

POLI(KWAS ASPARAGINOWY) JAKO BIOMATERIAŁ. SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE

JAN PIELICHOWSKI, EWA DZIKI, JOLANTA POLACZEK

SAMODZIELNA KATEDRA CHEMII I TECHNOLOGII TWORZYW SZTUCZNYCH,
POLITECHNIKA KRAKOWSKA

Streszczenie

Niniejsza praca zawiera krótki wstęp literaturowy poświęcony roli poli(kwasu asparaginowego) w dziedzinie biomateriałów, prezentuje nowatorską metodę otrzymywania tego polimeru z bezwodnika maleinowego i amoniaku w polu promieniowania mikrofalowego, oraz omawia jego właściwości termiczne.

Słowa kluczowe: poli(kwas asparaginowy), promieniowania mikrofalowe, analiza termiczna.

Wprowadzenie

W dziedzinie materiałów biomedycznych i farmaceutycznych znaczenie użytkowe mają poli(α L aminokwasy), które ulegają pełnej degradacji enzymatycznej w organizmach żywych [1]. Intensywne badania prowadzone w ciągu ostatnich trzydziestu lat zaowocowały szeregiem aplikacji głównie jako czasowe implanty, szwy, kleje medyczne lub matryce w systemie podawania leków [2, 3]. Stosunkowo nowym polimerem w tej grupie jest poli(kwas asparaginowy) (PKA), który ze względu na zdolność do biodegradacji i nietoksyczność coraz mocniej ugruntowuje swoją pozycję na rynku medycznym i farmaceutycznym.

Polimery kwasu asparaginowego odgrywają kluczową rolę w procesach mineralizacji i krystalizacji w warunkach *in vivo* [4]. Stanowią one wierzchnią warstwę implantów ułatwiającą integrację żywej tkanki z wszczepem. Bradt i inni opisują nowe implanty kostne, w których doskonałą związaną włókien kolagenowych z krystalitami węgla wapnia przez dodanie poli(asparaginianów) do mieszaniny reakcyjnej. Przeprowadzone przez nich badania dowodzą, że polimery te inhibują proces transformacji amorficzno - krystalicznej.

Obecnie wiele badań koncentruje się na wykorzystaniu syntetycznego PKA w aplikacjach farmaceutycznych [3]. Jednym z przykładów jest użycie tego polimeru jako składnika hamującego nefrotoksyczność antybiotyków aminoglikozydowych bez ujemnego wpływu na działanie lecznicze specyfiku. Znane są przykłady wykorzystania PKA do modyfikacji chemicznej innych polimerów. Poli(kwas laktydowy) charakteryzuje się dobrą biokompatybilnością i niską immunogennością, ale nie zawiera reaktywnych grup i nie rozpuszcza się w wodzie, aby zmodyfikować te właściwości i wprowadzić grupy funkcyjne otrzymuje się kopolimery kwas laktydowy / kwas asparaginowy stanowiące dalej bazę do kontrolowanego uwalniania leków [5].

Poli(kwas asparaginowy) jest otrzymywany na drodze polimeryzacji termicznej N-karboksybezwodników α -amino-kwasów, kwasu asparaginowego, bądź pochodnych kwasu maleinowego [6]. Jednak, niezależnie od zastosowane-

POLY(ASPARTIC ACID) AS A BIOMATERIAL. SYNTHESIS AND PHYSICAL PROPERTIES

JAN PIELICHOWSKI, EWA DZIKI, JOLANTA POLACZEK

DEPARTMENT OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF POLYMERS,
CRACOW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Abstract

This paper consist of a short literature introduction about the role of poly(aspartic acid) as a biomaterial and the description of the new original synthesis method of this polymer from maleic anhydride and ammonium under microwave irradiation thermal properties is presented.

Key words: poly(aspartic acid), microwave irradiation, thermal analysis.

Introduction

In the field of medical and pharmaceutical materials a practical significance have got only poly(α L amino acid)s, which have been found to be completely enzymatic degradable in living organisms [1]. Intensive research, during the last 30 years has been effected with many applications, especially as temporary implants, sutures, medical glue as well as a basis in drug delivery system [2, 3]. Relatively a new polymer in this group is poly(aspartic acid) (PAS), which due to its biodegradability and non-toxicity has become more and more important in medical and pharmaceutical field.

Polymers of aspartic acid play a key role in mineralization and crystallization processes *in vivo* [4]. They consist of an upper layer of implants, which makes easier its integration with living tissue. Bradt et al. described a new bone implants, in which adhesion between collagen fibril and calcium carbonate crystallites is improved by adding poly(aspartate)s into reaction mixture. The experiments show the PAS delay amorphous - crystalline transformation.

Currently, many medical researches on synthetic PAS concern the use of these polymers in pharmaceutical applications [3]. One example is the use of PAS as an inhibiting agent of aminoglycoside - induced nephrotoxicity, without a negative influence on therapeutic effect of the drug. It is known that PAS could be used to chemical modifications of other polymers. Poly(lactic acid) characterises in good biocompatibility and low immunogenicity, but it has no reactive side - chain groups and is water insoluble. To modify its properties and to introduce functional pendant groups copolymers of lactic acid and aspartic acid have been prepared, which can be used as component in controlled drug deliverance [5].

Poly(aspartic acid) is obtained by thermal polymerisation of N-carboxyanhydride of α -amino acids, aspartic acid or maleic acid derivatives [6]. However, regardless of the kind of monomer, the polymerisation's process is carried out at high temperature during several hours in the present of a catalyst, for example phosphorus acid (V). It is not out of question that polymer obtained in the synthetic pathways,

go monomeru, proces polimeryzacji wymaga wielogodzinnego ogrzewania w wysokich temperaturach w obecności katalizatora np. kwasu fosforowego (V). Nie wykluczone, że tak otrzymany polimer, nawet po dokładnym oczyszczeniu zawiera śladowe ilości toksycznego inicjatora, a zatem jego obecność w materiałach biomedycznych i farmaceutycznych budzić może uzasadnione kontrowersje. Natomiast prowadzenie procesu bez obecności katalizatora przebiega z małą wydajnością i w znacznie dłuższym czasie.

W niniejszej pracy przedstawiamy nową metodę syntezy poli(kwasu asparaginowego) w polu promieniowania mikrofalowego prowadzoną bez udziału katalizatora [7].

Materiał i metoda

Do syntezy wykorzystano bezwodnik maleinowy (cz.d.a.) i wodorotlenek amonu o zawartości amoniaku ok. 25% (cz.d.a.) (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A Gliwice) Syntezę prowadzono w wielomodowym reaktorze mikrofalowym firmy "Plazmatronika" (Polska) z mieszadłem magnetycznym i maksymalną mocą promieniowania 300 W.

Analiza termogravimetryczna TG

Pomiar przeprowadzono przy użyciu analizatora termogravimetrycznego Netzsch TG - 209. Próbkę o masie ~ 4,5 mg analizowano przy szybkości ogrzewania 10K / min. w atmosferze argonu, w zakresie temperatur 30°C - 600°C [8].

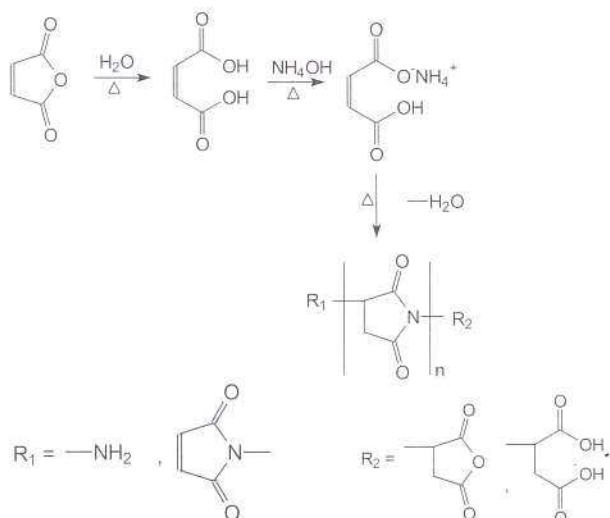
Różnicowa kalorymetria skaningowa DSC

Pomiar DSC przeprowadzono za pomocą aparatu Netzsch DSC 200. Próbkę o masie ~ 5 mg umieszczono w zamkniętym naczynku aluminiowym. Jako wzorce do kalibracji zastosowano rtęć i ind; odnośnik stanowiło puste naczynko aluminiowe. Pomiary prowadzono przy ogrzewaniu 10 K/min [9].

Wyniki i dyskusja

Synteza PKA przebiega w kilku etapach jak przedstawiono na RYS. 1.

W pierwszej kolejności z bezwodnika maleinowego otrzymano kwas maleinowy. Następnie do układu wprowadzono



RYS. 1. Przebieg syntezy poli(kwasu asparaginowego) z bezwodnika maleinowego i amoniaku
FIG. 1. Synthetic pathway of poly(aspartic acid) from maleic anhydride and ammonium.

includes some toxic initiator, even after precise cleaning. Therefore, its presence in biomedical and pharmaceutical materials can be controversial. However, the performing of process without using a catalyst results in low yield and definitely longer reaction time.

In this paper a new synthesis method of poly(aspartic acid) under microwave irradiation without using a catalyst is presented [7].

Material and method

Maleic anhydride and ammonium hydroxide (including ca. 25% ammonium) were obtained from Polskie Odczynniki Chemiczne S.A. Gliwice, Poland. The synthesis was carried out using a multimode microwave reactor 'Plazmatronica' (Poland), with a magnetic mixer and maximal microwave power 300W.

Thermogravimetric analysis TG

The measurement was performed using a Netzsch TG-209. The ~ 4,5 mg sample was analysed at the heating rate of 10 K/min from 30°C to 600°C under nitrogen atmosphere [8].

Different Scanning Calorimetric DSC

For the DSC measurement a Netzsch DSC 200 was employed. Sample of ca. 5 mg weight was placed in sealed aluminium pan. The heating rate of 10 K/min was applied. Prior to use the calorimeter was calibrated with a mercury and indium standards; and an empty aluminium pan was used as a reference [9].

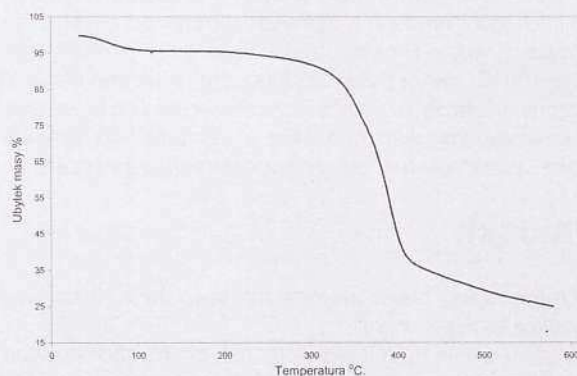
Results and discussion

The synthesis of PAS occurs in several steps as shown in FIG.1.

Firstly maleic acid was obtained from maleic anhydride. Ammonium, in the form of aqua solution was added into the mixture which was heated to obtain a starting monomer - monoammonium salt of maleic acid. The salt produced in this way, as an aqueous solution was polycondesated under microwave irradiation. Power level was selected that the mixture was heated up to the required temperature. The final product, anhydrous poly(aspartic acid), was washed with water several times to get neutral pH.

Thermal stability of PAS is shown in FIG. 2.

At the first stage, before reaching the temperature of 100°C evaporation of a solvent takes place, as evidenced by a ca.



RYS. 2. Krzywa TG poli(kwasu asparaginowego).
FIG. 2. TG profile of poly(aspartic acid).

no amoniak w postaci wodnego roztworu i prowadzono ogrzewanie w celu otrzymania monomeru wyjściowego - soli amonowej kwasu maleinowego. Otrzymaną w ten sposób sól, w postaci wodnego roztworu poddano polikondensacji w polu promieniowania mikrofalowego. Wysokość mocy dobierano tak, aby promieniowanie emitowane było w sposób ciągły i jednocześnie zapewniało ogrzewanie układu do żądanej temperatury. Polikondensację prowadzono do całkowitego odprowadzenia wody z układu, stopniowo podnosząc temperaturę. Produkt końcowy, bezwodny poli(kwasu asparaginowy), oczyszczano wielokrotnie przemycząc wodą do uzyskania odczynu obojętnego.

Stabilność termiczną PKA przedstawiono na RYS. 2.

Stabilność termiczną zobrazowano krzywą degradacji PKA, z widocznym, wyraźnym etapem rozpadu, rozpoczynającym się w temperaturze ok. 300°C. W pierwszym etapie, do temperatury 100°C następuje odparowanie wody, sygnalizowane ok. 5% ubytkiem masy. Powolny rozkład polimeru rozpoczyna się w temperaturze ok. 200°C, a najbardziej intensywny w zakresie temperatur 390°C - 420°C, do pozostałości stałej ok. 30%.

Degradacja termiczna PKA przebiega kilkietapowo, a taki przebieg krzywej jest wynikiem nałożenia się kilku procesów degradacji wskutek zbliżonych wartości energii dysocjacji wiązań. Większość poli(aminokwasów) rozkłada się z utworzeniem aminokwasów, dwutlenku węgla, amoniaku i związków karbonylowych [10]. Zakres temperaturowy pomiędzy przejściem polimeru w stan elastyczny i początkiem jego rozkładu jest wystarczająco szeroki, istnieje zatem możliwość wykorzystania PKA jako składnika kompozytu przetwarzanego np. metodą wtrysku. Jednocześnie temperatura zeszklenia jest zdecydowanie wyższa od temperatury ciała ludzkiego, nie ma więc obawy pogorszenia właściwości polimeru w trakcie pracy.

Temperatura zeszklenia T_g wyznaczona metodą DSC wynosiła 67°C jak pokazano na RYS. 3.

Promieniowanie mikrofalowe jako źródło ogrzewania w procesie polimeryzacji termicznej aminokwasów jest nowym w tej dziedzinie sposobem aktywacji reagentów. Istotne znaczenie w syntezach mikrofalowych ma środowisko reakcji zdolne do pochłaniania emitowanych dawek promieniowania i pośredniczenia w ogrzewaniu reagentów [11]. Wydaje się być zatem słusznie poddawanie polimeryzacji termicznej monomeru wyjściowy bez uprzedniego wydzielenia ze środowiska wodno - alkalicznego. Zawarta w układzie woda, jako związek silnie polarny, pełni rolę swoistego "katalizatora". Jednakże, takie uproszczenie procesu może generować wiele reakcji ubocznych. Z kolei, wydzielony, suchy monomer wyjściowy w postaci ciała stałego nie ulega polimeryzacji w polu promieniowania mikrofalowego. Najbardziej korzystnym rozwiązaniem jest więc polimeryzowanie monomeru wydzielonego ze środowiska wodno - alkalicznego i następnie wprowadzonego do czystej, destylowanej wody. Proces prowadzono w temperaturze powyżej 100°C, zatem z układu stale odprowadzano wodę. W początkowej fazie, przy niższych temperaturach odparowywano wodę wprowadzoną wraz z monomerem, a w wyższych powstającą w trakcie kondensacji cząsteczek.

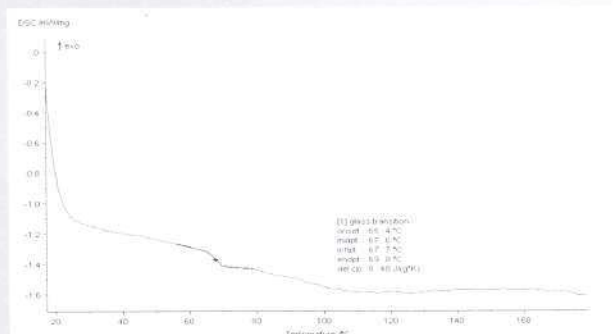
Wnioski

1. Opracowano nową metodę rokującą zastosowanie w produkcji tego polimeru.
2. Zastosowanie promieniowania mikrofalowego jako sposobu ogrzewania umożliwia przeprowadzenie syntezy bez udziału katalizatora. Jednocześnie obserwuje się wyraźne skrócenie czasu reakcji w porównaniu do syntezy w warunkach konwencjonalnych, bez ujemnego wpływu na wydaj-

about 5% mass loss. One - step degradation begins at temperature of ca. 200°C then between 390°C and 410°C follows the biggest mass loss, until solid residue of ca. 30% is obtained .

The proper degradation profile shows only one step of decomposition starting at temperature of 300°C. Thermal degradation of PAS consists of a number of different thermal degradation processes with similar bond energies, since most of the poly(amino acid)s decompose in a complex way, yielding amino acids, carbon dioxide, ammonium and carbonyl compounds [11]. Temperature range between the glass transition of polymer and the beginning of degradation process is wide enough to make the thermal processing of PAS possible for example by injection moulding. The glass point is considerably higher than a human body temperature as well, so there is no fear of decreasing of polymer's properties during work.

The glass point determined by DSC method is to 67°C, as shown in FIG. 3.



RYS. 3. Krzywa DSC poli(kwasu asparaginowego).
 FIG. 3. DSC profile of poly(aspartic acid).

Microwave irradiation, as a type of heating in thermal polymerisation of amino acids is a new method of reagent activation. An important meaning in the microwave synthesis has a reaction medium, which has to be able to absorb emitted microwave doses and transfer energy towards heating of reagents [11]. It seems also correct to polymerise starting monomer without a separation from aqua - alkali medium. Water, included in the mixture, as a strong polar compound plays a role of a specific 'catalyst'. However, this simplification of the process can generate many by-products. On the other hand, separated and dry starting monomer in form of a solid does not polymerise under microwave irradiation. The most favourable was is therefore polymerisation of monomer separated from aqua-alkali medium and afterwards dissolved in some clean distilled water. The polymerisation process described above was carried out at temperature of above 100°C and water from the reaction was removed by distillation. At the first stage at low temperature water introduced into the mixture together with monomer was evaporated. Next, at the higher temperature water produced during condensation of molecules was emitted as well.

Conclusions

1. Applying microwave irradiation as a kind of heating makes production of PAS without a catalyst possible. This invention drastically shortens the reaction time comparing to the conventional method, without a negative influence on the yield of the product.
2. Poly(aspartic acid) synthesis without a presence of toxic initiators has primary importance for production of biomaterials. New method of PAS synthesis has been de-

ność produktu.

3. Możliwość prowadzenia procesu syntezy PKA bez inicjatorów ma istotne znaczenie dla otrzymywania nowej grupy biomateriałów.
4. Właściwości termiczne, zdolność do biodegradacji, obojętność biologiczna wskazują na możliwość wykorzystania PKA w biokompozytach.

Podziękowania

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych (KBN), grant 082/T08/06.

Piśmiennictwo

- [1] F. B. Oppermann, S. Pickartz, A. Steinbuchel: "Biodegradation of polyamides" *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 59, 337-344.
- [2] Praca zbiorowa: *Biopolimery* 1993.
- [3] S. Rowenton, S. J. Huang, G. Swift: "Poly(aspartic Acid): Synthesis, Biodegradation, and Current Applications", *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1997, 3, 175-181.
- [4] J. Bradt, M. Mertig, A. Teresiak, W. Pompe: "Biomimetic Mineralization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation", *Chemical Materials*, 1999, 11, 2694-2701.
- [5] J. Jagur - Grodziński: "Biomedical Application of Functional Polymers", *Reactive and Functional Polymers*, 1999, 39, 99-138.
- [6] J. Polaczek, E. Dziki, J. Pielichowski: "Właściwości i synteza poli(kwasu asparaginowego oraz jego pochodnych)", *Polimery* 2003, 1, 61-65.

veloped which may be implemented of technical scale.

3. Thermal properties, biodegradability and non-toxicity indicate possibility of using of PAS in biocomposites.

Acknowledgment

This work was supported by the State Committee for Scientific Research (KBN), grant 082/T08/06.

References

- [7] J. Pielichowski, Jolanta Polaczek, Jerzy Polaczek, zgł. Pat. P-346 885 (2001).
- [8] K. Pielichowski, D. Bogdał, J. Pielichowski, A. Boroń: "Post-cure effect of long-chained diol dimethacrylates", *Die Angewandte Makromolekul. Chemie*, 1998, 257, 59.
- [9] K. Pielichowski, K. Flejtuch, : "Differential scanning calorimetry studies on polyethylene glycol with different molecular weights for thermal energy storage materials", *Polymers for Advanced Technologies*, 2002, 13, 690.
- [10] P. Melius, C. Srisomsap: "Sequences in hydrolysates of thermal poly(glutamic acid, phenylalanine, alanine, methionine)", *Polymer* 1997, 19, 4989-4992.
- [11] D. Bogdał Zastosowanie promieniowania mikrofalowego w reakcjach przeniesienia międzyfazowego w układach bezrozpuszczalnych, *Monografia 248, Politechnika krakowska* 1999.

OCENA SPOSOBU PRECLOTTINGU PROTEZY NACZYNIOWEJ W OPERACJACH NAPRAWCZYCH DUŻYCH TĘTNIC

ARTUR PUPKA, PIOTR STĘPIŃSKI, STANISŁAW PAWŁOWSKI,
GRZEGORZ KAŁUŻA, PIOTR SZYBER

KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII NACZYNIOWEJ, OGÓLNEJ I TRANSPLANTACYJNEJ AM WE WROCŁAWIU

Streszczenie

Celem pracy jest ocena sposobu uszczelniania hydrofilnej dwustronnie welurowanej protezy naczyniowej w operacjach naprawczych w segmencie aortalno-biodrowo-udowym.

Material i metoda. W pracy przedstawiono 94 przypadki chorych leczonych w latach 2001-2002 z powodu miażdżycy zarostowej w odcinku aortalno-biodrowo-udowym. U wszystkich chorych stosowano hydrofilne protezy naczyń krwionośnych: rozwidłone, aortalno-dwuudowe (56) lub proste, przęśła biodro-

EVALUATION OF THE PRECLOTTING WAY OF VASCULAR PROSTHESIS IN REPAIRING OPERATIONS OF THE BIG ARTERIES

ARTUR PUPKA, PIOTR STĘPIŃSKI, STANISŁAW PAWŁOWSKI,
GRZEGORZ KAŁUŻA, PIOTR SZYBER

DEPARTMENT OF VASCULAR, GENERAL AND TRANSPLANTOLOGICAL SURGERY WROCLAW UNIVERSITY OF MEDICINE

Abstract

The aim of this study is to evaluate the way of making tight the hydrophilic, bilateral velurowed vascular artificial graft in repair operations in aorto-iliaco-femoral segment.

Material and methods. In our work, in years 2001-2002 94 patients were treated in case of the atherosclerosis in aorto-iliaco-femoral section. In all cases hydrophilic, artificial grafts were used: bifurcated, aorto-bifemoral (56) or ilico-femoral by-passes (38). In every cases vascular grafts were sealed up with