

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Liliia Kosenko

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek

Oddělení syntetických polymerů, vláken a textilní chemie

Vývoj roubovaných kopolymerů na bázi kyseliny hyaluronové určených pro
kosmetický průmysl

Liliia Kosenko

Diplomová práce

2019

University of Pardubice

Faculty of chemical technology

Institute of chemistry and technology of macromolecular materials

Department of synthetic polymers, fibers and textile chemistry

Development of novel ingredients based on Hyaluronan for cosmetics

Liliia Kosenko

Diploma thesis

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Liliia Kosenko**
Osobní číslo: **C17537**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Technologie výroby a zpracování polymerů**
Název tématu: **Vývoj roubovaných kopolymerů na bázi kyseliny hyaluronové určených pro kosmetický průmysl**
Zadávací katedra: **Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V teoretické části se zaměřte na problematiku kyseliny hyaluronové, možnosti její modifikace a na různé typy antioxidantů, používaných k její kopolymeraci.
2. Dále vypracujte literární rešerši na téma metody přípravy a charakterizace kopolymerů na bázi kyseliny hyaluronové se zaměřením pro kosmetický průmysl.
3. Syntetizujte roubované kopolymery na bázi derivátů kyseliny hyaluronové s různými typy antioxidantů.
4. Připravené materiály charakterizujte, studujte vliv jejich složení pomocí vybraných analytických metod a sledujte vliv vybraných kopolymerů na jejich biologické vlastnosti.
5. Srovnajte a diskutujte změřené vlastnosti u jednotlivých testovaných vzorků. Zhodnoťte vliv složení připravených kopolymerů na sledované analytické a biologické vlastnosti.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Luboš Prokúpek, Dr.

Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek

Konzultant diplomové práce:

Ing. Gloria Huerta-Angeles, Ph.D.

Datum zadání diplomové práce:

21. prosince 2018


Termín odevzdání diplomové práce:

10. května 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



Ing. David Veselý, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 07. 05. 2019

Liliia Kosenko

Poděkování

Rada bych poděkovala Ing. Luboši Prokúpkovi, Dr. za pomoc při vedení diplomové práce a také cenné rady. Dále bych ráda poděkovala Ing. Glorii Huertě-Angeles, Ph.D. za pomoc a rady s touto prací spojené. Děkuji také firmě Contipro, a.s. za možnost vypracování experimentální části na oddělení Nosiče. Velké díky patří také Martině Brandejsové a Kateřině Kopecké za pomoc při přípravě vzorků.

Moje poděkování patří též mé rodině a blízkým přátelům za pomoc a podporu během studia na Univerzitě.

ANOTACE

Tato práce je zaměřena na vývoj roubovaných kopolymerů na bázi kyseliny hyaluronové určených pro kosmetický průmysl. Teoretická část je zaměřena na problematiku kyseliny hyaluronové a různých typů antioxidantů, používaných k její kopolymeraci, a také možností charakterizace kopolymerů na bázi kyseliny hyaluronové. V praktické části je popsána příprava derivátů HA a jejich charakterizace pomocí vybraných analytických a biologických metod.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kyselina hyaluronová, antioxidanty, biotin, kyselina lipoová, roubování, spektroskopie

ANNOTATION

This thesis is focuses on the development of graft copolymers based on hyaluronan for cosmetics. The theoretical part is focused on the problems of hyaluronic acid and various types of antioxidants used for its copolymerization, as well as the possibility of characterizing copolymers based on hyaluronic acid. The practical part describes the preparation of HA derivatives and their characterization using selected analytical and biological methods.

KEYWORDS

Hyaluronic acid, antioxidants, biotin, lipaic acid, grafting, spectroscopy

OBSAH

Seznam zkratek	11
1. Úvod.....	14
2. Teoretická část	15
2.1. Kyselina hyaluronová.....	15
2.1.1. Chemické metody používané pro syntézu derivátů HA	16
2.1.2. Modifikace -COOH	17
2.1.2.1. Amidace	17
2.1.2.2. Esterifikace	18
2.1.3. Modifikace -OH.....	18
2.1.3.1. Etherifikace	18
2.1.3.2. Esterifikace	18
2.1.4. Modifikace - NHC ₂ H ₅	19
2.1.4.1. Deacetylace / amidace	19
2.2. Antioxidanty.....	19
2.2.1. Rozdělení antioxidantů podle antioxidační obrany	20
2.2.2. Obecné použití antioxidantů.....	20
2.2.3. Nejznámější a nejvýznamnější antioxidanty	20
2.2.4. Zdroje ve stravě	21
2.2.5. Kosmetické antioxidanty	21
2.3. Astaxanthin	23
2.4. Vitamín A a jeho deriváty	24
2.5. Koenzym Q10 nebo ubichinon.....	24
2.6. Biotin.....	25
2.7. Tokoferol a tokoferol sukcinát	26

2.8. Lipoová kyselina	27
2.9. Salicylová kyselina.....	28
2.10. Gallová kyselina.....	28
2.11. Kávová kyselina	29
2.12. Ferulová kyselina	29
2.12. Kopolymerace	30
2.13 Roubování (Grafting)	31
2.13.1. Techniky roubování.....	33
2.13.1.1. Roubování iniciované chemickými prostředky	33
2.13.1.2. Radikálové roubování	33
2.13.1.3. Roubování živou polymerací	33
2.13.1.4. Iontové roubování	34
2.14. Metody pro čištění kopolymerů	34
2.14.1. Dialýza.....	34
2.14.2. Lyofilizace	35
2.14.2.1 Primární sušení	35
2.14.2.2. Sekundární sušení	35
2.15. Metody pro charakterizaci kopolymerů	36
2.15.1. Infračervená spektroskopie (IČ)	36
2.15.2. Ultrafialová spektroskopie (UV)	37
2.15.3. Nukleární magnetická rezonance (NMR).....	38
2.15.4. Hmotnostní spektrometrie (MS).....	40
2.15.5. SEC- MALLS	40
2.15.6. Antioxidační aktivita	41
2.15.7. Cytotoxicita	42
3. Experimentální část.....	43
3.1. Použité chemikálie	43

3.2. Příprava derivátů kyseliny hyaluronové.....	45
3.2.1. Reakce přípravy derivátů HA	52
3.3. Charakterizace připravených derivátů HA	59
3.3.1. NMR spektroskopie	59
3.3.2. UV spektroskopie	60
3.3.3. IČ spektroskopie	61
3.3.4. SEC-MALLS	63
3.3.5. Antioxidační aktivita	64
3.3.6. Cytotoxicita	66
4. Výsledky a diskuze	67
4.1. NMR spektroskopie	68
4.1.1. ¹ H NMR spektra.....	68
4.1.2. COSY NMR spektra.....	69
4.1.3. DOSY NMR spektra.....	71
4.1.4. HSQC NMR spektra.....	72
4.2. UV spektroskopie.....	74
4.3. IČ spektroskopie.....	76
4.4. SEC-MALLS.....	78
4.5. Antioxidační aktivita.....	79
4.6. Cytotoxicita.....	80
5. Závěr	83
Seznam použité literatury	84
Seznam obrázků a tabulek	90

Seznam zkratek

A₂ – druhý viriální koeficient

ATRP – radikálová polymerace atomového přenosu

B – biotin

BC – benzoylchlorid

CA – kyselina kávová

CMPI – chlor-1-methylpyridinium jodid

COSY – Correlation Spectroscopy

DMAP – dimethyl-aminopyridin

DMEM – modifikované Dulbecco Eagleovo médium

DMF – dimethylformamid

DMSO – dimethylsulfoxid

DOSY – Difusion-ordered Spectroscopy

DPPH – 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl

DS – stupeň substituce

FA – kyselina ferulová

FT-IČ – Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací

GA – kyselina gallová

HA – kyselina hyaluronová

HCA – kyselina hydrokávová

HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy

IČ – Infračervená spektroskopie

IPA – isopropylalkohol

LA – kyselina lipoová

M_n – číselně střední relativní molekulová hmotnost

M_w – hmotnostně střední relativní molekulová hmotnost

M_z – velikostní průměr molekulové hmotnosti

MALLS – Multi Angle (Laser) Light Scattering

MS – Hmotnostní spektrometrie

η – vnitřní viskozita

NIH – typ kmene pro měření cytotoxicity

NMR – Nukleární magnetická rezonance

OSA – oktenyljantarová kyselina

RNS – reaktivní formy dusíku

ROS – reaktivní formy kyslíku

RS – reakční směs

RT – laboratorní teplota

s – gyrační poloměr

SA – kyselina salicylová

SEC – Size exclusion chromatography (molekulová síťová chromatografie)

SOD – superoxid dismutáza

TEA – triethylamin

THF – tetrahydrofuran

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan

TS – tokoferol sukcinát

TSA – kyselina thiosalicylová

UV – Ultrafialová spektroskopie

^1H – Protonová spektra v NMR

^{13}C – Uhlíková spektra v NMR

3T3 – označení myších fibroblastů

1. Úvod

V současné době každá žena věnuje hodně času svému vzhledu, aby co nejdéle zůstala mladou, a proto používá stovky různých kosmetických přípravků. Zásadním problémem je to, že většina složek těchto přípravků nejsou biologického původu a mohou být škodlivá pro lidský organismus. Z tohoto důvodu cílem mé diplomové práce bylo vyvinutí biologicky aktivních složek na bázi kyseliny hyaluronové s navázanými antioxidanty, které významně zlepšují vlastnosti pokožky. Kyselina hyaluronová byla vybrána kvůli tomu, že je přírodním biopolymerem, který se nachází v lidské pokožce a hraje důležitou roli pro její hydrataci a pružnost.

Antioxidanty jsou důležitými látkami pro zlepšení vzhledu a ochranu pokožky. Mezi významné antioxidanty v kosmetice patří, např. vitamíny, koenzym Q, kyselina gallová a ferulová. Úkolem mé diplomové práce bylo nejen připravit deriváty HA, ale i stanovit jejich biologické a analytické vlastnosti. Speciálně byly provedené testy cytotoxicity, aby vybrané látky mohli být použitelné pro aplikace v kosmetickém průmyslu.

Tato diplomová práce obsahuje teoretickou a experimentální část. Experimentální část byla zpracována na oddělení Nosiče ve firmě Contipro, a.s. v Dolní Dobrouči.

2. Teoretická část

2.1. Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) je lineární polysacharid, který se vyskytuje přirozeně ve všech živých organismech. Má vysokou molekulovou hmotnost. Pokud není vázaná na jiné molekuly, váže se na vodu, což jí dává tuhý viskózní charakter podobný "želatině".¹

Kyselina hyaluronová je poměrně nákladným biopolymerem široce používaným v kosmetice. Jelikož zvířata jsou bohatá na HA, zvířecí zdroj jako např. hřeben kohouta lze použít k její extrakci.

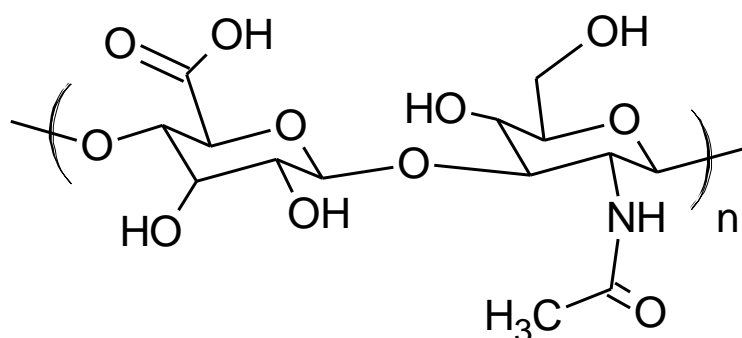
Nevýhoda v komerční produkci živočišného původu HA je přísné následné zpracování za účelem odstranění proteoglykanů připojených k HA a dalším potenciálním kontaminantům, jako jsou priony. V tomto scénáři získává pozornost mikrobiální produkce kyseliny hyaluronové. *Streptococcus equi* je komerčně používaný mikrob, který produkuje kyselinu hyaluronovou za použití komplexního média. Vazquez navrhl kultivační médium *Streptococcus zooepidemicus* založené na produktech z mořských plodů pro produkci kyseliny hyaluronové. Médium obsahuje odpad ze zpracování mušlí jako zdroj uhlíku a peptid z tuňáka jako proteinový substrát, a může tedy být levnou alternativou k syntetickému médiu na bázi peptonu. Nyní je geneticky modifikovaný kmen s vysokou produktivitou kyseliny hyaluronové na místě, aby vyhověl výzvám konvenční fermentace.

Vzhledem k vynikající schopnosti zadržovat vodu a viskoelastickým vlastnostem může být kyselina hyaluronová považována za vysoce účinné zvlhčovačlo pro hydrataci pokožky. Vzhledem k tomu, že přirozenou funkcí kyseliny hyaluronové je chránit a regenerovat pokožku, zjistilo se, že lokální aplikace HA umožňuje hojení pro zlepšení vzhledu jizev, omlazení kůže a regeneraci vlasů.

Kyselina hyaluronová je často používána v kosmetice proti stárnutí, protože snadno proniká kůží, změkčuje pokožku a obnovuje její pružnost. V současné době jsou na trhu dermální výplně obsahující kyselinu hyaluronovou, které dávají okamžitý obličejový výtah a mladistvý pohled na stárnoucí kůži. Kyselina hyaluronová může být použita k léčbě akné a keloidního zjizvení a napomáhá rovnoměrnému konturování pokožky.²

Plniva měkkých tkání kyseliny hyaluronové zahrnují řadu produktů, které se běžně používají ke zlepšení vzhledu obličeje. Přestože jsou tyto produkty v mnoha ohledech podobné, nejsou vzájemně zaměnitelné a mají jedinečné vlastnosti, které je třeba vzít v úvahu. Místo aplikace pro injekce a techniky omlazení obličeje jsou stále diskutovány.³

Na obrázku 1 je znázorněna chemická struktura kyseliny hyaluronové.



Obrázek 1. Vzorec kyseliny hyaluronové.

2.1.1. Chemické metody používané pro syntézu derivátů HA

HA může být chemicky modifikována dvěma různými způsoby: zesíťováním nebo konjugací. Konjugace a zesíťování HA jsou založeny na stejných chemických reakcích a liší se pouze v tom, že v prvním případě je sloučenina naroubována pouze na jeden řetězec HA jednou vazbou, zatímco v druhém případě jsou různé řetězce HA spojeny společně dvěma vazbami nebo více. Kromě toho existují různé typy postupů zesíťování: přímé zesíťování a zesíťování různých derivátů HA. Chemická modifikace HA může být provedena na dvou dostupných funkčních místech HA: skupina karboxylové kyseliny a hydroxylová skupina. Amin skupina může být také získána deacetylací N-acetylové skupiny. Není známo, která z hydroxylových skupin reaguje, i když je rozumné předpokládat, že k reakci dochází hlavně na hydroxylové skupině C6 N-acetylglukosaminové skupiny HA z důvodu lepší dostupnosti reakčních činidel k primárním alkoholům.

Vzhledem k tomu, že HA je rozpustná ve vodě, nejjednodušší metodou je provedení reakce ve vodě. Nicméně ve vodných podmínkách jsou některé reakce závislé na pH a musí být prováděny v kyselých nebo alkalických podmínkách, u kterých bylo prokázáno, že významně indukují hydrolyzu HA řetězce.

Tyto aspekty povzbudily výzkumné týmy, aby prozkoumaly nové syntetické cesty pro vývoj derivátů HA s vhodnými charakteristikami podle jejich specifických potřeb. V některých případech není účinnost reakce kritériem, protože stupeň substituce nebo zesíťování je dostatečný pro požadovaný účinek, zatímco pro jiné aplikace je vyžadován vysoký stupeň substitucí. Tabulka 1 shrnuje všechny chemické modifikační techniky popsané v této části.

Tabulka 1. Metody modifikace kyseliny hyaluronové.

HA - cílové místo	Typ reakce	Rozpouštědlo
-COOH	Amidace	Voda (pH 4,75–7,5) nebo DMSO
	Esterifikace	DMSO
	Oxidace	Voda
-OH	Esterifikace	Voda
	Esterifikace	Voda
-NHCOCH₃	Deacetylace / amidace	Voda následovaná DMSO

2.1.2. Modifikace -COOH

2.1.2.1. Amidace

Amidace ve vodě s karbodiimidem je jednou z nejpoužívanějších metod pro modifikaci HA. Reakce je velmi jemná, protože je silně závislá na pH. Při provedení amidační reakce používáme jako činidlo vodu. V případě nahrazení vody dimethylsulfoxidem (DMSO) můžeme získat stupeň substituce až 60 - 80%.

Magnani, Rappuoli, Lamponi a Barbucci (2000) popsali amidační reakci s použitím 2-chlor-1-methylpyridinium jodidu (CMPI) jako aktivačního činidla karboxylových skupin HA. Tato reakce se provádí v dimethylformamidu (DMF), bezvodém organickém rozpouštědle,

aby se minimalizovala hydrolyza CMPI. Tento způsob je proto vysoce účinný, protože ve srovnání s předchozími metodami s karbodiimidem se používá malé množství činidel.

Druhou možností je amidace karbonyldiimidazolem. Karbonyldiimidazol reaguje s HA za vzniku vysoce reaktivního meziprojektu, který se rychle přeskupuje do stabilnějšího meziprojektu HA-imidazolu. Tento poslední meziprojekt reaguje s aminem za vzniku amidové vazby. Popsaný postup je dlouhý ve srovnání s předchozími metodami, které se obvykle provádějí v řadu několika hodin, protože tvorba imidazolového meziprojektu trvá 12 hodin a následuje 48-hodinová amidační reakce.

2.1.2.2. Esterifikace

První možnost esterifikace HA je za použití diazometanu. Reakce se provádí v organickém rozpouštědle DMSO. Druhou možností je reakce HA s glycidylmethakrylátem pro syntézu methakrylované HA. Reakce se provádí ve vodě v přítomnosti přebytku triethylaminu jako katalyzátoru.

2.1.3. Modifikace -OH

2.1.3.1. Etherifikace

Jednou z možností je reakce s otevřením epoxidového kruhu za vzniku etherových vazeb s hydroxylovými skupinami HA. Druhou možností je tvorba etheru pomocí divinylsulfonu nebo ethylensulfidu.

2.1.3.2. Esterifikace

Tvorba esteru se provádí s použitím anhydridu oktenyljantarové kyseliny (OSA), za alkalických podmínek (pH = 9) ve vodě. Hydroxylové skupiny HA reagují s anhydridem za vzniku esterových vazeb. Reakce je poměrně rychlá, přičemž po 6 hodinách bylo dosaženo 18% míry substituce. Jiná možnost esterifikace HA je s anhydridem methakrylátu. Reakce se provádí v ledově studené vodě po dobu 12 hodin při pH 8 - 10.

2.1.4. Modifikace - NHCOCH₃

2.1.4.1. Deacetylace / amidace

Bellini a Topai (2000) patentovali amidaci HA reakcí kyseliny s deacetylovanou aminoskupinou HA. Kyselina byla nejprve aktivována za použití karbodiimidu. Deacetylovaný HA amin reaguje s aktivovanou kyselinou a tvoří amidovou vazbu.⁴

2.2. Antioxidanty

Antioxidanty jsou chemické látky, které mohou interferovat pomocí řetězové reakce tím, že tvoří méně reaktivních radikálů nebo významně snižují počet volných radikálů. Obě tyto akce účinně zabraňují, zpomalují nebo inhibují oxidační reakci.⁵

Antioxidant je definován společností Halliwell a Gutteridge jako „jakákoliv látka, která pokud je přítomna v nízkých koncentracích ve srovnání s oxidačním substrátem, významně zpožďuje nebo zabraňuje oxidaci tohoto substrátu“.⁶

Antioxidanty nemají žádnou chuť, jejich podíl v potravinách je počítán na miligramy a proto si ani neuvědomíme, že nám v organismu něco chybí. Ovšem jen do doby, kdy nám tělo řekne, že není něco v pořádku. Pro sportovce to může znamenat pomalejší regeneraci, což poté povede k horším výkonům. Bez antioxidantů se lze rychleji dostat do stavu přetrénování, a může dojít i ke zranění, jelikož se tím sníží schopnost organismu regenerovat.

Antioxidanty působí i proti vzniku civilizačních onemocnění. Vědecké studie dokazují, že pravidelným a vyváženým příjmem antioxidačních látek lze oddálit vznik civilizačních onemocnění, což jsou zejména nemoci srdce, oběhové soustavy a rakoviny. Dokáží však chránit i tak důležitou součást lidského zdraví, jako je zrak. Známe je i posilování imunity právě vitamíny a minerály v období chřipek v zimním období.⁷

2.2.1. Rozdělení antioxidantů podle antioxidační obrany

Antioxidanty se dělí na 4 různé typy podle antioxidační obrany.

(1) Antioxidanty s nízkou molekulovou hmotností. Tyto antioxidanty mohou být rozděleny do dvou skupin: endogenní (syntetizované v těle) a exogenní (odvozené ze stravy). Lidská kůže obsahuje jak lipofilní [vitamín E (tokoferoly, tak tokotrienoly), ubichinony (koenzym Q) a karotenoidy] a hydrofilní [(vitamín C (askorbát), glutathion a kyselina močová (urát)] antioxidanty.

(2) Enzymy, které katalyticky odstraňují volné radikály a další reaktivní formy kyslíku (ROS). Příklady jsou enzymy superoxid dismutáza (SOD, přemění superoxid na peroxid vodíku a kyslík) a kataláza (přemění peroxid vodíku na vodu a kyslík).

(3) Proteiny, které minimalizují dostupnost prooxidantů, jako jsou ionty železa, ionty mědi. Příklady jsou transferiny, metalothionein.

(4) Proteiny, které chrání biomolekuly proti oxidačním a jiným škodám, např. proteiny tepelného šoku.

2.2.2. Obecné použití antioxidantů

Antioxidanty mají mnoho možností využití. Používají se, např. v potravinách k zastavení žluknutí, jako doplněk výživy pro zlepšení zdraví, v syntéze polymerů pro řízení polymerace během výroby a pro ochranu polymerů před poškozením UV zářením. V osobní péči se antioxidanty používají nejen k ochraně kůže před poškozením způsobeným sluncem a zpomalení známek stárnutí, ale i ke zlepšení trvanlivosti ochranného kosmetického prostředku.⁶

2.2.3. Nejznámější a nejvýznamnější antioxidanty

Patří mezi ně zinek, vitamín C, vitamín E, selen, glutathion, beta glukan, lykopen, resveratrol, beta karoten a koenzym Q10. Samozřejmě je jich mnohem více a rozhodně nelze říci, že nejsou v těle potřeba. Pro jejich funkčnost je nutné zajistit jejich vstřebatelnost, což lze docílit konzumováním přírodních zdrojů nebo bioaktivních doplňků stravy. V zelenině a

ovoci jsou přítomny, tzv. fytochemikálie, kterých bylo objeveno už tisíce. Samozřejmě mají i antioxidační účinky a probíhají s nimi i vědecké výzkumy. A tak se zjistilo, že anthocyanin, nejvíce obsažený v borůvkách či fazolích, má výrazné antioxidační účinky a měl by působit preventivně proti rakovině, zpomalovat stárnutí a také snižovat svalová poškození, čímž se zkrátí doba regenerace a trénovat lze častěji.

2.2.4. Zdroje ve stravě

Kterou stravu si vybrat, aby obsahovala co největší množství antioxidantů? Z ovoce jsou to, např. drobné lesní plody, jako borůvky, maliny, jahody, ostružiny, které obsahují nejen vitamíny a minerály ale i jeden z nejsilnějších antioxidantů, kterým je anthocyanin. Doporučit lze rajčata, která navíc obsahují další silný antioxidant lykopen. V hroznovém vínu je resveratrol, ořechy jsou zdrojem selenu, zinku a vitamínu E, v mrkvi nalezneme beta karoten, v paprikách, kiwi a pomerančích vitamín C a syrovátkový protein zvyšuje hladinu glutathionu. Samozřejmě se nelze spoléhat pouze na omezený počet potravin, ale je potřeba zajistit co nejpestřejší přísun látek potřebných pro chod organismu.⁷

2.2.5. Kosmetické antioxidanty

Použití antioxidantů pro péči o pleť bylo v době renesance dobře zdokumentováno Paracelsusem, který slavně poznamenal, že "dávka dělá jed" ("The dose makes the poison") a byl často považován za otce toxikologie. On údajně prokázal příznivý účinek léčby vrásek pokožky octem z červeného vína, který, jak víme, obsahuje hroznové polyfenolové antioxidanty.

V současné době používané kosmetické antioxidační složky zahrnují vitamíny A, B, C a E, koenzym Q10 a jeho analogy a také rostlinné polyfenoly jako jsou taniny a flavonoidy.⁸

Antioxidanty jsou často používány kosmetickým průmyslem v produktech péče o pleť jako účinné látky, které snižují stárnutí pleti způsobené oxidačním stresem vyvolaným UV zářením. Kromě schopnosti antioxidantů redukovat tvorbu ROS (reaktivních forem kyslíku) v kůži bylo zkoumáno, zda mohou být také zapojeny do chemické stabilizace UV filtrů.⁹

Ke kosmetickým přípravkům, obsahujícím antioxidanty jako aktivní složky, patří opalovací krémy, přípravky na zjasnění pleti a produkty proti stárnutí.

Kromě toho, antioxidanty hrají roli stabilizátorů a také zlepšují trvanlivost produktů tím, že zabráňují autooxidaci sloučenin, jako je olej a tuky. Tabulka 2 uvádí seznam důležitých antioxidantů používaných v kosmetice. Aktivní molekulární konformace, stabilita a prahy účinnosti jsou důležitými parametry, které je třeba vzít v úvahu při přidávání antioxidantu do kosmetické formulace.

Tabulka 2. Důležité antioxidanty používané v kosmetickém průmyslu.²

Antioxidanty používané v kosmetice
Astaxanthin
Vitamín A a jeho deriváty
Koenzym Q
Kyselina askorbová
Polynenasycené mastné kyseliny
Kyselina ellagová
Kyselina gallová
Kyselina ferulová

Níže jsou uvedeny v tabulce 3 antioxidanty, které jsem používala pro přípravu derivátů kyseliny hyaluronové.

Tabulka 3. Antioxidanty používané v diplomové práci.

Antioxidanty používané pro přípravu derivátů kyseliny hyaluronové
Biotin
Tokoferol sukcinát
Kyselina lipoová
Kyselina salicylová
Kyselina gallová
Kyselina kávová
Kyselina ferulová

2.3. Astaxanthin

Astaxanthin (obrázek 2) je antioxidant terpen přítomný v některých rybách, korýšech a některých ptácích. Astaxanthin patří mezi karotenoidy. Má nejvyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s jinými antioxidanty, jako je lykopen, vitamín E a vitamín A a obvykle se označuje jako král antioxidantů.

Existuje mnoho případů porovnání mikrobiálního astaxanthinu se syntetickým astaxanthinem, přírodní astaxanthin byl schválen pro farmaceutickou formulaci. Astaxanthin byl díky své jasně červené barvě používán jako barvivo v potravinářských a kosmetických výrobcích. Astaxanthin spolu s dalšími fotokonvertibilními karotenoidy chrání pokožku před UV zářením a také pro prevenci akné.²

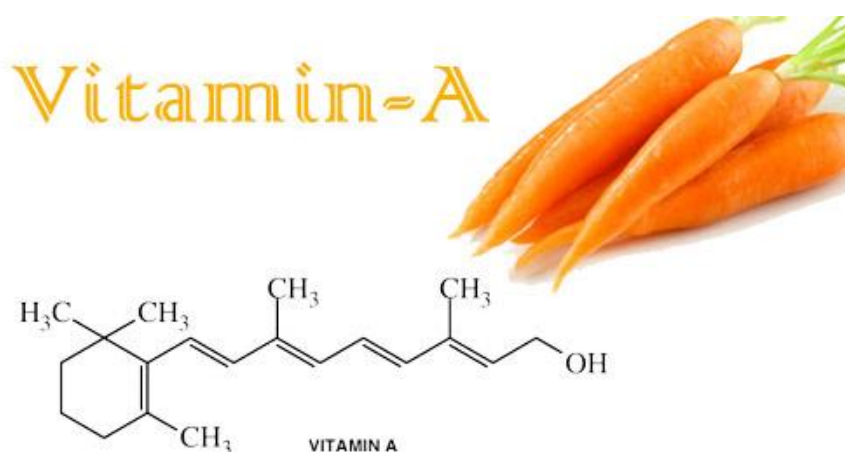


Obrázek 2. Vzorec a vzhled astaxanthinu.¹⁰

2.4. Vitamín A a jeho deriváty

Vitamín A (obrázek 3) a jeho deriváty jsou široce používanými prostředky pro ochranu kůže nebo jako normalizátory v kosmetice. Mohou regulovat buněčný růst a diferenciaci v kůži, normalizovat keratinizaci, zmenšovat vrásky a dodávat hladkou a vláchnou pokožku.

Aktivní formy vitamínu A používané v kosmetice jsou alkohol vitamínu A (retinol), estery vitamínu A, aldehyd vitamínu A (retinal) a tretinoin. Při aplikaci na kůži se všechny tyto formy přeměňují na tretinoin. Další formou vitamínu A používaného v kosmetice je β -karoten, účinné fotoprotektivní činidlo používané v kosmetických prostředcích. β -karoten je velmi populární v barvivech nebo kosmetických prostředcích používaných při opalování. Je to dobrý foto-ochranný prostředek a je aplikován jako sekundární opalovací prostředek v opalovacích krémech.²



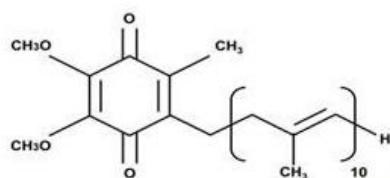
Obrázek 3. Vzorec a zdroj vitamínu A.¹¹

2.5. Koenzym Q10 nebo ubichinon

Ubichinon (obrázek 4) je silný antioxidant rozpustný v lipidech. Vzhledem k antioxidační aktivitě exogenní aplikace ubichinonu, nejenže chrání pokožku před UV zářením a stárnutím, ale také regeneruje pokožku a výsledkem je esteticky přitažlivá kůže.

Aktuální aplikace koenzymu Q zlepšuje dýchání mitochondrií, které se s věkem obvykle snižuje a snižuje tak známky stárnutí. Koenzym Q snižuje hloubku vrásek a zabraňuje tak vnitřnímu a vnějšímu stárnutí.

Lokální aplikace koenzymu Q má revitalizační účinek na kůži potlačením rozpadu kolagenu a elastinu a zabraňuje tak prověšení kůže spojené se stárnutím.²



Obrázek 4. Vzorec a vzhled koenzymu Q10.¹²

2.6. Biotin

Biotin (vitamíny H a B7) je důležitou mikroživinou, protože jeho nedostatek může způsobit vážné onemocnění, zejména u mladých lidí.

Biotin funguje jako kofaktor pro enzymy závislé na biotinu. Savci mají pět těchto enzymů. Defekty v metabolismu biotinu vedou k inaktivaci všech pěti enzymů, což vede k závažnému stavu, který je známý jako mnohočetný nedostatek karboxylázy.¹³

Biotin, je přítomen ve všech buňkách v malých množstvích. Nejbohatším zdrojem jsou játra. Protože biotin je všudypřítomný v potravinách, v podstatě jediný způsob, jak způsobit nedostatek, je konzumace velkého množství syrového vaječného bílku, který obsahuje protein avidin. Avidin se váže na biotin specificky a velmi těsně.¹⁴

2.7. Tokoferol a tokoferol sukcinát

α -tokoferol nebo vitamín E je hlavním antioxidantem přítomným v kůži. Dříve se pro léčbu jizev, používanou po operaci kůže, doporučoval obvykle lokální krém obsahující vitamín E. Baumann však uvádí, že lokální aplikace α -tokoferolu zhoršuje kosmetický vzhled jizvy a může být někdy škodlivá, protože způsobuje kontaktní dermatitidu. Podobně jako kyselina askorbová, lokální aplikace vitamínu E, zvyšuje antioxidační vlastnosti, zajišťuje ochranu pokožky a významně zvyšuje hydrataci kůže.²

α -tokoferol sukcinát (obrázek 5) byl široce používán při léčbě zvířecích a lidských nádorů. Vitamín E sukcinát, když je kombinován s tepelným ošetřením, snižuje přežití buněk melanomu více než samotný vitamín E. Bylo prokázáno, že α -tokoferol sukcinát inhibuje růst a indukce morfologickou diferenciaci v melanomových buňkách.

α -tokoferol sukcinát (TS) však měl účinnější antioxidační ochranu než ekvivalentní množství přímo přidaného volného α -tokoferolu. Autoři věřili, že zjevný nedostatek aktivity přímo přidaného volného α -tokoferolu může být způsoben díky jeho extrémní hydrofobnosti.¹⁵



Obrázek 5. Vzhled α -tokoferol sukcinátu.¹⁶

2.8. Lipoová kyselina

Kyselina lipoová (obrázek 6) je známá jako antioxidant a je významná svou jedinečnou schopností neutralizovat intracelulární i extracelulární volné radikály. Kyselina alfa-lipoová vede k nepřímému prospěchu, když jsou zvýšené hladiny kortizolu.¹⁷

Kyselina alfa-lipoová je nezbytná pro účinnou biochemickou funkci vitamínů E a C. Tato molekula prokázala, že obnovuje věkově závislou ztrátu redukováného glutathionu v mozkové tkáni. Bylo zjištěno, že kyselina lipoová uvolňuje tokoferol a ubichinol v keratinocytech po ozáření ultrafialovým zářením, ale při lokální aplikaci na kůži nebyl pozorován žádný fotoprotektivní účinek.¹⁸

Kyselina lipoová (LA) pomáhá našim buňkám dýchat – zúčastňuje se tak získávání energie. Také slouží jako detoxikační činidlo pro některé škodlivé sloučeniny vnikající do těla. Patří k nejdůležitějším antioxidantům, látkám, které chrání buňky před působením volných kyslíkových radikálů. Navíc regeneruje ostatní antioxidanty, kromě nervů je nezbytná pro správnou funkci srdce, mozku, očí a jater, pro krve tvorbu a ukládání genetické informace. Předepisuje se diabetikům, neboť zvyšuje účinek inzulínu a tím zlepšuje příjem glukózy do buňky. Kyselinu lipoovou získáme především z brambor a ovoce. Poprvé byla extrahována z hovězích jater.¹⁹



Obrázek 6. Vzhled kyseliny lipoové.²⁰

2.9. Salicylová kyselina

Aromatická kyselina se systematickým názvem kyselina 2-hydroxybenzoová, která se nachází jako methylester v mnoha éterických olejích. Kyselina salicylová (SA) (obrázek 7) a salicylát obecně existují v mnoha rostlinách a dlouho se využívají pro léčbu. V potravinářském průmyslu se používá v konzervačních prostředcích.

Další využití je ve farmaceutickém průmyslu v antiseptikách a aspirinu. Aspirin se rychle hydrolyzuje v těle na kyselinu salicylovou, která má několik farmakologických účinků.^{21, 22}



Obrázek 7. Vzhled kyseliny salicylové.²³

2.10. Gallová kyselina

Kyselina gallová (GA) je strukturně 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina, která se nachází v různých rostlinách. Estery kyseliny gallové jsou nejběžněji používanými stabilizátory nebo konzervačními látkami v kosmetických přípravcích. Biologická přeměna taninového substrátu kyseliny gallové byla dosažena za použití hub, které obvykle patří do rodů *Aspergillus*, *Penicillium* a *Rhizopus*.

Kyselina gallová vykazuje silný inhibiční účinek na tvorbu melaninu spolu s antioxidační aktivitou v kosmetických přípravcích. Kyselina gallová může být také použita ve farmaceutickém prostředku pro narovnění vlasů. Kyselina gallová také vykazuje silnou antimikrobiální aktivitu, která je účinným kandidátem v produktech proti akné.²

2.11. Kávová kyselina

Kyselina kávová je přítomna převážně v zrnech, zelenině a ovoci v konjugované formě se sacharidy. Tato kyselina zabraňuje šíření lipidové peroxidační řetězové reakce a chrání membránové fosfolipidy před UV zářením. Studie ukazují, že tato kyselina může být úspěšně použita jako lokální ochranná činidla proti poškození kůže způsobeného UV zářením.²⁴

Kyselina kávová (CA) je přirozeně dostupná a vyskytuje se v řadě produktů, jako je víno, olivový olej a káva. Má pozitivní ochranný účinek proti mnoha lidským onemocněním, jako jsou různé druhy rakoviny, kardiovaskulární onemocnění atd. Studie ukázaly, že CA a její deriváty mají různé biologické účinky, jako jsou antioxidační a protizánětlivé. Vzhledem k vysoké antioxidační aktivitě, UV-absorpčním a protizánětlivým účinkům kyseliny kávové je nyní velká pozornost věnována její aplikaci jako léčiva pro kůži a v oblasti kosmetických přípravků.²²

CA má povahu hydrofilního antioxidantu a má schopnost redukovat ionty přechodných kovů.²⁵

2.12. Ferulová kyselina

Kyselina ferulová (obrázek 8) je hydroxylová kyselina skořicová, rostlinná fenolová sloučenina. Obvykle je přítomna ve volné formě v semenech a listech a kovalentně vázána na lignin v jiných částech rostlin. Kyselina ferulová (FA) je silným antioxidantem, protože snadno vytváří rezonančně stabilizovaný fenoxyl radikál, který může ukončit reakce volných radikálů.

Kyselina ferulová může být vyráběna jako produkt s přidanou hodnotou z lignocelulózové biomasy, jako je rýžová sláma, pšeničná sláma, kukuřičný klas pomocí biokonverze za použití enzymu. Ačkoliv má vysokou antioxidační aktivitu, FA je biologicky odbouratelná a dlouhodobě stabilní. Kromě vysoké antioxidační aktivity mají estery kyseliny ferulové i další příznivé kožní aktivity, jako je UV absorpce, zesvětlování kůže a zlepšené vychytávání jiných aktivních složek kůže. Kombinace kyseliny ferulové, vitamínů C a E má vyšší ochranu před UV zářením, což umožňuje její potenciální úlohu ve formulaci krémů na opalování.²

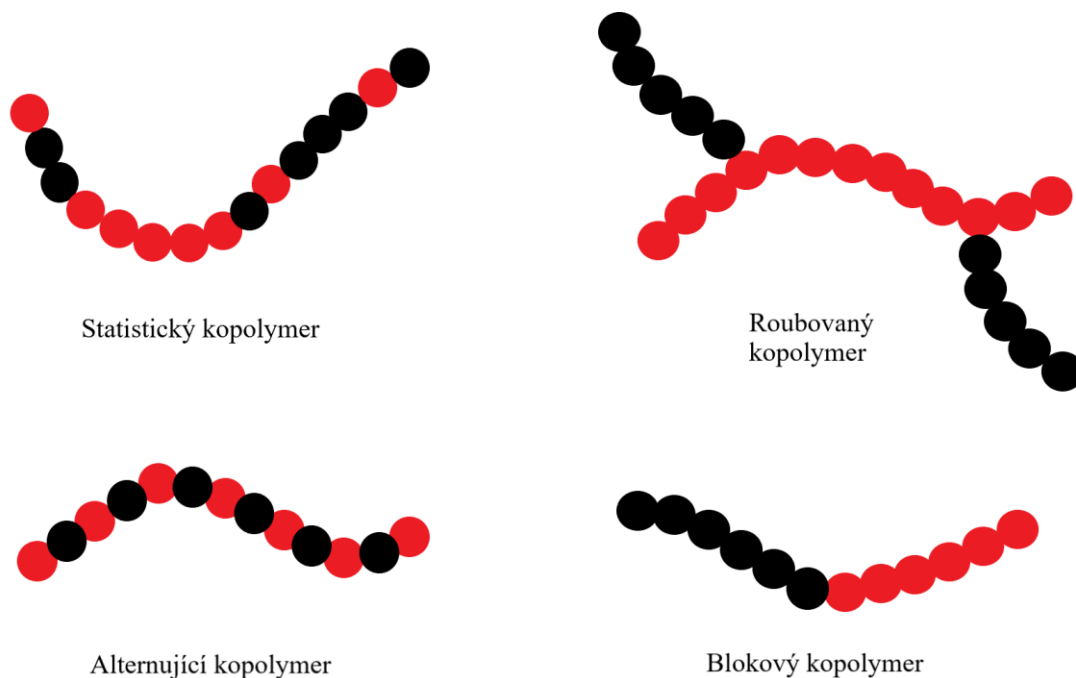


Obrázek 8. Vzhled kyseliny ferulové.²⁶

2.12. Kopolymerace

Když se v sekvenci opakují dva různé monomery, polymer se nazývá kopolymer. Vzorec, na který bude kopolymer a monomer navázán, je určen srovnávací reakcí monomeru a polymeru. Kopolymer může být dále klasifikován jako blokový kopolymer, náhodný kopolymer, alternující kopolymer a roubovaný kopolymer (obrázek 9). Když jsou monomerní jednotky přítomny v uspořádané formě, nazývá se alternující kopolymer, zatímco když je náhodně připojen, nazývá se náhodným (statistickým) kopolymerem. Blokový kopolymer je kombinací dvou nebo více segmentů různých polymerů, které jsou lineárně spojeny na konci.²⁷

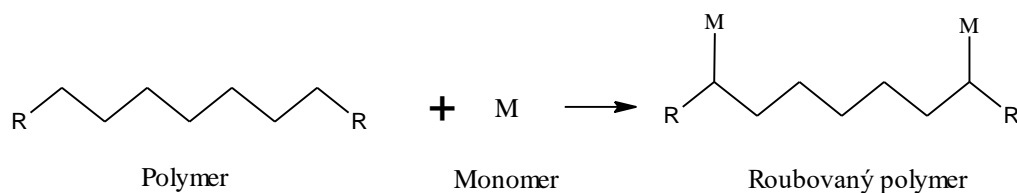
Kopolymery roubované (graft) se vyznačují tím, že ze základního řetězce jednoho polymeru vyrůstají boční řetězce polymeru jiného.



Obrázek 9. Základní typy kopolymerů.²⁸

2.13 Roubování (Grafting)

„Roubování“ je metoda, při které jsou monomery kovalentně vázány (modifikovány) na polymerní řetězec. (obrázek 10). Technika roubování byla využita v této diplomové práci pro přípravu derivátů HA.



Obrázek 10. Roubování (Grafting).

Existují dva hlavní typy roubování: (1) roubování jedním monomerem a (2) roubování směsí dvou (nebo více) monomerů. První typ se obvykle vyskytuje v jediném kroku, ale druhý se může vyskytnout, buď při současném, nebo postupném použití dvou monomerů.²⁹

Roubovaný kopolymer se ve většině případu skládá z přírodního polymeru a syntetického polymeru, ve kterém přírodní polymer působí jako základní řetězec roubovaného kopolymeru a syntetický monomer působí jako vedlejší řetězec, který je připojen k předem vytvořenému polymeru na různých místech. Syntetický polymer může být monomer nebo to může být binární směs. V jednom kroku může být dokončena roubovací reakce, do které jsou zahrnuty pouze monomery.

Proces roubování může probíhat za použití jakékoli polymerační techniky a díky své pružné povaze je nejrozsáhleji studován a také používán.²⁷

Zejména roubované kopolymery obsahující velké množství postranních řetězců chemicky navázaných na lineární řetězec jsou opatřeny fascinujícími vlastnostmi, včetně konformace kompaktních molekulárních rozměrů.

S příchodem živé (řízené) polymerizace a rozvojem organické chemie existuje možnost připravit polymery s požadovanými strukturami a funkcemi. Pro získání hlubšího pochopení korelace mezi strukturami polymerů a jejich vlastnostmi a realizace specifických aplikací polymerů byla úspěšně syntetizována řada roubovaných kopolymerů s různými větvenými topologiemi a chemickými kompozicemi.

Zvýšená pozornost byla věnována syntéze dobře definovaných roubovaných kopolymerů s požadovanými funkčními skupinami, chemickým složením, délkám postranních řetězců, „páteřní“ struktuře a hustotám roubování, díky jejich speciálním molekulárním strukturám a širokým aplikacím od biologie po nanovědy.

Ve srovnání s lineárními blokovými kopolymery lze hydrofilní/hydrofobní rovnováhu roubovaných kopolymerů snadno regulovat nastavením relativní hustoty roubování, délky hlavního a postranního řetězce. Za určitých podmínek mohou být stabilnější unimolekulární micely, které jsou tvořeny amfifilními roubovanými kopolymery. Proto micely tvořené amfifilními roubovanými kopolymery vzbudily značný zájem o použití jako nosičů léčiv a genů v chemoterapii.³⁰

2.13.1. Techniky roubování

Značná pozornost je věnována technikám kopolymerace roubů různých monomerů na polymerních základních řetězcích. Tyto techniky zahrnují chemické, radiační, fotochemické, plazmaticky indukované techniky a enzymatické roubování.

2.13.1.1. Roubování iniciované chemickými prostředky

Chemické prostředky roubování mohou probíhat dvěma hlavními cestami, tzn. pomocí volných radikálů a iontů. V chemickém procesu je role iniciátoru velmi důležitá, protože určuje cestu procesu roubování. Kromě obecného mechanismu za pomoci volného radikálu probíhá roubování radikálovou polymerací v tavenině a pomocí atomového přenosu (ATRP), které jsou také zajímavými technikami pro provádění roubování.

2.13.1.2. Radikálové roubování

V chemickém procesu se z iniciátorů vytvoří volné radikály a přenesou se na substrát, aby reagovaly s monomerem za vzniku roubovaných kopolymerů. Obecně lze uvažovat o tvorbě volných radikálů nepřímými nebo přímými metodami.

2.13.1.3. Roubování živou polymerací

V posledních letech se vyvinuly metody „živé polymerizace“, které poskytují potenciál pro roubovací reakce. Podle názoru Szwarc je nejspolehlivější definicí „živého polymeru“ „to, že si zachovává schopnost šíření po dlouhou dobu a růst na požadovanou maximální velikost, zatímco jejich stupeň ukončení nebo přenos řetězců je stále zanedbatelný“. Řízené radikálové polymerizace kombinují vlastnosti konvenčních radikálových a iontových polymerací. Konvenční polymerace volnými radikály vyžaduje kontinuální iniciaci, s ukončením radikálů prodlužujících řetězce v kopulačních nebo disproporcionačních reakcích, a v důsledku toho vede k nereaktivním („mrtvým“) polymerům, v podstatě časově invariantním stupňům polymerace a širokému rozdělení molekulových hmotností. V případě živé polymerace poskytuje živé polymery s regulovanou molekulovou hmotností a nízkou polydisperzitou.

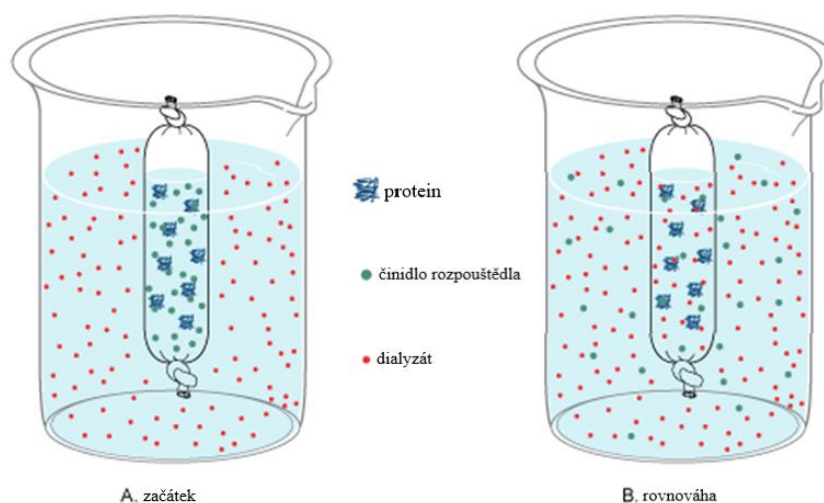
2.13.1.4. Iontové roubování

Roubování může také probíhat iontovým způsobem. Suspenze alkalických kovů v kapalině Lewisovy báze, organokovové sloučeniny a naftalenid sodný jsou v tomto smyslu použitelnými iniciátory.²⁹

2.14. Metody pro čištění kopolymerů

2.14.1. Dialýza

Dialýza (obrázek 11) je děj, při kterém jsou od sebe odděleny látky s různou rozpustností a velikostí molekul. Prakticky se tak děje přechodem analyticky disperzních látek přes polopropustnou membránu z prostředí s vyšší koncentrací těchto látek do prostředí s nižší koncentrací. Důležité je, aby látky tvořící koloidní roztok přes membránu neprocházely.



Obrázek 11. Dialýza.

Dialýza se používá pro širokou škálu aplikací: odsolení, výměnu pufců, odstranění činidel, studie vazby na léky, růst buněk, čištění virů a ošetření krve. Obvykle jsou vzorek a roztok pufců (nazývaný dialyzát) umístěny na opačných stranách dialyzační membrány, která obsahuje

póry určitého rozsahu velikostí. Molekuly vzorku, které jsou větší než póry, jsou zadržovány na straně vzorku membrány, ale malé molekuly procházejí membránou, což snižuje koncentraci těchto molekul ve vzorku.³¹

2.14.2. Lyofilizace

Lyofilizace je definována jako stabilizační proces, ve kterém je látka nejprve zmrazena a potom je množství rozpouštědla redukováno nejprve sublimací (primárním sušením) a pak desorpčí (sekundárním sušením) na hodnoty, které již nebudou podporovat biologický růst nebo chemické reakce.

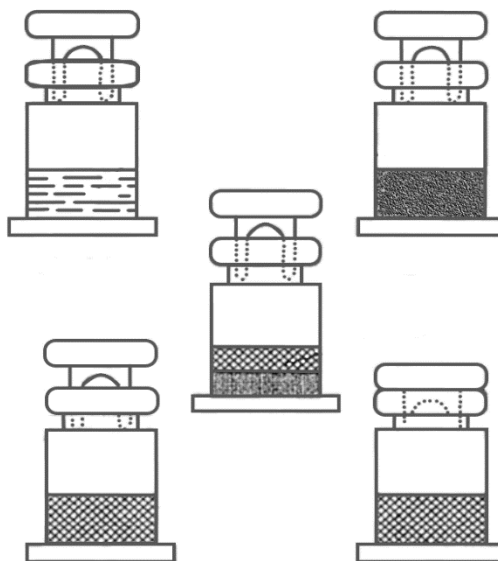
2.14.2.1 Primární sušení

Jakmile prostředek dosáhne úplně zmrazeného stavu, tlak v lyofilizátoru se sníží a na formulaci se aplikuje teplo, aby se iniciovala sublimace ledových krystalů. Dokončení procesu primárního sušení nastane, když jsou z formulace odstraněny všechny ledové krystaly a objem obsazený ve výsledném koláči je ekvivalentní objemu zmrzlé matrice.

2.14.2.2. Sekundární sušení

Po dokončení primárního sušení bude stále na povrchu koláče adsorbována voda. Tato vlhkost může v závislosti na teplotě a povaze složek obsahujících koláč obsahovat 5 - 10% hm. suchého produktu. Konečná desorpce zbývající vody se obvykle provádí zvýšením teploty produktu a snížením parciálního tlaku vodní páry v kontejneru. Dokončení sekundárního sušení, je obecně posledním krokem procesu lyofilizace.

Příklad přístroje pro lyofilizaci je uveden na obrázku 12.



Obrázek 12. Lyofilizace ve skleněném kontejneru.³²

2.15. Metody pro charakterizaci kopolymerů

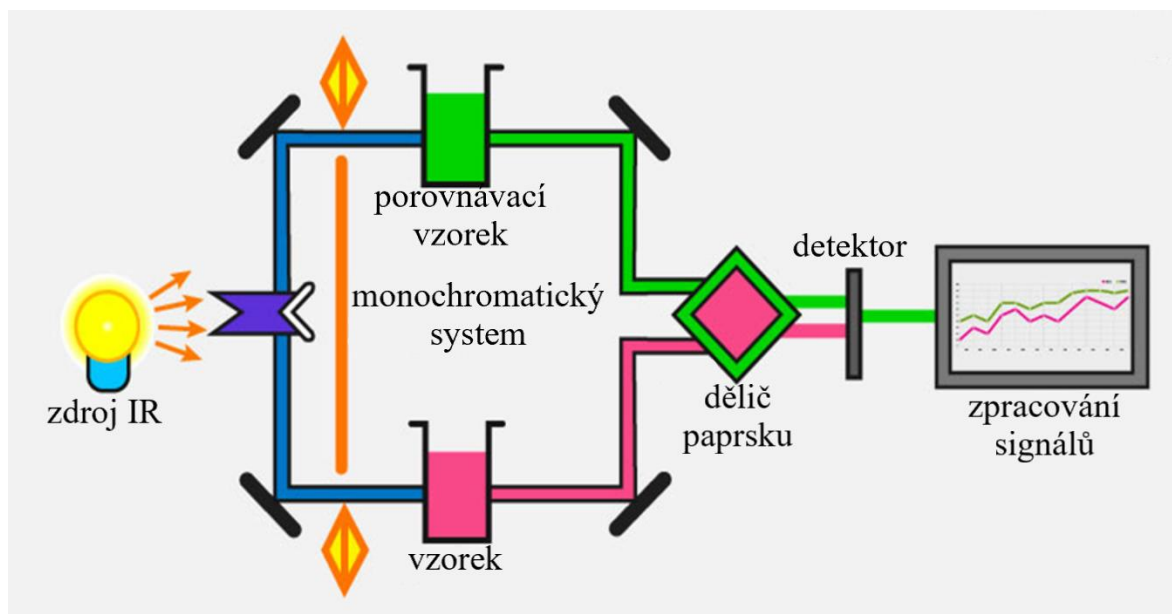
2.15.1. Infračervená spektroskopie (IČ)

Jedná se o optickou techniku pro měření absorpčních spekter pevných, kapalných nebo plynných organických sloučenin v IČ oblasti. Tato technika se také používá pro stanovení izomerů a homologů. Získaná IČ-absorpční křivka se porovnává se známými křivkami v katalogu (např. Landolt-Börnstein), který umožňuje rychlou identifikaci konstituce. V IČ-spektroskopii jsou zaznamenávány přechody mezi molekulárními stavy, zejména vibračními a rotačními stavy. Pro kontinuální zaznamenávání absorpce prochází vzorkem infračervený paprsek ve spektrální oblasti 200 – 4000 nm. Z výsledných absorpčních píků mohou být snadno a přesně identifikovány funkční skupiny, jako jsou ketony, estery atd.

Je možné provádět jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu pomocí IČ-spektroskopie. Pro kvalitativní analýzu je obzvláště vhodná oblast „otisku prstu“ spektra v rozsahu 650 – 1450 nm. Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací (FT-IČ) je zvláště důležitý pro kvantitativní analýzu nízkých koncentrací.

Kromě analýzy látek významných pro životní prostředí je možné pomocí IČ-spektroskopie také provést kvalitativní a kvantitativní analýzu textilií s ohledem na jejich složení vláken.³³

Schematické znázornění přístroje pro IČ je uvedeno na obrázku 13.

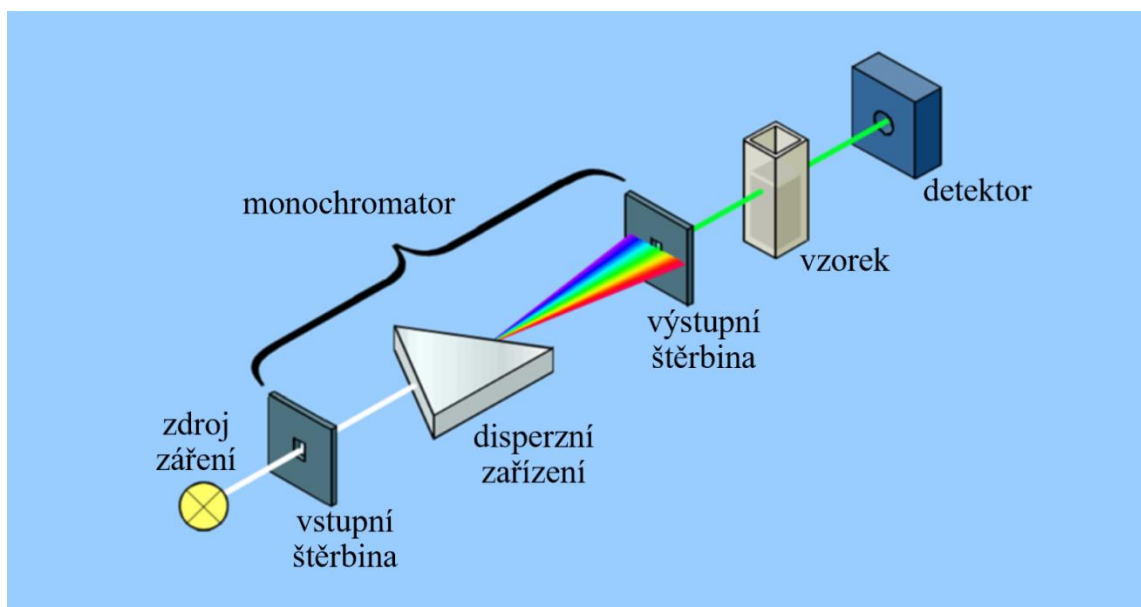


Obrázek 13. Schéma IČ měření.³⁴

2.15.2. Ultrafialová spektroskopie (UV)

Ultrafialová spektroskopie, známá také jako UV spektrometrie, byla jednou z prvních spektroskopických technik používaných ke kvantifikaci chemického složení. Stejně jako ostatní spektroskopické techniky se používá k identifikaci charakteristických molekulárních „otisků prstů“ umožňujících kvantitativní detekci specifických molekul nebo molekulárních druhů v komplexních směsích.³⁵

Schematické znázornění přístroje pro UV je uvedeno na obrázku 14.



Obrázek 14. Schéma UV měření.³⁶

UV absorpční maxima se vyskytují při 190, 230 a 260 nm a odpovídají mono-, di- a polyaromátům. Množství těchto složek v analytickém vzorku může být kvantifikováno použitím jednoduchého vzorce založeného na molekulové hmotnosti a průměrné molární absorpce každého druhu na těchto vlnových délkách. Jedním z nejčastějších použití UV spektrometrie je stanovení množství toxických nečistot, zejména polyaromatických uhlovodíků, v mazivech a palivech.³⁷

2.15.3. Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je fyzikální jev založený na kvantových, mechanických a magnetických vlastnostech atomového jádra. NMR spektroskopie je jednou z hlavních metod používaných k získání fyzikálních, chemických, elektronických a strukturních informací o molekulách v důsledku chemického posunu a Zeemanova vlivu na rezonanční frekvence jader.

Jedná se o výkonnou techniku, která může poskytnout podrobné informace o topologii, dynamice a struktuře 3D molekul v roztoku a v pevném stavu.³⁸

NMR spektroskopie je v současné době stále více využívána k analýze potravin. Výhody, jako je jednoduchost postupů přípravy vzorků a měření, instrumentální stabilita a snadnost, s jakou lze spektra interpretovat, přispěly k rostoucí popularitě této techniky. NMR spektra potravinářských výrobků mohou působit jako „otisky prstů“, které mohou být použity pro porovnání, rozlišení nebo klasifikaci vzorků.³⁹

Dvě důležité techniky jsou protonová (^1H) NMR a uhlíková (^{13}C) NMR spektroskopie, i když lze měřit i některá další magnetická jádra. NMR spektroskopie umožňuje identifikaci jednotlivých atomů v čisté molekule. Tato technika je jednou z neúčinnějších metod určování struktury organických sloučenin.

Na rozdíl od IČ spektroskopie, která zkoumá funkční skupiny v molekule nebo UV spektroskopii, která zkoumá molekuly jako celek, NMR zkoumá specifické atomy a jejich prostředí ve vzorku. Protonová (^1H) a uhlíková (^{13}C) NMR jsou ideální pro získání strukturních informací organických sloučenin, protože se z větší části skládají z atomů uhlíku a vodíku. Další vlastností NMR spektroskopie je, že může kvantifikovat počet atomů v každém strukturním prostředí, což přesně definuje molekulární strukturu sloučeniny.

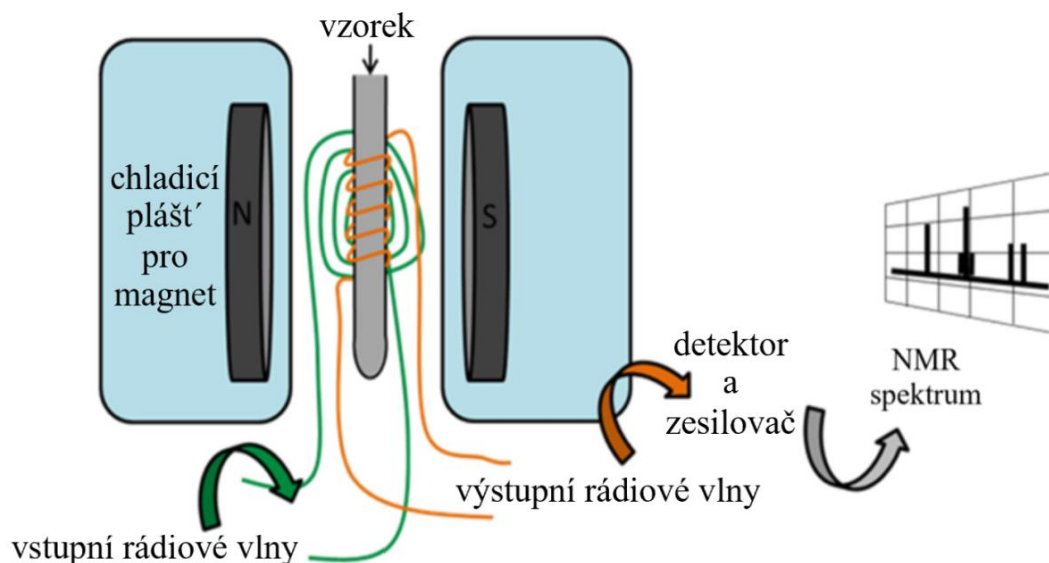
Když jsou NMR aktivní jádra, jako je ^1H nebo ^{13}C , umístěna v magnetickém poli, rezonují na specifické frekvenci, tedy na magnetické rezonanci pro techniku, v závislosti na síle magnetického pole.³⁷

V mnoha případech můžeme identifikovat molekulu z ^{13}C NMR spektra, ale pak musíme vždy zkontrolovat, zda je naše řešení v souladu s ^1H NMR spektrem.

Často je obtížné identifikovat alicyklické molekuly pomocí protonového spektra NMR, protože spektra se stávají velmi složitými v tuhých systémech, ale tyto molekuly jsou relativně snadno identifikovatelné pomocí ^{13}C NMR.⁴⁰

Ze spektra ^{13}C provedeme přiřazení chemického posunu jednotlivým signálům. ^1H spektra udává chemický posun a hodnotu interakční konstanty.⁴¹

Schematické znázornění přístroje pro NMR je uvedeno na obrázku 15.



Obrázek 15. Schéma NMR měření.⁴²

2.15.4. Hmotnostní spektrometrie (MS)

Jedná se o techniku identifikující strukturu, která zahrnuje analýzu vzorků v plynné fázi. Ty, které nejsou v plynném stavu, se přeměňují na plyny odpařováním. Vzorek plynu je pak ionizován, buď elektronovou ionizací, nebo chemickou ionizací za vzniku primárních a fragmentovaných iontů, které jsou rozděleny podle hmotností a jejich poměru hmotnost / náboj a relativní množství je zaznamenáno. Hlavní omezení MS je v tom, že složitost hmotnostního spektra se zvyšuje s rostoucí molekulovou velikostí (molekulovou hmotností) a počtem složek v analytickém vzorku.³⁷

2.15.5. SEC- MALLS

SEC (Size Exclusion Chromatography) – známá také jako molekulová síťová chromatografie, je chromatografická metoda, při které jsou molekuly v roztoku odděleny svou velikostí a v některých případech molekulovou hmotností.⁴³

Další metodou detekce je MALLS – Multi Angle (Laser) Light Scattering. Při dopadu primárního paprsku světla na částici dochází k jeho rozptylu do různých směrů, detektor zaznamenává intenzitu tohoto rozptýleného světla pod určitým úhlem.

Spojením SEC chromatografie a MALLS detektoru můžeme určit hodnoty M_n (číselně střední relativní molekulová hmotnost), M_w (hmotnostní střední relativní molekulová hmotnost), M_z (velikostní průměr), gyrační poloměr s a druhý viriální koeficient A_2 . Při zapojení viskozimetru určíme i vnitřní viskozitu $[\eta]$.^{44, 45, 46}

2.15.6. Antioxidační aktivita

V posledních desetiletích se zvyšuje množství poznatků a úroveň znalostí o úloze volných radikálů při oxidačním stresu u živých organismů. Volným radikálům, které vznikají in vivo a mají řadu fyziologických funkcí (např. účast v protizánětlivých reakcích, v procesu fagocytosy), se v současnosti věnuje velká pozornost a sleduje se jejich negativní působení na organismus při řadě onemocnění. Jde především o reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a dusíkové radikály (RNS – reaktivní formy dusíků). Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci.

Z uvedených důvodů vzrůstá zájem stanovit antioxidační aktivitu různých látek. V literatuře lze nalézt velký počet metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály nebo reakci s přechodnými kovy. Přesnější chemické vymezení mechanismu jejich účinku je však často problematické. Proto také postupy hodnotící míru antioxidačního působení jsou založeny na různých principech. Obecně mohou být kategorizovány do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a dále na metody posuzující redoxní vlastnosti látek.

Jednou ze základních metodik pro posouzení antioxidační aktivity je metoda DPPH. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpicrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl).⁴⁷

2.15.7. Cytotoxicita

V současné době jsou běžně používanými testy životaschopnosti buněk: přímé počítání živých buněk, kvantifikace aktivity esterázy, celková hmotnost nukleové kyseliny, celková hmotnost proteinu a metabolismus buněk. Metody založené na stanovení buněčného metabolismu zahrnují: kvantifikaci intracelulárního adenosintrifosfátu (ATP) a redukci tetrazoliových solí (MTT) na formazan v životaschopných buňkách. Oba tyto metodologické přístupy odrážejí množství aktivních mitochondrií. Metoda MTT (obrázek 16) odráží aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz. Na druhou stranu množství intracelulárního ATP přímo odpovídá úrovni tvorby ATP v těchto organelách.

Tyto metody založené na analýze metabolické aktivity jsou však nekompatibilní s experimentálními léčbami, které přímo modulují buněčný metabolismus, mitochondriální aktivitu nebo intracelulární hmotnost mitochondrií. Dále bylo popsáno, že některé látky, převážně redoxní účinné látky, přímo reagují s formazanovými barvivy, což přináší zavádějící informace o životaschopnosti buněk. Z těchto důvodů je odhad životaschopnosti buněk metodami MTT nebo ATP omezen a jsou zapotřebí další přístupy.⁴⁸

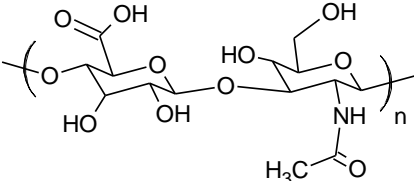
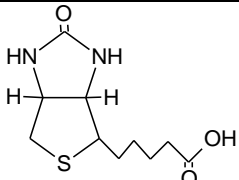
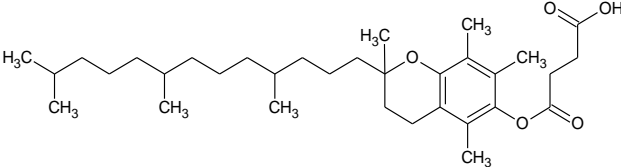
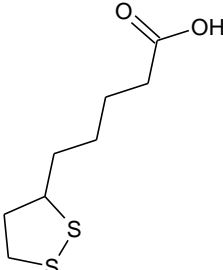
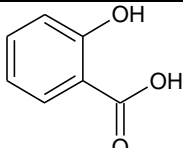
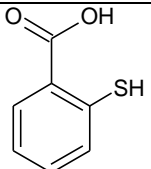
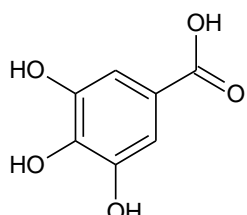


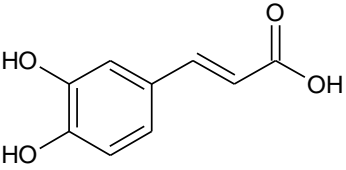
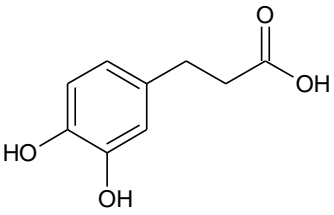
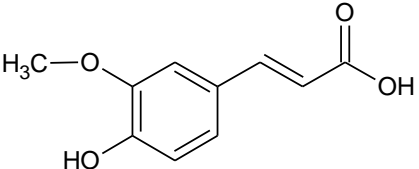
Obrázek 16. MTT test.⁴⁹

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie

V tabulce jsou seřazeny všechny chemikálie použité pro přípravu derivátů kyseliny hyaluronové.

Název	Vzorec	Vlastnosti	Výrobce
Kyselina hyaluronová		M = 400 (g.mol ⁻¹) bílý prášek	Contipro
Biotin		M = 244,31 (g.mol ⁻¹) bílý prášek	Sigma-Aldrich
Tokoferol sukcinát		M = 530,78 (g.mol ⁻¹) bílý prášek	Sigma-Aldrich
Kyselina lipoová		M = 206,33 (g.mol ⁻¹) žluté jehličkovité krystaly	Sigma-Aldrich
Kyselina salicylová		M = 138,1 (g.mol ⁻¹) bílý prášek	Merck
Kyselina thiosalicylová		M = 154,19 (g.mol ⁻¹) světle žlutý prášek	Merck
Kyselina gallová		M = 170,12 (g.mol ⁻¹) žluto-bílé krystaly	Merck

Název	Vzorec	Vlastnosti	Výrobce
Kyselina kávová		M = 180,16 (g.mol ⁻¹) žlutý prášek	Sigma- Aldrich
Kyselina hydrokávová		M = 182,17 (g.mol ⁻¹) bílý prášek	Alfa Aesar
Kyselina ferulová		M = 194,18 (g.mol ⁻¹) bílý prášek	Sigma- Aldrich
Isopropyl- alkohol (IPA)	C ₃ H ₈ O	M = 60,1 (g.mol ⁻¹) ρ = 0,786 (g.cm ⁻³) bezbarvá kapalina	PENTA
Tetrahydro- furan (THF)	C ₄ H ₈ O	M = 72,11 (g.mol ⁻¹) ρ = 0,889 (g.cm ⁻³) bezbarvá kapalina	PENTA
Triethylamin (TEA)	C ₆ H ₁₅ N	M = 101,2 (g.mol ⁻¹) ρ = 0,727 (g.cm ⁻³) bezbarvá kapalina	PENTA
Dimethyl- aminopyridin (DMAP)	C ₇ H ₁₀ N ₂	M = 122,17 (g.mol ⁻¹) bílý prášek	Merck
Benzoyl- chlorid (BC)	C ₇ H ₅ ClO	M = 140,57 (g.mol ⁻¹) ρ = 1,21 (g.cm ⁻³) bezbarvá kapalina	Merck

Název	Vzorec	Vlastnosti	Výrobce
Chlorid sodný (NaCl)	NaCl	M = 58,44 (g.mol ⁻¹) bílý prášek	Merck
Oxid deuteria (D ₂ O)	D ₂ O	M = 20,03 (g.mol ⁻¹) ρ = 1,11 (g.cm ⁻³) bezbarvá kapalina	Sigma- Aldrich
Hydrogen- uhličitan sodný (NaHCO ₃)	NaHCO ₃	M = 84 (g.mol ⁻¹) bílý prášek	Lach- Ner

3.2. Příprava derivátů kyseliny hyaluronové

Postupně bylo připraveno celkem 18 derivátů kyseliny hyaluronové.

Proces přípravy probíhal v prvním kroku přípravou roztoku HA, pak následovala aktivace kyseliny, reakce mezi aktivovanou kyselinou a roztokem HA, poté probíhalo srážení, několikanásobné promývání a nakonec proces sušení.

Během přípravy bylo použito tmavé nadobí, kvůli citlivosti antioxidantů na světlo.

Příprava roztoku HA: Přesná navážka HA (viz tabulky 5 a 8) byla rozpuštěna v demineralizované vodě. Do roztoku HA byl přidán THF, TEA a DMAP (rozpuštěný v malém množství vody). Roztok HA byl během aktivace kyseliny míchán.

Aktivace kyseliny: V THF bylo rozpuštěno potřebné množství antioxidantu. Následně byl do roztoku přidán TEA a BC. Aktivace roztoku probíhala 60 min při RT (laboratorní teplota).

Roztok aktivované kyseliny byl přimísen do roztoku HA. Reakce probíhala 3 h při RT.

Srážení: Přidáno NaCl v demineralizované vodě a IPA (IPA byla přidávána do reakční směsi).

Promývání: 4-krát 100% IPA a 4-krát 80% IPA.

Sušení: 24 hod v sušárně.

Průběh přípravy derivátů HA je znázorněn na obrázku 17. Zařízení pro míchání a promývání vzorků je uvedeno na obrázku 18.

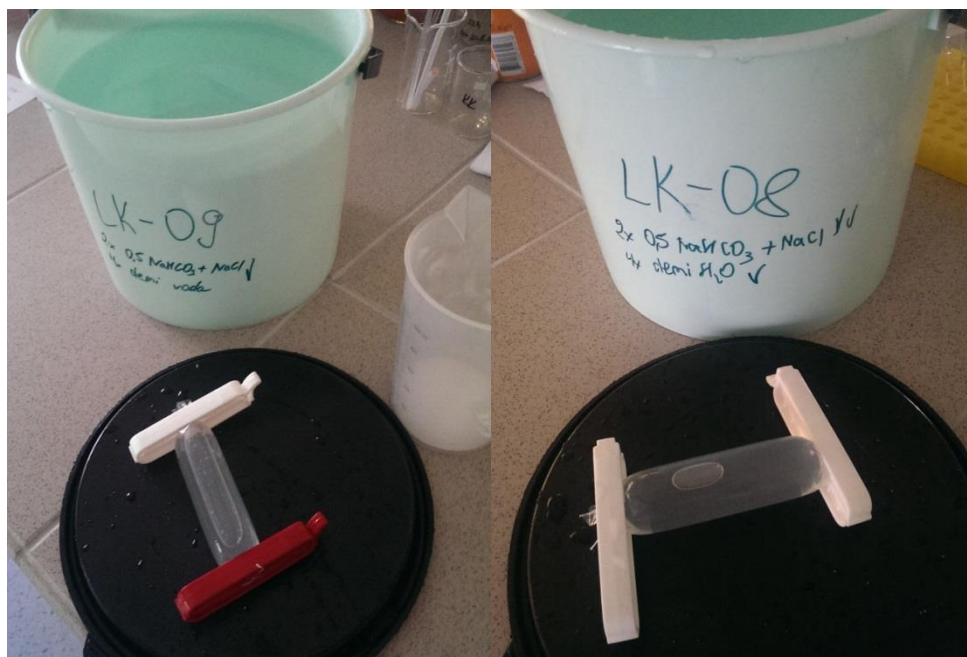


Obrázek 17. Příprava derivátů kyseliny hyaluronové.

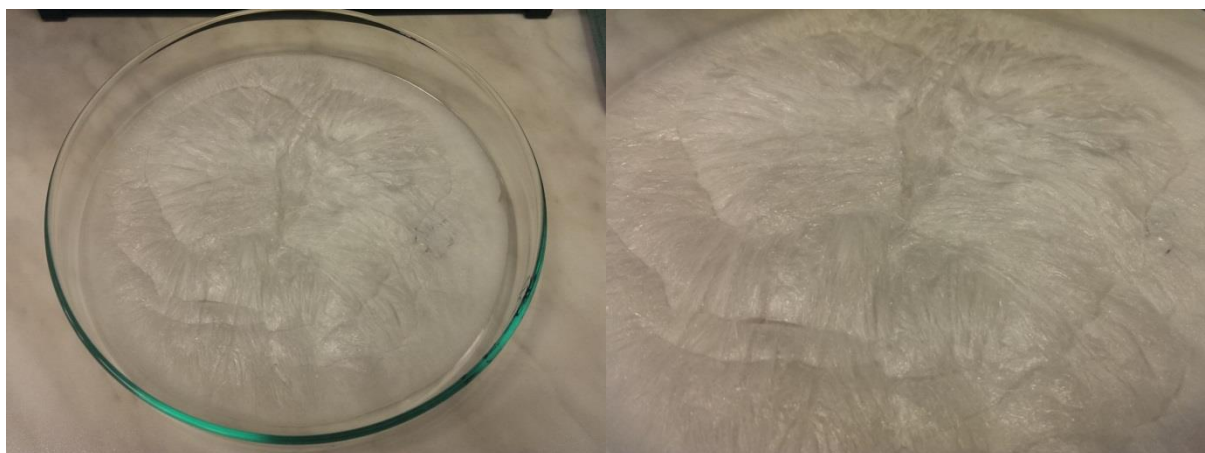


Obrázek 18. Zařízení pro promývání vzorků.

Dva vzorky měly trochu odlišnou přípravu. Místo promývání a sražení u vzorků HA-B1105 a HA-LA1105 byla provedena dialýza (promývání 0,5% NaHCO_3 + NaCl 2-krát a demineralizovaná voda 4-krát), zamražení v průběhu 24 hod a lyofilizace na přístroji CoolSafe 55-9 Pro. Dialýza probíhala v plastových kyblíkách zobrazených na obrázku 19. Vzhled vzorku po lyofilizaci je uveden na obrázku 20.



Obrázek 19. Dialýza vzorků.



Obrázek 20. Produkt po lyofilizaci.

V tabulce 4 je uveden seznam všech vzorků, které byly připravené pro vypracování diplomové práce. Příklad kódu: KÓD HA-B1051, kde HA je kyselina hyaluronová, B je biotin, vzorek je připraven v poměru 1:0,5 a navážka HA je 1g.

Tabulka 4. Seznam všech připravených vzorků.

№	Vzorek	Poměr (Ekv.)	Navážka HA (g)	KÓD
1.	HA-B	1:0,5	1	HA-B1051
2.	HA-B	1:0,5	5	HA-B1055
3.	HA-B	1:1	0,5	HA-B1105
4.	HA-B	1:1	1	HA-B111
5.	HA-TS	1:0,5	1	HA-TS1051
6.	HA-TS	1:0,5	5	HA-TS1055
7.	HA-TS	1:1	1	HA-TS111
8.	HA-LA	1:0,5	1	HA-LA1051
9.	HA-LA	1:1	0,5	HA-LA1105
10.	HA-LA	1:1	1	HA-LA111
11.	HA-SA	1:0,5	1	HA-SA1051
12.	HA-SA	1:1	1	HA-SA111
13.	HA-GA	1:0,5	1	HA-GA1051
14.	HA-GA	1:1	1	HA-GA111
15.	HA-TSA	1:1	1	HA-TSA111
16.	HA-CA	1:1	1	HA-CA111
17.	HA-HCA	1:1	1	HA-HCA111
18.	HA-FA	1:1	1	HA-FA111

Navážky jednotlivých surovin pro přípravu vzorků v poměru ekvivalentu 1:1 (HA:Antioxidant) jsou uvedené v tabulce 5.

Tabulka 5. Navážky surovin pro přípravu vzorků v poměru ekvivalentu 1:1.

Chemikálie	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]	V [ml]	Ekv.
HA	1	2,5	400		1
Antioxidant	x	x	x		1
TEA	0,76	7,5	101,2	1,045	3
	0,76	7,5	101,2	1,045	3
DMAP	0,015	0,125	122,2		0,05
BC	0,35	2,5	140,57	0,290	1
THF			72,11	10	
				10	
H ₂ O			18,0	20	
NaCl	0,731	12,5	58,44		5

Pozn: x – viz navážky z tabulky 6.

Navážky jednotlivých antioxidantů při poměru ekvivalentu 1:1 (HA:Antioxidant) následují v tabulce 6.

Tabulka 6. Navážky antioxidantů při poměru ekvivalentu 1:1.

Antioxidant	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]
Biotin	0,611	2,5	244,31
Tokoferol sukcinát	1,327	2,5	530,78
Kyselina lipoová	0,516	2,5	206,33
Kyselina salicylová	0,345	2,5	138,12
Kyselina gallová	0,425	2,5	170,12
Kyselina thiosalicylová	0,386	2,5	154,19
Kyselina kávová	0,451	2,5	180,16
Kyselina hydrokávová	0,455	2,5	182,17
Kyselina ferulová	0,485	2,5	194,18

Tak bylo připraveno celkem 9 vzorků s různými typy antioxidantů.

Dále byly připravené dva vzorky z menšího množství HA (0,5 g), při stejném poměru ekvivalentu 1:1 (HA:Antioxidant). Navážky byly zmenšené dvakrát oproti navážkám uvedených v tabulce 5. Zmenšené navážky antioxidantů jsou uvedené v tabulce 7.

Tabulka 7. Zmenšené navážky antioxidantů při poměru ekvivalentu 1:1.

Antioxidant	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]
Biotin	0,305	1,25	244,31
Kyselina lipoová	0,258	1,25	138,12

V další části bylo připraveno 5 vzorků v poměru ekvivalentu 1:0,5 (HA:Antioxidant), jednotlivé navážky jsou uvedené v tabulce 8.

Tabulka 8. Navážky surovin pro přípravu vzorků v poměru ekvivalentu 1:0,5.

Chemikálie	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]	V [ml]	Ekv.
HA	1	2,5	400		1
Antioxidant	x	x	x		0,5
TEA	0,76	7,5	101,2	1,045	3
	0,76	7,5	101,2	1,045	3
DMAP	0,015	0,125	122,2		0,05
BC	0,18	1,3	140,57	0,145	0,5
THF			72,11	10	
				10	
H ₂ O			18,0	20	
NaCl	0,731	12,5	58,44		5

Pozn: x – viz navážky z tabulky 9.

Navážky jednotlivých antioxidantů při poměru ekvivalentu 1:0,5 (HA:Antioxidant) ukazuje tabulka 9.

Tabulka 9. Navážky antioxidantů při poměru ekvivalentu 1:0,5.

Antioxidant	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]
Biotin	0,305	1,25	244,31
Tokoferol sukcinát	0,664	1,25	530,78
Kyselina lipoová	0,258	1,25	206,33
Kyselina salicylová	0,174	1,25	138,12
Kyselina gallová	0,214	1,25	170,12

Nakonec byli připravené dva vzorky z většího množství HA (5 g), při poměru ekvivalentu 1:0,5 (HA:Antioxidant). Navážky byly zvětšené pětinasobně oproti navážkám v tabulce 8. Vzorky byli připravené kvůli ověření výsledků stupňů substituce DS (jaký vliv má zvětšení navážky). Zvětšené navážky antioxidantů jsou uvedené v tabulce 10.

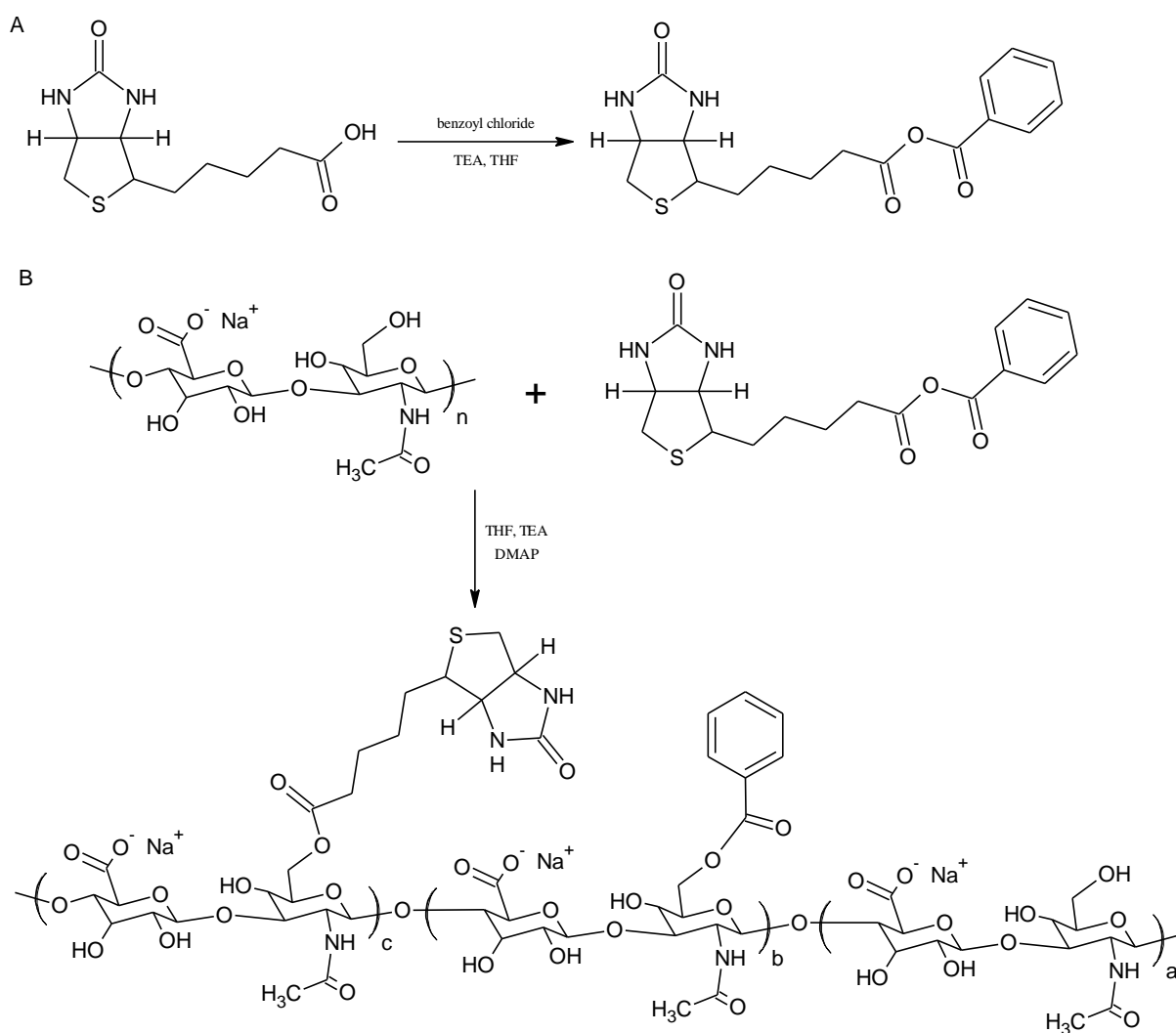
Tabulka 10. Zvětšené navážky antioxidantů při poměru ekvivalentu 1:0,5.

Chemikálie	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]
HA	5	12,5	400
Biotin	1,526	6,25	244,31
Tokoferol sukcinát	3,320	6,25	530,78

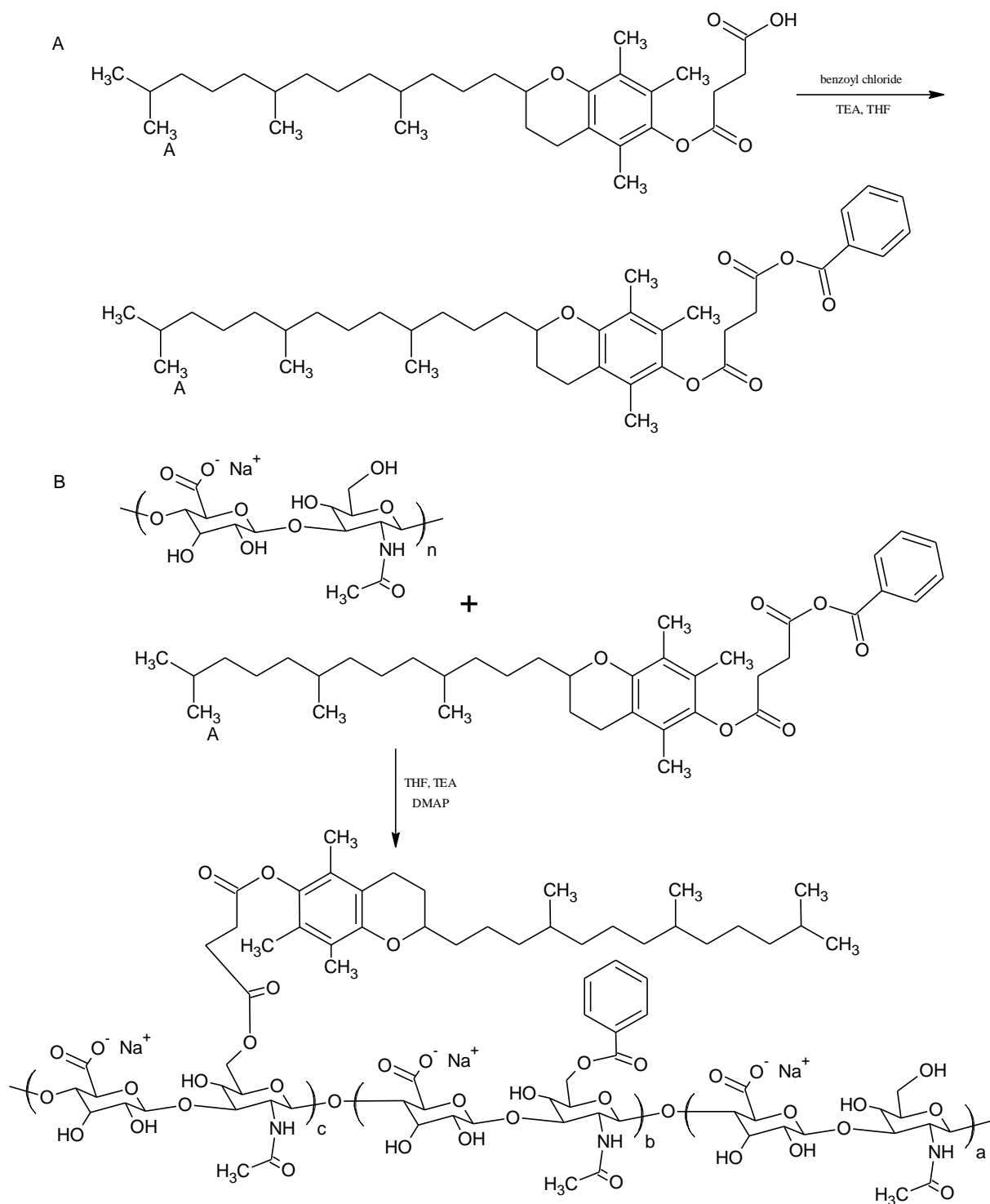
3.2.1. Reakce přípravy derivátů HA

Níže jsou popsány jednotlivé reakce přípravy různých derivátů kyseliny hyaluronové.

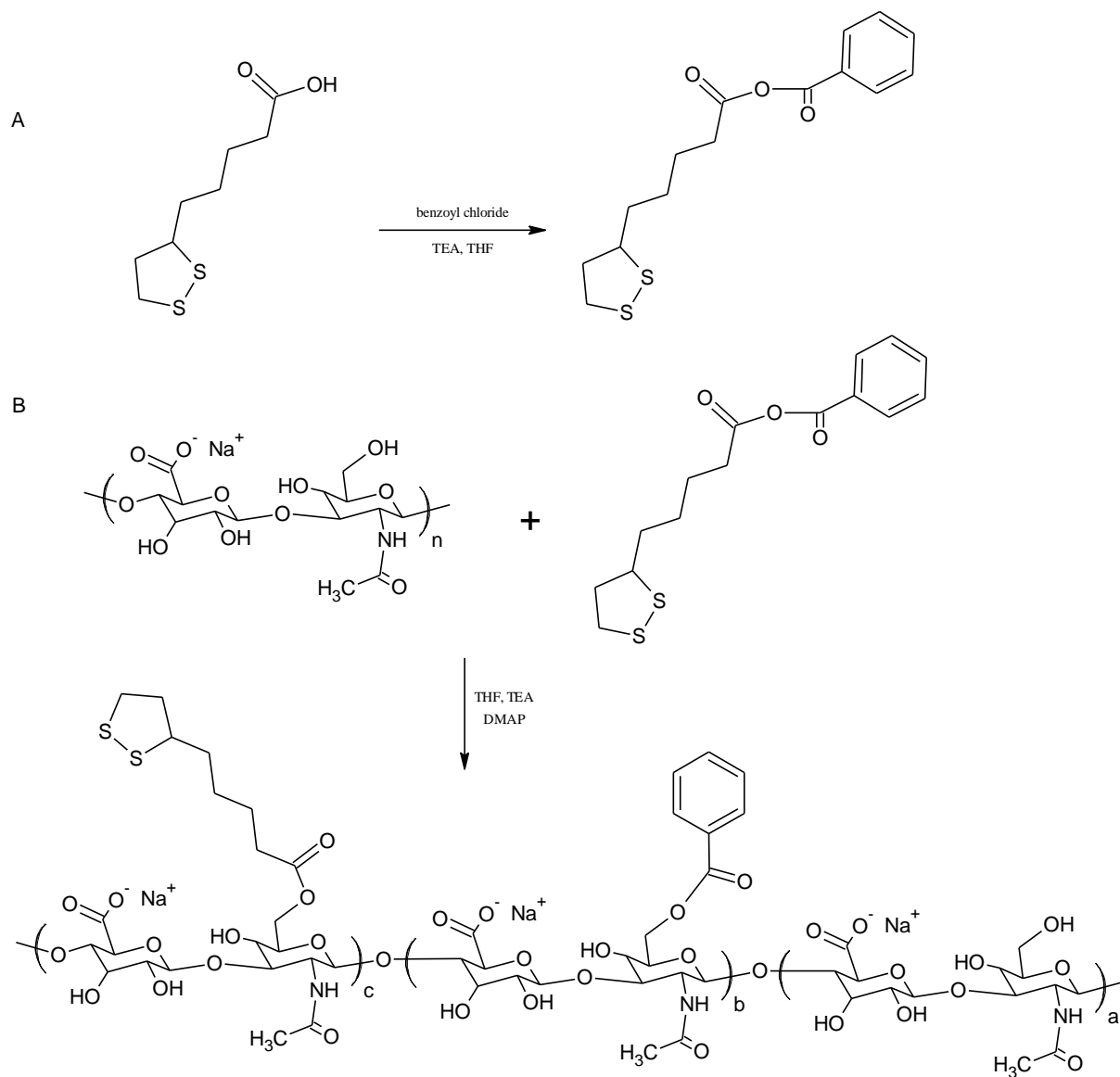
Reakce HA + Biotin



Reakce HA + Tokoferol sukcinát

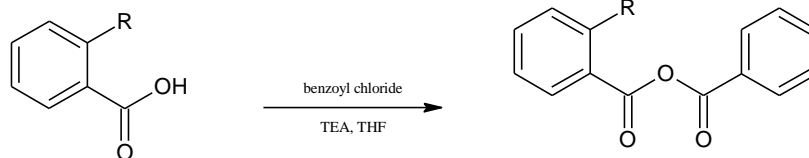


Reakce HA + Kyselina lipoová



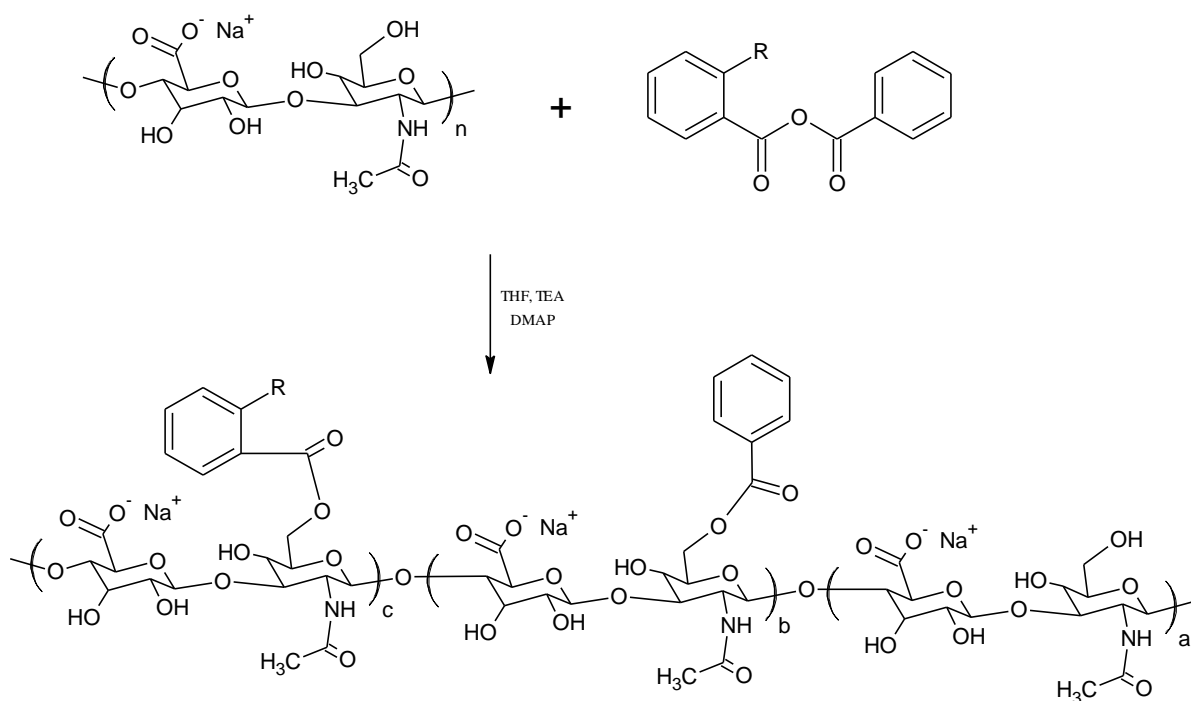
Reakce HA + Kyselina salicylová, kyselina thiosalicylová

A

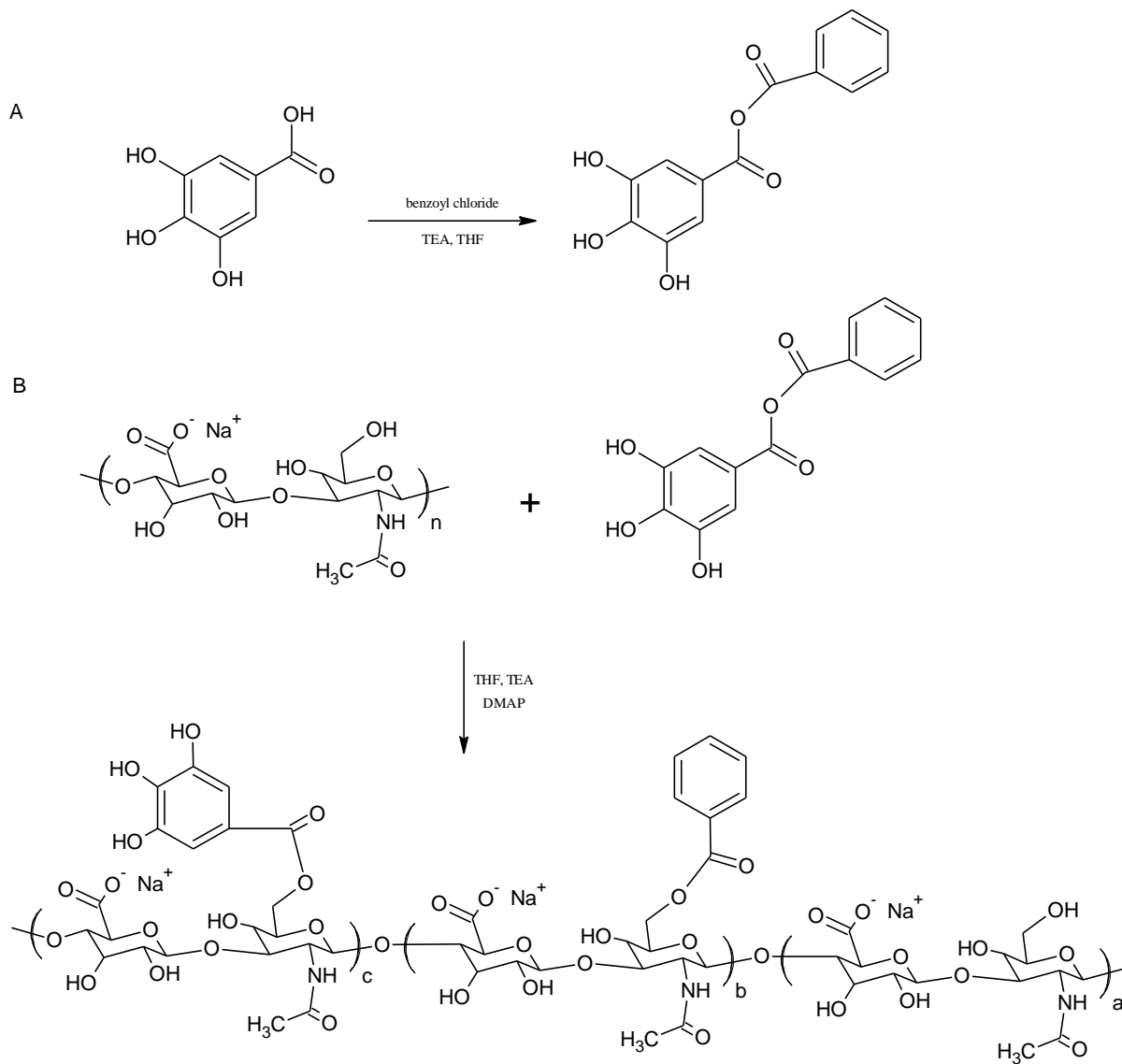


R = OH, SH

B

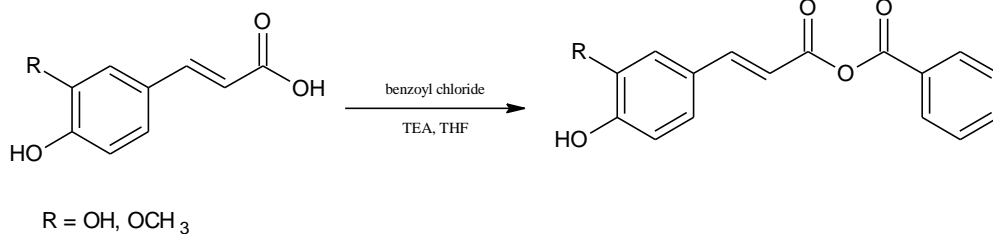


Reakce HA + Kyselina gallová

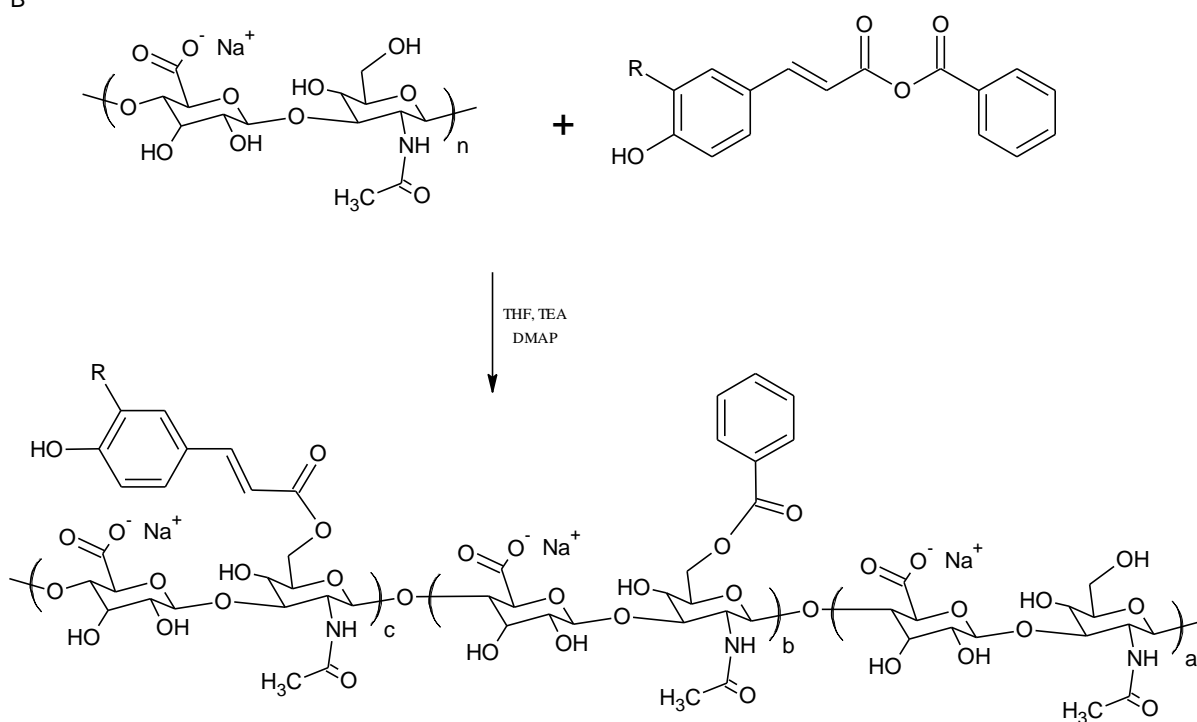


Reakce HA + Kyselina kávová, Kyselina ferulová

A

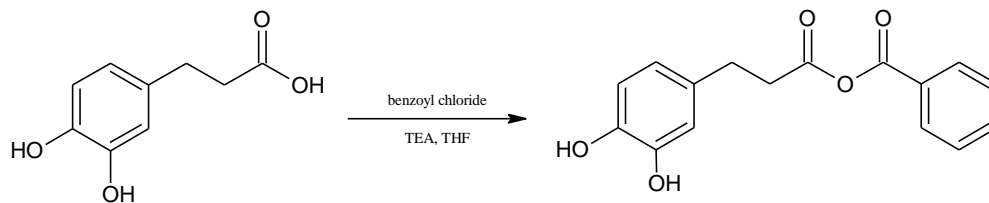


B

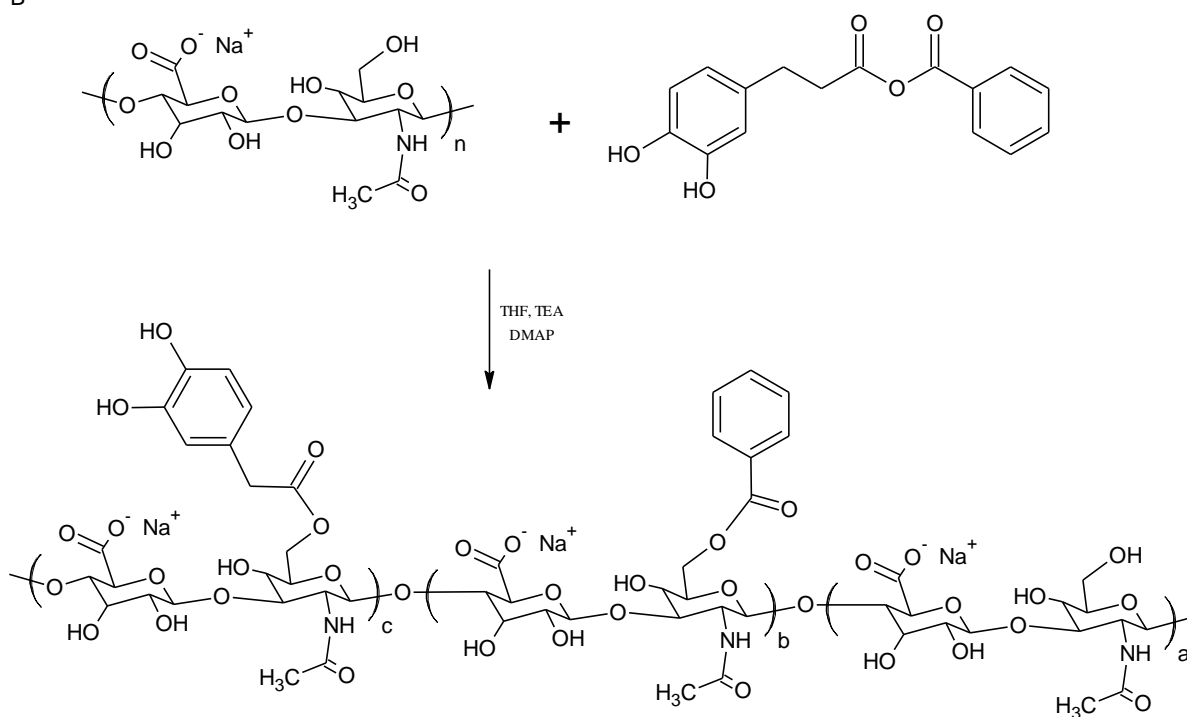


Reakce HA + Kyselina hydrokávová

A



B



3.3. Charakterizace připravených derivátů HA

3.3.1. NMR spektroskopie

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena při 25 °C na přístroji BRUKER Avance™ III 500 MHz (obrázek 21) pracující při frekvenci pro ^1H - 500,25 MHz a pro ^{13}C - 125,8 MHz. Chemický posun ^1H a ^{13}C byl vztažen na 3 - (trimethylsilyl) - sodnou sůl kyseliny propionové jako vnitřní standard.

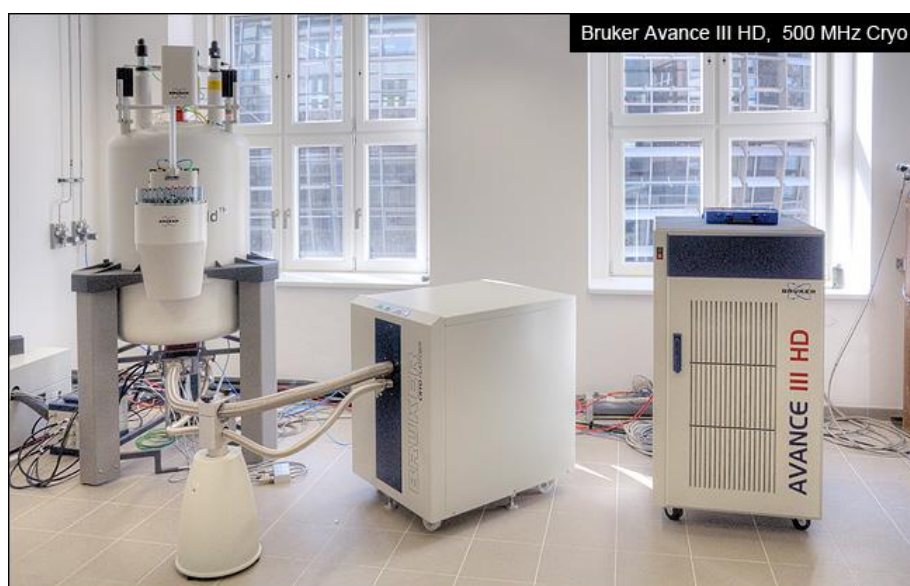
Vzorky derivátů HA byly analyzovány rozpuštěním 8 mg×ml⁻¹ v oxidu deuteria (D₂O). Stupeň substituce (DS) je vyjádřen v % a je definován jako průměrný počet substituentů navázaných na 100 disacharidových dimerů HA. Například stupeň substituce DS = 10,8% ukazuje, že bylo modifikováno 11 ze 100 disacharidových dimerů HA.

Měření pomocí ^1H NMR bylo provedeno u všech 18 vzorků. U vybraných 2 vzorků s vysokým stupněm substituce, které byly připravené pomocí lyofilizace HA-B1105 a HA-LA1105, byly NMR spektra vyhodnoceny pomocí metod COSY, DOSY a HSQC.

COSY (Correlation Spectroscopy) je 2D NMR metoda z homonukleární korelací (^1H - ^1H).

DOSY (Difusion-ordered Spectroscopy) je 3D NMR metoda.

HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy) je 2D NMR heteronukleární metoda (^1H - ^{13}C).



Obrázek 21. Přístroj BRUKER Avance™ III.

3.3.2. UV spektroskopie

Při této metodě bylo 100 mg vzorku rozpuštěno v 10 ml demineralizované vody v průběhu 12 hod. Takto bylo připraveno 9 vzorků (obrázek 22), které byly změřeny a následně nařaděny podle potřeby na nižší koncentrace pro lepší citlivost.

Měření probíhalo na přístroji Varian CARY 100 Conc UV Visible Spectrophotometer (obrázek 23) v rozmezí 200 - 800 nm.

Byla nastavená optická délka 1 cm a jako pozadí byla první měřena voda. Následně bylo do kvarcové kyvety nalito 1 ml vzorku a zahájeno měření. Tak bylo změřeno 9 vzorků s různými typy antioxidantů v poměru ekvivalentu 1:1.

Získaná data u každého vzorku byla převedena na graf a z něho jsme získali hodnotu absorpčního maxima. (viz kapitola 4.2.)



Obrázek 22. Vzorky pro měření pomocí UV spektroskopie.



Obrázek 23. Přístroj Varian CARY 100 Conc UV Visible Spectrophotometer.

3.3.3. IČ spektroskopie

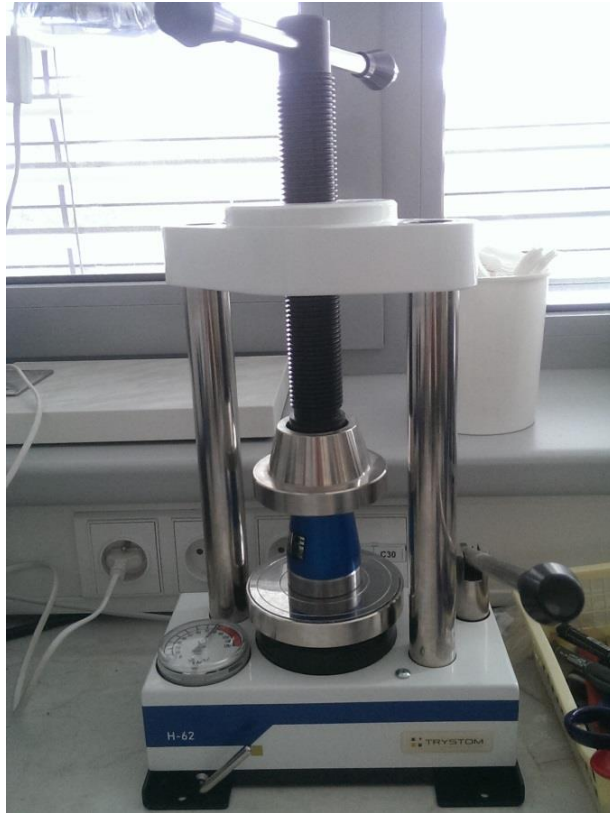
Pro měření pomocí IČ spektroskopie byly vybrány 2 vzorky s nejvyšším stupněm substituce HA-B111 a HA-LA111.

Pro přípravu vzorků byla použita tabletovací forma - Lis-TRYSTOM (obrázek 24). Pro měření byly připraveny celkem 4 vzorky ve formě tablet (obrázek 25): 1. tableta – KBr. 2. tableta – vzorek HA. 3. tableta – vzorek HA-B111. 4. tableta – vzorek HA-LA111.

Příprava probíhala tak, že 1 lžička (kolem 5 mg) KBr byla rozetřena do prášku, přesypána do tabletovačky a vložena do lisu na 1-2 min (tato tableta je měřena jako pozadí).

Další tablety jsou připravené tak, že do 5 mg KBr je přimícháno půl lžičky (2-3 mg) vzorku. Následně byla tableta slisována a před měřením bylo odečteno pozadí KBr.

Samotné měření bylo prováděno na přístroji Nicolet 6700 FT-IR Spectrometer (obrázek 26). Naměřená spektra jsou uvedena v kapitole 4.3.



Obrázek 24. Tabletovací forma Lis-TRYSTOM.



Obrázek 25. Vzhled připravené tablety.



Obrázek 26. Přístroj Nicolet 6700 FT-IR Spectrometer.

3.3.4. SEC-MALLS

Stanovení molekulové hmotnosti (M_w) bylo provedeno pomocí vylučovací chromatografie (SEC) - vícenásobný laserový rozptyl (MALLS). Průměrná molekulová hmotnost (M_w) a distribuce molekulových hmotností byly stanoveny pomocí SEC-MALLS za použití chromatografického systému Agilent Degasser Model G 1379A. Objem injekce byl 100 μ l 0,015 - 1% derivátů HA. Koncentrace byla dříve optimalizována podle M_w , který má být analyzován. Koncentrace, pro nízkou molekulovou hmotnost HA (12,3 kDa) je 1%, zatímco HA s vysokou molekulovou hmotností (600 kDa) musí být v koncentraci 0,05%.

Mobilní fází byl vodný, fosfátem pufovaný, fyziologický roztok a 0,02% roztok azidu sodného při průtoku 0,5 ml \times min⁻¹. Přírůstek indexu lomu 0,155 ml \times g⁻¹ byl použit pro výpočet molekulové hmotnosti a polydisperzity ($PDI = M_w/M_n$) modifikované HA.

Měření bylo provedeno u 9 vybraných vzorků s různými typy antioxidantů v poměru ekvivalentu 1:1 analytickou skupinou firmy Contipro.

3.3.5. Antioxidační aktivita

Pro měření antioxidační aktivity byly vybrány 2 vzorky s nejvyšším DS, které byly připravené pomocí lyofilizace (HA-B1105 a HA-LA1105).

Touto metodou byla stanovena antioxidační aktivita derivátů HA pomocí difenylpikrylhydrazylů (DPPH). Cílem bylo zjištění vlivu zkoumaných látek na antioxidační aktivitu u modifikované HA ve finální koncentraci 0,1; 0,2; 0,5 a 1 mg/ml.

Stanovení spočívá v reakci látky s radikálem DPPH. Při reakci dochází k redukci radikálu (schopnost přenést elektron a darovat vodík) za vzniku bezbarvého difenylpikrylhydrazinu (DPPH). Pokles absorbance při vlnové délce 517 nm byla měřena spektrofotometricky na VersaMax™ Microplate readeru (viz obrázek 27).



Obrázek 27. Příklad přístroje na měření antioxidační aktivity.

Příprava roztoků:

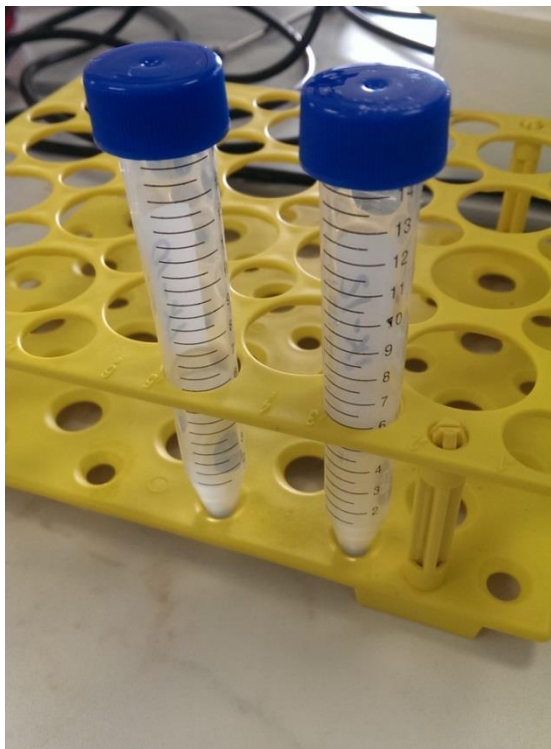
TRIS/HCl pufr - 3,03 g do 500 g H₂O, upraveno pH na 7,1 5M HCl (TRIS - *tris*(hydroxymethyl)aminomethan).

Trolox 0,01% - 1 mg do 10 ml TRIS/HCl pufru, pH 7,1. Vždy je nutné připravovat roztok čerstvý a rozpouštění musí probíhat minimálně 30 minut.

DPPH 0,01% - 1 mg do 10 ml 100% Me-OH (světlocitlivý). Míchání probíhá do úplného rozpuštění (2-3 hod). Celkem bylo připraveno 10 ml na 1 destičku.

Vzorky:

Byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 10 mg/ml TRIS/HCl pufru, pH 7,1 (viz obrázek 28).



Obrázek 28. Vzorky pro měření antioxidační aktivity.

Postup:

Do 96 jamkového panelu (viz obrázek 29) byla napipetována a naředěna kalibrační řada Troloxu o finálních koncentracích 25/12,5/6,25/3,125/1,56/0,78 $\mu\text{g/ml}$, která byla použita jako standard. Do jamky s nejvyšší koncentrací bylo pipetováno 100 μl roztoku k 100 μl TRIS/HCl pufru a dvojkovým ředěním v jamkách byla zhotovena celá kalibrační řada. Následně bylo napipetováno 100 μl vzorků sledovaných koncentrací (v tripletech), byl změřen počáteční stav na readeru a dále bylo přidáno 100 μl DPPH. V jednotlivých jamkách bylo vše řádně promícháno, nejlépe špičkou a změřena absorbance v časech 5 min, 10 min a 15 min. Měření bylo provedeno při vlnové délce 517 nm.

Dle kalibrační řady byla vypočítána antioxidační aktivita a sestaven graf z průměru 3 měření. (viz kapitola 4.5.)



Obrázek 29. Mikrodestička na měření vzorků.

3.3.6. Cytotoxicita

Pro měření cytotoxicity byly vybrány 2 vzorky s vysokým stupněm substituce, které byly připravené pomocí lyofilizace (HA-B1105 a HA-LA1105).

Stanovení cytotoxicity bylo prováděno na buňkách NIH-3T3 myších fibroblastech v modifikovaném Dulbecco Eagleově médiu (DMEM). Testování probíhalo při teplotě 37 °C pro koncentrace 10, 100, 500 a 1000 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$. Vzorky byly měřené v triplicátu. Bunečná viabilita (životnost) byla stanovena pomocí MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazoliumbromidu) testu po 24, 48 a 72 hodinách. Výsledky poskytlo biologické oddělení firmy Contipro.

4. Výsledky a diskuze

Celkem bylo připraveno 18 vzorků různých derivátů HA. Získaná hmotnost každého vzorku při přípravě je uvedena v tabulce 11. Tyto vzorky byly postupně analyzovány a testovány různými metodami, s cílem zjistit nejvyšší stupeň substituce derivátů a zhodnotit možnost použití v kosmetickém průmyslu.

Tabulka 11. Získaná hmotnost derivátů HA.

Vzorek	Získaná hmotnost (g)
HA-B111	1,017
HA-B1051	1,013
HA-B1055	5,261
HA-B1105	0,561
HA-TS111	0,935
HA-TS1051	0,897
HA-TS1055	4,837
HA-LA111	0,898
HA-LA1051	0,895
HA-LA1105	0,602
HA-SA111	0,978
HA-SA1051	0,812
HA-GA111	1,135
HA-GA1051	1,014
HA-TSA111	0,987
HA-CA111	1,014
HA-HCA111	1,013
HA-FA111	0,978

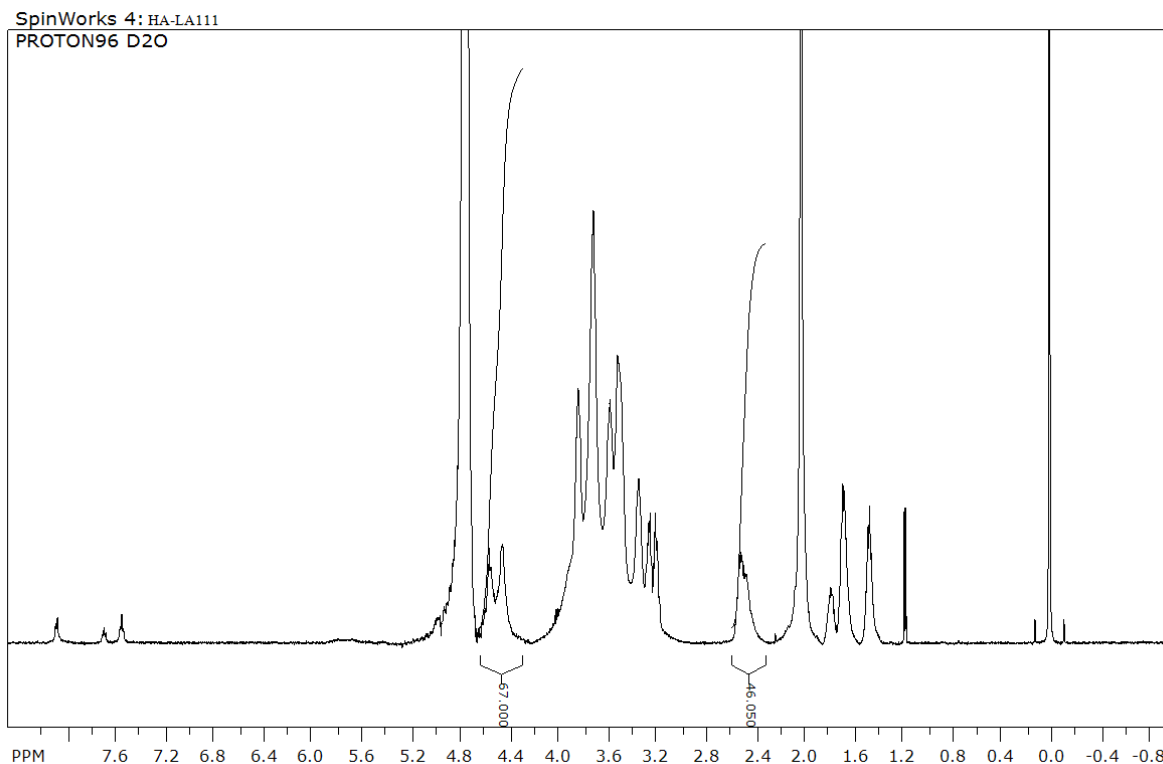
4.1. NMR spektroskopie

4.1.1. ¹H NMR spektra

Z jednotlivých měření ¹H NMR byly odečteny stupně navázání různých substituentů na kyselinu hyaluronovou (DS) (tabulka 12). Jako příklad ¹H NMR spektra a odečítání DS je uveden systém HA-LA111 na obrázku 30.

Tabulka 12. Naměřené stupně substituce derivátů HA.

Vzorek	Substituent	DS ^c (%)
HA-B111	Biotin	11,2
HA-B1051		4,1
HA-B1055		4,9
HA-B1105		7
HA-TS111	Tokoferol sukcinát	6,8
HA-TS1051		1,0
HA-TS1055		2,1
HA-LA111	Kyselina lipoová	46,0
HA-LA1051		15,1
HA-LA1105		27,3
HA-SA111	Kyselina salicylová	2,8
HA-SA1051		0,9
HA-GA111	Kyselina gallová	0,1
HA-GA1051		0,3
HA-TSA111	Kyselina thiosalicylová	0
HA-CA111	Kyselina kávová	0
HA-HCA111	Kyselina hydrokávová	0,6
HA-FA111	Kyselina ferulová	0



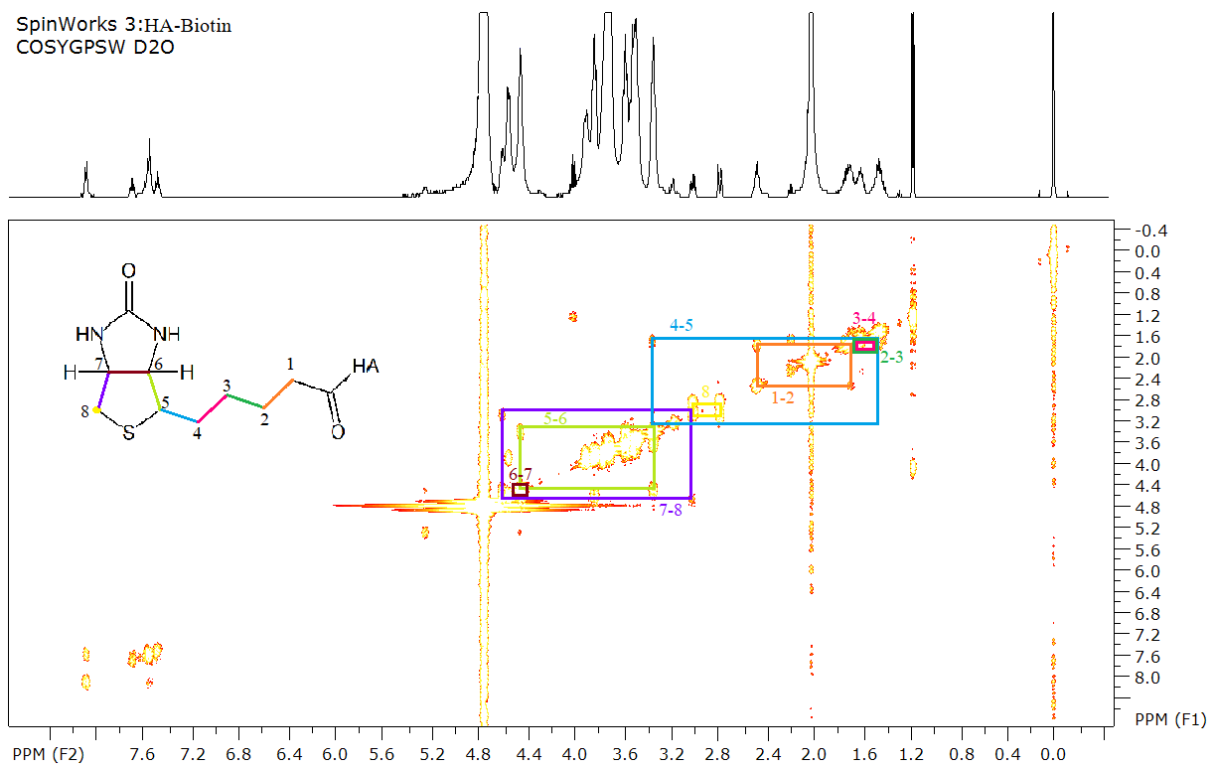
Obrázek 30. ^1H NMR spektra HA-LA111.

Z výsledků vyplývá, že nejvyšších stupňů substituce bylo dosaženo u derivátů HA s kyselinou lipoovou a biotinem (především HA-B111 a HA-LA111). Naopak je patrně, že u derivátů s kyselinou gallovou, thiosalicilovou, kávovou, hydrokávovou a ferulovou se téměř nic nenavázalo, DS je velmi nízký nebo nulový. Z tohoto důvodu se pro většinu dalších měření používaly deriváty HA s kyselinou lipoovou a biotinem.

4.1.2. COSY NMR spektra

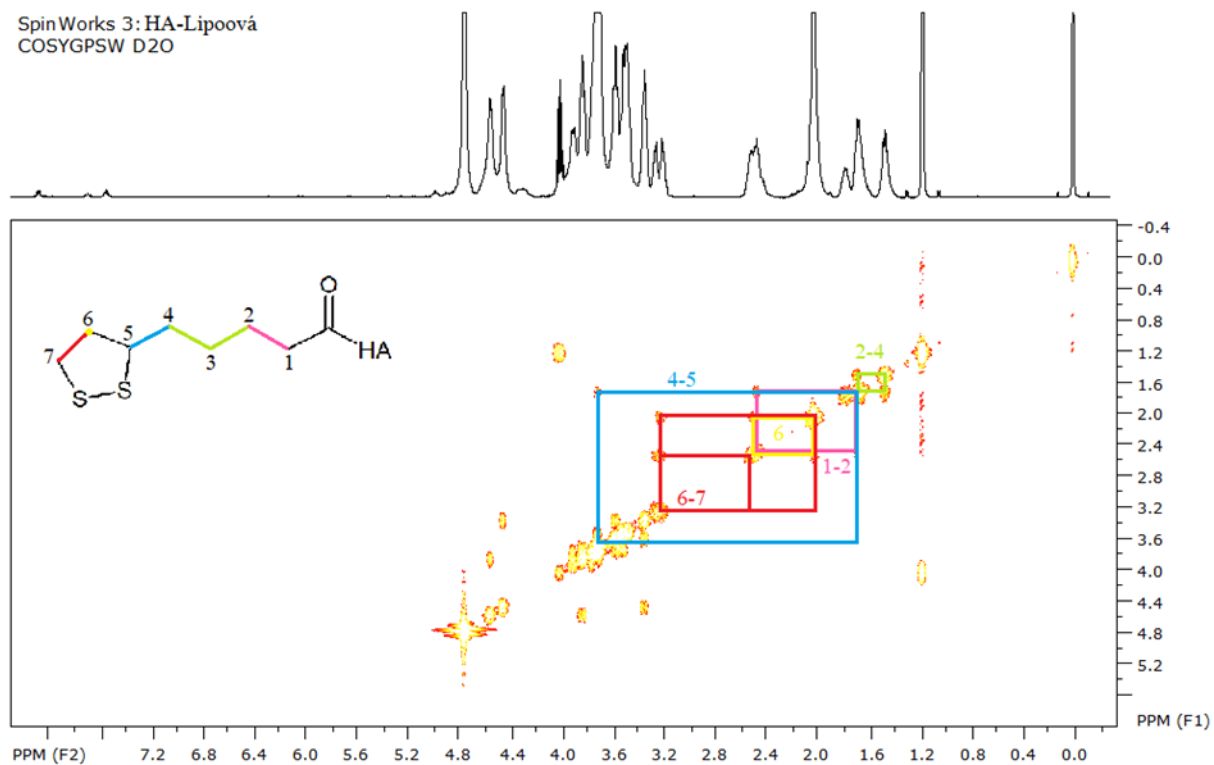
Metodou COSY bylo ověřeno přiřazení jednotlivých skupin k píkům a umístění těchto skupin v řetězci pro vybrané deriváty HA (HA-B1105 a HA-LA1105) (obrázky 31 a 32).

SpinWorks 3:HA-Biotin
COSYGPSW D2O



Obrázek 31. COSY NMR spektra HA-B1105.

SpinWorks 3:HA-Lipoová
COSYGPSW D2O

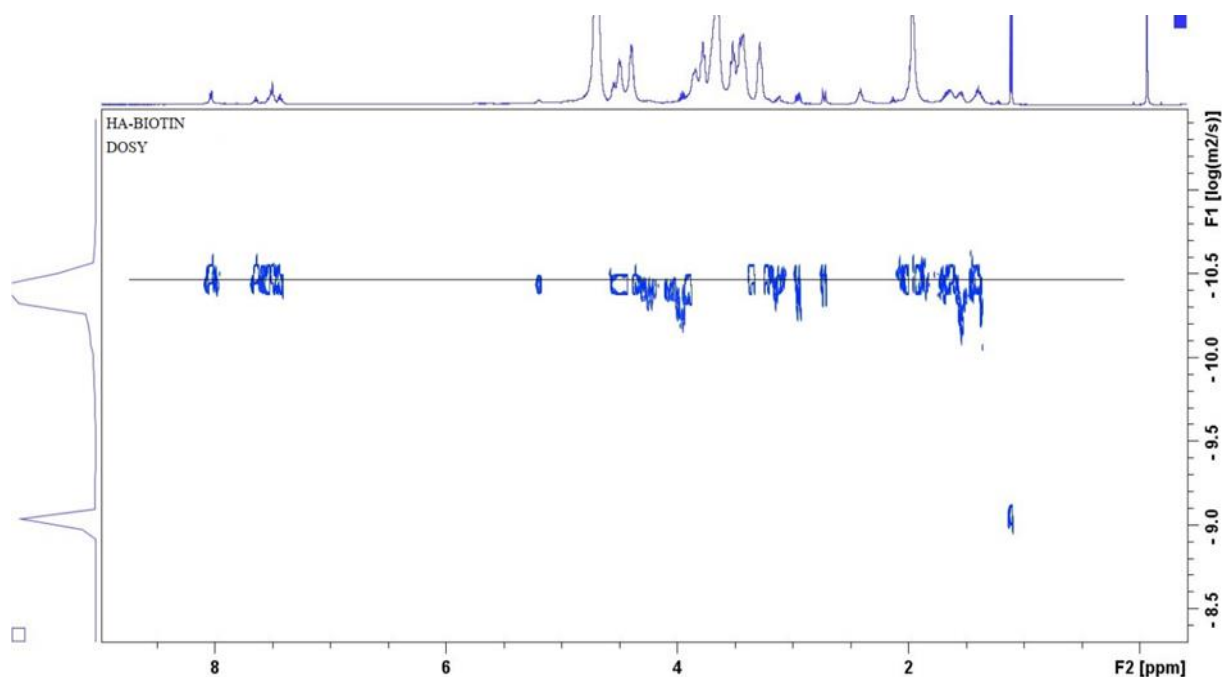


Obrázek 32. COSY NMR spektra HA-LA1105.

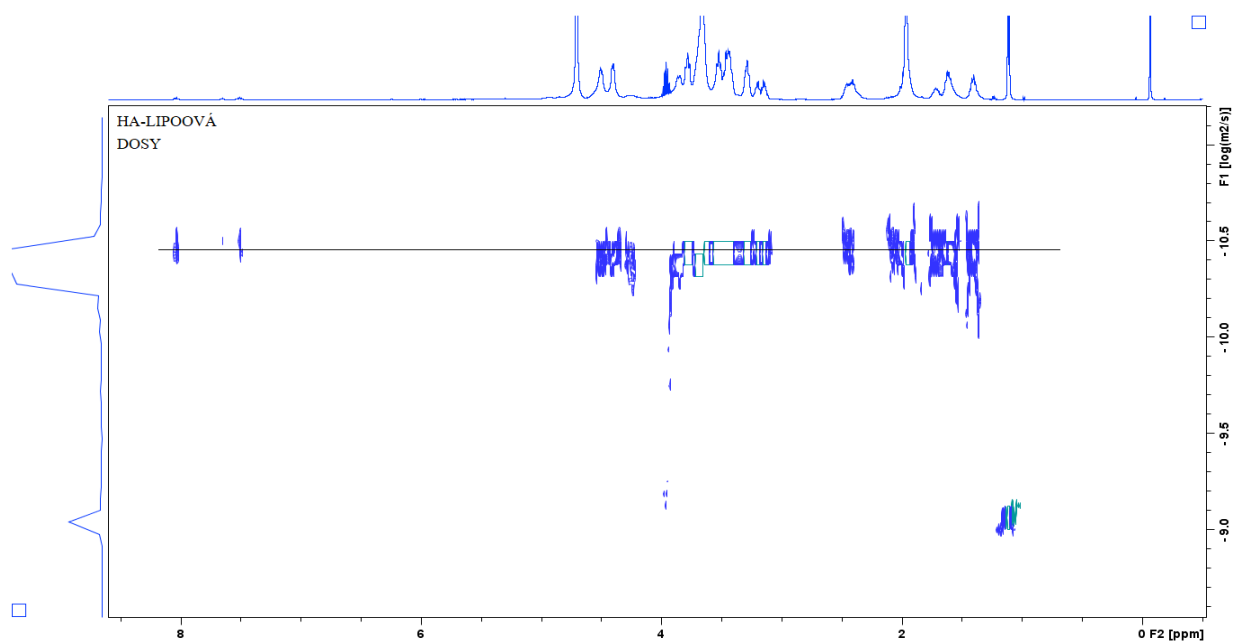
Ze spekter COSY u vzorků HA-B1105 a HA-LA1105 je patrné přiřazení jednotlivých skupin a ověření struktury daných derivátů HA, čímž bylo potvrzeno navázání příslušných antioxidantů na kyselinu hyaluronovou.

4.1.3. DOSY NMR spektra

Metoda DOSY uvádí rozdělení spekter směsi podle velikosti molekul. V případě, že jsou signaly v jedné řadě, je to důkaz, že jsou substituenty navazané, což ukazují obrázky 33 a 34 pro sledované vzorky HA-B1105 a HA-LA1105.



Obrázek 33. DOSY NMR spektra HA-B1105.

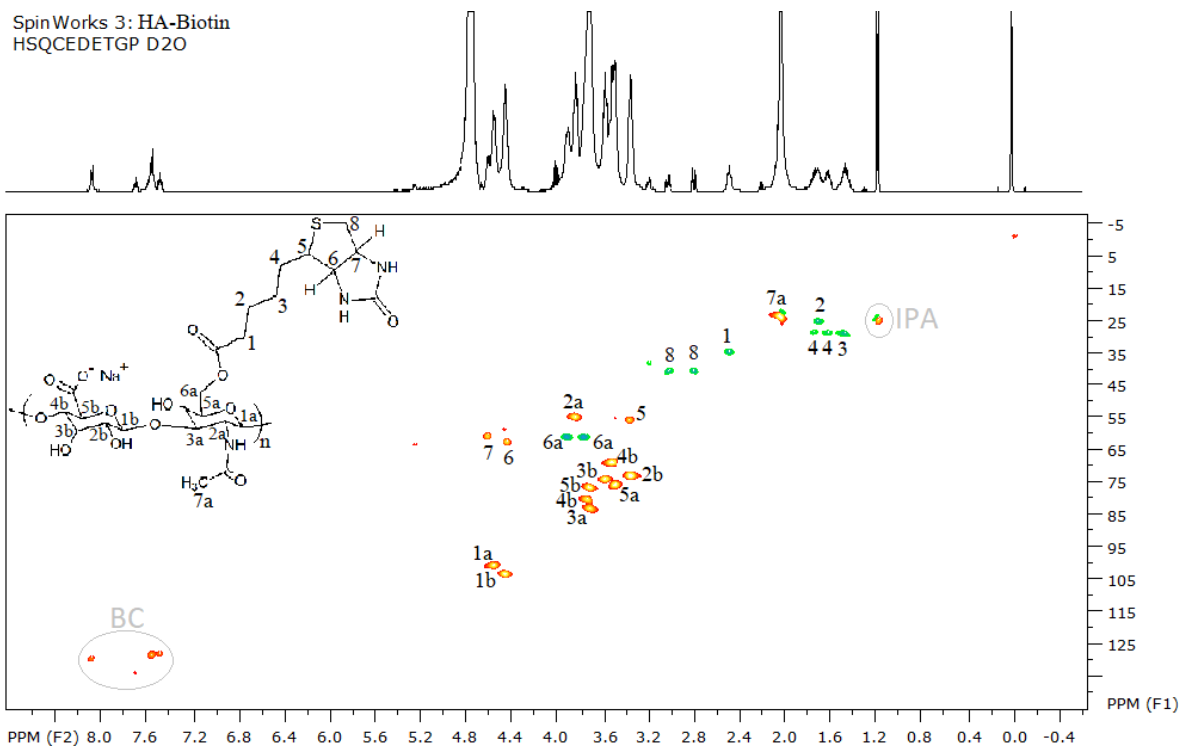


Obrázek 34. DOSY NMR spektra HA-LA1105.

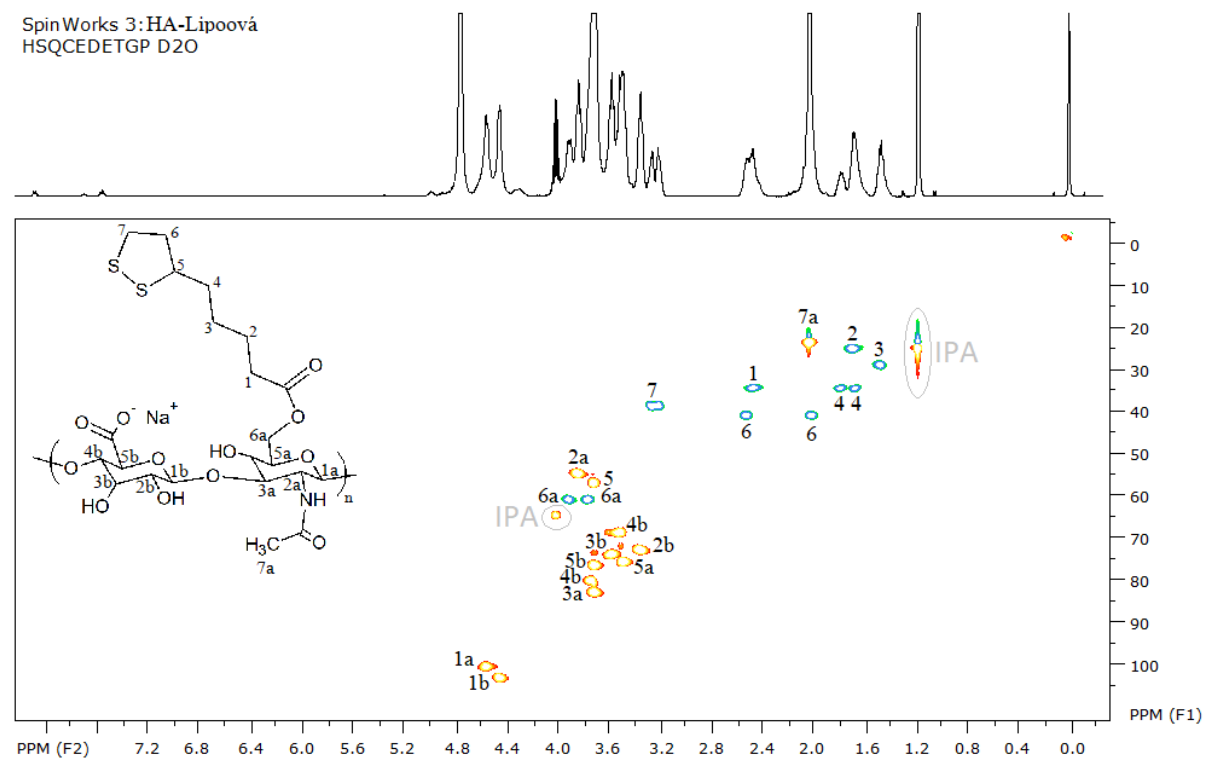
Z příslušných spekter je vidět, že signály se vyskytují v jedné rovině, což potvrzuje navázání substituentů na HA u obou zkoumaných derivátů.

4.1.4. HSQC NMR spektra

Metodou HSQC byly přiřazeny jednotlivé skupiny k příslušným píkům u stejných měřených vzorků jako v předešlých případech (obrázky 35 a 36).



Obrázek 35. HSQC NMR spektra HA-B1105.



Obrázek 36. HSQC NMR spektra HA-LA1105.

Z obou obrázků spekter je zřetelná struktura derivátů HA, je průkazná navázanost antioxidantů na HA, nicméně v daných spektrech je také přítomna látka (IPA), což může být způsobeno nedokonalým vyčištěním a vysušením produktu.

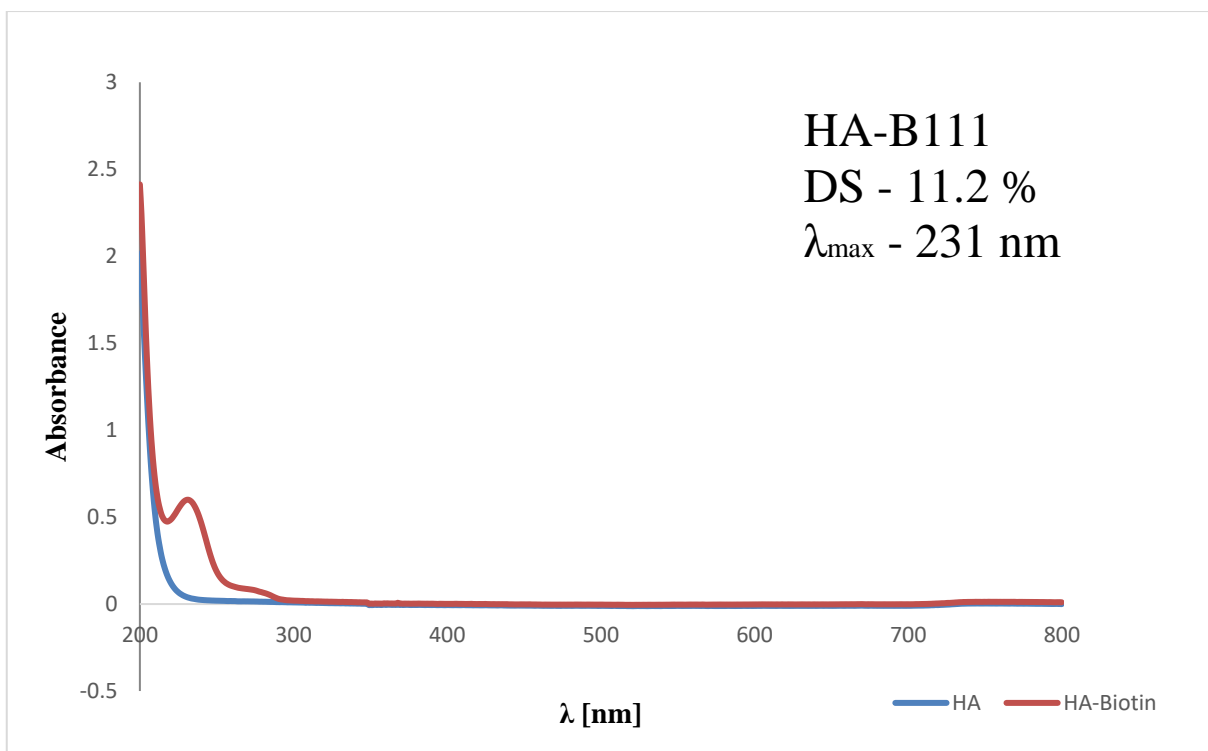
4.2. UV spektroskopie

Pro měření pomocí UV spektroskopie bylo vybráno 9 vzorků, vždy deriváty HA s jednotlivými typy antioxidantů ve stejném poměru (1:1). Porovnání naměřených hodnot absorpčního maxima u derivátů HA a hodnot absorpčního maxima u samotných antioxidantů je uvedeno v tabulce 13. Hodnoty absorpčních maxim (Λ_{\max}) u jednotlivých antioxidantů jsou tabelované. U vzorků HA-GA111, HA-TSA111, HA-CA111 a HA-HCA111 byla hodnota Λ_{\max} neměřitelná, kvůli nízkému stupni substituce.

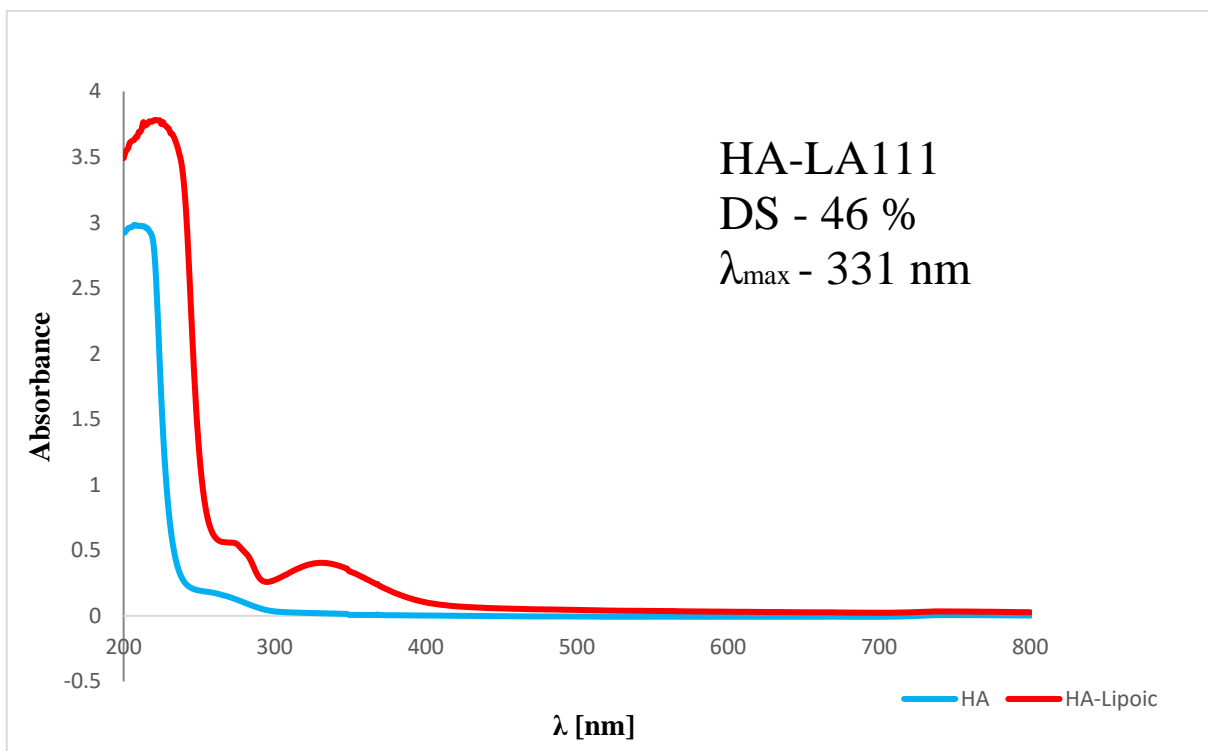
Tabulka 13. Hodnoty absorpčního maxima u derivátů HA a u samotných antioxidantů.

Derivát HA	Λ_{\max} [nm]	Antioxidant	Λ_{\max} [nm]
HA-B111	231	Biotin	-
HA-TS111	275	Tokoferol sukcinát	284
HA-LA111	331	Kyselina lipoová	334
HA-SA111	275	Kyselina salicylová	231, 296
HA-GA111	-	Kyselina gallová	265
HA-TSA111	-	Kyselina thiosalicylová	298, 310
HA-CA111	-	Kyselina kávová	295, 325
HA-HCA111	-	Kyselina hydrokávová	289
HA-FA111	277	Kyselina ferulová	275, 375

Některé samotné antioxidanty vykazují dvě absorpční maxima, příslušné deriváty s HA vykazují vždy nepatrně nižší hodnoty absorpčního maxima ve srovnání s příslušným antioxidantem. UV spektra vzorků HA-B111 a HA-LA111 s nejvyšším DS jsou uvedeny jako příklady na obrázcích 37 a 38.



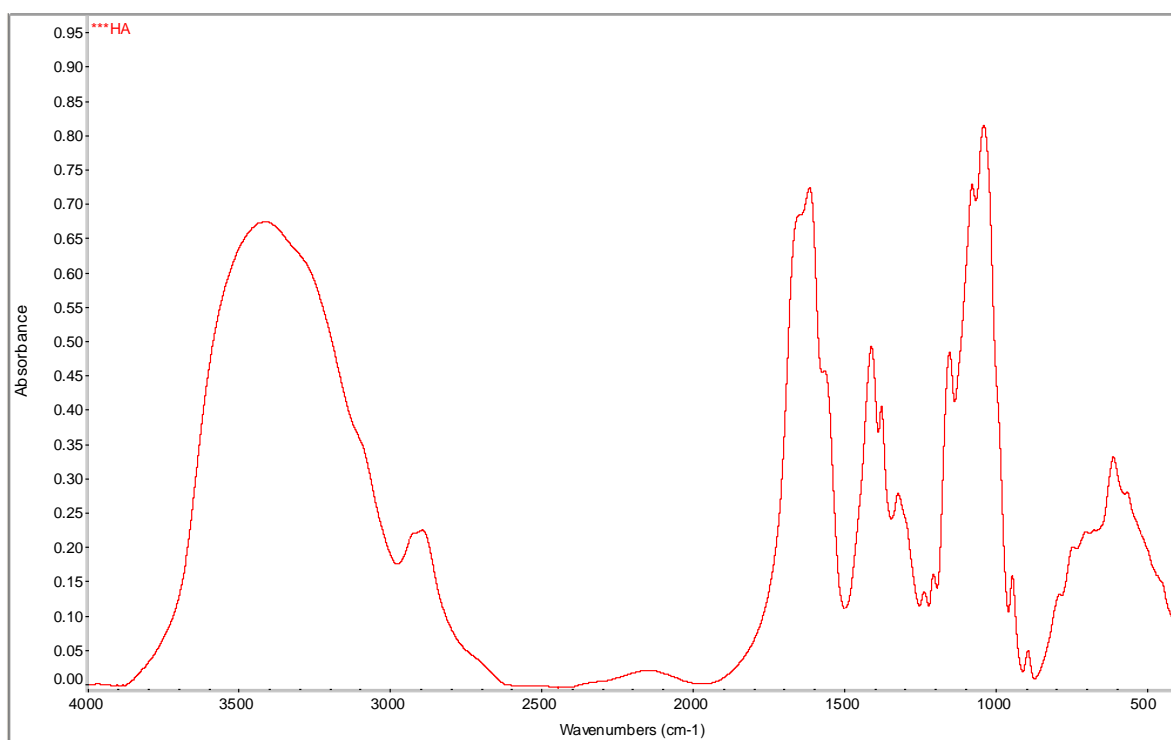
Obrázek 37. Porovnání UV spekter vzorků HA a HA-B111.



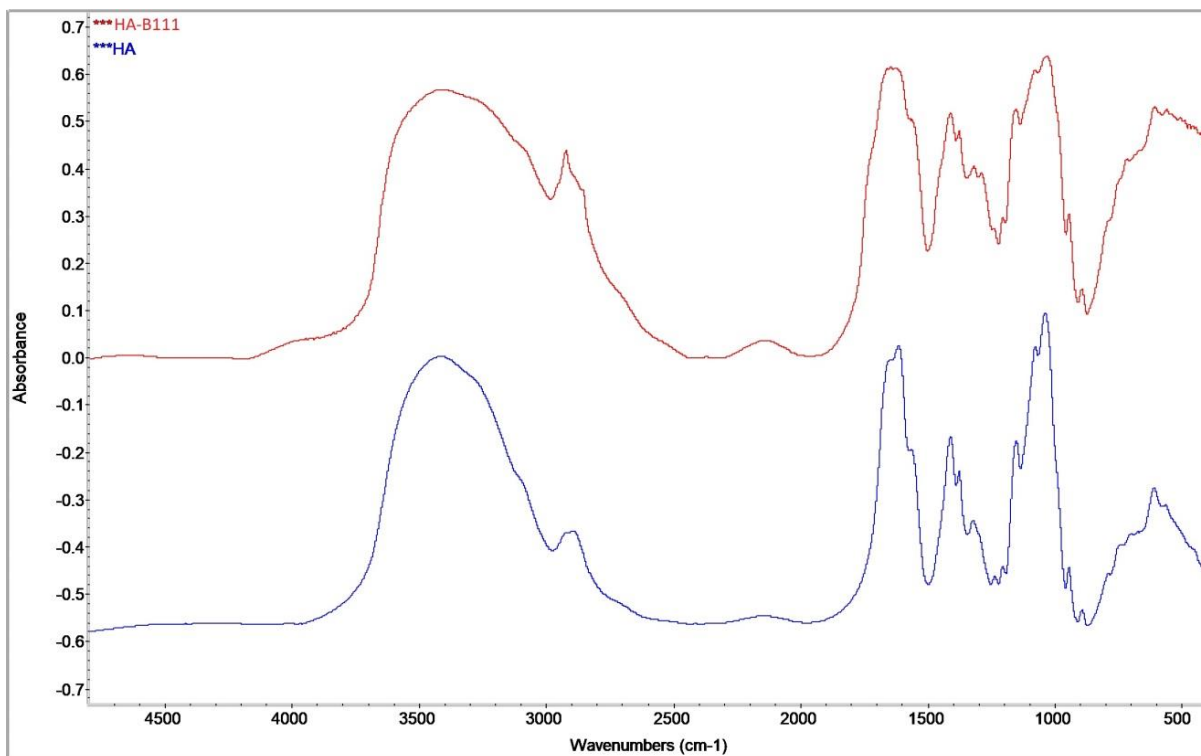
Obrázek 38. Porovnání UV spekter vzorků HA a HA-LA111.

4.3. IČ spektroskopie

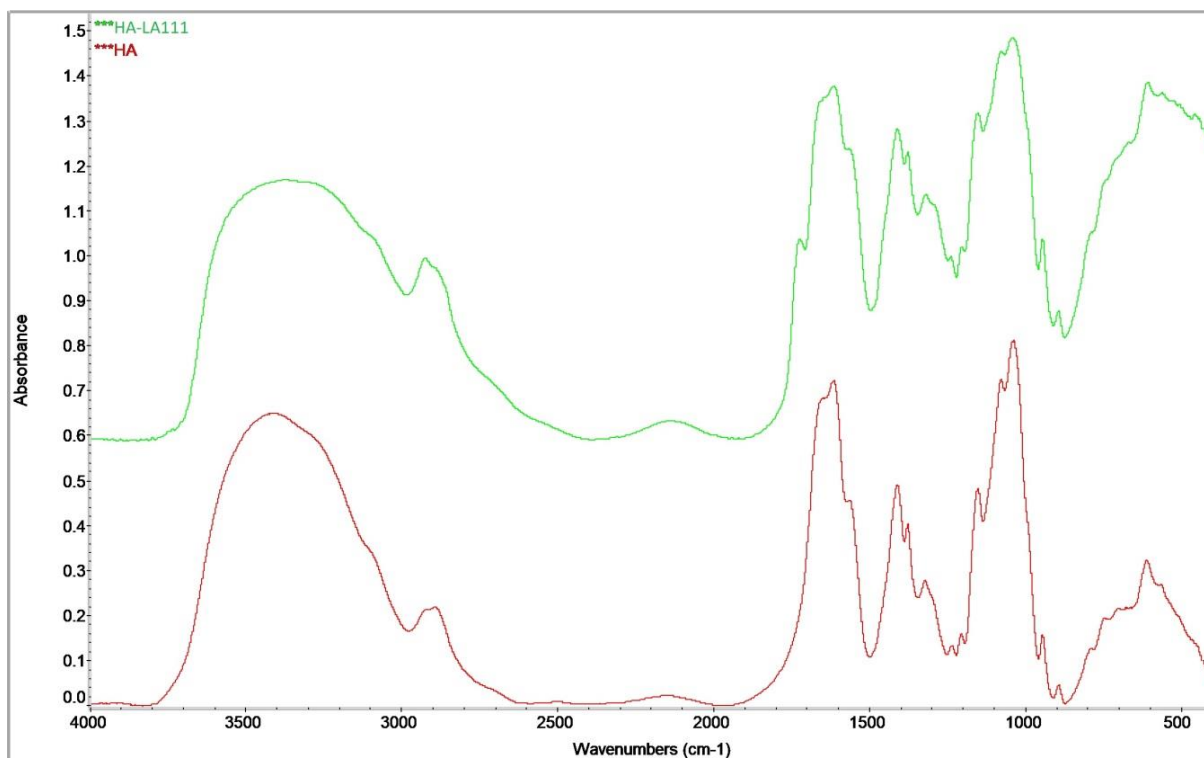
Pro měření pomocí IČ spektroskopie byly vybrány 2 vzorky s nejvyšším DS (HA-B111 a HA-LA111) a byly porovnány se spektrem samotné kyseliny hyaluronové. Spektrum HA je uvedeno na obrázku 39 a porovnání spekter vybraných vzorků s HA je zobrazeno na obrázcích 40 a 41.



Obrázek 39. IČ spektrum vzorku HA.



Obrázek 40. Porovnání IČ spekter vzorků HA a HA-B111.



Obrázek 41. Porovnání IČ spekter vzorků HA a HA-LA111.

Podle daných spekter vidíme, že měřené vzorky HA-B111 a HA-LA111 mají navazané příslušné antioxidanty, což potvrzuje výsledky předešlých měření. Vzorek HA-B111 vykazuje v oblasti 2800 cm^{-1} na skupině CH_2 nárůst. U derivátu HA-LA111 v oblasti 1725 cm^{-1} došlo ke vzniku esterů.

4.4. SEC-MALLS

Pro měření pomocí SEC-MALLS bylo vybráno 9 vzorků, vždy deriváty HA s jednotlivými typy antioxidantů ve stejném poměru (1:1). Výsledky molekulových hmotností a polydisperzita jednotlivých derivátů HA jsou uvedeny v tabulce 14. Stanovení provedla analytická skupina firmy Contipro.

Tabulka 14. Hodnoty molekulových hmotností a polydisperzita.

Vzorek	Mw (kDa)	PDI
HA	117,0	1,806
HA-B111	249,6	2,599
HA-TS111	-	
HA-LA111	158,5	1,453
HA-SA111	120,0	1,633
HA-GA111	153,2	1,966
HA-TSA111	129,1	1,720
HA-CA111	117,2	1,651
HA-HCA111	124,0	1,703
HA-FA111	116,8	1,785

Vzorek HA-TS111 je neměřitelný, kvůli tomu, že po filtraci vzorku byla změřena extrémně nízká koncentrace.

Z tabulky vyplývá, že nejvíce antioxidantů je navázáno u vzorků HA-B111 a HA-LA111, což potvrzuje předchozí výsledky, neboť i ty ukazují nejvyšší stupeň substituce právě u těchto dvou typů antioxidantů. Z těchto důvodů byly právě tyto vzorky zvoleny pro většinu měření a ukázaly se jako nejvhodnější pro aplikace v kosmetickém průmyslu.

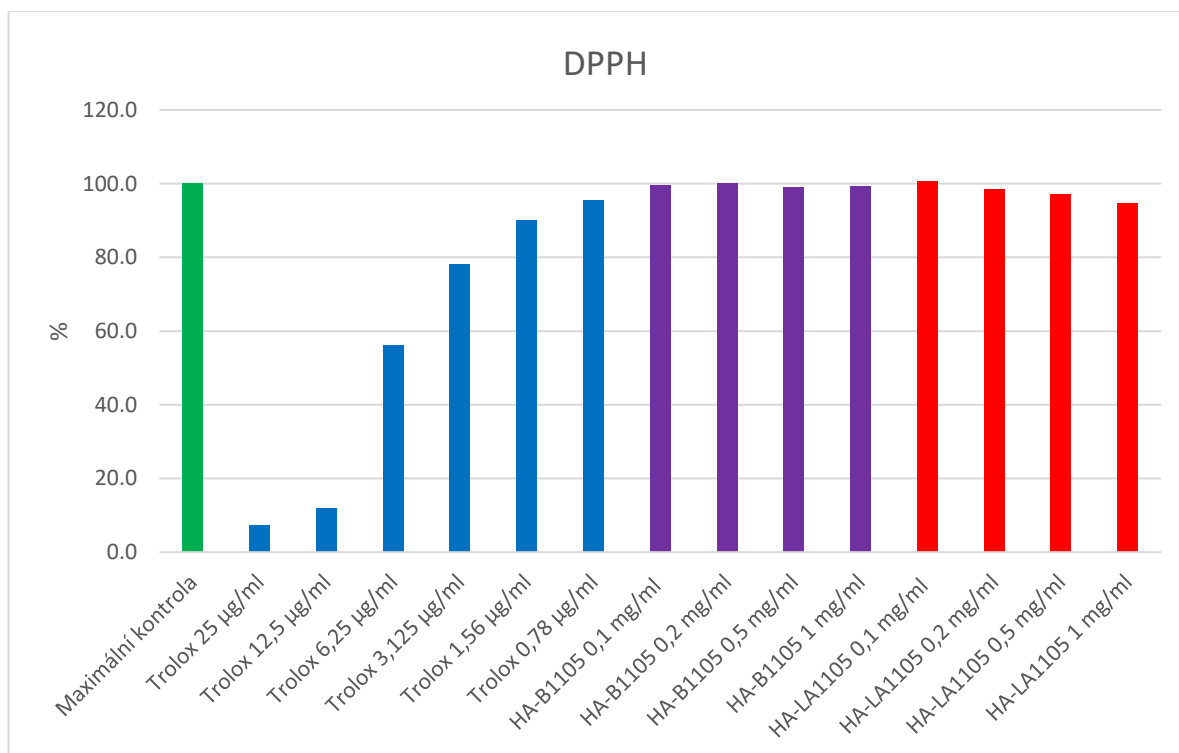
4.5. Antioxidační aktivita

Pro měření antioxidační aktivity byly vybrány 2 vzorky s nejvyšším DS, které byly připravené pomocí lyofilizace (HA-B1105 a HA-LA1105). Měření bylo vždy provedeno 3 krát a byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Nejlepší antioxidační aktivitu vykazuje vzorek HA-LA1105 při vyšších koncentracích (při koncentraci 1 mg/ml má antioxidační aktivitu 94,8), u nižších koncentrací a derivátů HA s Biotinem je zjištěná antioxidační aktivita poměrně malá (blízká hodnotě 100), což ukazuje tabulka 15 a obrázek 42.

Tabulka 15. Výsledky antioxidační aktivity.

	průměr	odchylka	1. měření	2. měření	3. měření
Maximální kontrola	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0
Trolox 25 µg/ml	7,4	0,3	7,0	7,4	7,9
Trolox 12,5 µg/ml	11,8	1,5	9,8	11,0	14,7
Trolox 6,25 µg/ml	56,1	1,7	55,4	53,6	59,3
Trolox 3,125 µg/ml	78,2	1,9	76,9	75,9	81,9
Trolox 1,56 µg/ml	90,0	1,3	88,5	88,9	92,7
Trolox 0,78 µg/ml	95,4	1,0	94,7	94,1	97,4
HA-B1105 0,1 mg/ml	99,5	1,3	98,6	97,7	102,1
HA-B1105 0,2 mg/ml	100,0	1,3	99,6	98,1	102,4
HA-B1105 0,5 mg/ml	98,9	1,4	99,1	96,5	101,1
HA-B1105 1 mg/ml	99,3	1,3	98,1	97,8	101,8
HA-LA1105 0,1 mg/ml	100,5	2,3	99,1	97,3	105,1
HA-LA1105 0,2 mg/ml	98,4	0,6	98,9	97,1	99,1
HA-LA1105 0,5 mg/ml	97,1	1,5	98,4	94,1	98,7
HA-LA1105 1 mg/ml	94,8	2,4	96,9	90,1	97,5

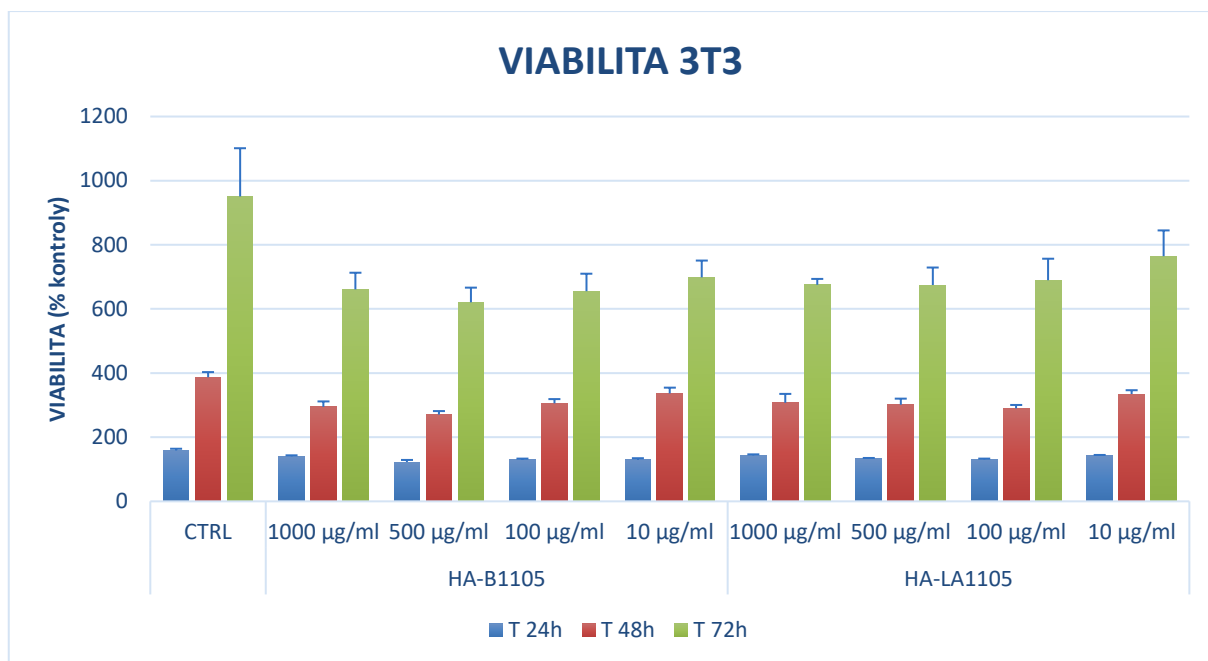


Obrázek 42. Grafické znázornění výsledků antioxidační aktivity.

Trolox (antioxidant) v různých koncentracích je uveden jako standard a vykazuje vysokou antioxidační aktivitu, samozřejmě zvyšující se při rostoucích koncentracích. Z porovnání s antioxidační aktivitou derivátů HA vyplývají podobné hodnoty při 1000-krát větší koncentraci.

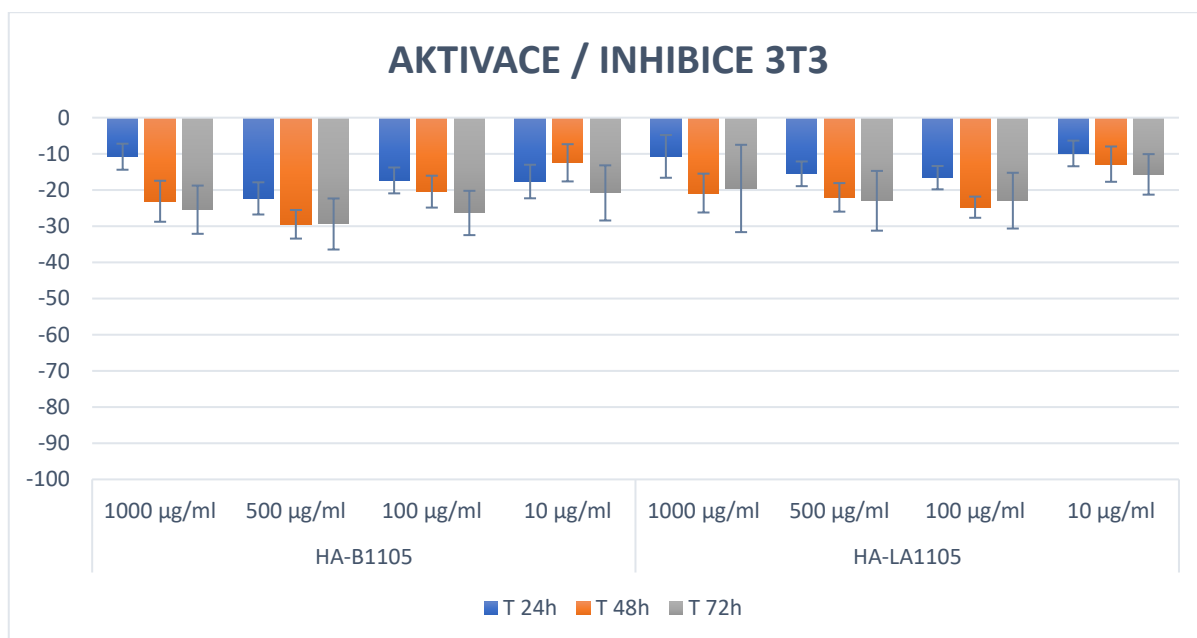
4.6. Cytotoxicita

Pro měření cytotoxicity byly vybrány 2 vzorky s nejvyšším DS, které byly připravené pomocí lyofilizace (HA-B1105 a HA-LA1105). Výsledky cytotoxicity jsou přehledně ukázány na obrázcích 43. a 44. Výsledky poskytlo biologické oddělení firmy Contipro.



Obrázek 43. Grafické znázornění výsledků cytotoxicity.

Pozn: CTRL – 100% živých neošetřených buněk



Obrázek 44. Grafické srovnání usmrcených buněk.

Z obrázků 43. a 44. je vidět, že po 24 hod oba testované deriváty, dle dané metody, nejsou toxické. Podle předpisu Státního zdravotnického ústavu platí, že látky s úmrtností buněk pod 20% se považují za necytotoxické, s úmrtností v rozmezí 20 – 40% za slabě cytotoxické, v rozmezí 40 – 60% středně cytotoxické a nad 60% silně cytotoxické. První graf ukazuje pokles živých buněk v porovnání s CTRL, druhý graf aktivace/inhibice již přehledně zobrazuje procentuální úmrtnost buněk (kolik % buněk nepřežilo) za daný čas. Jak již bylo konstatováno po 24 hodinách vykazují zkoumané vzorky necytotoxicitu, po 48 a 72 hodinách patří do skupiny s necytotoxicitou nebo slabou cytotoxicitou, nicméně aplikace kosmetických přípravků není běžně používána nepřetržitě po takto dlouhý čas. Takové chování je pro materiály s aplikacemi v kosmetice běžné a standardní. Můžeme konstatovat, že z hlediska testování viability (životnosti) lze tyto deriváty HA použít pro kosmetický průmysl, což splnilo cíl diplomové práce.

5. Závěr

Tato práce byla zaměřena na vývoj derivátů kyseliny hyaluronové s devíti rozdílnými antioxidanty v různých poměrech a při různých navázkách HA. Celkem bylo připraveno 18 vzorků, u kterých byl změřen stupeň substituce pomocí NMR spektroskopie. Z výsledků vyplývá, že nejvyšších stupňů substituce bylo dosaženo u derivátů HA s kyselinou lipovou a biotinem. Naopak u derivátů s kyselinou gallovou, thiosalicylovou, kávovou, hydrokávovou a ferulovou byl zjištěn stupeň substituce velmi nízký nebo nulový. U vybraných dvou vzorků připravených pomocí lyofilizace (HA-B1105 a HA-LA1105) byla pomocí metod NMR – COSY, DOSY a HSQC ověřena struktura a navázání substituentů, což výsledky potvrzují.

Pomocí UV spektroskopie byly zjištěny hodnoty absorpčních maxim připravených derivátů HA s antioxidanty. Z IČ spekter je zřejmé, že měřené vzorky HA-B111 a HA-LA111 mají navazané příslušné antioxidanty.

Metodou SEC-MALLS byly stanoveny molekulové hmotnosti a polydisperzita a bylo zjištěno, že nejvíce antioxidantů bylo navázáno u vzorku HA-B111 a HA-LA111, což potvrzuje předchozí výsledky, neboť i ty ukazují nejvyšší stupeň substituce právě u těchto dvou typů antioxidantů. Z těchto důvodů byly právě tyto vzorky zvoleny pro většinu měření a ukázaly se jako nejvhodnější pro aplikace v kosmetickém průmyslu. Tento předpoklad byl dále ověřován pomocí biologických metod: antioxidační aktivity a cytotoxicity.

Nejlepší antioxidační aktivitu vykazoval vzorek HA-LA1105 při vyšších koncentracích, u nižších koncentrací a derivátů HA s biotinem byla zjištěná antioxidační aktivita poměrně malá. Z výsledků cytotoxicity vyplývá, že po 24 hod oba testované deriváty nebyly toxické a splňovaly podmínky měření. Můžeme tedy konstatovat, že z hlediska viability (životnosti) jsou tyto deriváty HA použitelné pro kosmetické aplikace.

Na základě všech provedených metod bylo zjištěno, že mezi nejlepší vzorky patří deriváty HA se substituenty, jako je kyselina lipová a biotin, z důvodu své navázanosti (nejvyšší stupeň substituce). Proto u těchto vzorků byly provedeny biologické zkoušky (stanovení antioxidační aktivity a cytotoxicity), podle kterých bylo prokázáno, že vybrané látky jsou vhodné pro aplikace v kosmetickém průmyslu.

Seznam použité literatury

1. NECAS J., BARTOSIKOVA, L., BRAUNER P. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, **2008**. 53 (8), s. 397–411. DOI: 10.17221/1930-VETMED
2. SAJNA Kuttuvan Valappil, GOTTUMUKKALA Lalitha Devi, SUKUMARAN Rajeev K, PANDREY Ashok. White Biotechnology in Cosmetics. In: PANDREY Ashok, HÖFER Rainer, LARROCHE Christian, TAHERZADEH Mohammad, NAMPOOTHIRI K., Madhavan. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. UK: Elsevier, **2015**. s. 610–634. ISBN 978-0-444-63453-5
3. GUTOWSKI Karol A. Hyaluronic Acid Fillers: Science and Clinical Uses. *Clinics in Plastic Surgery*, **2016**. 43 (3), s. 489–496. ISSN 1558-0504
4. SHANTÉ Carole E., ZUBERA Guy, HERLIN Corinne, VANDAMME Thierry F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, **2011**. 85 (3), s. 469–489. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.03.019
5. TSAO Rong. Synergistic interactions between antioxidants used in food preservation. In: FEREIDOON Shahidi. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. UK: Elsevier, **2015**. s. 335–345. ISBN 978-1-78242-089-7
6. CHAUDHURI Ratan, K. Antioxidants in Cosmetics for Anti-Aging. In: MEYER Rosen, R. *Harry's Cosmeticology*. 7th ed. USA: Chemical Publishing Company Inc., **2015**. 2, s. 1072–1088. ISBN 978-0-8206-01779
7. Antioxidanty. [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z: <http://www.fitvit.cz/clanek/antioxidanty>
8. TABOR Aaron, BLAIR Robert M. The Benefits of Antioxidant - Rich Fruits on Skin Health. In: LEU Francis C., BAGCHI Manashi, ZAFRA-STONE Shirley, BAGCHI Debasis. *Nutritional Cosmetics - Beauty from Within*. USA: William Andrew Publishing, **2009**. s. 217–228. ISBN 978-0-8155-2029-0

9. WYPYCH George. Focus Technology – Sunscreens. *Handbook of UV Degradation and Stabilization*. 2nd ed. Canada: ChemTec Publishing, **2015**. s. 361–365. ISBN 978-1-895198-86-7
10. ASTAXANTHIN Plus. [Online]. [cit. 27.04.19]. Dostupné z:
<http://www.back2nature.net/product/astaxanthin-plus/>
11. Vitamin A. [Online]. [cit. 29.04.19]. Dostupné z:
<https://www.puravidabeauty.co.nz/why-vitamin-a-scores-an-a-grade/>
12. Koenzym Q10. [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z:
<http://m.cz.healthfoodingredients.com/softgel/q10-softgel-q10-softgel-oem-q10-softgel.html>
13. MAYENDE Lungisa, SWIFT Rachel D., BAILEY Lisa M., SOARES DA COSTA Tatiana P., WALLACE John C., BOOKER Grant W., POLYAK Steven W. A novel molecular mechanism to explain biotin-unresponsive holocarboxylase synthetase deficiency. *Journal of Molecular Medicine*, **2012**. 90 (1), s. 81–88. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1007/s00109-011-0811-x>
14. EAGLESON Mary. Biotin, vitamin H, bios II to Bitumen. *Concise Encyclopedia Chemistry*. Walter de Gruyter Berlin, New York, **1994**. s. 133. ISBN 978-0-89925-457-9
15. .BADAMCHIAN Mahnaz, SPANGELO Bryan L., HAGIWARA Yoshihide, HAGIWARA Hideaki, UEYAMA Hideo, GOLDSTEIN Allan L. a-tocopherol succinate, but not a-tocopherol or other vitamin E analogs, stimulates prolactin release from rat anterior pituitary cells in vitro. *The Journal of Nutritional Biochemistr*, **1995**. 6 (6), s. 340–344. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(95\)00044-Z](https://doi.org/10.1016/0955-2863(95)00044-Z)
16. Pharmaceutical D-alpha tocopherol Acid Succinate. [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z:
https://www.alibaba.com/product-detail/pharmaceutical-D-alpha-tocopherol-Acid-Succinate_60369996616.html?spm=a2700.7724857.normalList.20.43ca32fdLEgC9Z
17. GULATI Kavita, ANAND Rashmi, RAY Arunabha. Nutraceuticals as Adaptogens: Their Role in Health and Disease. *Nutraceuticals - Efficacy, Safety and Toxicity*, **2016**. 16, s. 193–205. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00016-4>

18. ANGERHOFER Cindy K., MAES Daniel, GIACOMONI Paolo U. The Use of Natural Compounds and Botanicals in the Development of Anti-Aging Skin Care Products. In: NAVA Dayan. *Skin Aging Handbook - An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development*. USA: William Andrew Publishing, **2008**. s. 212. ISBN 978-0-8155-1584-5
19. Vitamín B13 (kyselina lipoová). [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z: <https://www.ordinace.cz/clanek/vitamin-b13-kyselina-lipoova/?increase=1>
20. Kyselina Alfa Lipoová. [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z: <http://cz.sostherb.com/pharmacy-herbal-extract/alpha-lipoic-acid.html>
21. International Food Information Service. *Dictionary of Food Science and Technology*. 2nd ed. UK: International Food Information Service (IFIS Publishing), **2009**. s. 374–376. ISBN 978-1-4051-8740-4
22. BENVIDI Ali, REZAEINASAB Masoud, GHARAGHANI Sajjad, ABBASI Saleheh, ZARE Hamid R. Experimental and theoretical investigation of interaction between bovine serum albumin and the mixture of caffeic acid and salicylic acid as the antioxidants. *Electrochimica Acta*, **2017**. 255, s. 428–441. DOI: 10.1016/j.electacta.2017.09.184
23. Kyselina salicylová. [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z: <https://www.handymade.sk/kyselina-salicylova-prasok-100-g/>
24. ZAID Mohammad Abu, AFAQ Farrukh, SYED Deebea N., MUKHTSR Hasan. Botanical Antioxidants for Protection Against Damage from Sunlight. In: TABOR Aaron, BLAIR Robert M. *Nutritional Cosmetics - Beauty from Within*. UK: William Andrew Publishing, **2009**. s. 177. ISBN 978-0-8155-2029-0
25. JACOBSEN Charlotte, NIELSEN Nina Skall, HORN Anna Frisenfeldt, SORENSEN Ann-Dorit Moltke. Stabilization of omega-3 oils and enriched foods using antioxidants. *Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids*. UK: Elsevier, **2013**. s. 143. ISBN 978-0-85709-428-5
26. Kyselina ferulová. [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z: <http://cz.greenspringstore.com/standard-herb-extract/ferulic-acid.html>

27. ANUPAMA Setia. Applications of Graft Copolymerization: A Revolutionary Approach. In: THAKUR Vijay Kumar. *Biopolymer Grafting - Applications*. UK: Elsevier, **2018**. ISBN 978-0-12-810462-0
28. ŠŇUPÁREK Jaromir. Konstituce a nomenklatura polymerů. *Makromolekulární chemie*. Univerzita Pardubice. Pardubice, **2014**. 13-16. ISBN: 978-80-7395-761-2
29. BHATTACHARYA A., MISRA B. N. Grafting: a versatile means to modify polymers Techniques, factors and applications. *Progress in Polymer Science*, **2004**. 29 (8), s.768–775. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2004.05.002
30. CHUN Feng, YONGJUN Li, DONG Yang, JIANHUA Hu, XIAOHUAN Zhang, XIAOYU Huang. Well-defined graft copolymers: from controlled synthesis to multipurpose applications. *Chemical Society Reviews*, **2011**. 40 (3), s. 1282–1295. DOI:10.1039/b921358a
31. HANEY Paul, HERTING Katherine, SMITH Suzanneth. Molecular weight cut-off (MWCO) specifications and rates of buffer exchange with Slide-A-Lyzer Dialysis Devices and Snakeskin Dialysis Tubing. [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-biology-application-notes/separation-characteristics-dialysis-membranes.html#/legacy=www.piercenet.com>
32. JENNINGS Thomas A. Phase Technologies. *Lyophilization: Introduction and Basic Principles*. USA: CRC Press, **1999**. s. 5–8. ISBN: 978-1-4398-0607-4
33. ROUETTE Hans-Karl. Infrared Spectroscopy. *Encyclopedia of Textile Finishing*. UK: Woodhead Publishing, **2001**. s. 38–40. ISBN 978-3-540-65031-7
34. IR Spectroscopy. [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z: <https://byjus.com/chemistry/infrared-spectroscopy/>
35. FITCH, J., BARNES M. Chapter 24-Hydrocarbon Analysis. In *MNL37-EB Fuels and Lubricants Handbook: Technology, Properties, Performance, and Testing*, edited by GE Totten, SR Westbrook, and RJ Shah, West Conshohocken, PA: ASTM International, **2003**. s. 649–673. DOI:10.1520/MNL10739M.
36. UV Visible Absorption Spectroscopy. [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z: http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/LabMatters/Instruments/UV_Vis/Cary50.htm
37. RIZVI Syed Q. Lubricant Testing. Ultraviolet Spectroscopy (UV). *A Comprehensive Review of Lubricant Chemistry, Technology, Selection, and Design*. USA: ASTM International, **2009**. s. 542–544. ISBN 978-0-8031-7000-1

38. KO Frank K., WAN Yuqin. Nuclear Magnetic Resonance (NMR). *Introduction to Nanofiber Materials*. UK: Cambridge University Press, **2014**. s. 120–125. ISBN 978-0-521-87983-5
39. SUN Da-Wen. Trends in Food Authentication. *Modern Techniques for Food Authentication*. USA: Elsevier, **2008**. s. 618–620. ISBN 978-0-12-374085-4
40. WHITTAKER David. Problems in Interpreting Infrared Spectra, Mass Spectra, Ultraviolet Spectra, ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectra and ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectra. *Interpreting Organic Spectra*. UK: Royal Society of Chemistry, **2000**. s. 193. ISBN 978-0-85404-601-0
41. POPA Igor, NOVOTNÁ Radka. *Základy NMR spektroskopie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, **2012**. s. 21. ISBN 978-80-244-2991-5
42. Nuclear Magnetic Resonance. [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z: <https://chembam.com/techniques/nmr/>
43. PAUL-DAUPHIN Stephanie, KARACA Fatma, MORGAN Trevor J., MILLAN-AGORIO Marcos, HEROD Alan A., KANDIYOTI Rafael. Probing Size Exclusion Mechanisms of Complex Hydrocarbon Mixtures: The Effect of Altering Eluent Compositions. *Energy & Fuels*, **2007**. 21 (6), s. 3484–3489. DOI:10.1021/ef700410e
44. SEREDA Alena. Studium interakcí hyaluronanu a albuminu metodou SEC-MALLS [online]. Bakalářská práce. VUT Brno, **2014**. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/31390>.
45. POUCHLÝ Julius. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, **2008**. s. 205. ISBN 978-80-7080-674-6.
46. DUPONT C. Size-Exclusion Chromatography (SEC) and Multiangle Light Scattering (MALS) detection: principles and application to the study of cellulose. *Gelatine sizing of paper and its impact on the degradation of cellulose during aging: a study using size-exclusion chromatography*. Amsterdam: University of Amsterdam (UvA), **2003**. s. 55–84. Dostupné z: <http://dare.uva.nl/document/68926>.
47. PAULOVÁ Hana, BOCHOŘÁKOVÁ Hana, TÁBORSKÁ Eva. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. *Chemické listy*, **2004**. 98, s. 174–179.
48. VISTEJNOVA Lucie, DVORAKOVA Jana, HASOVA Martina, MUTHNY Tomas, VELEBNY Vladimír, SOUCEK Karel, KUBALA Lukas. The comparison of impedance-

based method of cell proliferation monitoring with commonly used metabolic-based techniques. *Neuroendocrinology Letters*, **2009**. 30 (1), s. 121–127. PMID: 20027157

49. Mtt Assay Viability Testing. [Online]. [cit. 28.04.19]. Dostupné z:
<https://www.indiamart.com/proddetail/mtt-assay-viability-testing-7937197648.html>

Seznam obrázků a tabulek

SEZNAM OBRAZKŮ:

Obrázek 1. Vzorec kyseliny hyaluronové.....	16
Obrázek 2. Vzorec a vzhled astaxanthinu.....	23
Obrázek 3. Vzorec a zdroj vitamínu A.....	24
Obrázek 4. Vzorec a vzhled koenzymu Q10.....	25
Obrázek 5. Vzhled α - tokoferol sukcinátu.....	26
Obrázek 6. Vzhled kyseliny lipoové.....	27
Obrázek 7. Vzhled kyseliny salicylové.....	28
Obrázek 8. Vzhled kyseliny ferulové.....	30
Obrázek 9. Základní typy kopolymerů.....	31
Obrázek 10. Roubování (Grafting).....	31
Obrázek 11. Dialýza.....	34
Obrázek 12. Lyofilizace ve skleněném kontejneru.....	36
Obrázek 13. Schéma IČ měření.....	37
Obrázek 14. Schéma UV měření.....	38
Obrázek 15. Schéma NMR měření.....	40
Obrázek 16. MTT test.....	42
Obrázek 17. Příprava derivátů kyseliny hyaluronové.....	46
Obrázek 18. Zařízení pro promývání vzorků.....	46
Obrázek 19. Dialýza vzorků.....	47
Obrázek 20. Produkt po lyofilizaci.....	47

Obrázek 21. Přístroj BRUKER Avance TM III.....	59
Obrázek 22. Vzorčky pro měření pomocí UV spektroskopie.....	60
Obrázek 23. Přístroj Varian CARY 100 Conc UV Visible Spectrophotometer.....	61
Obrázek 24. Tabletovací forma Lis-TRYSTOM.....	62
Obrázek 25. Vzhled připravené tablety.....	62
Obrázek 26. Přístroj Nicolet 6700 FT-IR Spectrometer.....	63
Obrázek 27. Přístroj na měření antioxidační aktivity.....	64
Obrázek 28. Vzorčky pro měření antioxidační aktivity.....	65
Obrázek 29. Mikrodestička na měření vzorků.....	66
Obrázek 30. ¹ H NMR spektra HA-LA111.....	69
Obrázek 31. COSY NMR spektra HA-B1105.....	70
Obrázek 32. COSY NMR spektra HA-LA1105.....	70
Obrázek 33. DOSY NMR spektra HA-B1105.....	71
Obrázek 34. DOSY NMR spektra HA-LA1105.....	72
Obrázek 35. HSQC NMR spektra HA-B1105.....	73
Obrázek 36. HSQC NMR spektra HA-LA1105.....	73
Obrázek 37. Porovnání UV spekter vzorků HA a HA-B111.....	75
Obrázek 38. Porovnání UV spekter vzorků HA a HA-LA111.....	75
Obrázek 39. IČ spektrum vzorku HA.....	75
Obrázek 40. Porovnání IČ spekter vzorků HA a HA-B111.....	77
Obrázek 41. Porovnání IČ spekter vzorků HA a HA-LA111.....	77
Obrázek 42. Grafické znázornění výsledků antioxidační aktivity.....	80
Obrázek 43. Grafické znázornění výsledků cytotoxicity.....	81

Obrázek 44. Grafické srovnání usmrcených buněk.....	81
--	----

SEZNAM TABULEK:

Tabulka 1. Metody modifikace kyseliny hyaluronové.....	17
Tabulka 2. Důležité antioxidanty používané v kosmetickém průmyslu.....	22
Tabulka 3. Antioxidanty používané v diplomové práci.....	22
Tabulka 4. Seznam všech připravených vzorků.....	48
Tabulka 5. Navážky surovin pro přípravu vzorků v poměru ekvivalentu 1:1.....	49
Tabulka 6. Navážky antioxidantů při poměru ekvivalentu 1:1.....	49
Tabulka 7. Zmenšené navážky antioxidantů při poměru ekvivalentu 1:1.....	50
Tabulka 8. Navážky surovin pro přípravu vzorků v poměru ekvivalentu 1:0,5.....	50
Tabulka 9. Navážky antioxidantů při poměru ekvivalentu 1:0,5.....	51
Tabulka 10. Zvětšené navážky antioxidantů při poměru ekvivalentu 1:0,5.....	51
Tabulka 11. Získaná hmotnost derivátů HA.....	67
Tabulka 12. Naměřené stupně substituce derivátů HA.....	68
Tabulka 13. Hodnoty absorpčního maxima u derivátů HA a u samotných antioxidantů...	74
Tabulka 14. Hodnoty molekulových hmotností a polydisperzita.....	78
Tabulka 15. Výsledky antioxidační aktivity.....	79

ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	Vývoj roubovaných kopolymerů na bázi kyseliny hyaluronové určených pro kosmetický průmysl
Autor práce	Liliia Kosenko
Obor	Technologie výroby a zpracování polymerů
Rok obhajoby	2019
Vedoucí práce	Ing. Luboš Prokůpek, Dr.
Anotace	Tato práce je zaměřena na vývoj roubovaných kopolymerů na bázi kyseliny hyaluronové určených pro kosmetický průmysl. Teoretická část je zaměřena na problematiku kyseliny hyaluronové a různých typů antioxidantů, používaných k její kopolymeraci, a také možností charakterizace kopolymerů na bázi kyseliny hyaluronové. V praktické části je popsána příprava derivátů HA a jejich charakterizace pomocí vybraných analytických a biologických metod.
Klíčová slova	Kyselina hyaluronová, antioxidanty, biotin, kyselina lipoová, roubování, spektroskopie