

Polymerní hydrogely jako moderní doplňky stravy

Bc. Adam Kurtin

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adam Kurtin**
Osobní číslo: **T12386**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Polymerní hydrogely jako moderní doplňky stravy**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Formy doplňků stravy dle jejich využití.
2. Účinné látky v doplňcích stravy.
3. Dělení doplňků stravy dle formy ve které se nacházejí.
4. Hydrogely a jejich klasifikace do skupin.
5. Přehled gelových/hydrogelových doplňků stravy na trhu s přírodními účinnými látkami.

II. Praktická část

1. Metody přípravy a metody charakterizace polymerních hydrogelů jako doplňků stravy.
2. Návrh složení a technologie přípravy polymerních hydrogelů s matricí založenou na polysacharidech s účinnými látkami na posílení imunity.
3. Příprava polymerních hydrogelů.
4. Provedení měření a vyhodnocení antioxidační aktivity připravených hydrogelů.
5. Provedení měření vybraných vlastností připravených hydrogelů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VÉGH, R. *Farmaceutická technologie*. Vyd. 1. Brno: Computer Press, 2011, 332 s. ISBN 978-80-251-3319-4.

[2] RABIŠKOVÁ, M. Perorální matricové tablety s řízeným uvolňováním léčiva, *Lékové formy, Remedia*, 17(2), 188-192, 2007. ISSN 0862-8947.

[3] BHOYAR, N. et al. Recent Advances in Novel Drug Delivery System Through Gels: Review. *Journal of Pharmacy and Allied Health Sciences* 2(2), 21739, 2012. ISSN 1908-2044.

[4] GULREZ, S. K. H., AL-ASSAF, S. and PHILIPS, G. O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*, Prof. Angelo Carpi (Ed.), InTech, 2011. ISBN 978-953-307-268-5.

[5] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H. a TÁBORSKÁ, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy* 98, 1747179, 2004. ISSN 1213-7103.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Lenka Jelínková, Ph.D.

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání diplomové práce:

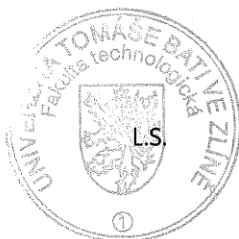
2. února 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

22. dubna 2015

Ve Zlíně dne 2. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: KURTIN ADAM

Obor: THEVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 24. 4. 2015



¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídáne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá možností využití přírodních polymerů jako nosných struktur aktivních látek ve formě hydrogelů. Připravené hydrogelové tablety byly zkoumány k využití ve výživě člověka jako doplňky stravy. Byly připraveny receptury a technologie na výrobu matic s aktivními látkami, které byly dále testovány. K popisu vlastností připravených hydrogelů jsme využili metod sušení a lyofilizace, na porovnání desorpce připravených receptur. Metodou HPLC jsme zkoumali využitelnost vitamínu C z nosné struktury. Byla měřena i antioxidační aktivita vybraných hydrogelových receptur.

Klíčová slova: hydrogel, doplňky stravy, antioxidační aktivita, účinná látka, HPLC, DPPH

ABSTRACT

This thesis deals with a possibility of using natural polymers in hydrogels forms as supporting structures for active substances. Prepared hydrogel tablets were investigated for a possible use in human nutrition as food supplements. Recipes and technologies were prepared to produce matrices with active substances that were tested. To describe properties of the prepared hydrogels we used the methods of drying and lyophilization in order to compare desorption of the prepared recipes. By the aid of HPLC method we investigated the usability of vitamin C from the supporting structure. Antioxidant activity of selected hydrogel recipes was also measured.

Keywords: hydrogel, dietary supplements, antioxidant activity, active substance, HPLC, DPPH

Chtěl bych poděkovat své vedoucí diplomové práce Ing. Lence Jelínkové Ph.D. za její pomoc, trpělivost, připomínky a cenné rady při vypracování této práce. Velmi ji děkuji za veškerý čas, který věnovala při tvorbě praktické části. Také bych rád poděkoval paní Ing. Lence Fojtíkové za velkou pomoc při práci v laboratoři. Velké poděkování patří také mé rodině, přátelům a všem mi blízkým za podporu, trpělivost a toleranci po celou dobu studia.

„Když už člověk jednou je, tak má koukat aby byl. A když kouká, aby byl a je, tak má být to, co je a nemá být to, co není, jak tomu v mnoha případech je.“

Jan Werich

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 DOPLŇKY STRAVY.....	13
1.1 DRUHY DOPLŇKŮ STRAVY.....	13
1.1.1 Antioxidanty.....	14
1.1.2 Doplnky pro zdraví kostí a kloubů.....	14
1.1.3 Probiotika	15
1.1.4 Doplnky stravy na hubnutí	15
1.1.5 Doplnky sportovní výživy	16
1.1.6 Enzymy	16
1.2 VYBRANÉ ÚČINNÉ LÁTKY V DOPLŇCÍCH STRAVY	17
1.2.1 Chlorella.....	17
1.2.2 Mumio	17
1.2.3 Vitamin C.....	18
1.2.4 Vitamin A.....	18
1.2.5 Vitamin E	19
1.2.6 Koenzym Q ₁₀	20
1.2.7 Nenasycené mastné kyseliny.....	21
1.2.8 Zinek	22
1.2.9 Xylitol	23
1.3 FORMY DOPLŇKŮ STRAVY	23
1.3.1 Retardované formy.....	24
1.3.2 Matricové tablety	24
1.3.2.1 Polymerní nerozpustné matrice	24
1.3.2.2 Lipofilní matrice	25
1.3.2.3 Hydrofilní gelové matrice	25
2 HYDROGELOVÉ FORMY DOPLŇKŮ STRAVY	28
2.1 KLASIFIKACE HYDROGELŮ	29
2.1.1 Klasifikace dle původu.....	29
2.1.2 Klasifikace v závislosti na konfiguraci	29
2.1.3 Klasifikace dle způsobu přípravy	29
2.1.4 Klasifikace dle elektrického náboje	30
2.1.5 Klasifikace dle způsobu síťování	30
2.1.5.1 Fyzikální síťování	30
2.1.5.2 Chemické síťování	30
2.1.5.3 Optimalizace síťování in situ	31
2.2 NOSNÉ STRUKTURY HYDROGELOVÝCH MATRIC	31
2.2.1 β-glukany.....	31
2.2.2 Agar	32
2.2.3 Algináty	33
2.2.4 Želatina.....	34
2.3 VYUŽITÍ HYDROGELOVÝCH FOREM V DOPLŇCÍCH STRAVY	35
2.3.1 Hydrogely při léčbě obezity	35
2.3.2 Hydrogely jako injekční tekutiny	35

2.3.3	Ukázka hydrogelových doplňků stravy.....	36
II	PRAKTICKÁ ČÁST	37
3	PŘÍPRAVA HYDROGELOVÝCH DOPLŇKŮ STRAVY	38
3.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	38
3.2	POUŽITÉ MATERIÁLY	38
3.2.1	Jednotlivé receptury připravených vzorků	39
3.3	PŘÍPRAVA HYDROGELŮ	40
3.3.1	Hydrogely obsahující agar	40
3.3.2	Hydrogely obsahující alginát sodný.....	40
3.3.3	Hodnocení	41
4	STANOVENÍ SKUTEČNÉHO MNOŽSTVÍ VITAMINU C V NOSNÉ STRUKTUŘE B-GLUKANU S AGAREM POMOCÍ HPLC	43
4.1	POUŽITÁ METODA.....	43
4.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	43
4.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ	44
4.4	VÝSLEDKY MĚŘENÍ	45
4.5	HODNOCENÍ A DISKUZE	47
5	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ DPPH.....	49
5.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	49
5.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	51
5.3	POSTUP MĚŘENÍ.....	52
5.4	VÝSLEDKY MĚŘENÍ	53
5.4.1	Hodnoty naměřené pro kalibrační křivku	53
5.4.2	Hodnoty naměřené absorbance připravených vzorků	53
5.5	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	54
6	STUDIUM DESORPCE VYBRANÝCH VZORKŮ	56
6.1	POSTUP MĚŘENÍ.....	56
6.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	56
6.3	VÝSLEDKY SUŠENÍ	56
6.4	HODNOCENÍ	58
6.5	LYOFILIZACE VYBRANÝCH RECEPTUR	59
6.5.1	Výsledky měření	60
6.5.2	Hodnocení	61
7	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE.....	62
7.1	POSTUP MĚŘENÍ.....	62
7.2	VÝSLEDKY A HODNOCENÍ.....	63
7.2.1	Hydrogely s nosnou strukturou β -glukan – agar	63
7.2.2	Hydrogely s nosnou strukturou β -glukan – alginát sodný	64
8	TERMICKÁ ANALÝZA – DIFERENČNÍ KOMPENZAČNÍ	

KALORIMETRIE (DSC)	66
8.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A NAŘADÍ	66
8.2 PRACOVNÍ POSTUP.....	66
8.3 VÝSLEDKY A HODNOCENÍ.....	66
ZÁVĚR	69
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	77
SEZNAM OBRÁZKŮ	78
SEZNAM TABULEK	79
SEZNAM PŘÍLOH	80

ÚVOD

Hydrogel je gelová forma látky, která do sebe dokáže navázat velké množství vody, kdy je její obsah až 99 % celkové směsi. Ke gelovatění jsou velmi vhodnými materiály přírodní polymery, kdy některé samy o sobě dovedou do své struktury navázat vodu. Vývojem technologií jsou hydrogely materiálem s velkým potenciálem.

Hydrogelové formy jsou v dnešní době zkoumány v lékařství jako matrice pro přenos aktivních látek do organismu. Existuje spousta výzkumných prací na studium hydrogelových materiálů využívaných jako krycích materiálů na hojení poškozené kůže nebo jiných druhů tkání. Tyto materiály jsou preferovány z hlediska snadných technologií přípravy, velké využitelnosti aktivních látek z nosné struktury a jsou založeny na přírodní bázi, čemuž je v současné době kladen významný důraz. Jejich využití se najde i v jiných odvětvích, například v potravinářství, kosmetice nebo zemědělství.

Vyjmenovaná odvětví se zabývají hydrogely z důvodu jejich specifických vlastností, mezi které patří elasticita, pevnost, biokompatibilita, vaznost vody a biodegradibilita.

Gelová forma je významným pokrokem i ve výživě člověka. Účinnost potravinových doplňků ovlivňují dva velmi významné faktory: postupné uvolňování aktivní látky a využitelnost živin. Polymerní síťovaná struktura napomáhá těmto dvěma funkcím, z tohoto důvodu má účinnější vliv na podávání účinných látek, vitaminů, minerálů a dalších významných látek potřebných pro organismus člověka. Biodegradibilita a biokompatibilita přírodních materiálů v neposlední řadě optimalizuje využitelnost živin uložených v podobě gelu tak, aby se maximalizovaly jejich fyziologické účinky. Využitelnost živin v potravinových doplňcích je zásadní i z hlediska ekonomické stránky, kdy je výhodné vstřebávat do organismu postupně všechny aktivní látky z hydrogelové matrice.

Předložená práce se zabývá hydrogely, které se mohou využít jako moderní forma potravinových suplementů. Technologie přípravy a složení směsi ovlivňuje samotné vlastnosti připravených hydrogelů, proto jsme se při zkoumání připravených směsí zaměřili, jak na způsob síťování, tak na složení receptur připravených potencionálních doplňků stravy.

Cílem této práce bylo připravit hydrogelový doplněk stravy o vhodné konzistenci, složení a dalších výše specifických vlastností.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 Doplnky stravy

Podle zákona o potravinách jsou doplňky stravy potraviny, jejichž účelem je doplňovat běžnou stravu a které jsou koncentrovanými zdroji vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravine samostatně nebo v kombinaci, určené k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích. [1]

Podle směrnice EP a R č. 2002/46/ES jsou doplňky stravy potraviny, jejichž účelem je doplňovat běžnou stravu a které jsou koncentrovanými zdroji živin nebo jiných látek s výživovým nebo fyziologickým účinkem, samostatně nebo v kombinaci, jsou uváděny na trh ve formě dávek, a to ve formě tobolek, pastilek, tablet, pilulek a v jiných podobných formách, dále ve formě sypké, jako kapalina v ampulích, v lahvičkách s kapátkem a v jiných podobných formách kapalných nebo sypkých výrobků určených k příjmu v malých odměřených množstvích. [2]

V doplňcích stravy by měla být povolena pouze přítomnost vitaminů a minerálních látek, které se obvykle nacházejí ve stravě a jsou konzumovány jako její součást; to však neznamená, že je jejich přítomnost nezbytná. Mělo by se zamezit možným sporům, pokud jde o identitu těchto živin, a je tedy vhodné vytvořit pozitivní seznam těchto vitaminů a minerálních látek. [2]

Doplňky stravy se uvádí do oběhu pouze balené. Obvykle jsou upraveny do formy kapslí či tobolek, pastilek, tablet, dražé, sáčků s práškem, ampulek s tekutinou, kapek nebo jiných jednoduchých forem tekutin a prášků určených pro příjem v malých odměřených množstvích. [1]

Hranice mezi doplňky stravy a některými jinými kategoriemi produktů je velmi úzká a kategorizaci konkrétního přípravku je třeba provádět případ od případu. [1]

Při střídání ročních období, chřipkových epidemiích, výkyvech teplot nebo stresu dochází ke zvýšené spotřebě vitaminů a jiných důležitých látek. V těchto situacích nejsme schopni doplňovat plnohodnotně všechny látky jen z potravy, proto je vhodné využívat doplňků stravy. [3]

1.1 Druhy doplňků stravy

Dělit doplňky stravy můžeme z různých hledisek. Pro tuto práci jsme vybrali dělení dle jejich možnosti využití neboli specifického působení. [4]

1.1.1 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které mohou reagovat s volnými radikály autooxidačního řetězce, hlavně s peroxylovými radikály. Při reakci se vytvoří hydroperoxid nebo jiný neradikálový lipidový produkt. Antioxidant přejde do formy volného radikálu, který však bývá dosti stálý, takže není schopen pokračovat v autooxidační reakci. Antioxidanty mají tedy za úkol zpomalit autooxidační reakci nebo v ideálním případě ji zastavit. [4]

Nejčastěji se jako antioxidanty využívají fenolové deriváty se dvěma hydroxyskupinami v *ortho*- nebo *para*-poloze. Účinnější jsou ty se skupinami substituovanými v *ortho*-poloze a přírodního původu. Zvýšení účinnosti antioxidantů je díky substituci benzenového jádra dvěma alkylovými skupinami. Přírodní antioxidanty se vyskytují v přírodních tucích a olejích, nejčastěji jsou to tokoferoly. [4]

Méně se využívají látky s dusíkatým heterocyklem, které jsou více toxické. [4]

Antioxidanty chrání zrak, lze potlačit průběh senilní degenerace oční čočky, která ve vyšším věku vede obvykle ke slepotě, užíváním vitaminů C, E, β -karotenu a zinku. Antioxidanty omezují vznik šedého zákalu a snižují riziko dalších onemocnění očí. Proto se doporučuje osobám starším 55 let, aby si chránily zrak užíváním těchto antioxidantů. Dle výzkumů se u lidí užívajících směsi antioxidantů se zinkem riziko onemocnění snížilo až o 30 %. Nejlepší účinky byly získány u směsi 500 mg vitaminu C, 400 mg vitaminu E, 15 mg β -karotenu a 80 mg zinku. [5, 6]

Pozitivní vliv mají i při onemocnění srdce. Vitamin E pomáhá zabránit oxidaci LDL v tepnách. Oxidace LDL je podnět pro onemocnění srdce a mozkové mrtvice. Antioxidanty mohou pomoci i prevenci a léčbu určitých typů vysokého krevního tlaku. Při onemocnění Alzheimerovou chorobou snižují oxidační poškození mozkových buněk. Antioxidanty tedy mohou zpomalit mentální zhoršení u Alzheimerovy choroby. Antioxidanty jsou důležité i při ochraně imunitního systému. [6]

1.1.2 Doplnky pro zdraví kostí a kloubů

Tato skupina doplňků stravy patří k nejdynamičtěji se rozvíjející skupinou přípravků. Jejich aktivními složkami jsou minerální látky, vitaminy, antioxidanty, glukosamin, výtažky ze živočišných chrupavek nebo želatina. [3]

Nejčastější poruchou kosterního skeletu ve světě je osteoporóza. U žen je například osteoporóza těsně spojena s poklesem hladiny estrogenu, který doprovází menopauzu. [4]

Při prevenci a léčbě osteoporózy je důležitý vhodný příjem živin a látek. Výživové komponenty, které jsou relativně bezpečné a hospodárné, obsahují faktory, týkající se metabolismu kostí, které mohou ovlivnit jak tvorbu kosti, tak i kostní resorpci. Aktuální nutriční doporučení pro prevenci osteoporózy jsou založeny na optimalizaci příjmu vápníku a vitamínu D. [7]

Dalšími vhodnými suplementy jsou výrobky obsahující želatinu, což je denaturovaná forma kolagenu, jež je stavební složkou pojivových tkání. Výzkumy prokazují pozitivní dopad kolagenových hydrolyzátů na léčbu osteoporózy. [7]

1.1.3 Probiotika

Nejčastěji se probiotika vyskytují v mléčných výrobcích. Definice pojmu „probiotika“ zdůrazňuje, že jsou to živé mikroorganismy a musí být prezentované v dostatečně vysokém množství v okamžiku spotřeby, s cílem zajistit jejich kladný účinek na zdraví. Probiotický produkt by měl obsahovat minimálně 10⁶ KTJ/g životaschopných buněk po celou dobu skladovatelnosti. Probiotika oživující činnost tělesné střevní mikroflóry, mohou hrát úspěšnou roli v prevenci průjmů, které se někdy dostavují jako vedlejší účinek léčby antibiotiky. Jako probiotické bakterie s protiprůjmovým účinkem byl úspěšně testován kmen *Saccharomyces boulardi* (z kvasnic), *Enterococcus* a *Lactobacillus acidophilus* ze zakysaných mléčných výrobků. Ukázalo se, že právě bakterie z přírodních zakysaných mléčných výrobků doplněné probiotickým doplňkem stravy působí při prevenci průjmových onemocnění nejúčinněji. [5, 9]

1.1.4 Doplnky stravy na hubnutí

Do skupiny těchto produktů se řadí doplňky podporující hubnutí (kontrolu tělesné hmotnosti) nebo látky tzv. diety na hubnutí, což jsou výživové směsi nahrazující hotová jídla. Třetí podskupinou jsou ještě spalovače tuku. [3]

Od 1. 10. 2003 jsou doplňky stravy nazývané „diety“ ošetřeny legislativou a schváleny volně k prodeji. Aby nedocházelo k avitaminóze nebo nedostatku minerálů v daných dietách, jsou ve směrnici udány minimální hodnoty jednotlivých látek. [3]

1.1.5 Doplnky sportovní výživy

Pro sportovce pilně trénující jsou výživové doplňky jako podpora při tréninku, což umožňuje konzistentnější a intenzivnější trénink tím, že podporuje regeneraci mezi tréninky, snižuje výpadky z důvodu nemoci či úrazu a zvyšují výkonnost. Průzkumy ukazují, že užívání doplňků je rozšířený u sportovců a sportovkyň, ale používají se i některé produkty přímo z výzkumných základen a některé mohou být dokonce pro sportovce škodlivé. [21]

Některé doplňky mají vlastnost a nabízí možnost zvýšení výkonu; mezi ně patří například kreatin, kofein nebo hydrogenuhličitany. [21]

Ve sportu je užívána užitečná pyramida doplňků stravy, podle které si sportovci doplňují mezery ve výživovém programu. Hlavním problémem u sportovců jsou nedostatky příjmu některých složek přímo z potravy, jako například nedostatečný příjem vitamínu E, vitamínu C, bílkovin na růst svalové hmoty nebo minerální látky. Sportovní potravinové doplňky s vysokým obsahem aminokyselin a bílkovin jsou nejčastěji v práškových formách, které obsahují přísady s významnými nutričními hodnotami jako je mléko, sojové a vaječné bílkoviny. [3, 11]

Minerální látky se nejčastěji dodávají ve formě iontových nápojů. V tomto případě ve vodě rozpuštěné látky mají dvojitý účinek. Dodání minerálních látek a vody. U sportovců je například potvrzeno, že úbytek tělesné vody o 2 % celkové tělesné hmotnosti už znamená měřitelný pokles sportovního výkonu. Dle výzkumů lze při tréninku ignorovat ztráty pouze 1 % a pít až po něm, ale už při ztrátě 4 % vody v těžkém terénu nebo a závodech se nepodaří ani cíleným doplněním tekutin ihned po námaze obnovit rovnováhu tekutin v těle dříve než za 6-8 hodin. [3]

Další skupinou látek jsou takzvané podpůrné prostředky ve sportu, užívané při fitness a wellness aktivitách. S touto skupinou látek musí sportovci zacházet velmi opatrně, neboť Antidopingová komise Českého olympijského výboru sestavila seznam zakázaných látek, které jsou považovány za doping. [3]

1.1.6 Enzymy

Základní složka enzymu je jednoduchá či složená bílkovina s katalytickou aktivitou, na něž se velmi často vážou další přídatné molekuly známé jako kofaktory nebo prostetické skupiny, které se podílí na katalýze. Enzymy určují povahu i rychlost chemických reakcí a

řídí většinu biochemických procesů v těle všech živých organismů včetně člověka. Enzymů je obrovské množství a je možné je klasifikovat do šesti základních skupin: oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy. [17]

Enzymy v syrové potravě nebo doplňkové enzymové preparáty natráví přijímané živiny, a tím sníží spotřebu tělních trávicích enzymů. Teplota používána při vaření bezpečně všechny enzymy v potravě zničí a tak si člověk musí vystačit se svými vlastními. Orgány produkující enzymy se zvětší a enzymový potenciál těla se využívá pouze na enzymy trávicích, místo aby se šetřil na produkci enzymů metabolických, které jsou potřebné na správnou funkci dalších orgánů a enzymů působících na onemocnění. [18]

1.2 Vybrané účinné látky v doplňcích stravy

1.2.1 Chlorella

Chlorella patří mezi zelené řasy. Jako doplněk stravy je nejvyužívanější druh *Chlorella vulgaris*, která se také vyskytuje u výroby barviv, léčiv, krmiv, akvakultur a v kosmetice. Tato řasa je dobrým zdrojem látek, jako jsou bílkoviny, sacharidy, pigmenty, vitamíny a minerální látky. [10]

Konzumace látek s obsahem řasy *Chlorella* má kladný dopad na zdraví, ve spojení s kardiovaskulárními onemocněními, jako prevence proti vzniku aterosklerózy a snižování krevního tlaku. Výzkumy prokazují i protirakovinné účinky, vliv na stimulaci kolagenu pro lepší vlastnosti pleti. [10]

Z hlediska výživy je pozitivní hlavně skladba minerálních látek. Například, kation draselný je důležitý pro lidskou výživu; je spojen s intracelulární rovnováhou tekutin, metabolismem sacharidů. Mezi další minerální látky, které obsahuje, patří hořčík nebo zinek. Z vitamínů obsahuje tato řasa vitamíny A, E a C nebo skupiny B. [10]

1.2.2 Mumio

Mumio bohužel zatím postrádá systematickou klinickou studii. Probíhají však mnohá studia na různé vlastnosti této látky. Studia se zaměřují na stimulaci imunity, antioxidační účinky, vliv na kosterní aparát a prevence osteoporózy, kdy mumio napomáhá k ukládání vápníku. Vliv na skladbu kostí je způsoben přítomností stroncia a zinku v mumiu. Obsah fulvinové kyseliny v této látce je předmětem pro výzkum v oblasti léčby žaludečních,

střevních onemocnění a baktericidních účinků. Fulvinová kyselina má prokázán účinek na bakterie typu coli, diftérie, tyfu, ale také na *Staphylococcus aureus*. [15]

Mumio je tradiční medicína zejména v oblasti Ruska, pohoří Altaj, Mongolska, Íránu Kazachstánu a Kyrgystánu. Přípravky z mumia byly úspěšně použity při prevenci a léčení infekčních onemocnění a mají stimulační a antialergickou aktivitu. [37]

Byly i vytvořeny léčivé hydrogely, které obsahují mumio, ale v oblasti aplikace na nerovnováhu poruchy. [39]

1.2.3 Vitamin C

Vitamin C se dle chemického názvosloví nazývá kyselina L-askorbová. Patří mezi značně kyselé látky, díky endiolovému systému v konjugaci s karbonylovou skupinou. Vitamin C patří mezi hydrofilní vitamíny a za přítomnosti těžkých kovů podléhá snadno oxidaci za vzniku kyseliny L-dehydroaskorbové. Vratná oxidace, čili oxidačně-redukční reverzibilní systém, má důležitou roli v biochemických procesech lidského těla, kdy přenáší vodík a elektrony z výchozího substrátu až na molekulární kyslík. [17]

Vitamin se také účastní syntézy kolagenu jako kofaktor hydroxylace při konverzi prolinu na hydroxyprolin. Extracelulární vitamin C působí jako ochrana LDL cholesterolu proti oxidaci. Dále redukuje železné ionty z potravy. [17]

V lidském metabolismu je potřeba vitaminu C značná, ale díky genové mutaci L-gulonolaktonoxidasu si není člověk, primát a morče tento vitamin samo syntetizovat. Dodávání vitaminu C je tedy pro lidský organismus nezbytný. Nedostatek příjmu se projevuje onemocněním zvaným kurděje nebo též skorbut, kdy dochází ke krvácivosti, uvolňování zubů, snadné lámavosti kostí, špatnému hojení ran. Avitaminosa také může způsobit deprese, změny nálad nebo hypochondrii, protože se vitamin C zasahuje i do biosyntézy katecholaminů. [17]

Vitamin C se nejvíce vyskytuje v černém rybízu, kiwi, zelené paprice, kopru, šípku nebo citrusových plodech. U kuřáků dochází ke snížení absorpce, takže denní doporučená dávka (DDD) je 150 mg na den, běžná DDD je v ČR pro dospělého jedince 75 mg.den⁻¹. [17]

1.2.4 Vitamin A

Účinnou formou vitaminu A jsou retinol a retinal. Retinol ve své molekule obsahuje β-jononový kruh a pět konjugovaných dvojných vazeb, z nichž čtyři v postranním řetězci

mohou vytvářet příslušné cis a trans izomery. Z těchto izomerů jsou fyziologicky aktivní retinol a neoretinol. V potravinách je doprovázen řadou analogů a metabolitů lišících se strukturou jonového cyklu nebo postranního řetězce. Nejvýznamějším provitaminem je β -karoten. Ten je v potravinách často doprovázen α -karotenem, γ -karotenem nebo β -kryptoxanthinem. Retinol se v organismu účastní látkové přeměny na několika různých místech. Uplatňuje se hlavně v biochemii zrakového vjemu a při biosyntéze bílkovin, potažmo diferenciaci buněk. Esenciálním kofaktorem enzymů regulujících metabolismus vitamínu A je zinek. Doporučená denní dávka je 0,4 - 0,6 mg u dětí, u dospělých pak 0,8 - 1,0 mg. [4]

Absorpce provitaminů není vždy kvantitativní, velmi závisí na složení potravy a způsobu přípravy pokrm, zejména v přítomnosti tuků. Významnými zdroji vitamínu jsou mléčné výrobky, játra, špenát, mrkev, rajčata, rybí tuk. V případě nedostatku se projevují poruchy vidění (šeroslepost), také inhibicí růstu a deformací kostí a reprodukčních orgánů. Předávkování má za následek zvýšení jaterní rezervy vitamínu až projevy hypervitaminosy. Mohou se projevovat různé projevy intoxikace včetně strumigenicity. Antivitaminem vitamínu A jsou lipoxygenasy. Provitaminy A vykazují protirakovinové účinky, neboť jsou součástí kontrolních mechanismů likvidujících volné radikály. Používá se k fortifikaci potravin vitamínem A. Hlavně se přidává do olejů, margarínů, másla, mléka a mouky. [4]

1.2.5 Vitamin E

Mezi vitaminy E řadíme látky, které se řadí do skupiny tokoferolů. Látky jsou odvozeny od tokolu (2-metyl-2(4',8',12'-trimetyltridecyl)-6-hydroxychromanu) a tokotrienolu (2-metyl-2-(4',8',12',-trimetyldecyl- 3',7',11'-trienyl)-6-hydroxychromanu). [4]

Liší se mezi sebou počtem a polohou metylových skupin. Základní látkou je α -tokoferol (5, 7, 8-trimetyltokol). Jednotlivé tokoferoly nemají stejnou biologickou účinnost. Nejúčinnější je α -tokoferol. Účinnost klesá v pořadí $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ -tokoferol. [4]

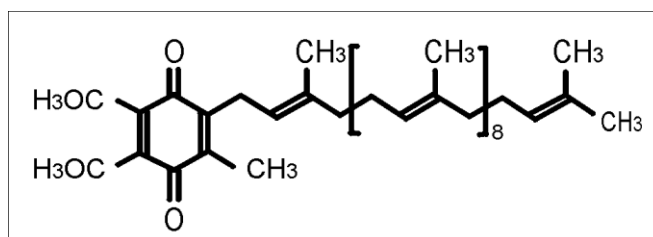
Tokoferoly se účastní oxidačně-redukčních procesů, respiračním procesů, ochrana vitamínu A před oxidací, a ochrana esenciálních mastných kyselin. Spolu s β -karotenem a koenzymem Q chrání strukturu a integritu plasmolemy a membrán vnitrobuněčných organel. Tokoferoly jsou transportovány krví asociované s lipidovou fází lipoproteinových částic LDL. Tokoferoly jsou dobře rozpustné v tucích a lipofilních rozpouštědlech. Jejich

citlivost stoupá s počtem metylových skupin v molekule tokolu, současně však klesá jejich antioxidační účinnost. [4]

Doporučený denní příjem je 14 – 19 mg. Potřebu vitamínu pokrývají především rostlinné lipidy, hlavně oleje, maso, vnitřnosti, ovoce a zelenina, obiloviny. [4]

1.2.6 Koenzym Q₁₀

Koenzymy nebo-li ubichinony se vyskytují jak v potravinách rostlinného tak i živočišného původu. Jsou doprovázeny často lipofilními sloučeninami, jako vitamín E nebo vitamín K.



Obrázek 1 Chemická struktura Koenzymu Q₁₀ [48]

Američtí vědci zjistili, že vyšší dávky koenzymu Q₁₀ zpomalují nástup projevů obávané Parkinsonovy nemoci, jako jsou snížená hybnost, třes rukou a nohou a přerušovaná řeč. Podle magazínu Archives of Neurology lze tyto symptomy snížit podáváním koenzymu Q₁₀ až o 44%. Prokázala to jedna americká studie provedená na 80 pacientech s Parkinsonovou nemocí. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u postižených, kteří denně užívali 1200 mg koenzymu Q₁₀. Mechanismus působení Q₁₀ u Parkinsonovy choroby není zatím ještě zcela prozkoumán, ale zdá se, že jeho léčivý účinek souvisí s podporou metabolismu nervových buněk, v jejichž mitochondriích se tvoří dostatek energie. [4]

Český odborný časopis Stoma Tip zase přinesl hodnocení zkušeností českých stomatologů s koenzymem Q₁₀ z posledních několika let. Odborníci konstatují, že u pacientů s chorobnými změnami parodontu a sliznice úst bylo po léčebné kúře s Q₁₀ prokázáno značné oživení metabolismu postižených tkání (tzv. trofiky), útlum zánětlivých procesů povzbuzením vlastní imunity a potlačení škodlivých mikroorganismů ve prospěch užitečné ústní mikroflóry. U všech věkových kategorií pacientů s gingivitidou, parodontitidou a aftózní stomatitidou bylo při užívání koenzymu Q₁₀ zaznamenáno markantní zlepšení proti výchozímu stavu. Souběžně s parodontologickou péčí a zlepšením hygienických

návyků pacienta (důkladné čištění kartáčkem a zubní nití, popř. mezizubním kartáčkem) došlo k rychlému zpomalení patologických procesů. Nejzajímavější je, že u starších pacientů a jedinců s výrazněji poškozeným parodontem bylo patrné největší zlepšení oproti výchozímu stavu. Čím je tedy onemocnění závěsného aparátu (parodontu) závažnější, tím viditelnější je efekt koenzymu Q10. Na 3. sympoziu mezinárodní vědecké asociace International Coenzyme Q10 Association v Londýně bylo předneseno několik závažných sdělení, která ukazují na stále se rozšiřující léčebné možnosti koenzymu Q10. [3]

Fibromyalgie je nemoc, kterou trpí zejména ženy středního věku, jsou pro ni typické bolesti kosterního svalstva, zvýšená únava a deprese. Podle výzkumů se jako léčebná terapie osvědčilo podávání směsi koenzymu Q10 (200 mg) a výtažku z listů ginkgo biloba (200 mg). Tato směs byla testována po dobu 84 dní na fibromyalgických osobách a vědci zkoumali, jak se po užívání této směsi (v porovnání s placebem) zvýšila kvalita jejich života. Zjistili, že ke zlepšení došlo u 64 % pacientů, což je velmi povzbudivý nálezn zejména proto, že tradiční léčebné postupy u této choroby zatím selhávají. [3]

Koenzym Q10 a migrény. Léčba dlouhodobých migrén s nespecifickými příčinami bývá nezřídka pro lékaře tvrdým oříškem. Zdá se však, že u osob, které trpí těmito obtížemi déle jeden rok, dobře zabírá suplementace koenzymem Q10 v denní dávce 150 mg po dobu nejméně 3 měsíců. Dvě třetiny z 31 testovaných osob pocítily díky tomuto způsobu léčení úlevu, spočívající v poklesu symptomů migrén o celých 50 %. I když další výzkumy ještě pokračují, už nyní se zdá, že lékaři mohou doporučovat zvýšené dávky Q10 jako jednu z možností léčby obávaných migrén. [3]

1.2.7 Nenasycené mastné kyseliny

Nenasycené mastné kyseliny jsou látky velmi reaktivní s kyslíkem a na vzduchu velmi rychle žluknou. Čím více je dvojných vazeb, tím rychleji dochází k hydrogenaci a dle počtu dvojných vazeb se také nenasycené mastné kyseliny dělí na mononenasyčené (MUFA) a polynenasycené (PUFA). Tabulka jedna zobrazuje běžné nenasycené mastné kyseliny a jejich výskyt. [25]

Tabulka 1 Vybrané nenasycené mastné kyseliny a jejich výskyt [25]

Mastná kyselina	Počet uhlíku v řetězci	Počet dvojných vazeb	Potravinové zdroje mastné kyseliny
Olejová	18	1	arašídý, sezam, olivy, máslo, kakaové máslo, kešu, avokádo
Linolová	18	2	slunečnice, kukuřice, sója, arašídý, losos, tuňák
Linolenová	18	3	sója, řepka, máslo, sezam
Arachidinová	20	4	živočišné tuky, arašídý
Eikosapentaeneová	20	5	rybí tuk
Eruková	22	1	řepkový a hořčičný olej

Dvě z polynenasycených kyselin nemohou být syntetizovány lidským tělem. Jsou esenciální a měli by tedy být poskytovány v požadované výši v naší stravě. Jsou to kyselina linolová patřící mezi omega-6 mastné kyseliny a kyselina linolenová omega-3 mastná kyselina. Omega-3 a omega-6 mastné kyseliny mají ve správném poměru vliv na snižování hladiny cholesterolu v krvi. [25]

Existuje bezpočet prací o tom, jak tyto kyseliny obsažené v rybím tuku chrání před kardiovaskulárními onemocněními. Nyní vědci ve Švédsku zjistili, že tyto látky poskytují dobrou prevenci proti rakovině prostaty. Byla publikována studie na 6 272 mužích, kteří byli sledováni v průběhu 30 let. Ti, kteří nejedli ryby vůbec nebo je jedli jen příležitostně, trpěli rakovinou prostaty 3krát častěji než ti, kteří jedli ryby pravidelně, a to zejména ryby s vyšším obsahem mastných kyselin omega-3, jako jsou sardinky, makrely a sledi. Již dřívější studie prokázaly, že omega-3 mastné kyseliny zastavují růst rakovinných buněk v prostatě. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) postihuje rakovina prostaty 21 mužů na každých 100 000 jedinců, a to nejvíce v USA a severozápadní Evropě. [3]

1.2.8 Zinek

Zinek je nezbytnou složkou enzymů, které se účastní mnoha metabolických procesů, jako syntézy sacharidů, lipidů a proteinů. Účastní se i jako nezbytná součást kofaktoru na tvorbě

enzymu dismutázy, který se podílí na ochraně proti oxidačním procesům a snižuje závažnost silných průjmů. [14]

Uplatňuje se při udržování stále acidobazické rovnováhy krve a udržování stálé hladiny vitamínu E. Tlumí zvětšování prostaty, stimuluje činnost rozmnožovacího systému. Má dosud ne zcela jasně objasněnou funkci v centrálním nervovém systému a používá se při léčbě schizofrenie. Je nutný při torbě DNA. Potřebná denní dávka je stanovena na 12-15mg denně pro dospělého člověka. [13]

Děti s nízkou porodní váhou lze chránit zinkem. Když maminky užívají během těhotenství zinek, mohou výrazně snížit rizika infekcí u novorozenců. Při výzkumu byly měřeny výsledky, kdy došlo k porovnávání s podáváním placeba. Ve srovnání s placebem bylo ve skupině dětí s nízkou porodní váhou, jejichž matky užívaly před porodem 30 mg zinku denně, o 32 % méně průjmových onemocnění, o 74 % méně onemocnění úplavicí a o 61 % méně onemocnění impetigem (svědivou puchýřnatou vyrážkou). [3]

1.2.9 Xylitol

Xylitol je látka, která je využívána jako umělé sladidlo. Chemicky se řadí mezi polyalkoholy. Vyskytuje se ve velmi nízkém množství v ovoci a zelenině, ale v komerčním měřítku je vyráběn chemickými nebo biotechnologickými procesy. Jedná se o funkční sladidlo, protože má prebiotické účinky, které mohou snížit hladinu glukózy v krvi, triglyceridů a hladinu cholesterolu. Využívá se i v zubním lékařství. Jeho pozitivní vlastnosti jsou, že dokáže v prevenci proti zubnímu kazu proniknout do bakteriální buňky, která je deformována a následně uhyne. Dále xylitol pozitivně působí na zubní sklovinu, kdy remineralizuje v místech jejího odvápnění. [27, 48]

1.3 Formy doplňků stravy

Jednotlivé doplňky lze rozdělit, z hlediska v jaké formě se přijímají (tzv. léková forma). Tyto formy se liší v různé vstřebatelnosti neboli biologické využitelnosti. Tyto výrazy nám vyjadřují, jaký podíl aktivní látky přestoupil do tělního oběhu (systémové cirkulace), popřípadě jaký podíl se vyloučil. Je-li biologická využitelnost 1, což je ideální, zřejmě přestoupilo do tělního oběhu celých 100 % účinné látky a nic se nevyloučilo. Vstřebatelnost závisí na technologii výroby. Doplnky stravy s lepší vstřebatelností mají složitější, nebo finančně náročnější technologie výroby. [3]

Vstřebatelné jsou náročně připravené retardované tablety, kapsle nebo granule, které lze zkontrolovat nárůstem aktivních látek v krevní plazmě. Velký důraz na biologickou vstřebatelnost se klade u bioaktivních přípravků a vitaminových sirupů. [4]

Dle fáze v jaké se suplement nachází, dělíme lékové formy:

- 1) Pevné – dražé, granulát, prášek, kapsle, pastilka, tableta, žvýkací plátek
- 2) Tekutiny – aerosol, gel, kapky, tobolka roztok, sirup, sprej, olej [4]

1.3.1 Retardované formy

Retardovaná forma (se zpožděným vylučováním) se aplikuje například pro doplňky stravy, které obsahují vitamin C, kdy tento způsob dávkování optimálně využívá resorpční kapacity tenkého střeva, která je až 12 hodin. To znamená postupné vylučování menších dávek aktivní látky po delší časový úsek. [3]

Výroba těchto forem se provádí tak, že se složka aktivních látek (např. vitaminů nebo minerálů) fluidně postříkuje vrstvou želatiny rostlinného původu, aby se vytvořily uniformní kuličky. Ty se usuší a každá zvlášť se šetrně uloží do mikrozapouzdřené formy (mikropeleta), která je obalena lékopisně definovaným celulosovým nebo akrylátovým potahem o různé tloušťce. Po požití je obal postupně rozpuštěn žaludečními šťávami, což vytváří unikátní „retard“ efekt, postupné uvolňování účinných látek do tenkého střeva, které tyto látky vstřebává. [3]

1.3.2 Matricové tablety

Matricové tablety jsou jednoduché lékové formy, které, na rozdíl od násobných forem, neobsahují částice. Tableta funguje jako jeden celek (systém) a její vlastnosti závisí především na vlastnostech nosné pomocné látky a vlastnostech léčivé látky, které mohou být do jisté míry upraveny dalšími vhodnými aditivami tak, aby přípravek splňoval požadované farmakologické vlastnosti a stabilitu. Podle charakteru nosiče (vehikula) se rozlišují polymerní nerozpustné, lipofilní, hydrofilní gelové, popř. smíšené matricové tablety. [5]

1.3.2.1 Polymerní nerozpustné matrice

Tyto matrice jsou tvořeny léčivou látkou dispergovanou v nerozpustných polymerech, např. polyakrylátech, etylcelulose, polyvinylchloridu, polyetyleny, polystyrenu nebo

některých kopolymerech. Vyrábějí se jednoduchými technologiemi přímého lisování prášku nebo lisování změněných prášků (granulátů). Často obsahují i jiné pomocné látky. [2]

Nosný polymer tvoří pevnou pórovitou strukturu – skelet; proto se tento typ matric často označuje jako skeletové tablety. Během expozice v gastrointestinálním traktu (GIT) se tvar tablety nemění, léčivá látka se pomalu rozpouští a difunduje ve formě roztoku z výlisku do okolního prostředí, kde se absorbuje. Léčivo se tedy uvolňuje rychle z povrchu tablety, umožňuje tím dosažení terapeutické koncentrace léčiva v plazmě, poté se v závislosti na dráze, kterou musí roztok léčiva urazit z vnitřní části skeletu, uvolňování zpomaluje tak, aby se vyrovnal koncentrační deficit vzniklý rozkladem a eliminací léčiva. Protože se léčivá látka uvolňuje po rozpuštění vodou vyplněnými kanálky, ovlivňuje uvolňování léčiva z matrice především její pórovitost. Rychlost uvolňování zvyšuje rostoucí rozpustnost léčiva ve vodě, jeho vyšší koncentrace nebo přidání dalších hydrofilních excipientů. Pomalejšího uvolňování léčiva se dosáhne naopak přidáním hydrofobních látek, které snižují smáčivost matrice a vyplňují některé její póry. [5]

1.3.2.2 Lipofilní matrice

Lipofilní matrice z vosků a tuků se vyrábějí technologií sprejového chlazení, termoplastickou granulací nebo přímým lisováním práškové směsi nosiče a léčiva. Základními nosnými látkami jsou mastné kyseliny, mastné alkoholy a jejich estery, např. stearylalkohol, cetylalkohol, glycerolmonostearát, glyceroldibehenát, karnaubský nebo montanglykolový vosk. Léčivá látka se z těchto matric uvolňuje erozí – postupným zmenšováním tablety na základě hydrolyzy a rozpouštění tuků a vosků vlivem působení enzymů a změny pH v GIT. Povrchová eroze lipofilních matric, a tím i rychlost uvolňování léčiva závisí na vlastnostech a koncentraci nosné pomocné látky a na dalších přidaných excipientech. Ty mohou mít jak hydrofilní, tak lipofilní charakter a doladují disoluční profil léčivé látky na požadované optimum. [5]

1.3.2.3 Hydrofilní gelové matrice

Základem hydrofilních gelových matric jsou bobtnající hydrofilní polymery typu celulosových derivátů (hydroxypropylmethylcelulosa, sodná sůl karboxymethylcelulosa, hydroxypropylcelulosa, hydroxyetylcelulosa, methylcelulosa), karbomerů, povidonu a dalších nosných pomocných látek (kyselina alginová, želatina, přírodní gummy). [5]

Hydrofilní matrice jsou dynamické systémy, u kterých při styku s vodným prostředím probíhají procesy zvlhčení, hydratace a rozpouštění polymeru. Po zvlhčení polymeru se uvolní počáteční dávka rozpuštěného léčiva z povrchu matrice s následným navozením jeho terapeutické koncentrace v krevní plazmě. Současně začne polymer hydratovat a vytvářet gelovou vrstvu na povrchu výlisku. Tvorba gelové bariéry na základě hydratace je prvním základním krokem k dosažení řízeného uvolňování léčiva. Ochranná vrstva gelu umožňuje vodě kontinuálně pronikat do tablety, pomalu, zvolna, bez toho, aby se tableta rozpadla. Rozpuštědlo zvýší pohyblivost polymerních řetězců a jejich rozvolnění umožní vznik nabobtnalého gelu. Původní gelová vrstva se postupně rozpouští, nahrazuje ji vrstva nová, která musí být dostatečně pevná, aby zpomalovala difuzi a dále prodlužovala uvolňování léčiva. Konzistenci povrchového gelu podmiňuje viskozita, koncentrace polymeru a jeho chemická struktura. Uvolňování léčivé látky z těchto systémů se děje v závislosti na rozpustnosti léčiva ve vodném prostředí difuzí (převažuje u léčiv dobře rozpustných), erozí (převažuje u léčiv špatně rozpustných) nebo kombinací obou dějů podle rozpustnosti léčiva a relaxace polymerových řetězců. Průměr výlisku není konstantní, ale v průběhu liberace léčiva se mění. Zpočátku se průměr tablety zvyšuje nabobtnáním polymeru hydratace a vznik gelu se posouvají směrem do suchého jádra matrice a velikost tablety se postupně zmenšuje, až výlisek zanikne. [5]

Rychlost uvolňování léčiva lze ovlivnit četnými formulačními a procesními faktory, z nichž nejdůležitější jsou rychlost hydratace polymeru, jeho viskozita a koncentrace, rozpustnost léčivé látky a vlastnosti dalších přidaných pomocných látek. Hydrofilní gelové matrice získaly široké uplatnění mezi matricovými systémy zejména pro jednoduchost výroby, malou finanční náročnost technologie a rozumnou cenu pomocných látek. K jejich dalším nesporným výhodám patří možnost použití pro špatně rozpustná léčiva. Nevýhodou matricových tablet obecně je fakt, že rychlost uvolňování léčiva se postupně snižuje. Je to dáno zmenšujícím se povrchem tablety u hydrofilních, resp. lipofilních matric a prodlužující se vzdáleností difuze roztoku léčiva u polymerních nerozpustných matric. Některé zveřejněné vědecké práce řešily uvedený nedostatek úpravou geometrie tablet nebo použitím speciálních nosičů málo rozpustných v kyselém prostředí (žaludek) a rozpustnějších v neutrálním a zásaditém prostředí (střevní trakt). [5]

Pro ústní podání je možné vložení léčivé látky do hydrogelové matrice, kdy se nejvíce využívá přidání antibiotik, analgetik a protizánětlivých látek. [52]

Jako nosné struktury hydrogelových léčiv se využívají gely vytvořené z kyseliny polyakrylové. Tyto gely snadno bobtnají, kdy se ve směsi využívají aktivní látky rozpustné ve vodě nebo lihu. Mezi další syntetické gelové matrice patří polyethylenglykolové hydrogely, kdy lze využít různé molekulové hmotnosti při tvorbě matrice, což má vliv na viskozitu gelu. [49, 50].

Byly i připraveny hydrogelové směsi, které lze doporučit jako obvazové materiály pro léčení popálenin nebo jiných vad kůže stejně jako nástroje pro transdermální dodávku aktivních látek. [45]

2 Hydrogelové formy doplňků stravy

Hydrogely jsou trojrozměrné sítě vážící do své struktury vodu. Strukturu tvoří různé druhy polymerů, lišící se tvarem, velikostí, formou. Vaznost vody neboli hydrofilita je způsobena přítomností různých chemických skupin jako jsou karboxylové, hydroxylové, sulfonové, nebo amidové. Tyto skupiny jsou zabudovány v polymerní síti tvořící hydrogel. [21]

Hydrogelové základy jsou tvořeny hydrofilním rozpouštědlem, nejčastěji vodou s přísadou dalších vehikul (glycerol, etanol, propylenglykol) a gelotvornou látkou, kterou může být škrob, deriváty celulózy nebo jiné přírodní a syntetické látky. Jsou snadno kontaminovány bakteriemi, kvasinkami a plísněmi, a proto se k nim přidává antimikrobní látka. [20]

Z důvodu jejich vynikající schopnosti absorbovat vodu se hydrogely podobají přírodním živým tkáním lépe než jakékoliv jiné třídy syntetických polymerních materiálů. Dalšími pozitivními vlastnostmi je schopnost bobtnání, propustnosti látek a podstoupit strukturální změny v reakci na různé fyzikální, chemické a biologické podněty. [33]

Tabulka 2 Různé podněty používané pro spouštění uvolnění léčiva z hydrogelů [33]

Podněty nebo změny	Mechanismus
pH	změny pH způsobují bobtnání a uvolňování aktivních látek
iontová síla	změny koncentrace iontů pomáhají k bobtnání a uvolňování látek
chemické podněty	tvorba nabitých komplexů způsobuje bobtnání a uvolňování látek
enzymové substráty	enzymové látky napomáhají k bobtnání a uvolňování léčiv
magnetické	magnetické pole tvoří v gelu póry a při následném bobtnání dochází k uvolňování aktivních látek
elektrické	změny v rozložení náboje uvolňují aktivní látky
teplotní	změny v interakcích polymer-polymer a polymer-voda způsobují bobtnání a uvolnění látek
ultrazvuk	nárůst teploty způsobuje uvolnění aktivních látek

Vzhledem k jejich vysokému obsahu vody, biokompatibilitě a pružné konzistenci, podobné jako mají přírodní tkáně, se hydrogely používají v klinické a experimentální medicíně pro širokou škálu aplikací, včetně tkáňového inženýrství a regenerativní medicíně (chirurgické stehy, umělé orgány, měkké tkáně, protézy, měkké kontaktní čočky), membrány pro biosenzory, mobilní znehybnění, separaci biomolekul nebo buněk (hemodialýza membrány), bariérové materiály, které regulují biologické srůsty, a také systémy podávání léků. [35]

Moderní systémy podávání léků nabízejí potenciální výhody tím, že poskytují jak kinetickou kontrolu, čímž zachovávají úroveň léčiv v terapeuticky požadovaném rozsahu a zvláštní kontrolu ze strany cílené aplikace, která umožňuje snížení systémových nežádoucích účinků. [35]

2.1 Klasifikace hydrogelů

2.1.1 Klasifikace dle původu

Je to dělení nejjednodušší a dělí se na přírodní, polosyntetické a syntetické, které se dále dělí na různé podskupiny dle hlavní složky, ze které je gel vyroben. Přírodní jsou vyrobeny z látek jako proteiny, kolagen, želatina, polysacharidy, škrob, alginát nebo agarosa. Syntetické hydrogely se připravují chemickou polymerací uměle vyrobených látek. [20,21]

2.1.2 Klasifikace v závislosti na konfiguraci

Toto dělení závisí na fyzikální struktuře a chemickém složení, kdy se řadí hydrogely do následujících kategorií:

- a) amorfní
- b) semikrystalické, komplexní směs amorfní a krystalické fáze
- c) krystalické [21]

2.1.3 Klasifikace dle způsobu přípravy

- a) homopolymery, které jsou složeny pouze z jednoho druhu monomeru, jež je základní strukturou polymeru.

- b) kopolymery, skládající se ze dvou nebo více různých druhů monomerů s alespoň jednou hydrofilní složkou, uspořádané v náhodné, skupinové nebo střídavé konfiguraci podél řetězce polymerní sítě
- c) multipolymery jsou strukturou skládající se ze dvou nezávisle zesíťovaných syntetických nebo přírodních polymerů vytvářejících síť, kde jedna složka je kopolymer síťující a druhá složka kopolymer nesíťující. [21]

2.1.4 Klasifikace dle elektrického náboje

Na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti elektrického náboje na zesíťovaném řetězci se dělí hydrogely do čtyř skupin:

- (a) neiontové (neutrální)
- (b) iontové (obsahují aniontové i kationtové náboje)
- (c) amfoterní elektrolyty (amfolytické) obsahující jak kyselé tak i bazické skupiny
- (d) Zwitteriontové (polybetaines) obsahující jak aniontové a kationtové skupiny v každé struktuře opakující se jednotky. [21]

Hydrogely zejména určené pro použití při podávání léků a biomedicínské účely, musí mít přijatelnou biologickou rozložitelnost a biokompatibilitu. Z hlediska rozložitelnosti se dělí hydrogely ještě na biodegradabilní a nebiodegradabilní. [21]

2.1.5 Klasifikace dle způsobu síťování

2.1.5.1 Fyzikální síťování

Fyzikální zesíťování polymerních řetězců může být dosaženo s použitím různých vlivů prostředí (pH, teplota, iontová síla) nebo různých fyzikálně-chemických interakcí (hydrofobní interakce, vodíkové můstky, stereokomplexace, nebo pomocí supramolekulární chemie). [8]

2.1.5.2 Chemické síťování

Fyzikálně síťované hydrogely mají vlastnosti závislé na chemické struktuře a někdy dochází *in vivo* k ředění hydrogelů. Naproti tomu, chemicky neboli kovalentně zesíťované jsou chráněny před ředěním hydrogelové matrice a šířením polymeru od místa vpichu. Dle

skupin molekul se vy užívají pre-reaktivní polymery, jako nízkomolekulární polymery nebo konjugované polymery. [8]

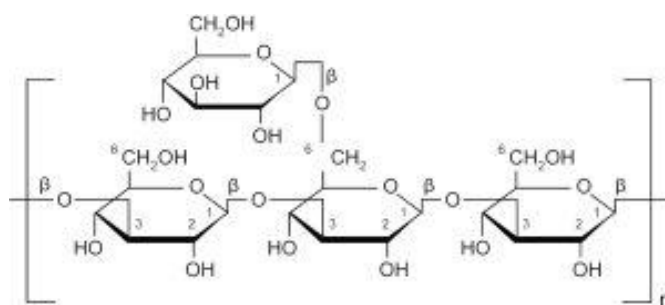
2.1.5.3 *Optimalizace síťování in situ*

Míra *in situ* síťování se odvíjí od jejich chemické kinetiky z reakce síťování. Snadné šíření polymerních prekurzorů přes částečně viskózní roztok gelu ovlivňuje koncentrace polymerů používaných pro přípravu hydrogelu. Při různých aplikacích se využívají různé stupně želatinace. Hustota zesíťení v hydrogelech také ovlivňuje rychlost šíření aktivní látky. Vyšší hustota zesíťení má za následek tvorbu menší velikosti ok, čímž se snižuje rychlost uvolňování zachycených aktivních látek. Nicméně, vysoký stupeň chemické modifikace ovlivňuje fyzikální vlastnosti základního hydrogelu což má vliv na mechanickou pevnost gelu. [8]

2.2 Nosné struktury hydrogelových matic

2.2.1 β -glukany

Polysacharidy nazývané β -glukany se nacházejí v zanedbatelném množství v buněčných stěnách dvouděložných rostlin nebo ve větším množství v buněčných stěnách některých obilovin. β -glukany s glukosovými jednotkami vázanými v hlavním řetězci vazbami (1 \rightarrow 3) a s postranními řetězci připojenými vazbami (1 \rightarrow 6), produkuje jako strukturální a zásobní polysacharidy množství kvasinek, plísní i vyšších hub. Většina β -(1 \rightarrow 3)-glukanů je izolována z hub stopkovýtrosých nebo vřeckatých. [4]



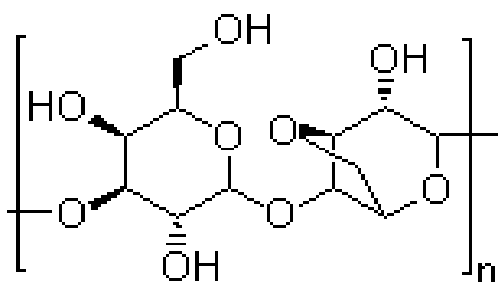
Obrázek 2 Chemická struktura β -glukanu[4]

Nejvýznamnější vlastností β -(1 \rightarrow 3)-glukanů je jejich schopnost posilovat imunitní systém a inhibovat růst nádorů. Aktivita závisí na molekulové hmotnosti, četnosti větvení a

konformaci molekul nejvyšší antinádorovou účinnost vykazují β -D-glukany se stupněm větvení 0,20-0,33 a vyšší relativní molekulovou hmotností (100-200 kDa). Některé β -D-glukany, například schizofyllan (*Basidiomycetes*, extracelulární polysacharid) a lentinan (*Oomycetes*, strukturální polysacharid buněčných stěn) získávané ze stopkovýtrusých hub se používají v klinické medicíně jako imunoterapeutická činidla při léčbě nádorových onemocnění, často v kombinaci s radioterapií. [12]

2.2.2 Agar

Agary se získávají extrakcí horkou vodou (teplota vyšší než je bod tání agarového gelu) z červených mořských řas (*Rhodophyceae*), u kterých agar tvoří intracelulární gelovou matici, která má obdobnou funkci jako celulóza u vyšších rostlin. Extrakce probíhá v alklickém, neutrálním nebo kyselém prostředí, kdy v alkalickém prostředí dochází k částečné hydrolyze sulfátových skupin a vznikají agary s modifikovanými vlastnostmi. Vymražením extraktů vznikají gely, které se suší. [4]



Obrázek 3 Molekulární struktura agaru [52]

Stavebními jednotkami těchto lineárních polysacharidů jsou β -D-galaktopyranosa a 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranosa spojené střídavě vazbou (1 \rightarrow 3) a (1 \rightarrow 4). Základní neutrální polysacharid je dosud nazývá agarosa, jehož základní stavební podjednotkou je disacharid agarobiosa. Kyselé frakce se dříve nazývaly agaropektin. Podle novějších studií tvoří až 18 % celkových cukrů u některých agarů xylopyranosa, substituována na hlavní řetězec. [4]

Želatinace a tavení agaru a jeho frakcí jsou založeny pouze na tvorbě vodíkových můstků (fyzikální gely), a tak je gelace reverzibilní. [51]

Mezi vlastnosti agarů patří rozpustnost ve vodě při teplotě 85°C a vyšší, kdy po ochlazení již 0,04 % disperze dochází k tvorbě gelu. Běžnější využívanou koncentrací je však rozmezí 0,5-2,0 %. Přejechy stavu sol do gelu a opačně dochází při různých teplotách.

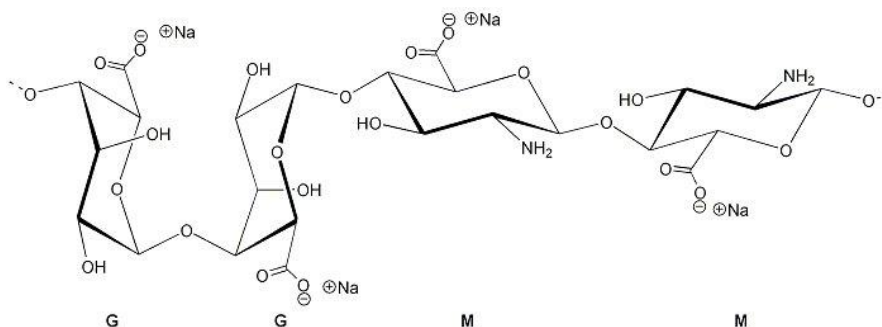
Teplota tání gelu je vyšší než teplota, při níž gel vzniká. Dalším dějem, kterému podléhají gely je synerze, projevující se při stárnutí gelů. Tvorba gelu z agaru nevyžaduje přítomnost neutralizujících kationtů, protože agary patří mezi málo kyselé polysacharidy. Využití agaru při výrobě potravin je tedy při tvorbě termoreverzibilních gelů a využívá se vlastnosti agaru vázat vodu. Použití je tedy do pekařských výrobků, při tvorbě džemů a želé, cukrářských výrobků, mléčných výrobků, masových, rybích a drůbežích výrobků a nápojů. [4]

2.2.3 Algináty

Algináty jsou soli kyseliny alginové a získávají se z hnědých řas čeledi *Phaeophyceae*. Jsou to přirozeně se vyskytující aniontové lineární (nerozvětvené) polysacharidy, jejichž kopolymer je β -D- mannuronová kyselina (M) spojena glykosidovou vazbou (1 \rightarrow 4) s α -L- guluronovou kyselinou (G). V řetězci se střídají různě dlouhé úseky obsahující pouze molekuly M s úseky tvořenými výhradně molekulami G a se smíšenými úseky G-M. Zastoupení a střídání obou komponent je velice variabilní, závisí především na původu alginátu. [4,24]

Rozpustnost alginátu je ovlivňována hodnotou pH, iontovou silou a druhem iontů. Soli s alkalickými kovy, amonnými ionty, soli aminů a hořečnaté soli jsou rozpustné, vápenaté soli jsou nerozpustné. V kyselých roztocích se sráží alginová kyselina. Při pomalém okyselování se místo sraženiny tvoří gel. [4]

Významnou vlastností alginátu je tvorba termostabilních gelů a filmů, které se snadno tvoří přidávkem vápenatých iontů k disperznímu alginátu sodnému. Na vazbě iontů vápníku se nepodílejí pouze elektrostatické síly, ale dochází i k chelataci. Vazebnými zónami jsou sekvence G úseků obsahující alespoň čtyři jednotky guluronové kyseliny. Vytváří se tak struktura zvaná krabice na vejce. V závislosti na obsahu guluronové kyseliny vznikají gely různých vlastností. [4]



Obrázek 4 Chemická struktura alginátu se sodnými ionty [4]

Algináty se používají v koncentraci 0,25-0,5 % jako zahušťovadla, stabilizátory a emulgátory pro zlepšení konzistence např. pečiva, omáček, dresingů, zmrzlin, ovocných džusů a mnoha dalších potravin. Gelotvorných vlastností se využívá k výrobě ovocných a dezertních želé, pudingů a rekonstituovaného ovoce připraveného z ovocné dřevě. S vysokoesterifikovanými pektiny vznikají termoreverzibilní gely. [4]

2.2.4 Želatina

Želatina se získává z živočišné pojivové tkáně kolagenu. Kolagen i želatina mají podobné chemické složení a želatina vznikne denaturací kolagenu. Denaturace se provádí záhřevem kolagenu na teplotu přibližně 90°C, kdy dojde k hydrolyze zahřívání směsi. [30,31]

Vlastnosti želatiny jsou biodegradovatelnost, je nedráždivá nekarcinogenní, netoxická a termoreverzibilní. Díky chemické struktuře, kdy postranní řetězce obsahují velké množství funkčních skupin, je velká variabilita v možnostech různě měnit základní vlastnosti želatiny. Rozlišujeme základní dva typy, želatina typu A a typu B, které se liší funkčními skupinami a rozdílný izoelektrickým bodem. Tyto dva typy se dají lehce kombinovat. Živočišný a lidský kolagen jsou si svou strukturou velmi podobny, takže je pro člověka želatina biokompatibilní. [30,31]

Želatina se používá k výrobě hydrogelů na hojení ran. Pro tuto výrobu má několik výhod. Želatina je bioresorbovatelná, antigenní za fyziologických podmínek a zachovává své fyzikálně-chemické vlastnosti, které mohou být snadno modifikovány. To také poskytuje okamžitou hemostázu a pomáhá předcházet různým deformitám, které jsou spojeny s běžným hojením ran. Dalšími pozitivními biologickými reakcemi jsou usnadňující adheze buněk a proliferace. Na druhé straně, hlavními nevýhodami želatiny, pokud se používá pro

krytí ran, jsou spojeny s jejími špatnými mechanickými vlastnostmi a nízkou tepelnou stabilitou. [29]

2.3 Využití hydrogelových forem v doplňcích stravy

Jednou z lékových forem pro řízené uvolňování léčiva jsou zesíťované lineární polymery. Obecně platí, že množství uvolňování aktivní látky z lineární polymerní matrice je nepřímo úměrné její viskozitě. Méně rozpustné zesíťované polymerní řetězce nejdříve bobtnají a až následně ve vodném prostředí in vivo se rozkládají. Hydrofilní polymery se rozpouštějí několik hodin. [8]

2.3.1 Hydrogely při léčbě obezity

V průmyslových zemích jsou obezita a nadváha druhou nejčastější příčinou úmrtí. V případech, kdy selhávají běžné dietní režimy nebo tělesný pohyb, nepostačuje k výraznému úbytku na váze, využívají se tzv. žaludeční plnidla. [19]

V posledním desetiletí byla věnována pozornost hydrogelům na celulóзовé bázi jako vhodným plnidlům, díky svým bobtnajícím vlastnostem, biologické roztažitelnosti a biokompatibilitě. Hydrogel bobtnající v žaludku dodává pocit nasycení a není tedy nutné využívat například chirurgických zákroků. [19]

2.3.2 Hydrogely jako injekční tekutiny

Hydrogely složené s chytosanu se používají jako nosné struktury pro přenos účinných látek. Tvorba chytosanových gelů není náročná a díky schopnosti postupného uvolňování látky jsou vhodným nosičem. Velká pozornost je upřena na chytosany/glycerol-fosfát. Testují se jako přenosné formy pro insulin, který je rozpuštěn ve vodné fázi gelu. Při rozpouštění hydrogelu a uvolňování insulinu nedochází k porušení struktury insulinu, tudíž se dostává do tkání ve formě, v jaké byl do gelu rozpuštěn. [22]

U léčby Parkinsonovy choroby dochází k mnoha vedlejším účinkům díky podávání běžných ústních lékových forem. Dochází u nich k rychlému odbourávání účinných látek, což může vyvolávat v těle nevhodné účinky. Řešením tohoto problému jsou hydrogely na bázi vlákniny Psyllium. Díky schopnosti postupného uvolňování účinné látky je vhodným nosným médiem. [23]

2.3.3 Ukázka hydrogelových doplňků stravy

Hydrogelových výrobků pro výživu člověka je již dnes široká škála. Jako ukázkou některých druhů jsem vybral několik výrobků.

Technologie přípravy výrobky od firmy Agel je založena na přimíchání vody do guarové a xantanové gumy, kdy se vytvoří nutriční vlákna, která dalším vstřebáním vody vytvářejí gelovou strukturu. Ta neustále expanduje a postupně se v ní začne utvářet nespočetné množství pouzder. Ty potom slouží jako nosiče aktivních prvků do těla. Všechny účinné složky (minerály, vitamíny, aminokyseliny) procházejí procesem hydratace, který jim umožňuje zůstat ve své přirozené, suspendované (rozložené) formě. [13]



Obrázek 5 Ukázka hydrogelových produktů [25]

Dalšími doplňky jsou různé suplementy, využívané při fitness cvičení. U těchto výrobků je například napsáno, že není nutné je zapíjet vodou, nehrozí negativní efekt předávkování jednoduchými cukry, riziko tvorby zubního kazu, v žaludku nezpůsobí hromadění tekutin, takže nezpůsobí žaludeční potíže jako to často je v případě použití „sirupů“ nebo konzervovaných tekutin. [34]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 Příprava hydrogelových doplňků stravy

3.1 Použité přístroje a pomůcky

Magnetická míchačka s ohřevem a regulací teploty (MAG HS 7), magnetická míchadelka, reagenční lahve s uzávěrem a kádinky různých velikostí, flow box (společnosti BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH), Petriho misky, plastové formy na vylévání vzorků, skleněná tyčinka, sušárna (Memmert, Německo), stříčka, pipeta a jiné běžné laboratorní sklo.



Obrázek 6 Magnetická míchačka MAG HS 7

3.2 Použité materiály

- β -glukan - extrakt z hlívy ustříčné - společnost Pleuran s. r. o., Slovenská republika
- Agar 05039 – společnost Fluka, Švýcarsko
- Alginát sodný – společnost Fluka, Švýcarsko
- CaCl_2 - společnost Fluka, Švýcarsko
- Mumio - společnost Monenzyme Co, Ltd, Mongolsko
- *Chlorella kessleri* (ChK) – Akademie věd České republiky, Botanický ústav v Třeboni, Česká republika
- Kyselina askorbová - Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o.
- Vitamin B₆ - Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o.
- Xylitol – společnost Iswari, Česká republika
- ZnCl_2 - Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o.

- ZnSO₄ - Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o.
- Vitamin E – Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o.
- β – karoten - Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o.
- Destilovaná voda

Na výrobu hydrogelů bylo jako nosných struktur využito β-glukanu, agaru a alginátu sodného. V teoretické části byly popsány účinné látky, které byly využity v námi připravených hydrogelech. Jako účinné látky, které vytvářejí pozitivní dopad na výživu člověka, byly použity mumio, chlorella, vitamíny B₆, C a E, β-karoten a zinek. Na redukci kyselosti byl do směsi přidán xylitol

3.2.1 Jednotlivé receptury připravených vzorků

Experimentálně byly vytvořeny receptury hydrogelových doplňků stravy. Polymerní matrice a další aktivní látky byly použity v poměru dle následující tabulky 3.

Tabulka 3 Složení jednotlivých receptur připravených hydrogelů

Látka	Receptura 1	Receptura 2	Receptura 3	Receptura 4	Receptura 5	Receptura 6	Receptura 7	Receptura 8	Receptura 9	Receptura 10 (Nosná struktura)
β-glukan	2,2 g	2,03g	2,03g	2g	4,1 g	2 g	19,6g	7,3g	19,5g	2g
Agar	0,4 g	0,5 g	0,5 g	x	x	x	receptury 10	receptury 10	receptury 10	1g
Alginát sodný	x	x	x	1g	2,11 g	1 g	x	x	x	x
Mumio	x	x	2 g	x	x	x	x	x	0,1131	
Chlorella	4 g	4 g	x	6 g	6 g	4 g	x	x	x	x
Xylitol	4 g	6 g	6 g	6 g	6 g	7 g	x	x	x	x
Kyselina askorbová	4 g	4 g	4 g	6 g	4 g	4 g	0,1124g	1,0698g	x	x
Vitamin E	3 g	3 g	3 g	x	x	x	x	x	x	x
Vitamin B ₆	x	0,03 g	x	0,045 g	0,045 g	0,045 g	x	x	x	x
β-karoten	x	0,12 g	0,12 g	0,18 g	0,18 g	0,18 g	x	x	x	x
ZnCl ₂	x	x	x	x	x	0,2 g	x	x	x	x
Zn SO ₄	x	x	x	x	0,15 g	x	x	x	x	x
H ₂ O	70 ml	75 ml	78,8 ml	85 ml	100 ml	70 ml	x	x	x	100ml

U receptur, kdy bylo využito agaru jako želírující látky, byly použity různé poměry β-glukanu s agarem. Aktivní látky byly nejprve namíchány v množství jednotlivých denních doporučených dávek každé látky. Abychom však mohli testovat vliv technologie na specifické vlastnosti hydrogelů, byly receptury upraveny a připraveny gely vhodné pro připravené testy.

3.3 Příprava hydrogelů

Výše uvedené vzorky hydrogelových tablet byly připraveny smícháním komponent dle jednotlivých receptur.

Ve všech vzorcích je obsažen β -glukan, jehož zgelovatění bylo dosaženo 24 hodinovým mícháním před přidáním dalších složek. Do reagenční lahve s 20 ml vody bylo přidáno určené množství β -glukanu dle receptury. Bylo vloženo magnetické míchadélko a reagenční lahev byla umístěna na magnetickou tepelně vyhřívanou míchačku. Po 24 hodinách byly přidávány a vmíchávány další jednotlivé složky směsi.

3.3.1 Hydrogely obsahující agar

Před přidáváním účinných látek byl do vodní suspenze β -glukanu přidán agar. Reagenční lahev s těmito látkami byla vložena do vodní lázně a za stálého míchání zahřívána na teplotu varu této směsi. Agar je látka, která se při teplotě varu ve vodě rozpustí a potom při zchlazení pod cca 37-40°C má želírující schopnosti a vytváří gel. Před zgelovatěním směsi, byla reagenční lahev vyjmuta z vodní lázně a její obsah zchlazen na 50°C. Během chlazení směsi byly naváženy aktivní látky jednotlivých hydrogelových tablet a po dosažení 50°C přimíchávány do směsi, dříve než zgelovají. Jednotlivé komponenty byly vmíchávány za teploty 50-40°C. Po důkladném promíchání směsi byla takto připravená hydrogelová směs vlévána do jednotlivých plastových lékových forem. Každá forma byla rozdělena na více komor, kdy do každé komory bylo vléváno 5 ml z připravené celkové směsi. Po naplnění všech forem byly vzorky vloženy do ledničky a zchlazeny.

3.3.2 Hydrogely obsahující alginát sodný

Tak jako v případě hydrogelových tablet s agarem tak i s alginátem sodným byla nejprve připravena vodní gelová suspenze β -glukanu a do ní poté vmíchávány alginát sodný a účinné látky. Alginát sodný se však nemusí pro účely gelovatění zahřívát na vyšší teploty. Alginát sodný reaguje za pokojové teploty s volnými ionty Ca^{2+} , se kterými tvoří síťovanou strukturu. Alginát byl tedy vmícháván do směsi β -glukanu s vodou za pokojové teploty a bylo přidáno malé množství 0,83 % Ca Cl_2 . Po vytvoření směsi o vhodné viskozitě byly opět naváženy jednotlivé účinné látky a vmíchány do směsi. Zde byly jednotlivé komponenty vmíchávány za pokojové teploty. Po důkladném promíchání směsi byla takto připravená hydrogelová směs vlévána do jednotlivých připravených forem, kdy

opět jednotlivé komůrky obsahovaly 5 ml směsi. Po naplnění všech forem byly vzorky uloženy do ledničky pro ztuhnutí.

3.3.3 Hodnocení

Byly připraveny hydrogelové tablety různých receptur, kdy bylo využito želírujících schopností agaru, alginátu sodného a β -glukanu. Po použití síťovacího činidla začali jednotlivé směsi tvořit nosnou gelovou strukturu, do které byly vmíseny účinné látky, které vyplňují do jednotlivé póry vytvořené sítě.



Obrázek 7 Ukázka připravených hydrogelových směsí

Pro agarové tablety jsme museli směs zahřívát, aby došlo k rozpuštění a následnému zgelovatění při zchlazení, u alginátu sodného se používá k zesíťování přídavek vápenatých iontů, kdy dojde ke změnám struktury a vytvoří se síť s centrálním atomem vápníku.

U receptury 6 však nastal problém se síťováním struktury. Do směsi byl přidán zinek ve formě $ZnCl_2$. Při sušení hydrogelových tablet jsme zjistili navázání malého množství vody do směsi. Ionty $ZnCl_2$ narušili pevnou strukturu sítě, kdy nám nebyla do sítě navázána voda. Zinek byl poté přidán do směsi ve formě $ZnSO_4$. Tato receptura byla podrobena lyofilizaci a zjištěno navázání většího množství vody do směsi.

Testovali jsme také vhodný poměr nosné struktury β -glukanu s agarem. Zhodnotili jsme nejvhodnější poměr 2 díly β -glukanu a 1 díl agaru. Tento poměr vytvořil požadovanou hustotu hydrogelu. Takto použité složení bylo využito už v práci Jarošové na tvorbu dentálních hydrogelů [36].

Připravené tablety po vlévání a ponechání při pokojové teplotě začali houstnout, po následném zchlazení v ledničce vytvořili požadovaný tvar hydrogelové struktury. Po zchlazení vytvořili tedy nosné struktury vhodné mechanické vlastnosti. Problémem byly

však účinné látky. Mumio a *Chlorella* nám při vmíchávání do receptury tvořili malé shluky, které by se mohli přenést do nevhodné struktury, a zároveň by nedošlo k jejich rovnoměrnému promíchání. Z tohoto důvodu byly mumio i *Chlorella* předem rozmíchány v malém množství vody a poté přidány do směsi. Tato směs byla opět řádně promíchána. Do hydrogelu bylo vyzkoušeno i vmíchání ve vodě nerozpustného vitamínu E. Tato látka však vyvstávala na povrchu tablet a vytvořila mazlavý povrch, nepříjemného slizovitého vzhledu. Z dalších receptur byl tedy vitamin E vyřazen.

V jednotlivých recepturách byl měněn i poměr kyseliny askorbové a xylitolu. Xylitol jako sladidlo redukoval kyselou chuť tvořenou kyselinou askorbovou.

Byly vytvořeny hydrogely o vhodných mechanických vlastnostech, vzhledu a přijatelné chuti. U takto připravených struktur byly následně testovány další vlastnosti.

4 Stanovení skutečného množství vitamínu C v nosné struktuře β -glukanu s agarem pomocí HPLC

4.1 Použitá metoda

Na stanovení množství kyseliny askorbové byla použita metoda HPLC, což je chromatografická metoda založena na rozdílné distribuci látek ve směsi mezi dvěma různými fázemi: mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou), kdy je jako mobilní fáze použita kapalina. U metody HPLC je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku. [38]

HPLC je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární fáze je zakotvená v chromatografické koloně. Během separace dochází k mnoha typům interakcí. Uplatňují se interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází a sorpce analytů na stacionární fází. Separované zóny analytů vycházejí z kolony a jsou zaznamenávány při průchodu detektorem, kdy je signál převeden do formy chromatografického záznamu. Tento záznam je nazýván chromatogram. Grafický záznam je charakteristický křivkami gausovského typu, které se nazývají píky (eluční křivky). [38]

Měřenou veličinou byla absorbance v závislosti odezvy detektoru na čase. Poté bylo z chromatogramu odečtena plocha píku. Kvantitativní analýza se provedla na principu odečtení výsledku z kalibrační křivky.

Kalibrační křivka byla připravena na standart kyseliny askorbové, tak aby zásobní roztok měl výslednou koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Z tohoto zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada a proměřena za stejných podmínek jako jednotlivé vzorky. Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí závislosti plochy píku na koncentraci standardu.

4.2 Použité přístroje a pomůcky

- Běžné laboratorní pomůcky a sklo – kádinky, zkumavky, vialky s uzávěrem a jiné
- Analytické váhy (Adam, AFA – 210 – LC, Schoeller instruments)
- Třepačka s temperovanou vodní lázní (Memmert, Německo)
- Mikrofiltry – nylon 13 mm x 0,45 μm

- HPLC UV/VIS Dionex UltiMate 3000 (obrázek 8)
 - Kolona – Dionex Acclaim C8 5 μ m 2,1x150 mm
 - Mobilní fáze – Směs Metanol, H₃PO₄, H₂O v poměru 99:0,5,0,5 (Lach-ner, ČR)
 - Průtok – 0,8 ml/min
 - Detektor – DAD
 - Vlnová délka – 254 nm
 - Doba měření vzorku – 10 min



Obrázek 8 HPLC Dionex - UltiMate 3000 Standard

4.3 Příprava vzorků

Na stanovení skutečného množství vitamínu C v připravených nosných strukturách byly připraveny receptury z nosné struktury β -glukanu a agaru. Do připravené nosné struktury byla vmíchána kyselina askorbová. Vzorky byly připraveny ze dvou výše uvedených receptur a to z receptury č. 8 a 9.

Byla připravena zásobní směs nosné struktury o receptuře, 100 ml H₂O, 2 g β -glukanu a 1g agaru. Z takto připravené směsi bylo odebráno množství 19,4554 g, do něhož byla vmíchána kyselina askorbová o hmotnosti 0,1124 g. Výsledný hmotnostní podíl kyseliny askorbové byl tedy 0,58 %. Tyto vorky jsou v tabulkách a hodnoceních označeny BGAG11, BGAG12, BGAG21, BGAG22. Jako druhý vzor byla použita stejná zásobní směs s vyšší koncentrací kyseliny askorbové a to s výsledným hmotnostním podílem 12,7 % kyseliny askorbové. Označení těchto vzorků je BGAG31, BGAG32, BGAG41,

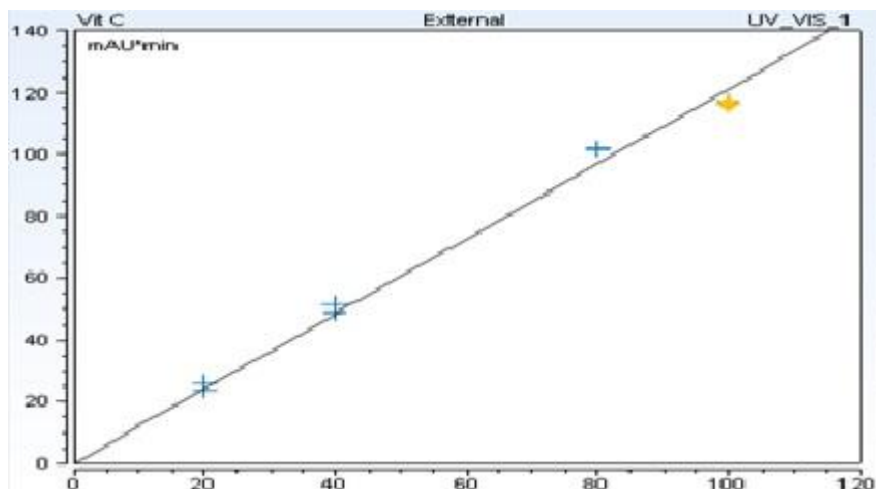
BGAG42. Po navážení jednotlivých vzorků byl přepočítán předpokládaný obsah kyseliny askorbové na jednotky $\mu\text{g/ml}$, které nám udává metoda HPLC. Z každé jednotlivé receptury byly připraveny 2 vzorky.

Po zvážení na analytických vahách s přesností na 0,0001 g byla navážka vzorku smíchána s extrakční směsí, která byla připravena smícháním 79,2 ml metanolu, 0,4 ml H_2O a 0,4 ml H_3PO_4 . Extrakční směs je připravována ve stejném poměru vyjmenovaných látek jako mobilní fáze HPLC. Připravená navážka jednotlivých receptur byla s extrakční směsí 10 minut promíchávána a protřepávána pro dostatečný výluh aktivní látky. Po uplynutí této doby byly připraveny jednotlivé vzorky na měření HPLC.

Každý jednotlivý vzorek byl proměřen dvakrát. U receptury, kdy byl hmotnostní podíl 12,7 % jsme museli daný vzorek zředit v poměru 1:19 s extrakční směsí, neboť hodnoty koncentrace kyseliny askorbové nekolidovaly s hodnotami připravené kalibrační křivky. Hodnoty naměřených vzorků byly vysoké a naměřené píky jsme nemohli zahrnout do výsledků.

4.4 Výsledky měření

Byla naměřeny hodnoty pro dva různé přídatky kyseliny askorbové do připravené nosné struktury. S chromatogramu byly odečteny velikosti píku a pomocí jejich integrace převedeny programem na naměřené množství kyseliny podle předem naměřené kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy na píku ($\text{mAU}\cdot\text{min}^{-1}$) na koncentraci kyseliny askorbové.



Obrázek 9 Připravená kalibrační křivka kyseliny askorbové

Tabulka 4 uvádí navážky vzorků a vypočítané předpokládané množství kyseliny askorbové v $\mu\text{g/ml}$. Předpokládané množství bylo vypočítáno z hmotnostního poměru dané receptury.

Tabulka 4 Navážky vzorků pro stanovení kyseliny askorbové v hydrogelu

Vzorek	Navážka [g]	Předpokládaný obsah kyseliny askorbové ve vzorku [$\mu\text{g/ml}$]
BGAG11	0.1917	111.19
BGAG12		
BGAG21	0.2251	130.56
BGAG22		
BGAG31	0.1086	34.48
BGAG32		
BGAG41	0.0989	31.40
BGAG42		

Naměřené hodnoty kyseliny askorbové v připravených vzorcích bylo porovnáno s předpokládaným množstvím kyseliny askorbové pomocí vztahu:

$$\% = \frac{m_v}{m_p} * 100 \quad (1)$$

m_v výsledné množství kyseliny askorbové (průměrná hodnota ze dvou nástríků jednoho vzorku)

m_p předpokládané množství kyseliny askorbové

% procentuální podíl kyseliny askorbové ve vzorku

Tabulka 5 Skutečné množství kyseliny askorbové v připravených vzorcích

Vzorek	Předpokládaný obsah kyseliny askorbové ve vzorku [$\mu\text{g/ml}$]	Skutečný obsah kyseliny askorbové ve vzorku [$\mu\text{g/ml}$]	Procentuální výtěžnost [%]
BGAG11	111.19	99.68	89.47
BGAG12		99.29	
BGAG21	130.56	108.77	83.09
BGAG22		108.19	
BGAG31	34.48	78.27	223.68
BGAG32		75.98	
BGAG41	31.40	25.37	79.01
BGAG42		24.26	

4.5 Hodnocení a diskuze

Byla použita metoda HPLC ke stanovení skutečného množství vitamínu C námi připravených receptur. Vitamin C je tepelně labilní látka, proto byl hodnocen technologický vliv na vmíchávané množství kyseliny askorbové.

Z hodnocení výsledků byly vyřazeny vzorky BGAG31 a BGAG32 neboť jako výsledné množství kyseliny askorbové vyšlo dvojnásobné množství, než jaké bylo do vzorku vmícháno. Tato rozdílná hodnota je pravděpodobně způsobena špatným ředěním vzorku, které mohlo způsobit tuto velmi odlehlou a nepravděpodobnou hodnotu. Ředění vzorku bylo provedeno 1:19 dílům extrakční směsi. Při prvním měření nám chromatogram ukazoval píky, které neodpovídali píkům zjištěným při měření kalibrační křivky a byly nevhodné pro další zpracování chromatogramu. Ředěním prošli i vzorky BGAG41 a BGAG42. Hodnoty pro toto ředění však odpovídají reálným hodnotám, které zahrnujeme do hodnocení.

Pomocí metody HPLC byl zjištěn vliv technologie na výsledné množství vmíchané kyseliny askorbové u připravených hydrogelových receptur. V porovnání s naváženým množstvím se pohybují výsledné hodnoty kyseliny askorbové sníženy od 10-21 %. Tyto ztráty mohou být způsobeny jak nedostatečným vmícháváním látky do matrice vzorku, tak vlivem teploty nosné struktury při vmíchávání kyseliny askorbové. Kyselina askorbová byla vmíchána při teplotě blízké 50°C, před tuhnutím nosné struktury.

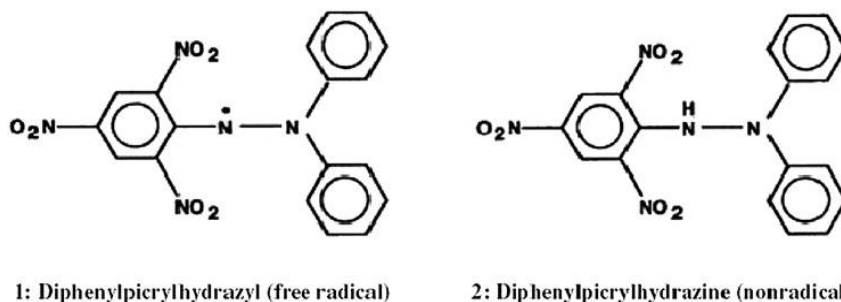
U receptury č. 9, kdy hmotnostní podíl kyseliny askorbové byl 0,58 % celkové hmotnosti receptury, byly zjištěny rozdílné výsledné hodnoty pro dvě různé navážky stejné receptury. Do hydrogelové nosné struktury β -glukanu s agarem byla vmíchána kyselina askorbová v práškové formě, kdy nosná struktura pomalu tuhla. Pravděpodobně tedy docházelo k nedostatečnému rozpouštění a nerovnoměrnému rozmíchávání kyseliny askorbové do struktury. Tato vada by mohla být odstraněna vmícháváním rozpuštěné formy kyseliny askorbové v požadované koncentraci.

Z námi připravené nosné struktury bylo dosaženo vyextrahování 89,47 % a 83,09 % vmíchaného množství kyseliny askorbové. Tato hodnota nejen poukazuje na vliv technologie, ale také může poukazovat na vlastnost nosné struktury, její schopnost vázat kyselinu askorbovou. Ztráty vmíchaného množství kyseliny askorbové mohou být i způsobeny navázáním do vázané vody hydrogelové matrice, která zůstává v dané struktuře zabudována i po rozpouštění.

Pro srovnání jsme vybrali spektrofotometrické stanovení kyseliny askorbové v tabletách Celaskonu. Touto problematikou se zabývá práce Moravcové [35], ve které bylo stanoveno množství vitamínu C v tabletách. V tabletách bylo naměřeno $224,849 \pm 0,0304$ mg kyseliny askorbové. Garantováno je 250 mg daného vitamínu. Výtěžnost těchto tablet je tedy 89,9%. U tablet připravených v této práci, bylo dosaženo vyextrahování nižšího procentuálního množství, než mají tablety Celaskonu. Hodnota u jednoho vzorku hydrogelové tablety se blížila i hodnotě naměřené v práci Moravcové [35].

5 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH

Metoda DPPH je založena na reakci DPPH, který je charakterizován jako stabilní volný radikál, s volným elektronem vodíku. Pokud dojde ke smíchání DPPH se zkoumanou látkou, která může darovat atom vodíku, vede tato reakce ke vzniku redukované formy DPPH a odbarvení fialové barvy. [32]



Obrázek 10 Chemický vzorec DPPH radikálu a jeho redukované formy [39]

K vyjádření antioxidační aktivity se využívají způsoby: rychlost oxidační inhibice, využití referenčního standardu nebo procento použitého činidla. Jako referenčního standardu je využíváno kyseliny askorbové nebo troloxu. [40]

Inhibici radikálu lze vypočítat vztahem

$$I(\%) = \frac{A_{blanc} - A_{sample}}{A_{blanc}} * 100 \quad (2)$$

kde:

Iinhibice radikálu DPPH v %,

A_{blanc} absorbance získaná při slepém pokusu,

A_{sample} absorbance analyzovaného vzorku [34]

5.1 Použité přístroje

Běžné laboratorní vybavení:

- Analytické váhy (Adam, AFA-210 LC)
- Tmavé vialky
- Kádinky, nálevky, odměrné baňky, pipety a jiné

- Mikropipety (Biohit Proline 1 – 100 μl , 100 – 1000 μl)
- Nálevky
- Spektrofotometr Libra S6 (Biochrom)



Obrázek 11 Mikropipeta 100 – 1000 μl

Na měření absorbance byl využit Biochrom Libra S6 spektrofotometr. Na tomto přístroji je možné měřit absorbanci, propustnost, poměr absorbance a další vlastnosti. Tento moderní typ spektrofotometru umožňuje rychlé změření absorpčního spektra v širokém rozsahu vlnových délek. Jako zdroj světla slouží halogenová lampa s wolframovým vláknem, která vydává světlo v celé šíři viditelného spektra. Toto bílé světlo je kolimováno, dopadá kolmo na vzorek, a po průchodu vzorkem je ohybem na optické mřížce rozloženo na monochromatické paprsky. Tyto dopadají na soustavu fotodiód, které měří intenzitu jednotlivých paprsků. Přístroj tedy neobsahuje žádné pohyblivé části, a umožňuje prakticky simultánní měření absorbance pro různé hodnoty vlnových délek. měření bylo provedeno při vlnové délce 515 nm.



Obrázek 12 Biochrom Libra S6 spektrofotometr

5.2 Příprava vzorků

Pro tuto metodu byly vybrány receptury č. 7, 9 a 10 z důvodu, že tyto receptury mají hodnotu antioxidační aktivity jednoduše průkaznou na tuto metodu. Byla proměřena i antioxidační aktivita roztoku mumia. Vzorek byl připraven pouze pro tuto analýzu, smícháním 0,1022g mumia s 10ml H₂O.

Další námi připravené receptury obsahují velké množství aktivních látek. Při zkouškách vhodnosti této metody ukazovaly tyto receptury barevné změny z fialové na žlutou už při vkápnutí vzorku do směsi s DPPH. Tyto receptury by bylo nutné velmi naředit a výsledky by byly neprůkazné. Byly tedy namíchány směsi, které nám prokázali míru antioxidačních vlastností nosné struktury a působení některých antioxidačních látek mezi sebou.

Vzorky byly připraveny navážením přibližně 1 g receptury do 20 ml extrakční směsi. Extrakční směs byla vytvořena smícháním H₂O s metanolem v poměru 70:30 do 1000 ml odměrné baňky. Vzorek s extrakční směsí byl vložen na třepačku, kde byl promícháván 1 hodinu při teplotě lázně 40°C. Po vyextrahování aktivních látek byly vzorky přefiltrovány.

Během filtrace byl připraven zásobní roztok DPPH navážením 0,12 g do 50 ml odměrné baňky. Z tohoto zásobního roztoku byl dále připraven pracovní roztok, kdy bylo odebráno 5 ml zásobního roztoku, které bylo smícháno s 22,5 ml čistého metanolu. Tento pracovní roztok byl vložen na hodinu do tmy a změřena jeho absorbance při vlnové délce 515 nm. Tato hodnota je užívána jako blanc a zapisuje se A₀.

Po filtraci extrahovaných vzorků, bylo z filtrátu odebráno 210μl a smícháno se 4 ml pracovního roztoku. Každá zkumavka byla řádně označena a také vložena na 1 hodinu do tmy. Po hodinové reakci byla proměřena absorbance takto připravených vzorků.

Označení jednotlivých vzorků:

BGAG – nosná struktura, receptura 10

BAKA – nosná struktura s kyselinou askorbovou, receptura 7

BAM – nosná struktura s mumíem, receptura 9

M – vodný roztok mumia

5.3 Postup měření

1. Byl zapnut spektrofotometr černým tlačítkem v pravém dolním rohu ovládacího panelu na spektrofotometru. Poté bylo vyčkáno asi 1 minutu, dokud neskončila sebediagnostika přístroje. (Dokud je přístroj zaneprázdněn diagnostikou či měřením, naskakuje postupně poslední řádek u spodního okraje displeje.)

2. Stiskem tlačítka F2 došlo k přechodu na úvodní obrazovku, která nabízí na výběr:

- Repeat last operation
- Make a measurement
- Set up instrument

Kdykoli během měření se lze na tuto obrazovku vrátit stiskem tlačítka F2.

3. Bylo zvoleno „Make a measurement“ a na další obrazovce zvoleno Scan. Poté tlačítkem F1 zvoleno jako výstup absorbanci (Abs).

4. Do držáku napravo od displeje byla vložena kyveta naplněna metanolem, který byl použit jako referenční vzorek. Poté stisknutím modrého tlačítka označeného „0A/100%T“ bylo spuštěno měření absorbance referenčního vzorku, které bylo automaticky uloženo do paměti.

5. Poté byl vyjmut referenční vzorek a vložena kyveta naplněna pracovním roztokem DPPH. Poté stisknutím zeleného tlačítka bylo spuštěno měření Absorbance a následně odečtena naměřená hodnota, která se zapíše jako hodnota A_{blanc} značena ve vzorci A_0 .

6. Následně byly vkládány postupně kyvety naplněné připravenými vzorky. Odečteny postupně hodnoty jako A_{sample} , které jsou ve vzorci značeny A_1 .

7. Poté byly postupně naměřené hodnoty dosazeny do rovnice a vypočítám úbytek absorbance, který je přímo úměrný antioxidační aktivitě.

8. Poté byly vypočítané hodnoty absorpčního úbytku přepočítány pomocí připravené kalibrační křivky. Která byla proměřena na různé koncentrace kyseliny askorbové.

9. Příprava kalibrační křivky. Pro přípravu sestavení kalibrační křivky pro metodu DPPH byla jako standard použita kyselina askorbová, kdy byla proměřena kalibrační křivka koncentrací 0, 50, 100, 150, 200 mg.l^{-1} kyseliny askorbové a sestaven graf. Z toho grafu

byla, vypočítána rovnice kalibrační křivky a z ní poté vypočítáno množství antioxidačních látek.

5.4 Výsledky měření

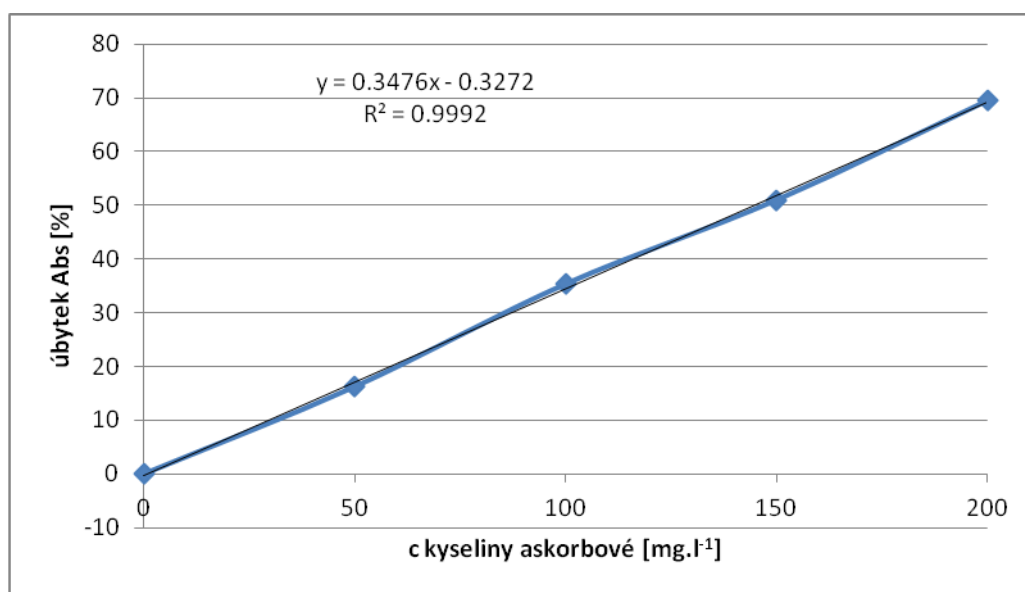
5.4.1 Hodnoty naměřené pro kalibrační křivku

Byly naměřeny hodnoty úbytků absorbance pro připravené koncentrace kyseliny askorbové. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6 Naměřené hodnoty na sestrojení kalibrační křivky

c [mg.l ⁻¹]	0	50	100	150	200
úbytek Abs [%]	0	16.25767	35.37832	51.02249	69.52965

Po sestrojení grafu jsme odčetli rovnici grafu $y = 0,3476x - 0,3272$



Obrázek 13 Kalibrační křivka kyseliny askorbové

5.4.2 Hodnoty naměřené absorbance připravených vzorků

Podle výše uvedeného postupu měření byl změřen antioxidační úbytek vybraných vzorků. Hodnoty absorbance byly měřeny na přístroji Biochrom Libra S6 při vlnové délce 515 nm.

Pro výpočet úbytku absorbance ze vztahu (2) byla naměřena hodnota A_0 pro pracovní roztok DPPH s hodnotou absorbance $1,192 \pm 0,0012$.

Vypočtené hodnoty úbytku absorbance byly dosazeny do rovnice kalibrační křivky a vypočtena antioxidační aktivita připravených vzorků. Do výpočtu byla zahrnuta i navážka

a množství použitého extračního činidla. Naměřené a vypočtené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 Stanovné hodnoty antioxidační aktivity

Vzorek	Navážka (g)	Metanol (ml)	Abs	Úbytek Abs (%)	Antioxidační aktivita (mg.l ⁻¹)	∅ Antioxidační aktivita (mg.l ⁻¹)
BGAG	1.0083	20	1.137	4.61	0.281	0.285 ± 0.002
		20	1.136	4.70	0.286	
		20	1.136	4.70	0.286	
BAM	1.0561	20	1.004	15.77	0.917	0.898 ± 0.0.014
		20	1.009	15.35	0.893	
		20	1.011	15.18	0.884	
BAKA	1.0960	20	0.833	30.12	1.734	1.736 ± 0.002
		20	0.833	30.12	1.734	
		20	0.832	30.20	1.739	
M	1ml vodného roztoku	20	1.113	6.63	0.396	0.399 ± 0.005
		20	1.111	6.80	0.406	
		20	1.113	6.63	0.396	

5.5 Vyhodnocení výsledků

Pomocí naměřených hodnot lze zhodnotit míru antioxidační kapacity připravených receptur. Kyselina askorbová je známá jako vitamin C s antioxidačními účinky, proto byla zvolena do nosné struktury jako aktivní látka. Byla proměřena také receptura s mumiem pro zjištění jeho vlivu na antioxidační aktivitu v recepturách.

Byla naměřena antioxidační aktivita vybraných vzorků. Nejvyšší antioxidační aktivitu měl vzorek obsahující kyselinu askorbovou 1,736±0,005 mg.l⁻¹, nejmenší poté samotná nosná struktura obsahující β-glukan a agar 0,285±0,002 mg.l⁻¹. Při měření antioxidační aktivity byla potvrzena i aktivita nosné struktury, která je hlavně způsobena přítomností β-glukanu, je tedy možné považovat β-glukan jak za nosnou matrici, tak i za účinnou látku. Antioxidační aktivita u látky mumio nebyla přepokládána, byla ovšem naměřena. Byla změřena hodnota samotného extraktu 0,399±0,005 mg.l⁻¹ tak i hodnotu mumia přimíchaného do nosné struktury 0,898±0,014 mg.l⁻¹. Při porovnání antioxidační aktivity samotné nosné struktury, extraktu mumia a nosné struktury společně s mumiem dohromady byla naměřena hodnota u nosné struktury smíchané s mumiem větší než součet samotných komponent. Tak jako v případě metody HPLC je příčinou těchto výsledkových rozdílů nerovnoměrné rozmíchávání aktivních látek ve směsi. Vzorky byly připraveny odlišnou technologií než výše uváděné receptury. Aktivní látky jsou vmíchávány v sušené formě, a tudíž může docházet k nedokonalému rozprostření aktivních látek do celé nosné struktury. Rovnoměrné rozprostření aktivních látek také může být způsobeno různou

velikostí pórů v dané matici, a tedy i množství rozpuštěných látek v dané směsi. Nosná struktura je v další části této práce podrobena skenovací elektronové mikroskopii, která může vyvrátit nebo potvrdit tyto závěry. Řešením nerovnoměrného rozpuštění hydrofilních aktivních látek, také může být vmíchávání látek již předem rozpuštěných ve vodě. Tedy vmíchávání ve formě vodného roztoku.

6 Studium desorpce vybraných vzorků

Desorpce je proces, při kterém dochází k odpoutávání navázaných molekul ze systému. U připravených hydrogelů jsme pomocí sušení pozorovali hmotnostní ztráty vody a v ní rozpuštěných látek.

6.1 Postup měření

Pro zkoumání vlastností jednotlivých hydrogelů při procesu sušení byly vybrány receptury 1,3 a 6. Receptury 1 a 3 s agarem jsou síťovány fyzikálně pomocí tepelného záhřevu, kdy každá z nich má jiné složení aktivních látek. Receptura 6 s alginátem sodným je síťována chemicky. Z každé receptury byly odebrány 3 vzorky, které byly nejprve zváženy před procesem sušení a poté váženy v různých časových intervalech při konstantní teplotě sušení 30°C. Všechny vzorky byly váženy ve formičkách, do kterých byly předem vlévány, aby bylo zamezeno ztrátám vzorku. Časové intervaly byly různé, měření probíhalo od desáté minuty sušení do času 1305 minut od počátku sušení. Intervaly měření byly desetiminutové, dvacetiminutové, čtyřicetiminutové, dle velikosti změny hmotnosti.

6.2 Použité přístroje

K tomuto měření byly použity analytické váhy (Adam, AFA-210 LC), kdy vzorky byly váženy na 4 desetinná místa a sušárna (Memmert, Německo). Naměřené hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Excel.

6.3 Výsledky sušení

Průběh sušení byl dle naměřených hodnot zaznamenán do grafu do grafu. Poté byly porovnány naměřené hodnoty na počátku a na konci měření. Dle vztahu:

$$D(\%) = \frac{m_0 - m_1}{m_0} * 100 \quad (3)$$

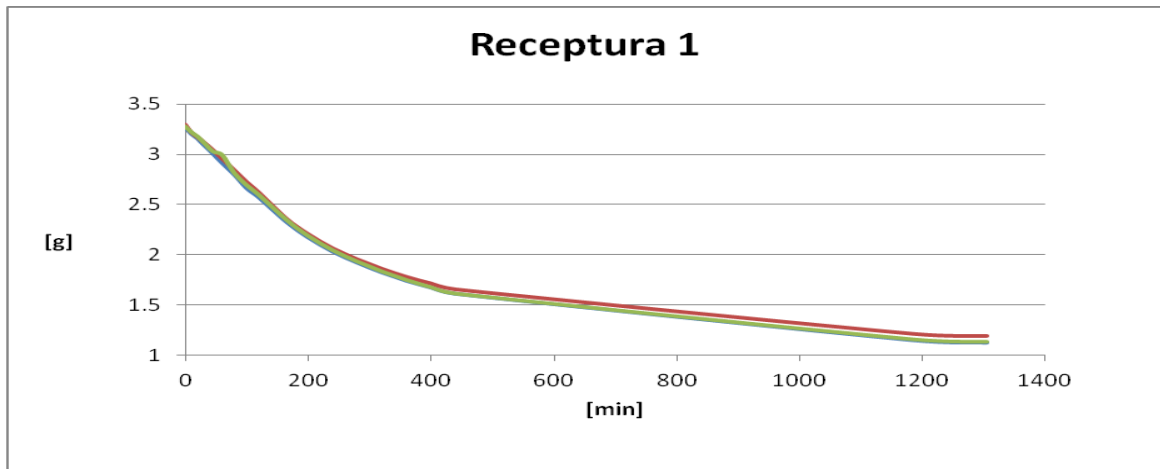
kde:

D (%)..... procentuální množství desorbované vody

m_0 hmotnost vzorku před sušením

m_1 hmotnost vzorku na konci sušení

Pro recepturu 1 byly naměřeny hodnoty, které byly zaneseny do grafu. Průběh sušení byl pro všechny vzorky dané směsi stejný viz. Obrázek 13.



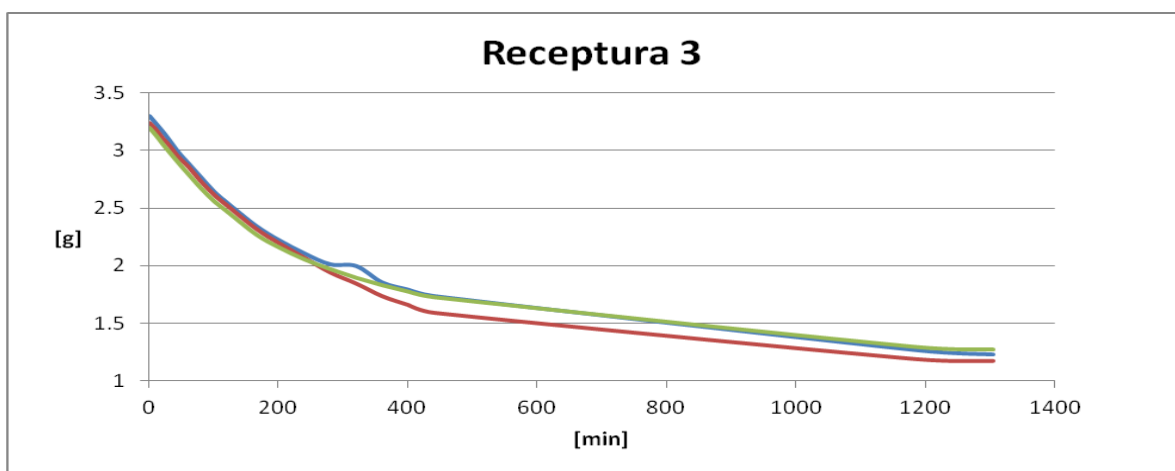
Obrázek 14 Graf sušení hydrogelu namíchaného dle receptury 1

Hodnoty naměřené před a po sušení receptury 1 jsou uvedeny v Tabulce 8

Tabulka 8 Procentuální ztráty vody z receptury 1 sušením

Číslo vzorku	m_0 (g)	m_1 (g)	m_{01} (g)	D (%)	$\bar{\Delta} D$ (%)
1	3.2690	1.1274	2.1416	65.51239	64.8746 ± 0.7778
2	3.2998	1.1952	2.1046	63.77962	
3	3.2762	1.1358	2.1404	65.33179	

Pro recepturu 3 byly naměřeny hodnoty, které byly zaneseny do grafu. Průběh sušení byl pro všechny vzorky dané směsi podobný s mírnými odchylkami dvou měření viz. Obrázek 14.



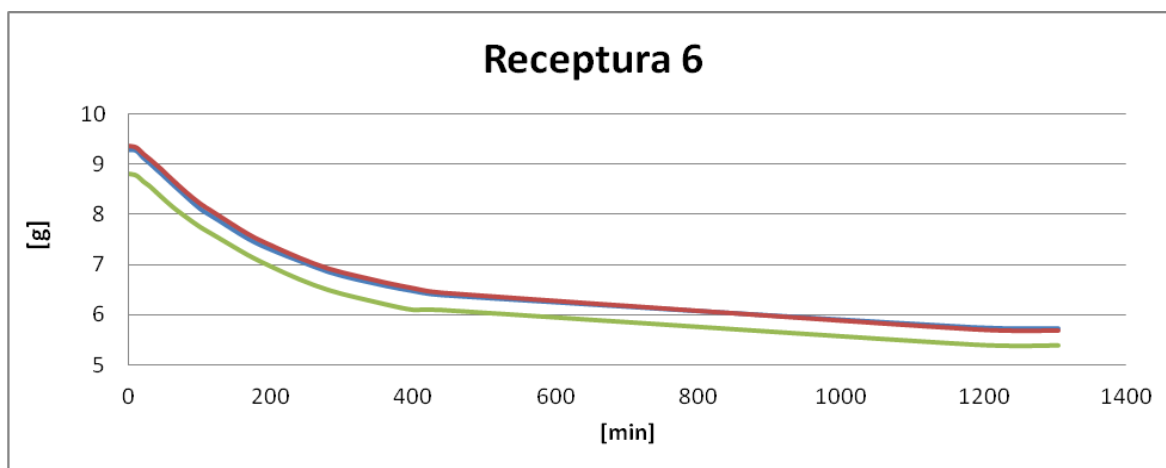
Obrázek 15 Graf sušení hydrogelu namíchaného dle receptury 3

Hodnoty naměřené před a po sušení receptury 3 jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9 Procentuální ztráty vody z receptury 3 sušením

Číslo vzorku	m_0 (g)	m_1 (g)	m_{o1} (g)	D (%)	\emptyset D (%)
1	3.2383	1.2315	2.0068	61.97079	61,5559 ± 1,5609
2	3.1827	1.1704	2.0123	63.22619	
3	3.1370	1.2714	1.8656	59.47083	

Pro recepturu 6 byly naměřeny hodnoty, které byly zaneseny do grafu. Průběh sušení byl pro všechny vzorky dané směsi téměř totožný viz. Obrázek 15.



Obrázek 16 Graf sušení hydrogelu namíchaného dle receptury 6

Hodnoty naměřené před a po sušení receptury 6 jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10 Procentuální ztráty vody z receptury 6 sušením

Číslo vzorku	m_0 (g)	m_1 (g)	m_{o1} (g)	D (%)	\emptyset D (%)
1	9.2810	5.7190	3.5620	38.37948	38.8027 ± 0.3749
2	9.3701	5.6885	3.6816	39.29094	
3	8.8064	5.3950	3.4114	38.73774	

6.4 Hodnocení

Metodou sušení byl porovnán vliv fyzikálního a chemického síťování na množství absorbované vody do hydrogelu. Část vody v receptuře zůstane jako voda volná, která je umístěna v pórech jednotlivých struktur, část vody se naváže do nosné struktury hydrogelu.

Receptury 1 a 3 jsou hydrogely fyzikálně síťované, lišící se skladbou aktivních látek a bylo u nich dosaženo hodnoty desorpce 61 – 65 %. Desorpce vody je ovlivněna skladbou a

koncentrací želírující látky. Vliv na desorpci vody má i složení a koncentrace aktivních látek.

Receptura 6 je hydrogel s chemickým síťováním a hodnota desorpce u tohoto vzorku byla přibližně 39%. Nižší hodnota desorpce než je u předešlých zkoumaných vzorků, je způsobena jinou formou síťování a i velikostí navážky.

Výsledky sušení nám ukazují, že chemicky síťované hydrogely obsahují méně vody, což způsobují husté iontové vazby. Tyto vazby tvoří ucelenější strukturu a menší póry. U receptury 6 však byl již výše zmiňovaný problém s přidavkem zinku ve formě $ZnCl_2$. Měření sušením, nám prokázalo špatnou tvorbu sítě a nedostatečné navázání vody do struktury. Do další receptury byl tedy vmícháván zinek ve formě $ZnSO_4$.

Touto metodou nebylo dosaženo konstantní hmotnosti vzorku, což by bylo možné vyřešit a delší dobou sušení, případně zvýšením teploty sušení. Změnou postupu by bylo možné deaktivovat tepelně labilní aktivní látky hydrogelu. Z těchto důvodů byla zvolena metoda sušení lyofilizací.

6.5 Lyofilizace vybraných receptur

Šetrnější metodou sušení je lyofilizace, která nám desorbuje vodu ze vzorku pomocí sublimace zmrzlé vody při nízkém tlaku a teplotě. Toto má pozitivní vliv i na stabilitu aktivních látek ve směsi.



Obrázek 17 Ukázka různých druhů lyofilizátorů

U této metody byl zvolen podobný postup jako při sušení. Vzorky byly zváženy před sušením v lyofilizátoru a po vysušení. Vzorky byly váženy samostatně bez formiček, ve

kterých byly předtím zgelovatěny. Po zvážení byly vzorky předem předmrazeny v mrazáku na -18°C . Vzorky byly sušeny po dobu 48 hodin, kdy teplota vzorku dosáhla hodnoty -26°C a teplota okolí vzorku byla -51°C . Použitý přístroj byl ALPHA Freeze-Dryer 1-4 LSC (Christ, Germany).

K lyofilizaci byly vybrány vzorky receptur 1, 3 a 6 pro porovnání s výsledky sušení. Jako další recepturu pro měření byl zvolen vzorek receptury 5, aby bylo možné pozorovat vliv na síťování, kdy jsme zaměnili ZnCl_2 za ZnSO_4 . Připravené lyofilizované tablety dále sloužily k pozorování struktury při skenovací elektronové mikroskopii. Receptury byly voleny i z důvodu, aby bylo možné pozorovat vliv způsobu síťování na jednotlivé struktury.



Obrázek 18 Lyofilizované vzorky

6.5.1 Výsledky měření

K lyofilizaci byly použity 4 různé receptury, kdy z každé byly připraveny 3 navážky a dle rovnice (3) vypočítáno množství obsažené vody ve vzorku.

Tabulka 11 Vliv lyofilizace na ztrátu vody v hydrogelech

	m_0 (g)	m_1 (g)	m_{01} (g)	D (%)	\varnothing D (%)	Procentuální množství vody v receptuře (%)
Receptura 1	1.3710	0.3033	1.0677	77.8775	78.4435 ± 0.4967	79.9087
	2.9149	0.6306	2.2843	78.3663		
	3.2869	0.6874	2.5995	79.0867		
Receptura 3	2.4694	0.7573	1.7121	69.3326	69.5637 ± 3.9077	79.2142
	2.8204	0.7203	2.1001	74.4611		
	1.9953	0.7004	1.2949	64.8975		
Receptura 5	4.6539	1.0021	3.6518	78.4675	78.3479 ± 0.1757	79.1631
	4.1736	0.8983	3.2753	78.4766		
	3.7506	0.8214	2.9292	78.0995		
Receptura 6	4.5075	1.0437	3.4638	76.84526	76.3479 ± 0.4306	81.5760
	4.4118	1.0444	3.3674	76.32712		
	4.5883	1.1108	3.4775	75.7906		

6.5.2 Hodnocení

Metoda lyofilizace udává větší hodnoty desorpce než běžné sušení vzduchem. Sušení vzorků vzduchem neprobíhalo do konstantní hmotnosti z důvodu vlivu teploty na aktivní látky, proto námi naměřené hodnoty lyofilizovaných vzorků jsou rozdílné a vyšší.

Tak jako u sušení byl nejnižší podíl desorbované vody naměřen u receptury 6, která byla síťována chemicky a její složení obsahuje látku $ZnCl_2$, která má vliv na schopnost alginátu sodného síťovat strukturu vzorku. V porovnání s recepturou 5, kdy byla v receptuře zaměněna forma zinku, bylo zjištěno, že i některé aktivní látky mají vliv na schopnost alginátu sodného síťovat strukturu matrice. Po změně složení receptury se podařilo odstranit ze vzorku téměř všechna voda.

Z agarových tablet vytvořených dle receptury 1 jsme také odstranili téměř veškerou vodu. U tablet dle receptury 3 byl rozdíl desorpce a množství vody v receptuře přibližně 10 %. Část tohoto rozdílu je způsobena rozpouštěním mumia před vmícháváním do vzorku. Rozdíl je způsoben, také odlišnými navážkami želírujících látek a odlišným složením aktivních látek. Největší vliv na schopnost desorpce a absorpce má síťování struktury a tvorba pórů. Lyofilizované vzorky byly tedy zkoumány pomocí skenovací elektronové mikroskopie.

7 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronový mikroskop pracuje na principu, kdy elektrony dopadají na pozorovaný preparát a interagují s povrchovými částicemi vzorku. Tyto interakce jsou pomocí vhodných detektorů zachyceny a výstupní signál z detektorů je pak interpretován v obraz. Povrch vzorku je postupně skenován po bodech elektronovým paprskem v určitém rastru s danou frekvencí. Výsledný obraz na zobrazovacím zařízení se pak skládá z interpretace signálů z jednotlivých bodů. [16]



Obrázek 19 Skenovací elektronový mikroskop [16]

Mikroskop je propojen s obrazovkou počítače, která zobrazuje snímky získané ze vzorku a kde se mohou porovnávat naměřené výsledky. Tato metoda se zabývá zkoumáním jak nanomateriálů (oxidy železa, povrchy tenkých filmů), tak i různými biologickými vzorky (chrupavky, tkáň, pyl). U této metody se však neměří materiály obsahující vodu. Vzorky se do mikroskopu vkládají po odstranění vody ze systému. V této práci byly použity připravené lyofilizované vzorky.

7.1 Postup měření

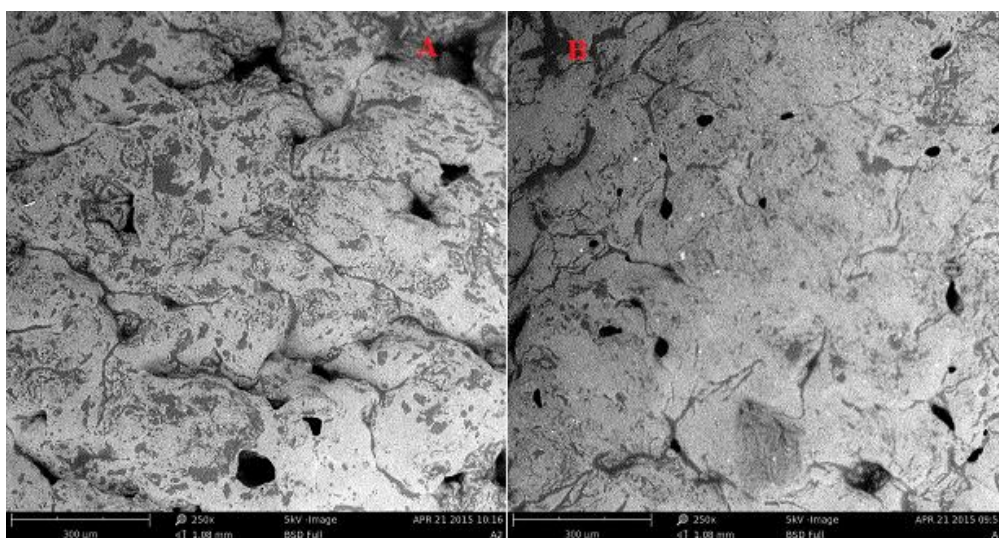
Vzorky pro SEM analýzu byly připraveny odřezáním části lyofilizované tablety a připevněny oboustrannou lepicí páskou na nosné pánvičky. Poté byly pomocí pinzety pánvičky vloženy do nevodivého držáku, který byl vsunut do mikroskopu. Následně byly vzorky analyzovány.

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie lze popsat strukturní vlastnosti připravených hydrogelů. Pro měření byly použity lyofilizované vzorky receptur 1, 3, 5 a 6, vytvořené dle bodu 6.5 této práce. Výše uvedené lyofilizované vzorky byly podrobeny tomuto testování na porovnání předešlých naměřených výsledků a učiněných závěrů. K porovnání byla také

skenována lyofilizovaná nosná struktura β -glukanu s agarem. U každého vzorku byl pozorován povrch a vytvořená síť uvnitř vzorku hydrogelu při různých zvětšeních v rozmezí 100 – 1000x.

7.2 Výsledky a hodnocení

7.2.1 Hydrogely s nosnou strukturou β -glukan – agar

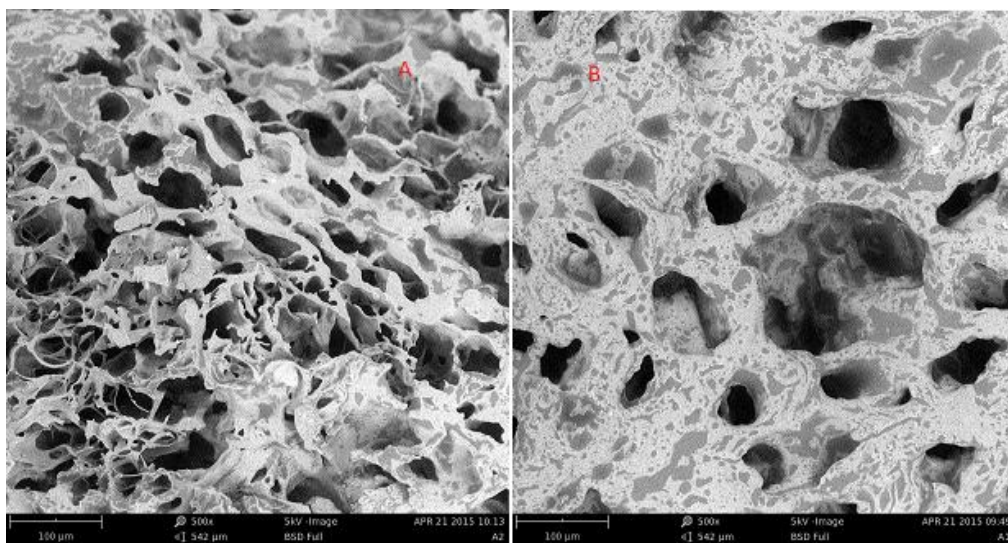


Obrázek 20 SEM 250x zvětšený povrch hydrogelů s agarem a) receptura 1 b) receptura 3

Na obrázku 20 lze pozorovat povrch hydrogelu, kde bylo použito β -glukanu a agaru jako želírující látky. Vzorek byl pozorován při zvětšení 250x. U obou receptur je možno vidět na povrchu malý výskyt pórů, takže povrch vzorků je poměrně celistvý, objevuje se zde mírné vrásnění. U obou vzorků můžeme pozorovat také vnořování tmavých skvrn do povrchu, které jsou pravděpodobně způsobeny aktivními látkami směsi.

Na obrázku 21 je znázorněn řez hydrogelů s přídavkem agaru. Mikroskopické obrázky potvrzují rozdílnost ve struktuře, tak jak jsme mohli pozorovat u výsledků desorpce jednotlivých vzorků. Na obrázku 21 a) lze vidět tenčí síť vzorku, která naabsorbuje vodu a poté je pro ni snadnější ji opět ztratit, kdežto na obrázku 21 b) je silnější síť s menšími póry. Silnější síťování je způsobenou navázáním vody do struktury matrice. Toto síťování poté zadržuje více vody i při vysoušení vzorku. Rozdílnost receptur 1 a 3 je množství použití želírovací látky (v receptuře 3 je vyšší obsah agaru) a obsahem mumia, který byl

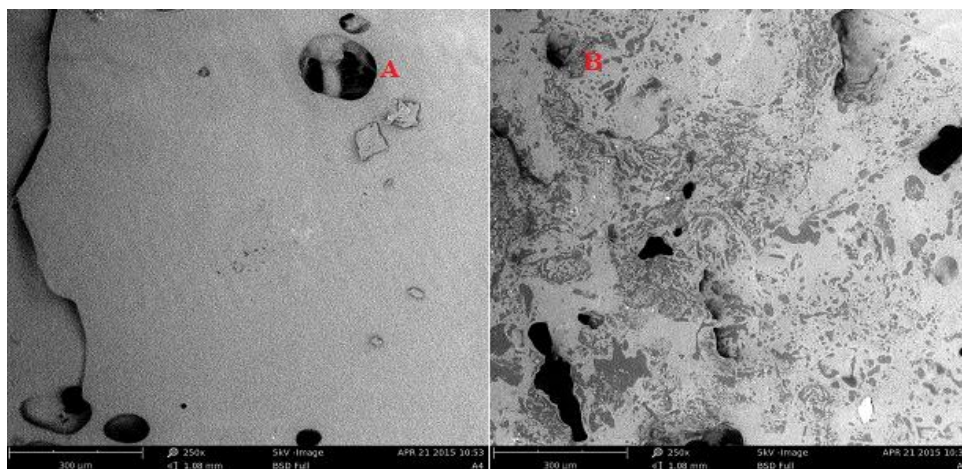
přimíchán do receptury 3. Mumio je látka, která má hygroskopické vlastnosti a do své struktury snadno váže vodu, což je pravděpodobně také důvod rozdílné tvorby sítě.



Obrázek 21 SEM 500x zvětšený řez hydrogelů s agarem a) receptura 1 b) receptura 3

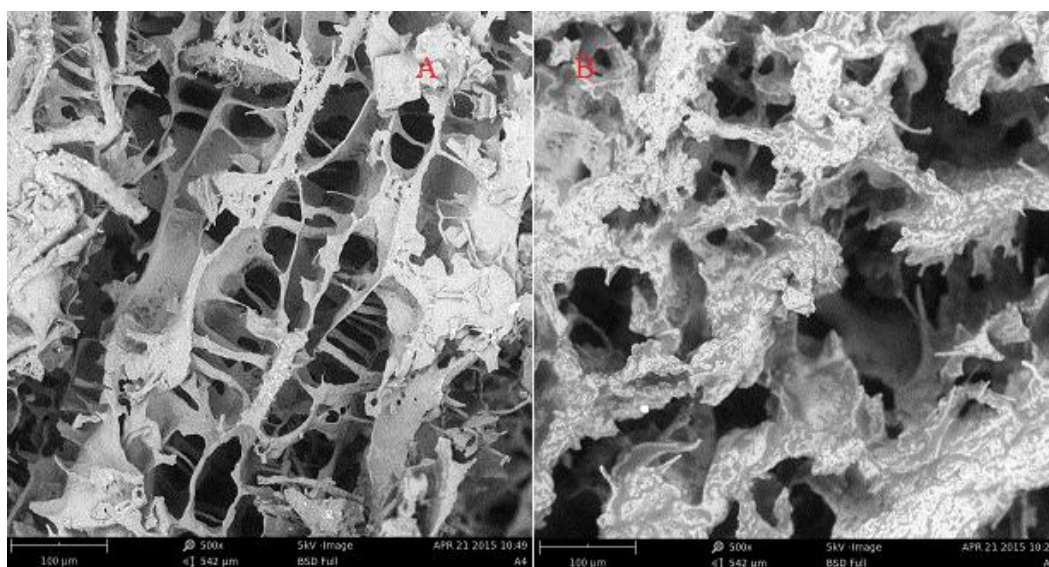
7.2.2 Hydrogely s nosnou strukturou β -glukan – alginát sodný

Obrázek 22 znázorňuje rozdílnost povrchu receptur 5 a 6, které byly připraveny chemickým síťováním. V tomto případě lze pozorovat velké odlišnosti mezi těmito dvěma hydrogely. Obrázek 22 a) ukazuje homogenní strukturu povrchu téměř bez vzniku pórů, ale na obrázku 22 b) lze pozorovat zvrásněný povrch s větším výskytem pórů, který připomíná povrchovou strukturu agarových hydrogelů. Odlišnosti jsou způsobeny přidávkou rozdílných forem zinku do struktury.



Obrázek 22 SEM 250x zvětšený povrch hydrogelů s alginátem sodným a) receptura 5 b) receptura 6

Na obrázku 23 je vidět síťování alginátu sodného s přídavkem CaCl_2 . U obou vzorků bylo využito stejného principu síťování, vzorky se liší skladbou aktivních látek, což způsobuje rozdílnost sítě. U těchto receptur došlo k rozdílné vaznosti vody po přidavku odlišných forem zinku. Na obrázku 23 a) je znázorněn řez hydrogelu s přídavkem ZnSO_4 , kdy je struktura sítě velmi tenká, proto vzorek snadno desorbuje téměř celý obsah vody. Na obrázku 23 b) je hydrogel s přídavkem zinku ve formě ZnCl_2 , který utváří silnější strukturu sítě, ze které se hůře vysušuje voda. U tohoto hydrogelu lze také pozorovat vznik menších pórů, již ve vzniklých větších pórech.



Obrázek 23 SEM 500x zvětšený řez hydrogelů s alginátem sodným a) receptura 5
b) receptura 6

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie bylo možno porovnat povrch a řez jednotlivých struktur. Metodou SEM byl pozorován vzhled síťování a velikost pórů, které ovlivňují hodnoty absorpce a desorpce vody v připravených hydrogelech. Touto analýzou byly potvrzeny námi naměřené hodnoty a jejich vysvětlení v předešlých testech.

8 Termická analýza – Diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC)

8.1 Použité přístroje a nářadí

Skalpel, nůž, pinzeta, analytické váhy, těsnicí lis, nosiče vzorků, Mettler-Toledo DSC 1.



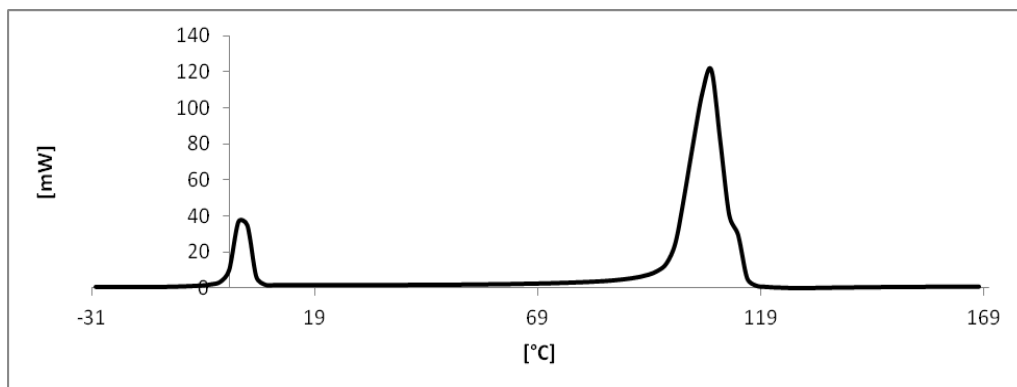
Obrázek 24 Mettler – Toledo DSC 1

8.2 Pracovní postup

Z vybraných vzorků bylo odřezáno a naváženo množství v rozmezí 6,49 mg až 6,82 mg. Vzorky byly naváženy do hliníkových pánviček a zalisovány. Připravené vzorky byly vloženy do automatického karuselového podavače vzorků DSC 1 a bylo provedeno měření pod proudem dusíku. Pro měření byl zvolen teplotní program v rozmezí -30°C až 170°C , kdy rychlost teplotní změny byla 10°C za minutu. Měření bylo provedeno za účelem získání přechodových teplot, jako je teplota tání a teplota skelného přechodu. Teplota tání byla stanovena z maximální hodnoty píku tání.

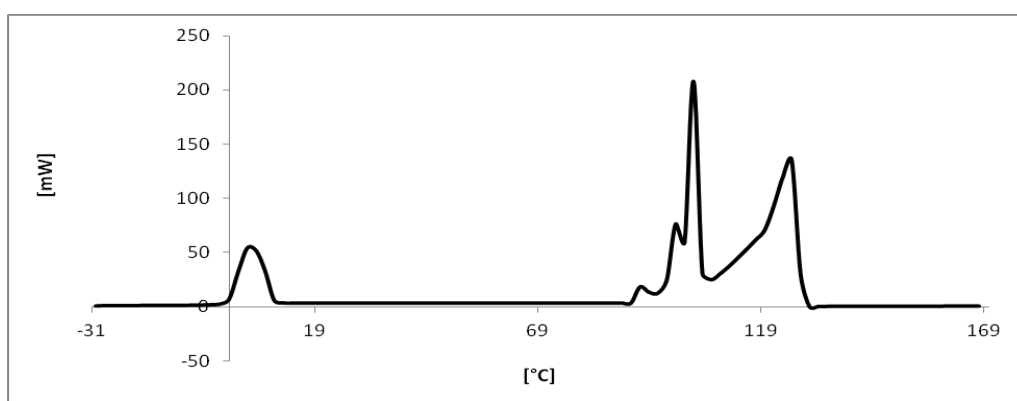
8.3 Výsledky a hodnocení

Na obrázku 25 lze pozorovat vliv teploty na samotný β -glukan. Z grafu byla určena teplota tání, kdy je tato hodnota 108°C .



Obrázek 25 Termická analýza β -glukanu

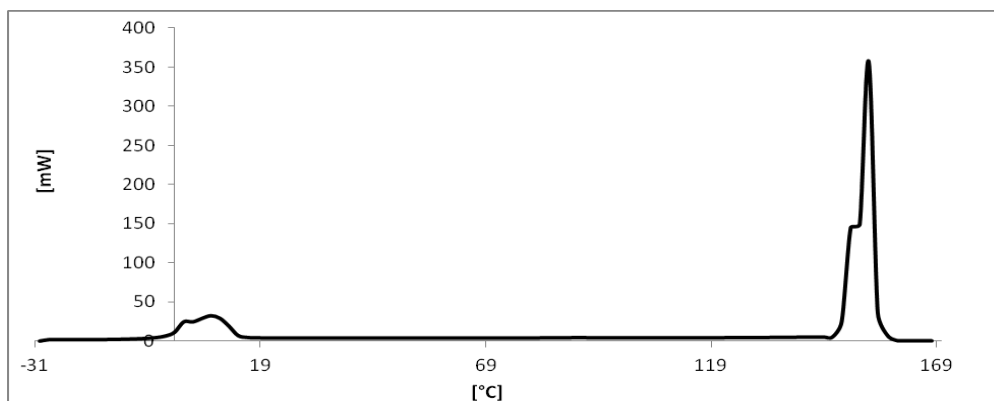
Pro porovnání lze pozorovat na obrázku 26 směs β -glukanu s agarem, kdy jsou vidět dva píky, které nám zobrazují nejprve teplotu tání β -glukanu a poté agaru, který má vyšší teplotu tání. Je patrné, že teplota tání agaru se posunula do vyšší hodnoty, což může být způsobeno zesílením síťování oběma materiály. Celková teplota tání směsi se určí dle druhého píku. Teplota tání nosné matrice je 126°C. Dále je z grafu patrná nemísitelnost polymerní nosné matrice, a to z důvodu přítomnosti teplot tání obou vstupních materiálů. V práci Leones [53] bylo uvedeno, že teplota tání agarových struktur je 130 °C. Připravená struktura v této práci má teplotu tání 126°C. β -glukan a agarem tedy vzájemně ovlivňují teploty tání svých směsí.



Obrázek 26 Termická analýza nosné matrice

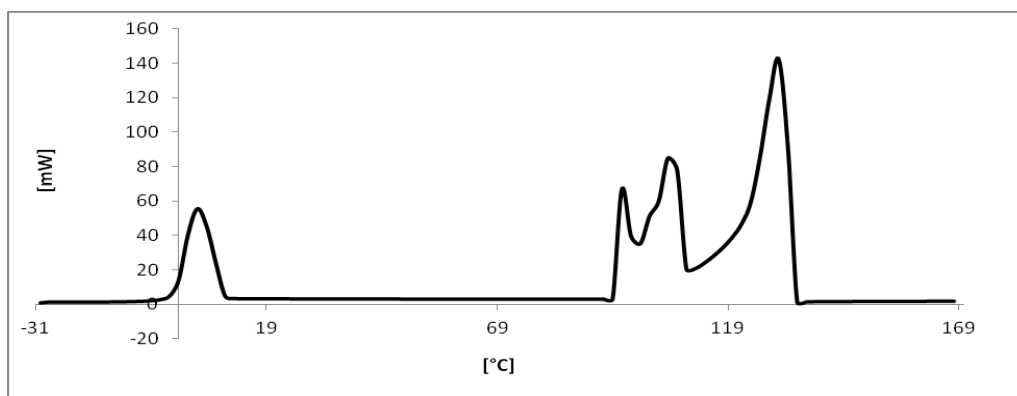
Dalšími zkoumanými vzorky byly nosné struktury obsahující aktivní látky. Jako třetí vzorek byla použita směs nosné struktury β -glukanu s agarem obsahující kyselinu askorbovou. Tuto směs lze pozorovat na obrázku 27, kdy je patrné, že kyselina askorbová

má vliv na strukturu směsi, neboť teplota tání je v tomto případě posunuta až na 154°C. Dle výšky píku lze pozorovat citlivější reakci na rozmezí těchto teplot. Zvýšení teploty tání také znamená zvýšení mechanických vlastností výsledného hydrogelu, což by se ovšem muselo potvrdit dalšími analýzami.



Obrázek 27 Termická analýza nosné struktury s kyselinou askorbovou

Na obrázku 28 lze pozorovat vliv aktivní látky mumia. Tato látka ovlivňuje uvolňování tepla, tak že se nosná struktura taje pomaleji, ve třech nerovnoměrně rychlých fázích. Struktura je méně citlivá na tepelný záhřev. Teplota tání této směsi je 130°C.



Obrázek 28 Termická analýza nosné struktury s mumiem

Pomocí termické analýzy jsme pozorovali vliv zahřívání na strukturu směsi. Teplota tání směsí je nejen ovlivněna nosnou maticí, ale i aktivními látkami uvnitř.

ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byly vytvořeny hydrogelové matricové tablety s možností využití ve výživě člověka jako doplněk stravy. Tato práce navazuje na výzkum gelových a hydrogelových materiálů vytvořených na Centru polymerních systémů a zároveň na ústavu Centrum polymerních materiálů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Na ústavu bylo pod vedením doc. Nabanita Saha, M.Sc., Ph.D. vytvořeno několik patentů a užitných vzorů při tvorbě hydrogelových matic pro různá využití. Jako účinné látky v recepturách bylo využito mumia, které bylo použito v dřívějším výzkumu Ing. Oyunchimeng Zandraa, Ph.D. Vedoucí diplomové práce Ing. Lenka Jelínková, Ph.D. se podílí na výzkumu těchto materiálů. Jako vedoucí bakalářské práce se podílela na práci Bc. Radmily Jarošové [36], u které vznikla myšlenka dalšího využití těchto hydrogelů. Ing. Lenka Jelínková, Ph.D. vytvořila základní receptury hydrogelů, které byly v této diplomové práci připraveny zkoumány. V naší práci jsme se tedy zaměřili na možnost dalšího využití hydrogelů.

Práce byla směřována k výrobě nové nosné struktury pro přenos aktivních látek a zkoumání vybraných vlastností připravených hydrogelů, u kterých bylo využito přírodních materiálů a fyzikálního zesíťování z důvodů lepší biokompatibility při použití ve výživě člověka. Z přírodních materiálů byly použity β -glukan, extrahovaný z hlívy ústřičné, agar, vitaminy a mumio, které se využívá v oblasti Mongolska jako přírodní léčivo. Složení jednotlivých receptur je uvedeno v praktické části této práce.

Hydrogely byly síťovány také chemickou cestou při použití alginátu sodného, pro porovnání vlastností s fyzikálně zesíťovanými gely. Z tohoto porovnání bylo vyhodnoceno, že hydrogely s použitím agaru jako síťovacího činidla mají vhodnější vlastnosti z hlediska lepší desorpce vody, a tvorby sítě, která nám umožní větší využitelnost vmíchávaných aktivních látek. Pro testování využitelnosti byly připraveny hydrogely, které obsahovali v nosné struktuře pouze kyselinu askorbovou, a byla porovnána s využitelností této látky s tabletami Celaskonu. Nosné struktury β -glukanu s agarem měly téměř shodné výsledky jako naměřené hodnoty využitelnosti vitamínu C v Celaskonu.

Další zkoumanou vlastností připravených fyzikálně zesíťovaných hydrogelů byla jejich antioxidační aktivita. U těchto vzorků byl porovnán vliv vmíchávaných účinných látek na celkovou antioxidační aktivitu připravené směsi. Byla porovnána aktivita samostatné nosné struktury polymerní hydrogelové matrice, její směsi s kyselinou askorbovou, její směsi s mumiem a aktivita samotného mumia. Z výsledku lze soudit, že samotná nosná struktura

vykazuje antioxidační aktivitu. Vmíchávané aktivní látky s nosnou maticí se navzájem ovlivňují v rámci své antioxidační aktivity a v rámci této práce byla zaznamenán dokonce jejich synergický účinek.

Vlastnosti hydrogelových polymerních matic a využitelnost aktivních látek úzce souvisí s tvorbou sítě v použitých polymerech. Na popis těchto sítí bylo využito skenovací elektronové mikroskopie, kde jsme potvrdily, že námi naměřené výsledky jsou ovlivněny nosnou strukturou a zároveň rozdílnosti při tvorbě hydrogelů fyzikální nebo chemickou cestou. Velikost pórů ovlivňuje množství navázané vody do struktury, čímž je ovlivněna i využitelnost aktivních látek, které jsou rozpouštěny ve vodě zabudované v těchto maticích.

Metodou DSC analýzy byly zjišťovány teploty tání nosné struktury. Bylo zjištěno, že teplota tání se zvyšuje s přidáním ostatních materiálů do běžného agaru, což je příznivý výsledek i z hlediska potenciálních mechanických vlastností takto připravených hydrogelových tablet.

Z výše uvedených výsledků jsou připravené receptury vhodné pro další testování a zkoumání v oblasti výživových doplňků. Nosné struktury prokázaly vhodné vlastnosti, které mohou při optimalizaci receptur a technologie napomoci k výrobě ekonomicky výhodných a zdravotně prospěšných lékových forem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Potraviny určené pro zvláštní výživu, doplňky stravy a přístup SZPI k jejich kontrole [online]. [cit. 2014-10-14]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1004570&nid=11431&chnum=3>
- [2] SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2002/46/ES [online]. [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: http://www.apic-ak.cz/data_ak/leg/SEPR2002_46ES.pdf
- [3] MACH, Ivan. Doplnky stravy: jaké si vybrat při sportu i v každodenním životě. 1. vyd. Praha: Grada, 2012, 175 s. Fitness, síla, kondice. ISBN 978-802-4743-530.
- [4] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [5] MACH, Ivan. Doplnky stravy. Vyd. 1. Praha: Svoboda Servis, 2004, 157 s. ISBN 80-863-2034-0.
- [6] MAYNARD, Cindy. *Antioxidants*. Current Health 2, a Weekly Reader Publication. 2001, vol. 27, no. 727. ISSN:0163-156X.
- [7] CÚNEO, Florencia, Lúcia COSTA-PAIVA, Aarão Mendes PINTO-NETO, Sirlei Siani MORAIS a Jaime AMAYA-FARFAN. Effect of dietary supplementation with collagen hydrolysates on bone metabolism of postmenopausal women with low mineral density: A review. *Maturitas*. 2010, vol. 65, issue 3, s. 253-257. DOI: 10.1016/j.maturitas.2009.10.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851220900379X>
- [8] HOARE, Todd R; KOHANE, Daniel S. Hydrogels in Drug Delivery: Progress and Challenges. *Polymer*. 2008, vol. 49, no. 8 s. 1993-2007. ISSN:0032-3861.
- [9] SETTACHAIMONGKON, Sarn, Hein J.F. van VALENBERG, Vera WINATA, Xiaoxi WANG, M.J. Robert NOUT, Toon C.M. van HOOIJDONK, Marcel H. ZWIETERING a Eddy J. SMID. *Effect of sublethal preculturing on the survival of probiotics and metabolite formation in set-yoghurt*. *Food Microbiology* [online]. 2015, vol. 49, s. 104-115 [cit. 2015-01-03]. DOI: 10.1016/j.fm.2015.01.011.

- [10] MAUGHAN, Ron J; KING, Doug S; LEA, Trevor. Dietary Supplements. *Journal of Sports Sciences*. 2004, vol. 22, no. 1 s. 95-113. ISSN:0264-0414.
- [11] Ceglie, Cristina De, Cosima D. CALVANO a Carlo G. ZAMBONIN. *MALDI-TOF MS for quality control of high protein content sport supplements*. *Food Chemistry* [online]. 2015, vol. 176, s. 396-402 [cit. 2015-02-05]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.12.038
- [12] HOZA, Ignác, KRAMÁŘOVÁ, Daniela. *Potravinářská biochemie II: pro studenty kombinované formy studia*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. ISBN 978-807-3184-964.
- [13] HOWELL, Edward [z anglického originálu přeložil Zdeněk DUŠEK]. *Enzymová výživa: jak jsou enzymy důležité*. *Hodkovičky* [Praha]: Pragma, 2007. ISBN 80-720-5109-1.
- [14] SAFI, Carl, Bachar ZEBIB, Othmane MERAH, Pierre-Yves PONTALIER a Carlos VACA-GARCIA. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014, vol. 35, s. 265-278. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114002342>.
- [15] WINDMANN, Wolfgang. *Mumio: Černé zlato Himaláje*. 1.vyd. Olomouc: Fontána, 2006. ISBN 807336302X[37] HAVLÍČEK, Petr. *Design elektronového mikroskopu*. Brno, 2011. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [16] HAVLÍČEK, Petr. *Design elektronového mikroskopu*. Brno, 2011. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [17] ZANDRAA, Oyunchimeg; JELÍNKOVÁ, Lenka; ROY, Niladri; SÁHA, Tomáš; KITANO, Takeshi; SAHA, Nabanita. *Viscoelastic Properties and Morphology of Mumio-based Medicated Hydrogels*. *Novel Trends in Rheology IV*. 2011.
- [18] Obrázek Koenzymu Q10 [online]. 2014 [cit. 2014-10-03]. <http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=print&val=88456>

- [19] SANNINO, Alessandro, Marta MADAGHIELE, Christian DEMITRI, Francesca SCALERA, Annaclaudia ESPOSITO, Vincenzo ESPOSITO a Alfonso MAFFEZZOLI. Development and characterization of cellulose-based hydrogels for use as dietary bulking agents. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010-02-05, vol. 115, issue 3, s. 1438-1444.
- [20] VÉGH, Roman. *Farmaceutická technologie*. Vyd. 1. Brno: Computer Press, 2011, 332 s. ISBN 978-80-251-3319-4.
- [21] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research*. 2013, s. -. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>
- [22] KHODAVERDI, Elham, Mohsen TAFAGHODI, Fariba GANJI, Khalil ABNOOS a Hanie NAGHIZADEH. In Vitro Insulin Release from Thermosensitive Chitosan Hydrogel. *AAPS PharmSciTech*. 2012, vol. 13, issue 2, s. 460-466. DOI: 10.1208/s12249-012-9764-9.
- [23] SINGH, Baljit; CHAUHAN, Nirmala. Release Dynamics of Tyrosine from Dietary Fiber Psyllium Based Hydrogels for Use in Parkinson's Disease. *Food Research International*. 2010, vol. 43, no. 4 s. 1065-1072. ISSN:0963-996.
- [24] ANDERSEN, Therese, Jan Egil MELVIK, Olav GÅSERØD, Eben ALSBERG a Bjørn E. CHRISTENSEN. Carbohydrate Polymers: Ionically gelled alginate foams: Physical properties controlled by type, amount and source of gelling ions. 2014, č. 99, s. 249-256. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.036>.
- [25] Hydrogelové doplňky stravy od firmy Agel. [online]. [cit. 2014-12-5]. Dostupné z: <http://www.suspenznigel.com/cs/text/gelova-technologie>.
- [26] HAMIDI, Mehrdad, Amir AZADI a Pedram RAFIEI. Hydrogel nanoparticles in drug delivery: Preparation, characterization, and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, vol. 60, issue 15, s. 1638-1649. DOI: 10.1016/j.addr.2008.08.002. [cit. 2013-11-25] Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X08002275>

- [28] MINDELL, Earl, MUNDISOVÁ, Hester [z anglického originálu přeložil Miloš MÁČEK]. Nová vitaminová bible: vitaminy, minerální látky, antioxidanty, léčivé rostliny, doplňky stravy, léčebné účinky potravin i léky používané v homeopatii. Vyd. 3. Praha: Ikar, 2010. ISBN 978-802-4914-190.
- [29] SAARAI, A., V. KASPARKOVA, T. SEDLACEK a P. SAHA. On the development and characterisation of crosslinked sodium alginate/gelatine hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2013, vol. 18, s. 152-166. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.11.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751616112003220>
- [30] GAREIS, R., SCHRIEBER, H. *Gelatine handbook theory and industrial practice*. Weinheim: Wiley-VCH-Verl, 2007. ISBN 978-352-7315-482.
- [31] MACHOLÁN, L. *Sekundární metabolity*. 2. dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2003, 150 s. ISBN 80-210-3068-2.
- [32] RODAY, Sunetra. *Food science and nutrition*. 2nd ed. New Delhi: Oxford University Press, 2012, xxi, 408 s., [4] s. obr. příl. ISBN 978-0-19-807886-9.
- [33] PILLAI, Omathanu; PANCHAGNULA, Ramesh. Polymers in Drug Delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2001, vol. 5, no. 4 s. 447-451. ISSN:1367-5931.
- [34] Hydrogelové doplňky stravy od firmy Holma. [online]. [cit. 2015-02-23]. Dostupné z: <http://www.hsport.cz/55-gelova-forma-doplнку-stravy.php>.
- [35] STEIN, David B. *Handbook of hydrogels: properties, preparation*. New York: Nova Science Publishers, c2009, xx, 750 p. ISBN 978-160-7417-026.
- [36] HOFFMAN, Allan S. *Hydrogels for Biomedical Applications. Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002, vol. 54, no. 1 s. 3-12. ISSN:0169-409X.
- [37] POLENÍK, P. Xylitol:Clio [online]. 2007. [cit. 2013-02-15]. Dostupné z: <http://www.sladidla.cz/xylitol.html>
- [38] NOVÁKOVÁ, Lucie, DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013, 2 sv. (299, 235 s.). ISBN 978-80-260-4243-3

- [39] SHARMA, Om P; BHAT, Tej K. DPPH Antioxidant Assay Revisited. *Food Chemistry*. 2009, vol. 113, no. 4 s. 1202-1205. ISSN:0308-8146.
- [40] PRAKASH, Aruna, Fred RIGELHOF a Eugene MILLER. Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories* [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: http://www.medlabs.com/downloads/antiox_acti_.pdf
- [41] JEŽKOVÁ, Kateřina et al. Analýza kyseliny L-askorbové v nápojích s využitím techniky MEPS. *Chemické listy* [online]. 2010, 104 [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_13_s17-s19.pdf
- [42] MORAVCOVÁ, Gabriela. *Spektrofotometrické stanovení kyseliny askorbové ve zbarvených vzorcích*. 2013. 31 l. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [43] JAROŠOVÁ, Radmila. *Příprava a charakterizace polymerních gelů pro léčbu zánětů dutiny ústní*. 2013. 88 l. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [44] AIELLO, Anna, Ernesto FATTORUSSO, Marialuisa MENNA, Rocco VITALONE, Heinz C. SCHRÖDER a Werner E. G. MÜLLER. Mumijo Traditional Medicine: Fossil Deposits from Antarctica (Chemical Composition and Beneficial Bioactivity). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2011, vol. 2011, s. 1-8 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1093/ecam/nen072.
- [45] SAHA, Nabanita; SAARAI, Aamarjargal; ROY, Niladri; KITANO, Takeshi; SAHA, Petr. *Polymeric Biomaterial Based Hydrogels for Biomedical Applications*. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2011, vol. 2, no. 1 s. 85-90. ISSN:2158-7027
- [46] MAYNARD, Cindy. *Antioxidants*. *Current Health 2, a Weekly Reader Publication*. 2001, vol. 27, no. 727. ISSN:0163-156X.
- [47] CEGLIE, Cristina De, Cosima D. CALVANO a Carlo G. ZAMBONIN. *MALDI-TOF MS for quality control of high protein content sport supplements*. *Food Chemistry* [online]. 2015, vol. 176, s. 396-402 [cit. 2015-02-05]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.12.038

- [48] UR-REHMAN, Salim, Zarina MUSHTAQ, Tahir ZAHOOR, Amir JAMIL a Mian Anjum MURTAZA. Xylitol: A Review on Bioproduction, Application, Health Benefits, and Related Safety Issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2013, vol. 55, issue 11, s. 1514-1528 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1080/10408398.2012.702288.
- [49] ZEMANOVÁ, J., *Příprava léků*, Vyd. 1, Praha: Nakladatelství: Avicenum, 1987, 400 s, ISBN 0802587
- [50] IMMER, S., *Biomedical hydrogels: biochemistry, manufacture and medical applications*, Oxford: Woodhead Publishing, 2011, 269 s., ISBN 9781845695903.
- [51] PHILLIPS, G. *Handbook of Hydrocolloids*, Vyd. 2., Woodhead Pub, 2009. ISBN 9781845694142.
- [52] Obrázek: Molekulární struktura agaru [online]. 2014 [cit. 2014-10-03]. <http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=print&val=88456><http://www.chemnet.com/cas/cz/9002-18-0/Agar.html>
- [53] LEONES, R. Investigation of polymer electrolyte based on agar and ionic liquids. *Express Polymer Letters* [online]. 2012, vol. 6, issue 12, s. 1007-1016 [cit. 2015-05-04]. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2012.106.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EP a R	Evropská parlament a Rada
mg	miligram
%	procento
DDD	denní doporučené dávka
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
β	beta
α	alfa
γ	gama
°C	stupeň Celsia
D	desorpce
I	inhibice radikálů
A	absorbance
c	koncentrace
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
DSC	diferenční kompenzační kalorimetrie
\emptyset	průměr
μg	mikrogram
m	hmotnost navážky
g	gram
l	litr
ml	mililitr

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Chemická struktura Koenzymu Q ₁₀ [48]	20
Obrázek 2 Chemická struktura β-glukanu[4].....	31
Obrázek 3 Molekulární struktura agaru [52]	32
Obrázek 4 Chemická struktura alginátu se sodnými ionty [4].....	34
Obrázek 5 Ukázka hydrogelových produktů [25].....	36
Obrázek 6 Magnetická míchačka MAG HS 7	38
Obrázek 7 Ukázka připravených hydrogelových směsí	41
Obrázek 8 HPLC Dionex - UltiMate 3000 Standard.....	44
Obrázek 9 Připravená kalibrační křivka kyseliny askorbové	45
Obrázek 10 Chemický vzorec DPPH radikálu a jeho redukované formy [39].....	49
Obrázek 11 Mikropipeta 100 – 1000 µl.....	50
Obrázek 12 Biochrom Libra S6 spektrofotometr	50
Obrázek 13 Kalibrační křivka kyseliny askorbové.....	53
Obrázek 14 Graf sušení hydrogelu namáchaného dle receptury 1	57
Obrázek 15 Graf sušení hydrogelu namáchaného dle receptury 3	57
Obrázek 16 Graf sušení hydrogelu namáchaného dle receptury 6	58
Obrázek 17 Ukázka různých druhů lyofilizátorů.....	59
Obrázek 18 Lyofilizované vzorky	60
Obrázek 19 Skenovací elektronový mikroskop [16]	62
Obrázek 20 SEM 250x zvětšený povrch hydrogelů s agarem a) receptura 1 b) receptura 3	63
Obrázek 21 SEM 500x zvětšený řez hydrogelů s agarem a) receptura 1 b) receptura 3	64
Obrázek 22 SEM 250x zvětšený povrch hydrogelů s alginátem sodným a) receptura 5 b) receptura 6.....	64
Obrázek 23 SEM 500x zvětšený řez hydrogelů s alginátem sodným a) receptura 5.....	65
Obrázek 24Mettler – Toledo DSC 1	66
Obrázek 25 Termická analýza β-glukanu	67
Obrázek 26 Termická analýza nosné matrice	67
Obrázek 27 Termická analýza nosné struktury s kyselinou askorbovou.....	68
Obrázek 28 Termická analýza nosné struktury s mumíem.....	68

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Vybrané nenasycené mastné kyseliny a jejich výskyt [25]	22
Tabulka 2 Různé podněty používané pro spouštění uvolnění léčiva z hydrogelů [33]	28
Tabulka 3 Složení jednotlivých receptur připravených hydrogelů	39
Tabulka 4 Navážky vzorků pro stanovení kyseliny askorbové v hydrogelu	46
Tabulka 5 Skutečné množství kyseliny askorbové v připravených vzorcích	46
Tabulka 6 Naměřené hodnoty na sestrojení kalibrační křivky	53
Tabulka 7 Stanovné hodnoty antioxidační aktivity	54
Tabulka 8 Procentuální ztráty vody z receptury 1 sušením	57
Tabulka 9 Procentuální ztráty vody z receptury 3 sušením	58
Tabulka 10 Procentuální ztráty vody z receptury 6 sušením	58
Tabulka 11 Vliv lyofilizace na ztrátu vody v hydrogelech.....	60

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Název přílohy