}^7$, $\text{DCDXA}_{0,2}^7$, $\text{DCDXA}_{0,5}^{3,5}$). Z Tabulky 4 a grafu na Obrázku 20 lze ale vidět, že s rostoucím množstvím SAMAC v reakční směsi ovšem dochází k poklesu \bar{M}_w pouze o necelých 20 %. Největší vliv na snížení molární hmotnosti DCDXA ($\text{DCDXA}_{0,5}^7$, $\text{DCDXA}_{0,5}^{3,5}$) má opět koncentrace oxidačního činidla, avšak pokles je natolik malý, že se standardní sulfonačně-indukované štěpení nedá považovat jako efektivní metoda snižování \bar{M}_w . Ani změna reakční doby sekundární oxidace nemá podstatný vliv na řízení molární hmotnosti produktu. Lze říct, že tímto způsobem indukované štěpení u dextransu nefunguje jako u dextransu a celulózy, zřejmě protože dextran neobsahuje žádné (1→4) glykosidické vazby. Příčinou neefektivity této reakce u DCDXA je pravděpodobně větší vzdálenost -SO₃H skupin, které jsou prostřednictvím esterové vazby spojeny s -CHO skupinami oxidovaných uhlíků C4 nebo C3, od α(1→6) glykosidických vazeb (dominantní ve struktuře dextransu), než je tomu u uhlíků C2, C3 a (1→4) glykosidických vazeb v DCC a DCD. Pouze adice molekul SAMAC na -CHO skupiny uhlíku C2 tak může u dextransu vést k požadovanému štěpení α(1→6) glykosidické vazby, protože pouze tato -SO₃H skupina se nachází v její blízkosti. Nižší počet vhodných

reakčních míst $-\text{SO}_3\text{H}$ skupin schopných štěpení $\alpha(1\rightarrow6)$ glykosidických vazeb (oproti $1\rightarrow4$ glykosidickým vazbám) vede ke snížení rychlosti této reakce u DADXA.



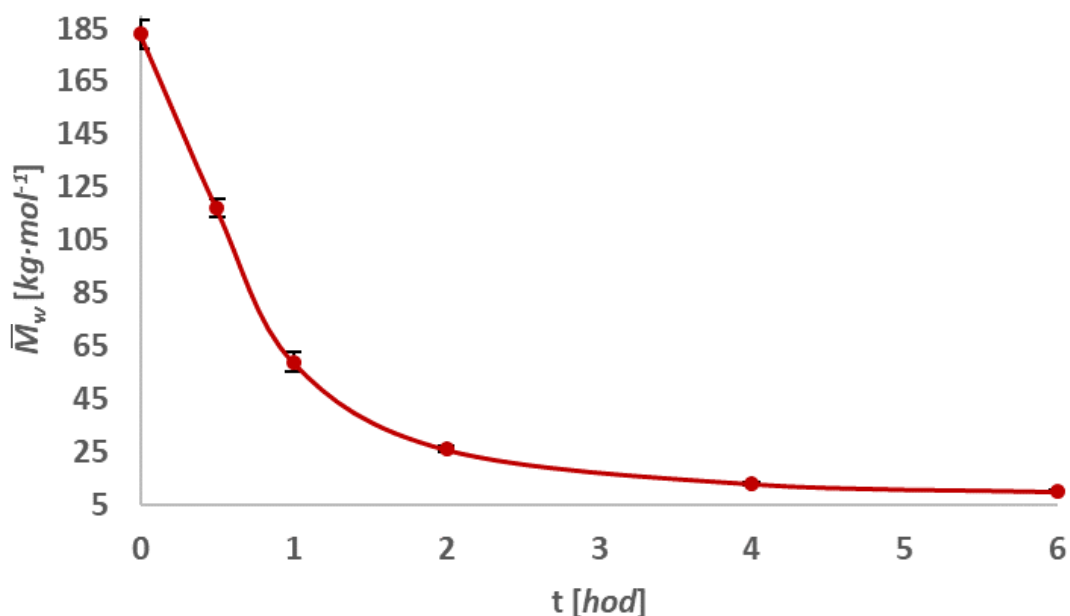
Obrázek 20: Závislost hmotnostního středu molárních hmotností \bar{M}_w na molárním poměru $-\text{CHO}$ skupin směsi dialdehydextranů (DADXA) ku SAMAC v reakční směsi při různých reakčních podmínkách (různá koncentrace NaClO_2 v reakční směsi, reakční doba) u DCDXA

6.3 Vliv pre-sulfonace na \bar{M}_w DCDXA

Protože přidavek SAMAC těsně před zahájením sekundární oxidace u DCDXA vede ke snížení \bar{M}_w pouze do 20 %, byla použita modifikovaná metoda zahrnující tzv. pre-sulfonační krok. Hlavním principem této metody je, že nejdříve okyselený roztok dextransu reagoval po určitou dobu se SAMAC a až po určité době byl přidán roztok oxidačního činidla. Celý postup je detailně popsán v Kapitole 5.3. To by mělo vést k efektivnějšímu rozštěpení $\alpha(1\rightarrow6)$ glykosidických vazeb, protože v reakční směsi nebyl přítomen NaClO_2 , a tudíž nedocházelo ke kompetitivní oxidační eliminaci $-\text{SO}_3\text{H}$ skupin.

Tato metoda vedla ke zdárným výsledkům, kdy po naměření \bar{M}_w pomocí GPC metody bylo zjištěno, že pomocí pre-sulfonace lze snižovat \bar{M}_w DCDXA v rozsahu 5–100 % oproti DCDXA připraveného standardním postupem. Závislost \bar{M}_w na době pre-sulfonace ukazuje Obrázek 21. Po 6 hod byl získán \bar{M}_w DCDXA o velikosti $10 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, přičemž index neuniformity klesl až na 1,43. Během sulfonačního štěpení tedy dochází k značnému poklesu

indexu neuniformity, což je další výhodou tohoto přístupu. Vybrané vzorky DCDXA připravené tímto způsobem byly použity jako nosiče cis-Pt a byla sledována rychlost jeho uvolňování.



Obrázek 21: Řízení hmotnostního středu molárních hmotností \bar{M}_w v závislosti na různých pre-sulfonačních časech t , tj. doby, než bylo přidáno oxidační činidlo u DCDXA.

6.4 Uvolňování cis-Pt z DCDXA

Rychlost uvolňování cis-Pt závisí na jeho obsahu v nosiči, tedy při vyšším obsahu je rychlost uvolňování vyšší, jelikož větší koncentrační gradient je mezi nosičem a rozpouštědlem („hnací“ síla difúze cis-Pt z nosiče do rozpouštědla). Zároveň ale taky závisí na molární hmotnosti nosiče, která se pojí s velikostí náhodných klubek (angl. „random coils“) tvořených makromolekulami nosiče v roztoku. Obecně vzato, čím větší je průměr klubek (a tedy \bar{M}_w nosiče), tím pomaleji se bude cis-Pt uvolňovat, protože po hydrolyze může interagovat s okolními řetězci nosiče, což zpomaluje difúzi do rozpouštědla (okolního prostředí). Naopak při nižších \bar{M}_w nosiče je difúze cis-Pt do okolního prostředí snazší.

Připravené konjugáty (Kap. 5.4) vzniklé reakcí rozpuštěného cis-Pt a DCDXA měly dobrou rozpustnost v PBS 7,4 ($>5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$), ale u DCDXA s vyšším \bar{M}_w došlo k rozpuštění až po několika hodinách, což by mohlo mít dopad na sledované uvolňování cis-Pt. Proto

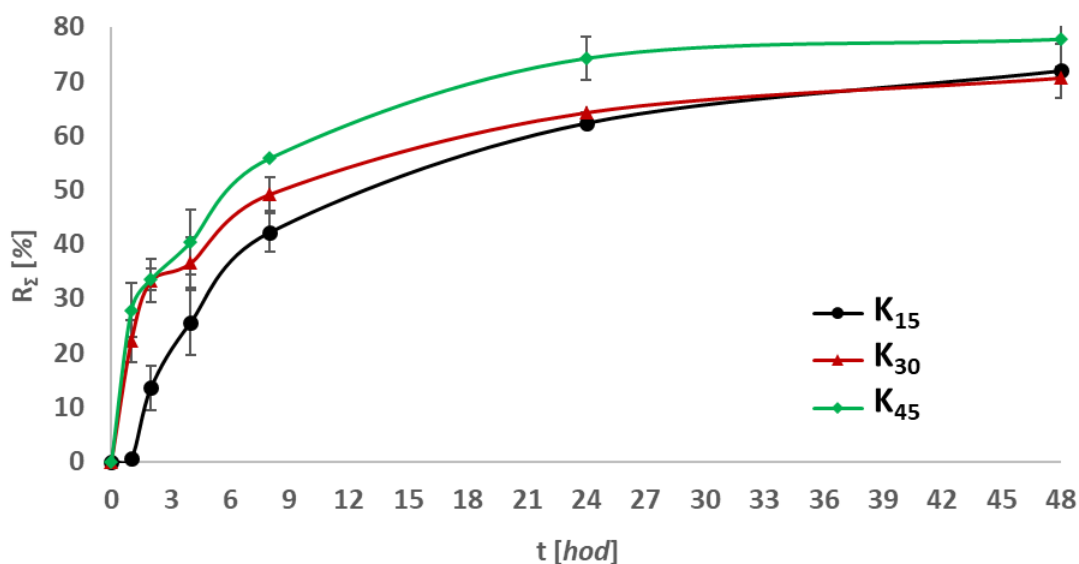
byly provedeny uvolňovací testy až po úplném rozpuštění všech vzorků. Pro snadnější orientaci byly zavedeny následující zkratky jednotlivých konjugátů. Délku řetězců DCDXA odráží písmeno v názvu konjugátu – Krátký (K) a Dlouhý (D), zatímco dolní index odpovídá hmotnostnímu procentu cis-Pt, konkrétně 15, 30 a 45 *hmot. %* (K₁₅, K₃₀, K₄₅, resp. D₁₅, D₃₀, D₄₅).

Uvolňování cis-Pt z nosiče bylo prováděno v podmínkách simulujících prostředí *in vitro*, tj. v PBS 7.4 za teploty 37 °C simulující teplotu těla. Z každého připraveného konjugátu (celkem 6) bylo rozpuštěno 10 mg v 5 ml PBS. Tento roztok byl převeden do dialyzační membrány (MWCO = 3,5 kg·mol⁻¹), která byla vložena do 95 ml téhož média. V daných časech (0, 1, 2, 4, 8, 24, 48 *hod*) byly odebírány alikvótní podíly (5 ml) dialyzátu, přičemž odebrané objemy byly vždy nahrazeny čistým PBS 7.4, aby výsledný reakční objem směsi činil 100 ml. Množství uvolněného cis-Pt v odebraných vzorcích byla stanovena metodou XRF.

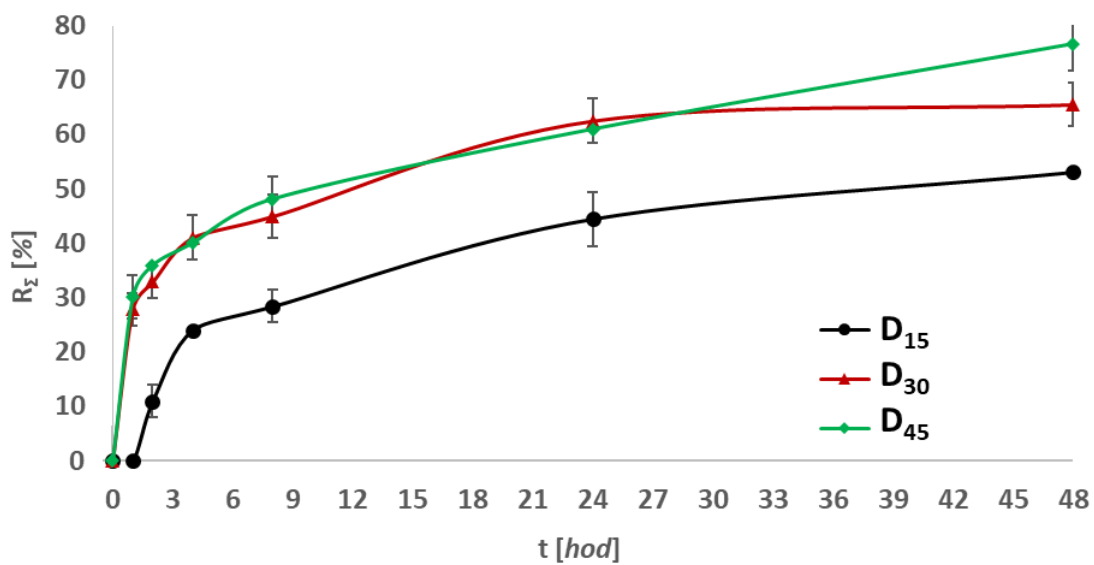
Z naměřených hodnot pro jednotlivé konjugáty (Tab. 5) byly vytvořeny grafy závislosti kumulativního uvolňování cis-Pt na době uvolňování (Obr. 22 a 23). Při porovnání těchto křivek z hlediska obsahu cis-Pt v nosiči je patrné, že rychlost uvolňování je nejvyšší u konjugátů K₄₅ a D₄₅, tj. těch s nejvyšším obsahem navázaného cis-Pt. Co se týče \bar{M}_w nosiče, tak konjugáty s kratšími řetězci K_{15,30,45} (nižší \bar{M}_w) měly rychlejší uvolňování než jejich D-analogy, zejména v prvních 8 *hod* uvolňování. U konjugátů s dlouhými řetězci D_{15,30,45} byl tento prudký nárůst do 4 *hod* a poté následoval jen pomalý růst množství uvolněného cis-Pt, což je důsledkem vzniku větších makromolekulárních klubek nosiče v roztoku, které zpomalují difúzi cis-Pt. Nejrychlejšího uvolňování dosáhl konjugát K₄₅, jelikož má největší množství navázaného cis-Pt a má krátké řetězce. Za 24 *hod* došlo k uvolnění přes 70 % cis-Pt u K₄₅. Nejpomaleji docházelo k uvolňování cis-Pt u D₁₅. Nízký koncentrační gradient a vysoká molární hmotnost zpomalovaly uvolňování léčiva nejvíce. Při porovnání konjugátu s nejrychlejším uvolňováním cis-Pt (K₄₅) a s nejpomalejším uvolňováním (D₁₅) se po 48 *hod* z K₄₅ uvolnilo (78 ± 5) % cis-Pt a z D₁₅ (53 ± 2) %. Rozdíl mezi nimi tedy činí 25 % z celkového množství cis-Pt bez ohledu na odchylky měření.

Tabulka 5: Naměřené hodnoty kumulativního uvolňování R_{Σ} cis-Pt a jeho směrodatné odchylky $\widehat{\sigma}_{R_{\Sigma}}$ u daných vzorků měřené v určitém čase t . K, D představují konjugáty s krátkými, resp. dlouhými řetězci a dolní indexy značí množství navázaného cis-Pt na DCDXA (nosiči) v $hmot. \%$.

t [hod]	$R_{\Sigma} \pm \widehat{\sigma}_{R_{\Sigma}}$ [%]					
	K ₁₅	K ₃₀	K ₄₅	D ₁₅	D ₃₀	D ₄₅
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1	1 ± 1	22 ± 4	28 ± 5	0 ± 0	28 ± 3	30 ± 4
2	14 ± 4	33 ± 4	34 ± 2	11 ± 3	33 ± 3	36 ± 1
4	26 ± 6	37 ± 5	40 ± 6	24 ± 1	41 ± 4	40 ± 1
8	42 ± 4	49 ± 3	55 ± 1	28 ± 3	45 ± 4	48 ± 4
24	62 ± 2	64 ± 1	74 ± 4	45 ± 5	63 ± 4	61 ± 1
48	72 ± 5	71 ± 2	78 ± 5	53 ± 2	66 ± 4	77 ± 5



Obrázek 22: Závislost kumulativního uvolňování (R_{Σ}) cis-Pt z DCDXA o $\bar{M}_w = 13 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ na době (t) (dolní indexy v legendě značí množství cis-Pt navázaného na nosič v $hmot. \%$)



Obrázek 23: Závislost kumulativního uvolňování (R_{Σ}) cis-Pt z DCDXA o $\bar{M}_w = 184 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ na době (t) (dolní indexy v legendě značí množství cis-Pt navázaného na nosič v $h\text{mot. } \%$)

ZÁVĚR

Tato práce se zabývala využitím modifikovaných polysacharidů, které jsou v současnosti hojně využívány, protože se jedná o materiály z udržitelných zdrojů, jsou biokompatibilní a biodegradovatelné. Jedna z modifikací umožňující další využívání těchto látek je regioselektivní oxidace s řízením molární hmotnosti.

Regioselektivní oxidaci polysacharidů můžeme rozdělit do dvou fází – primární oxidace a sekundární oxidace. Během těchto reakcí můžeme ovlivňovat dva základní parametry, konkrétně se jedná o molární hmotnost a stupeň oxidace. Jejich řízením můžeme ovlivnit vlastnosti modifikovaných polysacharidů, což je u řady aplikací velmi žádané.

V této práci jsme se věnovali řízením hmotnostního středu molárních hmotností prostřednictvím kyseliny amidosulfonové u celulózy, dextrinu a dextransu. Molární hmotnost u oxidovaného dextrinu a celulózy lze řídit metodou sulfonačně-indukovaného štěpení 1→4 glykosidických vazeb, kdy byla těsně před zahájením sekundární oxidace přidána kyselina amidosulfonová, která zapříčinila štěpení této vazby. Byl také zkoumán vliv různých podmínek sekundární oxidace na molární hmotnost produktů. Výsledky této části studie jsou shrnuty v článku „*Mechanism of sulfonation – induced chain scission of selectively oxidized polysaccharides*“, publikovaném v časopise *Carbohydrate Polymers* [20], jehož jsem spoluautorem.

U oxidovaného dextransu ovšem tato metoda fungovala jen omezeně, a proto byla vyvinuta její modifikace, při níž se kyselina amidosulfonová přidala již několik hodin před samotnou oxidační reakcí a tím mohlo dojít ke štěpení 1→6 glykosidických vazeb, protože nedocházelo ke kompetitivní eliminaci $-SO_3H$ skupin během sekundární oxidace.

Protože oxidované polysacharidy vykazují velký potenciál ve farmakologii a můžeme je aplikovat v podobě různých hydrogelů nebo nosičů různých léčiv, byl vliv řízení (snižování) molární hmotnosti připravených polysacharidů na rychlost uvolňování léčiva demonstrován na oxidovaném dextransu. Konkrétně byl připraven konjugát dikarboxydextransu a diammin-dichloroplatnatého komplexu, u kterého se ukázalo, že na vyšší rychlost uvolňování má vliv nízká molární hmotnost nosiče (dikarboxydextran) a zároveň vyšší obsah léčiva (diammin-dichloroplatnatý komplex) v nosiči.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MAYES, P. A. Fysiologicky významné sacharidy. In: R. K. MURRAY, *Harperova biochemie*. 4. vyd. v ČR. Praha, Jinočany: Nakladatelství H & H, Vyšehradská, s.r.o., 2002. ISBN 978-80-7319-013-2.
- [2] BEMILLER, James N. 4 – Polysaccharides: Occurrence, Structures, and Chemistry [online]. In: James N. BEMILLER, *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third Edition)*. AACC International Press, 2019, p. 75–101 [cit. 2020-12-14]. ISBN 978-0-12-812069-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812069-9.00004-2
- [3] LI, Z., L. WANG, X. LIN, L. SHEN a Y. FENG. Drug delivery for bioactive polysaccharides to improve their drug-like properties and curative efficacy. *Drug Delivery* [online]. 2017, 24(2), 70–80 [cit. 2020-12-25]. ISSN 1071-7544, 1521-0464. Dostupné z: doi:10.1080/10717544.2017.1396383
- [4] MÜNSTER, L., J. VÍCHA, J. KLOFÁČ, M. MASARŽ, P. KUCHARCZYK a I. KUŘITKA. Stability and aging of solubilized dialdehyde cellulose. *Cellulose* [online]. 2017, 24(7), 2753–2766 [cit. 2021-01-01]. ISSN 0969-0239, 1572-882X. Dostupné z: doi:10.1007/s10570-017-1314-x
- [5] MÜNSTER, L. *Dialdehyde cellulose preparation, characterization and utilization as crosslinking agent for PVA* [online]. Zlín, 2018. Doctoral Thesis. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/43723>
- [6] JELÍNEK, J. a V. ZICHÁČEK. Chromista a prvoci. In: *Biologie pro gymnázia: Nové vydání*. 9. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, s.r.o., 2007. ISBN 978-80-7182-213-4.
- [7] NAVRÁTILOVÁ, J. *Makromolekulární chemie II. přednášky*. Zlín, 2020. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Zlín.
- [8] DAS, D. a S. PAL. Modified Biopolymer-Dextrin Based Crosslinked Hydrogels: Application in Controlled Drug Delivery. *RSC Advances* [online]. 2015, 32(5), 25014–25050 [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: doi:10.1039/C4RA16103C
- [9] LEE, D.-J., J.-M. KIM a S.-T. LIM. Characterization of resistant waxy maize dextrins prepared by simultaneous debranching and crystallization. *Food Hydrocolloids* [online]. 2021, 112, 106315 [cit. 2021-03-01]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106315
- [10] DHANESHWAR, S., M. KANDPAL, N. GAIROLA a S. KADAM. Dextran: A promising macromolecular drug carrier. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2006, 68(6), 705 [cit. 2021-03-16]. ISSN 0250-474X. Dostupné z: doi:10.4103/0250-474X.31000
- [11] MÜNSTER, L., M. FOJTŮ, Z. CAPÁKOVÁ, M. MUCHOVÁ, L. MUSILOVÁ, T. VACULOVÍČ, J. BALVAN, I. KUŘITKA, M. MASARŽÍK a J. VÍCHA. Oxidized polysaccharides for anticancer-drug delivery: What is the role of structure? *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, 257, 117562 [cit. 2021-03-16]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2020.117562

- [12] GOODARZI, N., R. VARSHOCHIAN, G. KAMALINIA, F. ATYABI a R. DINARVAND. A review of polysaccharide cytotoxic drug conjugates for cancer therapy. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, 92(2), 1280-1293 [cit. 2021-03-16]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.036
- [13] VARSHOSAZ, J. Dextran conjugates in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2012, 9(5), 509-523 [cit. 2021-03-16]. ISSN 1742-5247, 1744-7593. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.2012.673580
- [14] MEHVAR, R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *Journal of Controlled Release* [online]. 2000, 69(1), 1-25 [cit. 2021-04-15]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(00)00302-3
- [15] MÜNSTER, L., M. FOJTŮ, Z. CAPÁKOVÁ, T. VACULOVÍČ, M. TVRDOŇOVÁ, I. KUŘITKA, M. MASÁŘÍK a J. VÍCHA. Selectively Oxidized Cellulose with Adjustable Molecular Weight for Controlled Release of Platinum Anticancer Drugs. *Biomacromolecules* [online]. 2019, 20(4), 1623–1634 [cit. 2021-04-15]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.8b01807
- [16] KOBAYASHI, M., T. URAYAMA, I. SUZAWA, S. TAKAGI, K. MATSUDA a E. ICHISHIMA. Cyclodextrin–Dialdehyde Prepared by Periodate Oxidation. *Agricultural and Biological Chemistry* [online]. 1988, 52(11), 2695–2702 [cit. 2021-04-15]. ISSN 0002-1369. Dostupné z: doi:10.1080/00021369.1988.10869123
- [17] ISOGAI, A., T. SAITO a H. FUKUZUMI. TEMPO – oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale* [online]. 2011, 3(1), 71–85 [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: doi:10.1039/C0NR00583E
- [18] KIM, U.-J., S. KUGA, M. WADA, T. OKANO a T. KONDO. Periodate Oxidation of Crystalline Cellulose. *Biomacromolecules* [online]. 2000, 1(3), 488–492 [cit. 2021-04-15]. ISSN 1525-7797, 1526–4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm0000337
- [19] KRISTIANSEN, K. A., A. POTTHAST a B. E. CHRISTENSEN. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydrate Research* [online]. 2010, 345(10), 1264–1271 [cit. 2021-04-15]. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/j.carres.2010.02.011
- [20] MÜNSTER, L., B. HANULÍKOVÁ, M. MACHOVSKÝ, F. LATEČKA, I. KUŘITKA a J. VÍCHA. Mechanism of sulfonation-induced chain scission of selectively oxidized polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, 229 [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115503
- [21] LIIMATAINEN, H., M. VISANKO, J. A. SIRVIÖ, O. E. O. HORMI a J. NIINIMAKI. Enhancement of the Nanofibrillation of Wood Cellulose through Sequential Periodate–Chlorite Oxidation. *Biomacromolecules* [online]. 2012, 13(5), 1592–1597 [cit. 2021-04-15]. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm300319m
- [22] KIM, U.-J., M. WADA a S. KUGA. Solubilization of dialdehyde cellulose by hot water. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2004, 56(1), 7-10 [cit. 2021-04-15]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2003.10.013

- [23] KALENDOVÁ, A. *Charakterizace polymerů*. Zlín, 2021. přednášky. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Zlín.
- [24] INGR, M. *Fyzikální chemie II*. Zlín, 2020. přednášky. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [25] ŠINDELÁŘ, V. Makromolekulární chemie. In: [online]. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Brno. 2009 [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/podzim2009/C4120/MakromolekularniChemie_09.pdf
- [26] ZIKMUNDOVÁ, E. C6920. In: [online]. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Brno. 2017 [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/sci/podzim2017/C6920/um/>
- [27] X-Ray Fluorescence Spectroscopy (XRF) – Basics. *XRF Spectroscopy* [online]. [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: <https://xrf-spectroscopy.com/>
- [28] *Liquid chromatograph Breeze – Centrum polymerních systémů UTB Zlín* [online]. [cit. 2021-04-24]. Dostupné z: <http://cps.utb.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/separacni-metody-chromatografy/708-chromatograf-kapalinovy-breeze>
- [29] *FT-IR spektrometr Nicolet 6700 – Centrum polymerních systémů UTB Zlín* [online]. [cit. 2021-04-24]. Dostupné z: <http://cps.utb.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/spektroskopie/162-ft-ir-spektrometr-nicolet-6700>
- [30] *Elementární analýza – Centrum polymerních systémů UTB Zlín* [online]. [cit. 2021-04-24]. Dostupné z: <http://cps.utb.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/spektroskopie/156-elementarni-analyza>
- [31] VEELAERT, S., D. DE WIT, K. F. GOTLIEB a R. VERHÉ. Chemical and physical transitions of periodate oxidized potato starch in water. *Carbohydrate Polymers* [online]. 1997, 33(2), 153–162 [cit. 2021-04-24]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/S0144-8617(97)00046-5

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

$\widehat{\sigma}_{\overline{M}_w}$	Odhad odchylky průměru hmotnostního středu molární hmotnosti
$\widehat{\sigma}_{R_\Sigma}$	Odhad odchylky průměru kumulativního uvolňování
AGP	D-anhydroglukopyranózová jednotka
Cis-Pt	Diammin-dichloroplatnatý komplex
Cis-Pt–DCDXA	Konjugát diammin-dichloroplatnatého komplexu
CMD	Karboxymethyldextran
D	DCDXA s dlouhými řetězci
D ₁₅	DCDXA s dlouhými řetězci s navázaným cis-Pt o 15hmot. %
D ₃₀	DCDXA s dlouhými řetězci s navázaným cis-Pt o 30hmot. %
D ₄₅	DCDXA s dlouhými řetězci s navázaným cis-Pt o 45hmot. %
Da	Dalton
DAC	2,3-dialdehydcelulóza
DAD	2,3-dialdehydextrin
DADXA	Směs dialdehydextranů
DCC	2,3-dikarboxycelulóza
DCC ₁ ⁷	2,3-dikarboxycelulóza připravená 7hod sekundární oxidací při látkové koncentraci oxidačního činidla 1M
DCC _{0,5} ⁷	2,3-dikarboxycelulóza připravená 7hod sekundární oxidací při látkové koncentraci oxidačního činidla 0,5M
DCC ₁ ^{3,5}	2,3-dikarboxycelulóza připravená 3,5hod sekundární oxidací při látkové koncentraci oxidačního činidla 1M
DCC_0	2,3-dikarboxycelulóza s množstvím SAMAC odpovídající molárnímu poměru –CHO : SAMAC (1 : 0)
DCC_0,125	2,3-dikarboxycelulóza s množstvím SAMAC odpovídající molárnímu poměru –CHO : SAMAC (1 : 0,125)
DCC_0,25	2,3-dikarboxycelulóza s množstvím SAMAC odpovídající molárnímu poměru –CHO : SAMAC (1 : 0,25)
DCC_0,5	2,3-dikarboxycelulóza s množstvím SAMAC odpovídající molárnímu poměru –CHO : SAMAC (1 : 0,5)

DCC_1	2,3-dikarboxycelulóza s množstvím SAMAC odpovídající molárnímu poměru –CHO : SAMAC (1 : 1)
DCD	2,3-dikarboxydextrin
DCD ₁ ⁷	2,3-dikarboxydextrin připravený 7hod sekundární oxidací při látkové koncentraci oxidačního činidla 1M
DCD _{0,5} ⁷	2,3-dikarboxydextrin připravený 7hod sekundární oxidací při látkové koncentraci oxidačního činidla 0,5M
DCD _{0,5} ^{3,5}	2,3-dikarboxydextrin připravený 3,5hod sekundární oxidací při látkové koncentraci oxidačního činidla 0,5M
DCDXA	Směs dikarboxydextranů
DCDXA _{0,5} ⁷	Směs dikarboxydextranů připravená 7hod sekundární oxidací při látkové koncentraci oxidačního činidla 0,5M
DCDXA _{0,2} ⁷	Směs dikarboxydextranů připravená 7hod sekundární oxidací při látkové koncentraci oxidačního činidla 0,2M
DCDXA _{0,5} ^{3,5}	Směs dikarboxydextranů připravená 3,5hod sekundární oxidací při látkové koncentraci oxidačního činidla 0,5M
EDX-XRF	Energy Dispersive X-ray Fluorescence
FT-IR	Fourier Transform InfraRed
GPC	Gel permeation chromatography
<i>hmot. %</i>	Hmotnostní procenta
K	DCDXA s krátkými řetězci
K ₁₅	DCDXA s krátkými řetězci s navázaným cis-Pt o 15 <i>hmot. %</i>
K ₃₀	DCDXA s krátkými řetězci s navázaným cis-Pt o 30 <i>hmot. %</i>
K ₄₅	DCDXA s krátkými řetězci s navázaným cis-Pt o 45 <i>hmot. %</i>
K _α	Rentgenově fluorescenční záření z přechodu elektronu z L slupky do K
K _β	Rentgenově fluorescenční záření z přechodu elektronu z M slupky do K
<i>M</i>	Molární
<i>M</i> ₀	Molární hmotnost monomerní jednotky polymeru
<i>m</i> _{<i>i</i>}	Hmotnost makromolekul <i>i</i> -té frakce
<i>M</i> _{<i>i</i>}	Molární hmotnost makromolekul <i>i</i> -té frakce
\bar{M}_n	Číselný střed molárních hmotností

\bar{M}_w	Hmotnostní střed molárních hmotností
MWCO	Molecular Weight Cut Off
\bar{M}_z	Velikostní střed molárních hmotností
PBS	Phosphate-buffered Saline
pH	Záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkového kationtu
P_i	Polymerační stupeň makromolekul i-té frakce
pKa	Disociační konstanta kyseliny
\bar{P}_n	Číselně střední polymerační stupeň
\bar{P}_w	Hmotnostně střední polymerační stupeň
R_Σ	Kumulativní uvolňování
SAMAC	Kyselina amidosulfonová
t	Doba reakce
TEMPO	(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl
VA	kyselina akrylová
w_i	Hmotnostní zlomek makromolekul i-té frakce
X	Index neuniformity (polydisperzity)
XRF	Rentgenově-fluorescenční spektrometrie
x_i	Molární zlomek makromolekul i-té frakce

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktra řetězce celulózy složeného z jednotek celobiózy nebo AGP (uvedeno také číslování atomů uhlíku v jednotce). Dále redukující a neredukující konec řetězce a β -(1 \rightarrow 4) glykosidická vazba.	12
Obrázek 2: Reakce kyseliny octové s monomerem celulózy.	15
Obrázek 3: Nitrace celulózy.	15
Obrázek 4: Reakce alkylhalogenidu a monomeru celulózy.	15
Obrázek 5: Struktura dextrinu (<i>m</i> a <i>n</i> značí procentuální zastoupení glykosidických vazeb; <i>R</i> je postranní řetězec).	17
Obrázek 6: Struktura dextransu (<i>m</i> a <i>n</i> značí procentuální zastoupení glykosidických vazeb; <i>R</i> je postranní řetězec dextransu).	18
Obrázek 7: Mechanismus reakce molekuly periodátu a monomerní jednotky AGP. A : Obecný mechanismus reakce molekuly periodátu a monomerní jednotky AGP s β -(1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou (primární oxidace celulózy); B : Atak periodátu na –OH skupiny C2 a C3, respektive C3 a C4 neredukujícího konce řetězce celulózy, kde dochází ke dvojité oxidaci a odštěpení kyseliny mravenčí. Dále na –OH skupiny C2 a C3 monomerní jednotky AGP, kde dochází k primární oxidaci a štěpení vazby mezi C2 a C3; C : Periodát nereaguje s monomerní jednotkou spojenou β -(1 \rightarrow 3) glykosidickou vazbou kvůli absenci vicinálních –OH skupin.	20
Obrázek 8: Mechanismus oxidace aldehydu NaClO ₂ (princip sekundární oxidace)	21
Obrázek 9: Primární a sekundární oxidace celulózy	21
Obrázek 10: Různé možné struktury DAC po primární oxidaci. I : dialdehyd; II : hydratovaný dialdehyd vznikající na začátku sekundární oxidace po okyselení reakční směsi; III : hemialdal; IV a V : intermolekulární hemiacetaly; VI a VII : intramolekulární hemiacetaly	22
Obrázek 11: Primární a sekundární oxidace dextrinu	23
Obrázek 12: Primární a sekundární oxidace dextransu.	25
Obrázek 13: Reakce kyseliny amidosulfonové (SAMAC) a kyseliny chlorné ve dvou fázích	26
Obrázek 14: Schéma principu rentgenové fluorescenční metody (XRF). K, L, M představují tři elektronové vrstvy (slupky) v atomu. Množství elektronů v M vrstvě je pouze demonstrativní, skutečný počet se liší. K _{α} a K _{β} jsou rentgenová fluorescenční záření odpovídající deexcitaci elektronu z L vrstvy do K vrstvy, respektive z M vrstvy do K vrstvy	31
Obrázek 15: Schéma možných reakcí SAMAC s hydratovaným DAC. Arabské číslice vyjadřují pořadí uhlíků v monomeru DAC. Značení 4' je pro kyslík v β (1 \rightarrow 4) glykosidické vazbě.	40
Obrázek 16: Rozdíl FT-IR spekter DCC připraveného pomocí SAMAC v molárním poměru 1 : 1 (–CHO : SAMAC) a spektra DCC připraveného bez SAMAC. Pásky při 1117 cm ⁻¹ a 621 cm ⁻¹ odpovídají vibracím vazeb S-O, respektive O=S=O.	41
Obrázek 17: Předpokládaný mechanismus sulfonačně-indukovaného štěpení	42

- Obrázek 18: Závislost hmotnostního středu molárních hmotností \bar{M}_w na molárním poměru –CHO skupin 2,3-dialdehydcelulózy (DAC) ku SAMAC v reakční směsi při různých reakčních podmínkách (různá koncentrace NaClO_2 v reakční směsi, reakční doba) u DCC..... 44
- Obrázek 19: Závislost hmotnostního středu molárních hmotností \bar{M}_w na molárním poměru –CHO skupin 2,3-dialdehydextrinu (DAD) ku SAMAC v reakční směsi při různých reakčních podmínkách (různá koncentrace NaClO_2 v reakční směsi, reakční doba) u DCD..... 45
- Obrázek 20: Závislost hmotnostního středu molárních hmotností \bar{M}_w na molárním poměru –CHO skupin směsi dialdehydextranů (DADXA) ku SAMAC v reakční směsi při různých reakčních podmínkách (různá koncentrace NaClO_2 v reakční směsi, reakční doba) u DCDXA 46
- Obrázek 21: Řízení hmotnostního středu molárních hmotností \bar{M}_w v závislosti na různých pre-sulfonačních časech t , tj. doby než bylo přidáno oxidační činidlo u DCDXA..... 47
- Obrázek 22: Závislost kumulativního uvolňování (R_Σ) cis-Pt z DCDXA o $\bar{M}_w = 13 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ na době (t) (dolní indexy v legendě značí množství cis-Pt navázaného na nosič v *hmot. %*) 49
- Obrázek 23: Závislost kumulativního uvolňování (R_Σ) cis-Pt z DCDXA o $\bar{M}_w = 184 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ na době (t) (dolní indexy v legendě značí množství cis-Pt navázaného na nosič v *hmot. %*) 50

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Stupeň polymerace u vybraných zdrojů celulózy.....	12
Tabulka 2: Krystalinita celulózy z různých zdrojů.	14
Tabulka 3: Výsledky a podmínky přípravy DCC za použití SAMAC nebo H ₂ SO ₄ . Značení vzorků udává rostoucí množství přidané SAMAC vůči aldehydickým skupinám (-CHO : SAMAC je molární poměr aldehydických skupin v DCC vůči SAMAC; pH je hodnota pH nastavená v reakční směsi; \bar{M}_w je hmotnostní střed molárních hmotností; X je stupeň neuniformity (polydisperzity).	40
Tabulka 4: Přehled naměřených hmotnostních středů molárních hmotností \bar{M}_w a jejich směrodatných odchylek $\widehat{\sigma}_{\bar{M}_w}$ u DCC, DCD a DCDXA pro daný molární poměr -CHO skupin : SAMAC (V horním indexu je reakční doba v <i>hod</i> a v dolním je konečná koncentrace NaClO ₂ v reakční směsi v <i>mol·dm⁻³</i> neboli <i>M</i>).	43
Tabulka 5: Naměřené hodnoty kumulativního uvolňování R_Σ cis-Pt a jeho směrodatné odchylky $\widehat{\sigma}_{R_\Sigma}$ u daných vzorků měřené v určitém čase <i>t</i> . K, D představují konjugáty s krátkými, resp. dlouhými řetězci a dolní indexy značí množství navázaného cis-Pt na DCDXA (nosiči) v <i>hmot. %</i>	49