

Studium interakce hyaluronanu a přírodních extraktů

Bc. Alica Staníková

Diplomová práce

2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alica Staníková**
Osobní číslo: **T17535**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Studium interakce hyaluronanu a přírodních extraktů**

Zásady pro vypracování:

Vypracujte rešerši na zadané téma.
Charakterizujte dostupnými metodami použité vzorky hyaluronanu.
Studujte jejich interakci se zvolenými přírodními extrakty.
Výsledky vyhodnoťte a zpracujte v přehledné formě diplomové práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. Pilgrova, T; Venerova, T; Mravec, F ; Pekar, M.: Interactions of hyaluronan with oppositely charged surfactants in very diluted solutions in water, INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES Volume: 112 Pages: 241–249 DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.176
2. Hegger, PS; Kupka, J; Minsky, BB; et al.: Charge Matters: Modulating Secondary Interactions in Hyaluronan Hydrogels: CHEMISTRYSELECT, Volume: 2 Issue: 25 Pages: 7701–7705 DOI: 10.1002/slct.201701908
3. Jiang, L ; Titmuss, S ; Klein, J: Interactions of Hyaluronan Layers with Similarly Charged Surfaces: The Effect of Divalent Cations, LANGMUIR Volume: 29 Issue: 39 Pages: 12194–12202 DOI: 10.1021/la401931y

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

2. ledna 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2019

Ve Zlíně dne 12. března 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské 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/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 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/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské 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/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

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 nevydělečně 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 vzdělávacího 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práca sa zaoberá interakciou kyseliny hyalurónovej v troch molekulových hmotnostiach s prírodnými extraktmi, konkrétne s esenciálnymi olejmi Elemi, Geranium a Ylang-ylang. Študuje ich interakcie a popisuje fyzikálne a povrchové vlastnosti týchto látok.

Teoretická časť je zameraná na charakteristiku kyseliny hyalurónovej ako významného polysacharidu ktorý sa nachádza prirodzene v ľudskom a tele a má široké uplatnenie v medicíne, farmácii a kozmetike. Druhá časť je venovaná esenciálnym olejom, ich charakteristike, výrobe a rozdeleniu chemických látok, ktoré sa v nich vyskytujú.

V praktickej časti sa popisujú vybrané metódy stanovenia, príprava skúmaných roztokov a jednotlivé aplikované metódy stanovenia ako sú chromatografická analýza, stanovenie povrchového napätia, viskozity vodivosti, veľkosti častíc a zeta potenciálu.

Kľúčové slova:

Kyselina hyalurónová, molekulová hmotnosť, prírodné extrakty, esenciálne oleje, interakcia

ABSTRACT

The thesis deals with the interaction of hyaluronic acid in three molecular weights with natural extracts, specifically with essential oils elemi, geranium and ylang-ylang. Studies their interactions and describe the physical and surface properties of these substances. . The theoretical part is focused on the characteristic of hyaluronic acid as a significant polysaccharide which is found naturally in human and body and has wide application in medicine, pharmacy and cosmetics. The second part is devoted to essential oils, their characteristics, production and distribution of chemical substances that occur in them. In the practical part are described selected methods of determination, preparation of the investigated solutions and individual applied methods of determination such as chromatographic analysis, determination of surface tension, conductivity viscosity, particle size and zeta potential.

Keywords:

Hyaluronic acid, molecular weight, natural extracts, essential oils, interaction

Touto cestou sa chcem poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce doc. Ing. Mariánovi Lehockému, Ph.D za odborné vedenie, vecné pripomienky a ochotu pomôcť a poradiť kedykoľvek som potrebovala.

Ďalej sa chcem poďakovať Ing. Lucii Pindáčkovej, Ph.D a Ing. Ondřeji Rudolfovi, Ph.D za pomoc pri praktickej časti mojej diplomovej práce.

Veľké ďakujem patrí mojej rodine a manželovi, ktorí mi umožnili venovať sa štúdiu popri materskej dovolenke a podporovali ma aj kde to nebolo vždy jednoduché.

Prácu venujem mojej dcére Agáte a týmto jej prajem, aby dostala príležitosť a vybrala si školu „podľa vlastných schopností“, rovnako ako ja.

„Svet je v rukách tých, čo majú odvahu snívať, dokážu prijať riziko a žiť svoje sny – každý podľa vlastných schopností.“ — Paulo Coelho

Prehlasujem, že odovzdaná diplomová práca a verzia elektronicky nahraná do IS/STAG sú totožné.

Obsah:

ÚVOD	11
I. TEORETICKÁ ČASŤ	12
1 KYSELINA HYALURÓNOVÁ.....	13
1.1 HISTÓRIA OBJAVU A ŠTRUKTÚRY	13
1.2 CHEMICKÁ ŠTRUKTÚRA.....	15
1.3 VLASTNOSTI.....	17
1.4 VÝROBA.....	20
1.5 VYUŽITIE	22
2 PRÍRODNÉ EXTRAKTY	26
3 ESENCIÁLNE OLEJE.....	27
3.1 HISTÓRIA.....	27
3.2 VÝSKYT	27
3.3 CHEMICKÁ ŠTRUKTÚRA A VLASTNOSTI	28
3.4 VÝROBA.....	31
3.4.1 DESTILÁCIA VODNOU PAROU.....	31
3.4.2 HYDRODESTILÁCIA.....	32
3.4.3 MECHANICKÉ LISOVANIE	33
3.4.4 EXTRAKCIE ORGANICKÝMI ROZPÚŠŤADLAMI	33
3.4.5 SATURÁCIA VÔŇOU KVETOV	33
3.4.6 SUPERKRITICKÁ FLUIDNÁ EXTRAKCIA (SFE)	34
3.4.7 MIKROEXTRAKCIA TUHÝCH FÁZ	34
3.5 YLANG YLANG	34
3.6 ELEMI OLEJ	35
3.7 GERANIUM	36
II. PRAKTICKÁ ČASŤ	37
4 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE.....	38
4.1 CHEMIKÁLIE	38
4.2 POMÔCKY A PŘÍSTROJE	38

5	METODIKA	39
5.1	PRÍPRAVA VZORIEK	39
5.1.1	SKLADOVANIE VZORIEK	40
5.2	CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA ESENCIÁLNYCH OLEJOV	40
5.2.1	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA	40
5.2.2	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA S PLAMEŇOVO-IONIZAČNÝM DETEKTOROM	41
5.2.3	CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA ESENCIÁLNYCH OLEJOV	41
5.3	STANOVENIE POVRCHOVÉHO NAPÄTIA	42
5.3.1	MERANIE POVRCHOVÉHO NAPÄTIA	43
5.3.2	WILHEMYHO METÓDA.....	44
5.3.3	STANOVENIE POVRCHOVÉHO NAPÄTIA WILHEMYHO DOŠTIČKOVOU METÓDOU 45	
5.4	STANOVENIE VISKOZITY	46
5.4.1	VISKOZIMETRIA.....	46
5.4.2	ROTAČNÝ VISKOZIMETER	47
5.4.3	STANOVENIE VISKOZITY.....	47
5.5	STANOVENIE VEĽKOSTI ČASTÍC	48
5.5.1	ROZPTYL SVETLA	48
5.5.2	DYNAMICKÝ ROZPTYL SVETLA	48
5.5.3	STANOVENIE VEĽKOSTI ČASTÍC	49
5.6	STANOVENIE ZETA POTENCIÁLU	50
5.6.1	ZETA POTENCIÁL	50
5.6.2	STANOVENIE ZETA POTENCIÁLU	51
5.7	STANOVENIE VODIVOSTI.....	52
6	VÝSLEDKY A DISKUZIA	53
6.1	CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA ESENCIÁLNYCH OLEJOV	53
6.2	CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA ESENCIÁLNEHO OLEJA ELEMI...53	
6.2.2	CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA ESENCIÁLNEHO OLEJA YLANG-YLANG.....	56
6.3	STANOVENIE POVRCHOVÉHO NAPÄTIA.....	57

6.4	STANOVENIE VISKOZITY	58
6.5	STANOVENIE VEĽKOSTI ČASTÍC	62
6.6	STANOVENIE ZETA POTENCIÁLU	63
6.7	STANOVENIE VODIVOSTI.....	66
	ZÁVER	67
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	69
	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	74
	ZOZNAM OBRÁZKOV	75
	ZOZNAM TABULIEK	76

ÚVOD

Kyselina hyalurónová je významný polysacharid, glykosaminoglykán tvorený z opakujúcich sa jednotiek D-glukurónovej kyseliny a N-acetylglukózáminu. Vďaka svojej výnimočnosti je predmetom veľa výskumov. Aplikuje sa medicíne, farmácii a kozmetike. Nachádza sa v ľudskom tele, je hlavnou zložkou extracelulárnej matrix a hrá kľúčovú úlohu v dermis a preto je významná pre jej biokompatibilitu. Ďalšia z vlastností kyseliny hyalurónovej je, že viaže na seba veľké množstvo vody a tým zabezpečuje vysoký hydratačný účinok. Táto vlastnosť zabezpečuje v koži elasticitu a napätie. Pôsobí regeneračne a protizápalovo.

V dnešnej dobe existuje na trhu široké spektrum kozmetických produktov s kyselinou hyalurónovou. V kozmetike sa nachádza väčšinou jej soľ hyaluronan sodný, ktorá môže mať rozličnú molekulovú hmotnosť. Absorpcia hyaluronanu do pokožky závisí na jej molekulovej hmotnosti. Nízkomolekulárny HYA sa dostane najhlbšie cez pokožku zatiaľ čo vysokomolekulový HYA zostáva na povrchu epidermis a má len povrchové hydratačné účinky.

Kombináciou s inými aktívnymi látkami sa ich vlastnosti môžu výrazne meniť. V kozmetike sú taktiež populárne esenciálne oleje, ktoré sú pridávané do kozmetiky predovšetkým pre ich aromaterapeutické vlastnosti. Ďalej sa do kozmetiky pridávajú za účelom parfumácie, konzervácie a niektoré zdroje uvádzajú, že sa lokálne používajú pri rôznych kožných ochoreniach a majú liečivé účinky.

Diplomová práca sa zaoberá interakciou hyaluronanu sodného o troch molekulových hmotnostiach (243 kDa, 600 kDa, 1180 kDa) s esenciálnymi olejmi (Elemi, Geranium, Ylang-ylang) v prítomnosti neionického tenzitu Tween 85. Vo vyhľadaných zdrojoch nebola nájdená adekvátne štúdia o týchto interakciách a preto sa diplomová práca venuje tejto problematike.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 KYSELINA HYALURÓNOVÁ

Kyselina hyalurónová je často považovaná iba za molekulu extracelulárnej matrix. Minulý a súčasný výskum však objavuje stále nové a nové funkcie tejto molekuly ako na bunkovej, tak na orgánovej úrovni. Posledné výskumy ukazujú aj to, že táto molekula má obrovský význam v organizme. Jej všade prítomnosť a účasť na celom rade biologických procesov, ako sú angiogenéza, migrácia a proliferácia rôznych bunkových typov, účasť na zápalových procesoch, procesoch hojenia rán a ďalších, ukazuje na celý rad možností využitia tejto molekuly [1].

1.1 História objavu a štruktúry

História objavu kyseliny hyalurónovej je zaujímavá a významná. V roku 1934 opísal Karl Meyer a jeho asistent, John Palmer, postup izolácie nového glykózaminoglykánu z hovädzieho sklovca. Objavili, že táto látka obsahuje urónovú kyselinu a aminocukor, ale nie sulfoester, ktorý je pre glykosaminoglykán špecifický. Látku nazvali hyaluronová kyselina (angl. Hyaluronic acid) ako spojenie slov hyaloid (sklovitý) a uronic acid (urónová kyselina) [2].

Vo fyziologickom pH dochádza k disociácii karboxylových skupín, a preto by mala byť nazývaná hyaluronát. Dnes je táto makromolekula čoraz častejšie označovaná ako hyaluronan s cieľom zdôrazniť jej polysacharidovú podstatu [2].

Počas 30. a 40. rokov 20. storočia bol hyaluronan izolovaný z mnohých zdrojov, napríklad zo sklovca, synoviálnej tekutiny, pupočnej šnúry, kože, kohútích hrebienkov a tiež zo streptokokov [1].

Kyselina hyalurónová je prirodzene sa vyskytujúci nesulfónovaný glykosaminoglykán, lineárny, nevetvený polysacharid, zložený z opakujúcich sa disacharidových jednotiek (kyseliny D-glukurónovej a N-acetyl-glukozamínu). Napriek jednoduchej primárnej štruktúre, vykazuje rozdielne biologické účinky v závislosti na veľkosti molekuly a jej priestorovom usporiadaní. Telo človeka obsahuje asi 15 g hyalurónovej kyseliny. Kyselina hyalurónová tvorí jednu z hlavných zložiek medzibunkovej hmoty. Je súčasťou spojivových, epitelových a nervových tkanív.

Fyzikálno-chemická charakterizácia hyaluronanu bola vykonávaná v priebehu 50. a 60. rokov 20. storočia. Molekulová hmotnosť je v 10^6 - 10^7 Da. Vlastnosti umožňujú hyaluronanu regulovať vodnú bilanciu, osmotický tlak a odpor proti prúdeniu, interagovať s proteínmi a

tiež pôsobiť ako sito a ako mazivo, ďalej stabilizovať štruktúru na základe elektrostatických interakcií [1].

V roku 1972 Hardingham a Muir objavili, že hyaluronan interaguje aj s chrupavkovými proteoglykánmi. Toto bol prvý príklad špecifickej interakcie medzi hyaluronanom a proteínom, mnoho ďalších takýchto interakcií bolo objavených počas 90. rokov 20. storočia [2].

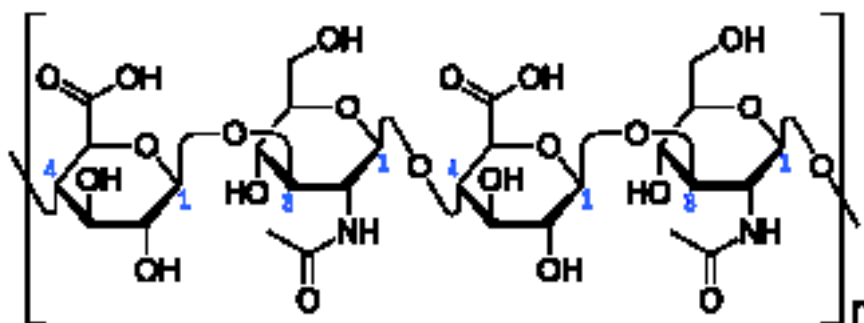
Na rozdiel od väčšiny glykozaminoglykánov, ktoré sú tvorené v Golgiho aparáte, bolo v 80. rokoch 20. storočia preukázané, že hyaluronan sa syntetizuje v plazmatickej membráne. Následne bolo možné merať hyaluronan špecificky v telesných tekutinách s vysokou citlivosťou. V tejto dobe začal Balazs propagovať aplikáciu hyaluronanu pre medicínske účely a vyrábať vysoko viskózne a protizápalové prípravky ako podporu pre očné lekárstvo a ako viskózný doplnok synoviálnej tekutiny u pacientov s osteoartritídou [2].

V 90. rokoch 20. storočia boli intenzívne študované interakcie hyaluronanu s proteínom, ďalej bola naklonovaná hyaluronansyntáza z rôznych zdrojov, každá schopná produkovať hyaluronan s rozdielnou dĺžkou reťazca a v rozdielnom množstve [1].

V poslednom čase sa ukazuje, že hyaluronan pôsobí ako zosilňovač pre aktívne proteínázy. Bolo už dlho známe, že hyaluronan je veľmi citlivý na oxygénne radikály spôsobujúce jeho rozklad. Vznikajúce produkty odbúrania sprostredkovávajú dôležité biologické funkcie. Produkty vznikajúce pri degradácii hyaluronanu, označované ako hyalurónové oligosacharidy, indukujú angiogénu a tiež aktivujú lymfocyty. Radikálna degradácia vytvára reaktívne aldehydy, ktoré modifikujú proteíny do hlavnej základnej antigénnej štruktúry reumatickej artritídy. Tento objav neskôr ukončil dlhé a ťaživé obdobie neznalosti medicínsky významného problému a môže prípadne viesť k úspešnej liečbe týchto chorôb, ktoré sú liečené iba symptomaticky [1].

1.2 Chemická štruktúra

Kyselina hyalurónová je relatívne jednoduchý glykosaminoglykán. Je tvorená jedným dlhým reťazcom z viac ako 25 000 opakujúcich sa disacharidových jednotiek, $\beta(1,3)$ -N-acetylglukóзамín sa strieda s $\beta(1,4)$ -D-glukurónovou kyselinou (glukurónátom), z ktorých každá nesie záporný náboj.



Obr. 1 Štruktúra kyseliny hyalurónovej [3]

Mnoho glykozaminoglykánov okrem kyseliny hyalurónovej, obsahuje ďalšie záporne nabité postranné skupiny, prevažne sulfáty. S výnimkou kyseliny hyalurónovej sa tieto lineárne reťazce kovalentne viažu na proteínové jadro, dávajúc vznik molekule proteoglykánu. Bolo zistené, že v chrupavke sa proteoglykánové molekuly viažu s reťazcami kyseliny hyalurónovej, vytvárajú väčšie štruktúry - proteoglykanové agregáty. Vzhľadom k tomu, že sa na sacharidových častiach väčšiny proteoglykánov nachádzajú vo veľkom množstve hydroxylové, karboxylové, prípadne sulfátové skupiny, sú tieto štruktúry vysoko hydrofilné a správajú sa ako polyanióny.

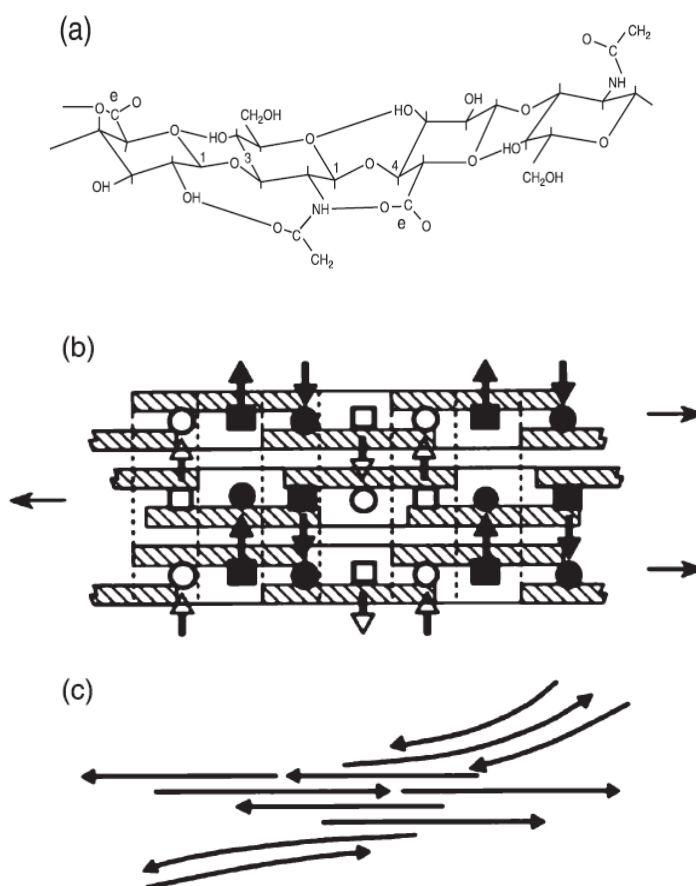
Sacharidová časť v proteoglykánoch prevažuje, tvorí 80 - 90 % hmotnosti tejto molekuly. Vzhľadom k spomínaným vlastnostiam sa proteoglykány môžu prostredníctvom elektrostatického náboja viazať s veľkým množstvom kationov (zvyčajne sodíkových), sú to vysoko hydratované štruktúry s molekulami obklopenými silnou hydratačnou vrstvou vody.

Štruktúra kyseliny hyalurónovej môže byť popísaná pomocou primárnej, sekundárnej a terciárnej štruktúry. Primárna štruktúra sa skladá z opakujúcich sa disacharidových jednotiek D-glukurónovej kyseliny a N-acetyl-D-glukóзамínu s až piatimi vodíkovými väzbami existujúcimi medzi každými dvoma susednými disacharidmi. Sekundárny štruktúra je formo-

vaná ako pásová dvojzávitnica, ktorá je tvorená vzájomne stočenými disacharidovými jednotkami cez uhol 180° . Terciárna štruktúra je stabilizovaná prítomnosťou intramolekulárnych vodíkových väzieb [5].

Niektoré ďalšie zdroje sa tiež zhodujú, že kyselina hyalurónová môže byť popísaná aj z hľadiska vysoko zložitej kvartérnej štruktúry, ktorej vznik je spôsobený superpozíciou elektrostatických repulzov ovplyvňovaných iónovou silou, alebo pH prostredia [5]. Hydrofóbná interakcia vodíkovej väzby v kombinácii s elektrostatickým odpudzovaním umožňujú agregáciu veľkého počtu molekúl a tvorbu molekulovej siete kyseliny hyalurónovej [4].

Obr.2 a) primárna štruktúra kyseliny hyalurónovej,



b) sekundárna štruktúra kyseliny hyalurónovej, c) schematické znázornenie siete molekuly kyseliny hyalurónovej ako výsledok intermolekulárnych interakcií [4]

Enzýmy hyaluronansyntázy syntetizujú veľké lineárne polyméry, tvorené z opakujúcej sa disacharidovej štruktúry hyaluronanu. Táto štruktúra vzniká striedavým pripájaním glukurónovej kyseliny a N-acetylglukozamínu k rastúcemu reťazcu, kde sa využívajú aktivované

nukleotidové cukry (UDP-glukurónová kyselina a UDP-N-acetylglukozamín) ako substráty. Počet opakujúcich sa disacharidov môže v kompletnej molekule dosiahnuť 10 000 a viac, s molekulovou hmotnosťou až 4 milióny Da (každý disacharid cca 400 Da). Priemerná dĺžka disacharidu je 1 nm. A tak má molekula hyaluronanu s 10 000 disacharidmi po natiahnutí od konca ku koncu 10 mikrometrov, táto dĺžka je približne zhodná s priemerom ľudského erytrocytu [6].

Vo vode hyaluronan agreguje, čiastočne pomocou väzieb medzi hydrofóbnymi miestami, a zaberá preferovaný tvar. Sekundárna štruktúra má výnimočné vlastnosti, obe strany sú identické, ale antiparalélne, a čo je možné na jednej strane štruktúry, je tiež možné na druhej. Agregáty môžu rásť z oboch strán. Molekuly hyaluronanu umožňujú ich hromadenie vo vode pomocou špecifických interakcií a vytvárajú sieť - terciárnu štruktúru (Obr. 2).

Vo fyziologickom roztoku je hlavný reťazec molekuly hyaluronanu vystužený kombináciou chemickej štruktúry disacharidov, vnútorných vodíkových mostíkov a interakciami s rozpúšťadlom. Axiálne atómy vodíka tvoria nepolárne, relatívne hydrofóbné väzby, zatiaľ čo ekvatoriálne postranné reťazce tvoria viac polárne, hydrofilné väzby, čím vytvárajú stočenú pásovú štruktúru. Molekula hyaluronanu prevezme vo fyziologickom roztoku rozšírenú štruktúru náhodného kľbka, ktoré zaujíma veľmi rozsiahlu oblasť.

Doménová štruktúra hyaluronanu má zaujímavý a dôležitý význam. Malé molekuly ako voda, elektrolyty a živiny môžu voľne difundovať rozpúšťadlom do domény. Avšak veľké molekuly ako proteíny budú čiastočne vylúčené z domény kvôli ich hydrodynamickej veľkosti v roztoku. Oboje vedie k pomalšej difúzii makromolekúl cez sieť hyaluronanu a na ich nižšiu koncentráciu v sieti v porovnaní s okolitými voľnými časťami hyaluronanu. Zaujímavé je, že reťazce hyaluronanu sa neustále v roztoku pohybujú a efektívne menia veľkosť pórov v sieti. V podstate teda môžu všetky molekuly prechádzať hyaluronovou sieťou, ale s rozdielnym stupňom retardácie. Pri pH 7 sú karboxylové skupiny prevažne ionizované a molekula hyaluronanu sa stáva polyaniónom s priradeným vymeniteľným katiónom k udržaniu nábojovej neutrality [7].

1.3 Vlastnosti

Ako bolo už spomenuté kyselina hyalurónová je dôležitou zložkou medzibunkovej hmoty. Ľudské telo s hmotnosťou 70 kg obsahuje približne 12 - 15 g tejto látky, ktorá je

neustále obnovovaná. Má schopnosť na seba viazať veľké množstvo vody a tak prispievať k optimálnej hydratácii tkaniva [8].

Je prítomná všade tam, kde je potreba medzi vrstvami tkaniva udržiavať vlhkosť a zabráňovať neželanému treniu. Kyselina hyalurónová sa tiež aktívne zúčastňuje imunologických procesov ako signálna molekula a ovplyvňuje mobilitu a adhéziu buniek v rámci ich proliferácie a diferenciácie [8]. Vykazuje aj významné antioxidantné vlastnosti a pôsobí ako lapač voľných radikálov. Kyselina hyalurónová je mimo iného látka často využívaná v kozmetike, pretože tvorí dôležitú zložku pri znovuoobnovení starnúcej a poškodenej pokožky. Má najvyššie známe hydratačné a regeneračné účinky, chráni kožu pred vonkajšími vplyvmi, zabráňuje vzniku strií, znižuje hrúbku rohovej vrstvy, koriguje tvorbu mazu, zastavuje zvýšené padanie vlasov a bráni vzniku jaziev [9]. Má aj mimoriadne kožné lubrikačné vlastnosti, zmäkčuje a vyhladzuje pokožku, pôsobí protizápalovo, tvorí väzby s niektorými toxickými ťažkými kovmi z prostredia ako je olovo, kadmium a funguje ako transportný nosič účinných látok s riadeným uvoľnením [9].

Vo fyziologickom roztoku je správanie molekúl kyseliny hyalurónovej ovplyvnené jednak chemickou štruktúrou disacharidov, vnútornými vodíkovými väzbami a tiež vzájomnými interakciami tohto biopolyméru s rozpúšťadlom, ako sme spomínali vyššie [10].

Molekula kyseliny hyalurónovej obsahuje disociovateľné skupiny $-COOH$. Preto sa vo vodných roztokoch chová ako záporne nabitý polyelektrolyt, čo spôsobuje viazanie kladných iónov o rôznom mocnosťou v blízkosti ionizovaných karboxylových skupín. Jej konformácia, tvar, rozmery i stupeň hydratácie závisí od stupňa disociácie, ktorý je určený pH, iónovou silou a prítomnosťou kladne nabitých iónov [5].

Štúdium uhlovej závislosti rozptylu svetla viedlo k záveru, že molekuly kyseliny hyalurónovej vytvárajú v roztoku štruktúru pripomínajúcu tuhé klobká, ktoré sú schopné zadržať až tisíc násobne viac vody, než činí ich hmotnosť [10].

Hydrofilný charakter hyalurónovej kyseliny uľahčuje jej interakciu s rôznymi tkanivami vnútri a mimo bunky [11]. Ako už bolo uvedené, v roztokoch je polymérny reťazec kyseliny hyalurónovej vo forme náhodne usporiadaného klobka. Jeho správanie však vykazuje od tohto usporiadania isté odchýlky, reťazec makromolekuly HA vykazuje vyšší stupeň tuhosti, spôsobený systémom vodíkových väzieb – vzájomný kontakt medzi reťazcami indukuje vznik ďalšej terciárnej a vyššej stupňovej štruktúry [5].

Molekulová hmotnosť kyseliny hyalurónovej závisí od zdroja, metódy jej izolácie a kvalite čistiaceho procesu použitého pri výrobe [12]. Z absolútnych metód sa na stanovenie molekulovej hmotnosti používajú sedimentácia, rozptyl svetla, osmometria a kombinácia sedimentácie a difúzie [5]. Distribúcia molárnej hmotnosti kyseliny hyalurónovej pripravenej z rôznych zdrojov, bola preskúmaná tiež pomocou gélovej chromatografie na rôznych typoch náplní. Treba podotknúť, že kvalita chromatografickej separácie je významne závislá na pH, iónovej sile, typu soli a rýchlosti toku mobilnej fázy, ktorá je pri chromatografickej separácii použitá [5].

V roztoku sú lineárne polymérne reťazce kyseliny hyalurónovej usporiadané do tvaru kĺbka a už pri nízkych koncentráciách sa navzájom prepletú, čo prispieva k jej neobvyklým reologickým vlastnostiam. Pri vyšších koncentráciách vykazujú roztoky kyseliny hyalurónovej extrémne vysokú závislosť viskozity. Roztok s koncentráciou 1% pripomína gél, avšak pokiaľ naň pôsobíme tlakom, pomerne ľahko sa pohybuje. Z hľadiska reológie sa teda kyselina hyalurónová správa ako pseudoplastický materiál [11].

Dlhodobým zahrievaním roztokov kyseliny hyalurónovej dochádza k znižovaniu jej relatívnej molekulovej hmotnosti. V literatúre [5] sa uvádza niekoľko pozorovaní, ktoré dokázali, že vplyvom degradácie sa pri teplote 128 °C po tridsiatich minútach relatívna molekulová hmotnosť znížila z hodnoty $4,3 \times 10^6$ na 1×10^6 a po 180 minútach dokonca na 1×10^5 . Kinetika tepelnej degradácie tohto biopolyméru v neutrálnom pH prebieha za vyššie uvedených podmienok mechanizmom náhodného štiepenia [5]. Pri zvýšenej teplote 40 - 44 °C v prítomnosti tiolov a prechodných kovov dochádza tiež k degradácii kyseliny hyalurónovej, pretože tieto kovy stimulujú produkciu reaktívnych OH radikálov. K poklesu relatívnej molárnej hmotnosti kyseliny hyalurónovej dochádza aj pri jej oxidácii účinkom kyseliny jodistej. To sa prejaví vo zvýšenej flexibilitě jej polymérneho reťazca a v znižovaní hydrodynamických interakcií v roztoku. Táto oxidácia môže spôsobiť aj roztrhnutie hlavného polymérneho reťazca.

Chemickou degradáciou kyseliny hyalurónovej účinkom dimetyl sulfoxidu a kyseliny chlorovodíkovej je možno pripraviť zmes jej oligosacharidov [5]. U cicavcov prebieha enzymatická degradácia kyseliny hyalurónovej pôsobením troch typov enzýmov: hyaluronidázou, β -D-glukuronidázy a β -N-acetyl-hexosaminidázou, ktoré sa v rôznych formách nachádzajú v ľudskom organizme [10]. Za pomoci hyaluronidázy sa kyselina hyalurónová v organizme odbúrava dvoma cestami, a to: internalizáciou a degradáciou v lyzozómoch buniek - uvoľnením do extracelulárnej matrix a transportom lymfatickými cestami do pečene a obličiek

[8]. Hyaluronidáza ako hlavná zložka intersticiálna bariéry znižuje viskozitu kyseliny hyaluronovej, čím zvyšuje priepustnosť tkanív [10].

Už dlhšiu dobu je stredobodom vedeckého záujmu štúdiom vplyvov rôznych druhov žiarenia na degradáciu kyseliny hyaluronovej, predovšetkým v súvislosti s monitorovaním patologických procesov prebiehajúcich v oku. Štúdiom bolo zistené, že UV žiarenie spôsobuje pokles viskozity roztokov kyseliny hyaluronovej a jeho vplyvom dochádza k trhaniu glykozidickej väzby za súčasného odbúravania vedľajších skupín účinkom reaktívnych radikálových foriem kyslíka. Degradácia terciárnej a kvartérnej štruktúry makromolekuly kyseliny hyaluronovej môže nastať aj účinkom singletového kyslíka O_2 [5]. Vedci taktiež skúmali vplyv fotosenzibilizátorov (metylénová modra, riboflavín) na zmenu štruktúry tkaniva sklovca účinkom viditeľného žiarenia a zistili, že dochádza ku stekúvovateniu jeho gélovej časti [12].

1.4 Výroba

Kyselina hyaluronová sa nachádza v spojivovom tkanive, v synoviálnych tekutinách a v sklovci, odkiaľ je možné ju izolovať [12]. Viacerí odborníci publikovali mnoho spôsobov izolácie kyseliny hyaluronovej. Jedným zo spôsobov izolácie a čistenia kyseliny hyaluronovej na farmaceutické účely je metóda opísaná autormi [12]. Surovina použitá na túto izoláciu, teda pupočná šnúra alebo kohútie hrebienky, sa zmrazia, aby sa rozrušili ich bunkové steny a následne sa rozrežú na malé kúsky. Takto upravená sa extrahuje etanolom s prídavkom cetylpyridinium chloridu, chloroformu a vody. Ďalej sa získaný produkt čistí a upravuje sa jeho pH. Týmto spôsobom je možné získať produkt s 0,5 % obsahom bielkovín s výťažnosťou 0,9 g/kg východiskovej látky. Pre ďalšie zníženie obsahu bielkovín pod 0,1 % je možno kyselinu hyaluronovú čistiť pomocou iónovo výmennej chromatografie [12].

Pre aplikáciu v kozmetickom priemysle je zaujímavá výroba tejto suroviny baktériami *Streptococcus equi*, *Streptococcus zoopidemicus* a *Streptococcus pneumoniae*. Kultivácia sa vykonáva v roztokoch glukózy s obsahom kvasiniek a soli pri 33 °C a pH 8,5 [12]. Pri izolácii kyseliny hyaluronovej z oslabeného kmeňa mikroorganizmu *Streptococcus equi* sa používa proces, ktorý sa skladá z postupných krokov vykonávaných vo vymedzených priestoroch. Základom je dostatočne vykonaná purifikácia vyrobenej kyseliny hyaluronovej a zníženie obsahu bielkovín. Vstupné materiály už nie sú živočíšneho pôvodu a týmto postupom

je zabránené kontaminácii vírusmi či priónmi, čo následne obmedzí alergické reakcie. Naopak nežiaducimi účinkami tejto metódy je prítomnosť bakteriálnych endotoxínov, chondroitín sulfátu, bielkovín, nukleových kyselín a ťažkých kovov [13].

Ďalšou účinnou metódou prípravy kyseliny hyalurónovej je enzymatická syntéza. Enzým hyaluronansyntáza syntetizuje veľké, lineárne polyméry opakujúce sa disacharidové štruktúry danej kyseliny striedavým prídavkom kyseliny glukurónovej a N-acetylglukozamínu na rastúci reťazec pomocou jeho aktivácie cukrami nukleotidov, ktoré slúžia ako substráty reakcie. Počet opakujúcich sa jednotiek disacharidov môže u kompletnej molekuly kyseliny hyalurónovej dosiahnuť až čísla 10000 a viac, s molekulovou hmotnosťou približne $4 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ [10].

Predtým sa na prípravu kyseliny hyalurónovej používali skôr biologické metódy, ale pre ich náročnosť a kvôli možnému riziku kontaminácie konečného výrobku surovinou živočíšneho pôvodu sa od týchto postupov ustúpilo. Počas posledných rokov sa kyselina hyalurónová získava prevažne modernými biotechnologickými procesmi [6].

Výrobcovia kyseliny hyalurónovej pre komerčné účely pochádzajú aj z Európy, napríklad spoločnosť Contipro Group a.s., najväčší dodávateľ kyseliny hyalurónovej pre európsky trh. Existujú ale aj ďalší producenti kyseliny hyalurónovej, napríklad z Číny, Japonska, Indie, Talianska, Francúzska a USA. Medzi súčasných najväčších výrobcov kyseliny hyalurónovej patrí český holding Contipro Group a.s. V roku 1992 uviedla táto spoločnosť na trh kyselinu hyalurónovú v kozmetickom stupni kvality, v roku 1999 farmaceuticky čistú kyselinu a po nej kyselinu hyalurónovú pre potravinárske účely. Údaje z roku 2004 potvrdzujú, že Contipro Group as ovládal dve tretiny európskeho a tretinu svetového trhu s touto komoditou [14].

Pre komerčné účely sa kyselina hyalurónová dodáva vo forme práškovej alebo vo forme 1 % roztoku. V prášku je obsiahnutá v koncentrácii 0,005 - 0,1 % a je používaná predovšetkým v kozmetike [14]. Ďalším významným výrobcom kyseliny hyalurónovej pre dermatológiu, kozmetiku, gynekonológiu a oftalmológiu je spoločnosť IBSA (Institut Biochimique SA) zo Švajčiarska. Stratégia spoločnosti je orientovaná na výskum a vývoj farmakokinetických systémov. Firma vyrába naplnené injekčné striekačky s kyselinou hyalurónovou určené pre estetickú dermatológiu. IBSA svoj výrobný proces založila na dostatočnej purifikácii kyseliny hyalurónovej bakteriálneho pôvodu a zníženie obsahu bielkovín (0,1 %) v konečnom produkte [6].

Možnosti využitia vlastnej technológie výroby kyseliny hyalurónovej jej otvorili cestu do oblasti kozmetiky, rovnako ako liekových injekčných foriem vysokomolekulárnej kyseliny hyalurónovej a očných kvapiek. V roku 1995 firma začala produkciu plet'ových vôd na báze kyseliny hyalurónovej, určených pre pravidelné denné použitie. V tom istom roku bol vyvinutý aj potravinový doplnok na báze včelieho peľu, materskej kašičky a hyaluronanu.

Medzi producentov kyseliny hyalurónovej patrí aj dánska spoločnosť Novozymes Biopharma, ktorá vyvinula novú generáciu tejto kyseliny získavanú kvasením bakteriálneho kmeňa *Bacillus subtilis*. Pri tomto spôsobe výroby nie sú používané žiadne materiály živočíšneho pôvodu ani organické rozpúšťadlá. Výsledný výrobok obsahuje veľmi nízku hladinu proteínov, endotoxínov a navyše je charakterizovaný dobre riadenou a reprodukovateľnou molekulovou hmotnosťou [13].

1.5 Využitie

Vďaka svojim unikátnym vlastnostiam našla kyselina hyalurónová mnoho uplatnení v medicínskych odvetviach: v reumatológii, oftalmológii, diabetológii, farmaceutickej technológii a ďalších oblastiach, napríklad aj pri hojení rán [12].

Jej potenciál ako liečiva je veľký a možnosti ďalšieho využitia pri terapii chorôb sú stále predmetom skúmania [12].

V oftalmológii je kyselina hyalurónová považovaná za kľúčovú makromolekulu, keďže je hlavnou zložkou sklovca. Vzhľadom k jej elastickými vlastnostiam sa využíva v rámci mnohých významných oftalmologických operáciách. Prípravky z nej chránia jemné očné tkanivá (adheruje k očným tkanivám a poskytuje im dostatočnú ochranu v priebehu operácie) a zaisťujú priestor počas chirurgických zákrokov. Produkty hyalurónovej kyseliny v gélovej forme zabraňujú vysychaniu rohovky počas rôznych oftalmologických operácií. Kyselina hyalurónová sa lokálne používa na liečbu syndrómu suchého oka. Aplikácia gélu sa úspešne využíva na prenos liekov v oftalmológii. Gél bráni slzám pred vymývaním lieku a zaisťuje tak jeho uvoľňovanie po dlhú dobu [12].

Jej hlavným využitím je nahradenie tekutiny sklovca, k ktorej strate dochádza pri operáciách zákalu a implantáciách šošovky. V súčasnosti je k dispozícii niekoľko prípravkov obsahujúcich kyselinu hyalurónovú o rôznej molekulovej hmotnosti v kombinácii s ďalšími látkami (chondroitinsulfát), ktoré lepšie spĺňajú požiadavky pre použitie v oftalmológii. Ich úlohou

je chrániť očné tkanivá, predovšetkým rohovkový endotel, pred nežiaducim poškodením operačnými nástrojmi, a znižovať tak riziko možných pooperačných komplikácií.

Druhou hlavnou oblasťou aplikácie kyseliny hyalurónovej je ortopedická chirurgia a reumatológia. Normálny zdravý kĺb umožňuje takmer ideálny a bezbolestný pohyb. Avšak kĺby poškodené a zasiahnuté artritídou sa stávajú stuhnutými a bolestivými. Z viac ako stovky artritických porúch sú osteoartritída a reumatoidná artritída najbežnejšími chronickými stavmi postihujúce najviac staršiu populáciu. Kým osteoartritída je degeneratívne ochorenie chrupavky a kostí, spôsobujúcich bolesť a tuhosť v zasiahnutom kĺbe, reumatoidná artritída ako systémové zápalové ochorenie, u ktorého je bolesť kĺbov často sprevádzaná degeneratívnymi zmenami v ďalších orgánoch (ako sú pľúca, srdce, krvné cievy). Odhaduje sa, že viac ako 10 % všetkých ľudí vo veku nad 55 rokov je postihnutých osteoartritídou [12].

Hoci sú pôvod a príčiny reumatoidnej artritídy doposiaľ neznáme, môže byť pri tejto chorobe pozorovaná postupná degradácia polymérnych sacharidov (predovšetkým kyseliny hyalurónovej) v synoviálnej tekutine. V akútnej fáze sa hromadí v synoviálnej tekutine vysoké množstvo neutrofilných granulocytov. Tieto bunky menia oxidačnú homeostázu a ich produkty, najmä reaktívne oxygenne zlúčeniny, môžu prispievať k deštrukcii kĺbovej štruktúry. V dôsledku chronického zápalu kĺbu menia reaktívne oxygenne zlúčeniny štruktúru kĺbu do takej miery, že nie je ďalej funkčný. Pozmenené tkanivá sú rozpoznané ako cudzie, autoimunitné reakcie následne podporujú chorobu a vytvárajú z reumatoidnej artritídy systémové ochorenie ovplyvňujúce celé telo [12].

Od konca 80. rokov 20. storočia je intraartikulárna aplikácie kyseliny hyalurónovej úspešne používaná u miliónov osteoartristických pacientov. Greenberg a kolektív navrhli štyri mechanizmy, ktorými kyselina hyalurónová uplatňuje svoj terapeutický účinok [12].

- obnovenie elastických a viskózných vlastností synoviálnej tekutiny,
- biosyntetický stimulačný vplyv exogénnej kyseliny hyalurónovej na bunky - kyselina môže indukovať endogénnu syntézu hyaluronanu synoviálnymi bunkami, stimulovať proliferáciu chondrocytov a inhibovať degradáciu chrupavky,
- protizápalový účinok kyseliny hyalurónovej kedy terapia je spojená so zníženým počtom zápalových buniek v synoviálnej tekutine a s redukciou reaktívnych oxygených zlúčenín,
- pozorované analgetické účinky pri podaní kyseliny hyalurónovej.

Zdá sa, že odpoveď postihnutého kĺbu na terapiu kyselinou hyalurónovou je obdobná ako odpoveď na terapiu kortikosteroidmi. Nevýhodou stále zostáva spôsob aplikácie pre účinnú liečbu. Intraartikulárna injekcia nie je prijateľným riešením pre všetkých pacientov. Je však zrejmé, že celkové nežiaduce účinky vyvolané kyselinou hyalurónovou sú a budú podstatne nižšie ako tie vyvolané podávaním kortikosteroidov [12].

Hoci je kyselina hyalurónová v ľudskom tele prakticky všadeprítomná, najviac sa vyskytuje v špecializovaných tkanivách, ako sú hlasivky, synoviálna tekutina, pupočná šnúra a chrupavka. V týchto tkanivách ovplyvňuje niekoľko rôznych funkcií zahŕňajúcich viskozitu tkanív, tkanivový tok, tkanivovú osmózu, tlmenie nárazov, hojenie rán a vyplňanie priestoru. Tieto funkcie sú obzvlášť dôležité v hlasivkách v dôsledku konštantnej traumy spôsobenej vibračným účinkom fonácie [12].

Osmotické, viskoelastické a vyplňovacie vlastnosti hyaluronanu sú dôležité pre hlas, pretože priamo ovplyvňujú hrúbku a viskozitu hlasiviek. Vyplnenie a zväčšenie tkanivových priestorov v hlasivkách, zlepšenie poranených či zjazvených hlasiviek a liečba paralýzy hlasiviek sú ďalšie možné využitia derivátov kyseliny hyalurónovej. Avšak hlavnou tienistou stránkou pre jej využitie ako bioimplantátu slizničného väziva pre liečbu hlasivkových porúch je jej krátka doba zadržania v hlasivkách - jej polčas rozpadu v králičích hlasivkách je len 3 - 5 dní. Za účelom zvýšenia doby zadržania sa jej molekulová štruktúra modifikuje. Zosieťovaná kyselina hyalurónová vpichovaná do hlasiviek produkuje nezápalové reakcie a materiál je prítomný ešte po roku [12].

Pri poruchách sluchu sú používané na terapiu filmy pripravené z esterov kyseliny hyalurónovej. Tieto prípravky podporujú hojenie poraneného ušného bubienka a uľahčujú reepitalizáciu [12].

Výhodné je použitie kyseliny hyalurónovej v kozmetike a kozmetickej chirurgii. Ako fyziologická komponenta tkanív nemá veľké nežiaduce účinky a zhoda v chemickom zložení kyseliny hyalurónovej produkovanej streptokokmi s ľudskou umožňuje jej aplikáciu bez predchádzajúceho testovania bezpečnosti na zvieratách.

Používanie hyaluronanu a jeho derivátov je prínosom pre povrch pokožky v dôsledku jeho hydratačných, antioxidantných a protizápalových účinkov. Ďalej spomaľuje starnutie pokožky, obnovuje epidermis a podporuje epidermálnu integritu. Všetky účinky závisia na molekulovej hmotnosti a koncentrácii hyaluronanu v konečnom preparáte ošetrojúceho pokožku. Odporúča sa kombinácia hyaluronanu o veľmi nízkej a veľmi vysokej molekulovej

hmotnosti. Nízkomolekulární hyaluronan je schopný penetrovat' stvrdnutou vrstvou kože a vytvárat' spojenie medzi endogénnym hyaluronanom v hlbších vrstvách epitelu a exogénnym hyaluronanom pokrývajúcim kožu. Toto spojenie uľahčuje priechod vody a malých molekúl z povrchu pokožky do podkožnej intracelulárnej matrix a späť [12].

Prípravky s kyselinou hyalurónovou sú v súčasnej dobe obvykle používané na zväčšenie pier a k vyplneniu tvárových vrások, jaziev po akné a hlbších. Kyselina hyalurónová sa aplikuje ako dermálna injekcia len s použitím anestetického gélu aplikovaného pred zákrokom. Gély sú oproti produktom na báze kolagénu účinnejšie v udržiavaní kozmetických úprav. Na rozdiel od aplikácie kolagénových produktov je kyselina hyalurónová extrémne elastická. U kolagénových prostriedkov sa ďalej vyskytujú malé (ale aj skutočné) problémy a alergia je jednou z najvážnejších komplikácií [12].

Prípravky obsahujúce vysokomolekulárnu kyselinu hyalurónovú aplikované lokálne podporujú hojenie čerstvých rán. Tiež podporujú hojenie vredov predkolenia a sú účinné pri liečbe chronických zranení. Kyselina hyalurónová má pri hojení rán rôzneho pôvodu mnoho účinkov, a to pri všetkých fázach hojenia rany: zápalu, formácii granulačného tkaniva a reepitalizácii [12].

2 PRÍRODNÉ EXTRAKTY

Rastlinné extrakty patria medzi najdlhšie používané liečivé formy v histórii. Pripravovali sa pôvodne z tradičných postupov, ktoré boli súčasťou ľudových receptárov. S rozvojom priemyslu sa produkcia extraktov stala súčasťou industriálnej výroby.

Extrakty sa získavajú extrakčnými metódami z rastlinných drog alebo zo živočíšneho materiálu. Droga je konzervovaná, upravená alebo neupravená rastlina, jej časť, prípadne produkt, ktorý je použitý na výrobu liečiv, technicky dôležitých látok alebo je priamo použitý k liečivým, technickým alebo iným účelom. Samotnej výrobe extraktov obvykle predchádza úprava materiálu, napríklad odtučnenie alebo inaktivácia enzýmov. Medzi najpoužívanejšie extrahovadlá patrí voda, etanol, propylénglykol, glycerol a iné [15].

Extrakty získané extrakciou rozpúšťadlom s rôznymi organickými rozpúšťadlami, kvapalným oxidom uhličitým alebo extrakciou superkritickou tekutinou (SFE) nemožno považovať za skutočné esenciálne oleje. Majú však aromatické profily, ktoré sú takmer identické so surovinou, z ktorej boli extrahované. Preto sa často používajú v aróme a voňavkárstve a navyše v potravinárskom priemysle, ak sú vybrané rozpúšťadlá prijateľné pre potraviny a nezanechávajú žiadne škodlivé zvyšky v potravinárskych výrobkoch [16].

3 ESENCIÁLNE OLEJE

3.1 História

Esenciálne oleje sa prvýkrát vyrobili metódou destilácie v Egypte, Indii a Perzii viac ako 2000 rokov pred našim letopočtom. Túto metódu vylepšili v 9. storočí Arabi. Použitie olejov sa v Európe rozšírilo až v 16. storočí. V 17. storočí bola príprava esenciálnych olejov dobre známa a lekárne boli zásobené 15 - 20 rôznymi olejmi [17].

M.J. Dumas bol francúzsky chemik, ktorý prvýkrát systematicky skúmal jednotlivé zložky esenciálnych olejov - analyzoval v nich určité uhľovodíky, zlúčeniny kyslíka, tiež zložky obsahujúce síru a dusík. Svoje výsledky zverejnil v r. 1883. Najdôležitejšie výskumy však vykonal nemecký chemik Otto Wallach. Zistil, že niekoľko terpénov má rôzny názov (často v závislosti na ich rastlinnom zdroji), ale v skutočnosti sú chemicky identické. So svojimi spolupracovníkmi frakčnou destiláciou oddelil jednotlivé esenciálne oleje a reakciou s anorganickými činidlami (napr. s kyselinou chlorovodíkovou) získal jednotlivé frakcie. V roku 1891 charakterizoval terpény limonén, pinén, kamfén, dipentén, fellandren, terpinolen, fenchen a sylvestren. Od roku 1893 sa venoval štruktúre a vlastnostiam cyklických terpénov nemecký chemik A. von Baeyer. Novším výskumom sa venovali J. Read, W. Hückel, H. Schmidt, W. Treibs a V. Prelog. Použitie ultrafialovej spektroskopie pre objasnenie terpenových štruktúr použil R.B. Woodward v 40 rokoch 20. storočia. V oblasti esenciálnych olejov v priebehu posledného pol storočia dochádza k značným pokrokom, najmä čo sa týka analytických metód [16].

3.2 Výskyt

Esenciálne oleje nazývané aj esencie, éterické oleje alebo prchavé oleje, sú zložené zmesi prchavých látok, ktoré sú syntetizované živými organizmami. Sú najčastejšie rastlinného pôvodu. Ich výskyt a funkcia v prírode je stále predmetom výskumu. Existujú dôkazy, že niektoré organizmy produkujú tieto látky pre svoju ochranu alebo sú ich produktom sekundárneho metabolitu [18].

Sú považované za „chemické zbrane“ rastlinného sveta, pretože ich zlúčeniny môžu odradiť hmyz alebo chrániť rastlinu pred napadnutím baktériami alebo hubami. Pôsobia tiež ako „rastlinné feromóny“ v snahe prilákať a zviazať svojich opel'ovačov. Okysličené molekuly éterických olejov, ktoré slúžia ako chemické poslovia pre bunky, prinášajú rastlinám život,

ničia zamorenie, napomáhajú rastu a stimulujú uzdravenie. povaha sa koncentruje ako vôňa, prostredníctvom ktorej rastliny komunikujú so svojim okolitým svetom.

Samotné vonné látky (éterické oleje) sa tvoria v chloroplastoch listov, vezinogénovej vrstve bunkovej steny alebo hydrolýzou určitých glykozidov. Môžu sa nachádzať v rôznych častiach rastliny [19] ako sú : kvet (ruža), list (mäta), plod (citrón), semeno (fenykel), tráva (citrónová tráva), koreň (vetiver), pakoreň (zázvor), drevo (céder), kôra (škorica), živica (kadidlo), kvety stromu (ylang-ylang), tobolka (cesnak), sušené puky kvetov (klinček). Väčšinou sú kvapalné, menej sa vyskytujú v tuhom a polotuhom skupenstve. Väčšina esenciálnych olejov je bezfarebná alebo bledožltá, ale vyskytujú sa aj v iných farbách ako je modrý harmanček alebo kozlík, ktorý je zelený [20].

Esenciálne oleje z rôznych častí tej istej rastliny môžu mať úplne odlišné vône a vlastnosti. Napríklad geranium poskytuje olej z kvetov a listov a oleje z oboch častí sa líši v zložkách, vôňach a niektorých ďalších vlastnostiach. Kvalita a kvantita esenciálneho oleja tiež závisí od viacerých faktorov ako sú klimatické, sezónne a geografické podmienky, doba zberu a technikami izolácie. Výťažok olejov z rastlín môže byť tiež ovplyvnený štádiami rastu rastlín [19].

3.3 Chemická štruktúra a vlastnosti

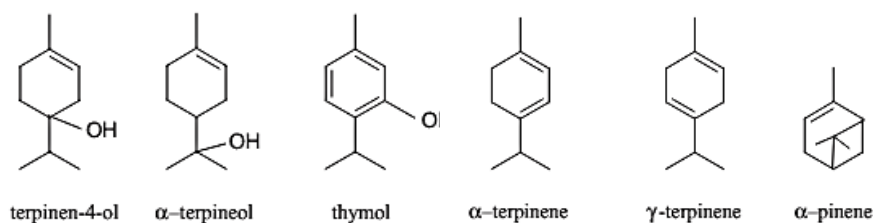
Z chemického hľadiska sú esenciálne oleje látky prchavé, nestále, bez farby s rozdielnou viskozitou. Esenciálne oleje sú zložené z jednotlivých chemických komponentov predovšetkým terpenického charakteru, obsahujú však aj rad neterpenoidných uhl'ovodíkov.

Vo vode sú v podstate nerozpustné, s vodou sa nemiešajú, dobre sa ale rozpúšťajú v rastlinných olejoch, v mede, liehu, étere a ďalších organických rozpúšťadlách. Obsahujú uhl'ovodíky a kyslíkaté látky, ktoré fungujú ako hlavný nositelia ich vonných a chuťových vlastností. Rastlinné silice sú produktom sekundárneho metabolizmu rastlín, pri ktorom dochádza k degradácii látok primárneho metabolizmu teda sacharidov, tukov a bielkovín [21].

Terpény v esenciálnych olejoch sú tvorené z izoprénových jednotiek. Každá izoprénová jednotka obsahuje 5 atómov uhlíka a podľa ich počtu sa delia na:

- Monoterpény (2 izoprénové jednotky) - tvoria najväčšie množstvo terpénov, sú to ľahké molekuly, ktoré sa rýchlo vyparujú.

- Seskviterpény (3 izoprénové jednotky) - vyšší počet atómov uhlíka znižuje nestálosť a preto majú vyšší bod varu ako monoterpény. Z toho dôvodu menej prispievajú k vôni esenciálneho oleja.
- Diterpény (4 izoprénové jednotky) - veľmi málo diterpénov nájdených v esenciálnych olejoch má tendenciu sa oxidovať na alkoholy. Príkladom diterpénov je taxol [16].



Obr. 3. Príklady terpénov [22]

Hlavné terpény sú monoterpén a seskviterpény, ale existujú aj hemiterpény, triterpény a tetraterpény. Aromatické zlúčeniny odvodené od fenypropánu sa vyskytujú v esenciálnych olejoch menej často ako terpény, patrí medzi nich napr. eugenol alebo škoricový aldehyd [23].

Terpenické alkoholy sa vyskytujú v mnohých esenciálnych olejoch. Monoterpenické alkoholy sú považované za vynikajúce antiseptiká. V siliciach môžeme nájsť alkoholy ako mentol, geraniol, borneol, linalool, geraniol, terpinén-4-ol.

Existujú rôzne fenoly nájdené v esenciálnych olejoch: tymol, karvakrol, chavikol a eugenol. S fenolmi sa musí zaobchádzať opatrne, pretože dokážu dráždiť kožu. Väčšina z nich má antibakteriálny účinok a dokážu stimulovať nervový a imunitný systém. Tymol pôsobí proti parazitickým červom a eugenol má protizápalové účinky.

Aldehydy majú často sedatívne účinky. Ako príklady možno uviesť citronellal (Eucalyptus citriodora) s antimykotickými vlastnosťami, škoricový aldehyd zo škorice (Cinnamomum zeylanticum) s účinkami proti patogénom črevnej flóry alebo vanilín [21].

Estery majú protikŕčové a upokojujúce vlastnosti, niektoré tiež účinkujú proti hubám. Často majú ovocnú vôňu. Príkladom sú linalylacetát (odvodený z kyseliny octovej a linaloolu) nájdený v levanduli alebo geranyl acetát vyskytujúci sa v sladkej majoránke. Medzi ďalšie estery patrí acyklický citronellyl acetát, monocyklický mentyl acetát alebo bicyklický izobornyl acetát [21].

Chemický názov ketónov má vždy koncovku -ón. Niektoré ketóny môžu vyvolať kŕče (obvykle pri orálnom podaní). Medzi bezpečné ketóny patrí napr. jasmón z jazmínu, fenchón z

feniklu či isomentón z muškátu. Súčasťou silíc sú tiež ketóny ako je gáfor, mentón alebo karvón [21].

Laktóny sú prítomné vo väčšine olejov. Percentuálne zastúpenie laktónov môže byť nízke, ale hrajú dôležitú úlohu ako mukolytiká (rozpúšťajú hlien). Mnoho esenciálnych olejov patriacich do čeľade Asteraceae, obsahuje laktóny, ktoré môžu spôsobiť podráždenie kože.

Étery sú zodpovedné za niektoré halucinogénne vlastnosti esenciálnych olejov, ak sú užívané orálne. Na rozdiel od fenolov nie sú étery agresívne na kožu. Príkladom je transanetol z fenikla obyčajného [24]. Ďalším je napr. cienol, ktorý pomáha odstrániť hlien z dýchacích ciest. Zástupcovia cyklických éterov 1,4-cineol i 1,8-cineol sa vyskytujú v niektorých esenciálnych olejoch. 1,8-cineol je nazývaný aj ako eukalyptol a môžeme ho nájsť v Eukalyptus globulus, rozmaríne alebo vavríne.

Výskyt silíc je typický pre niektoré rastlinné čeľade (Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Rutaceae, Zingiberaceae). Medzi čeľad'ami sú rozdiely v uložení silice, napríklad rastliny z čeľade Lamiaceae majú silice vo žľazových trichómoch, rastliny z čeľade Apiaceae v siličných kanálikoch.

Silice majú najčastejšie uplatnenie vo farmácii, v kozmetickom priemysle a v potravinárstve [21]. Látky obsiahnuté v siliciach vznikajú dvoma biochemickými dráhami - hlavnou je tzv. mevalonátová cesta (tvoria sa látky terpenické), ďalšou je tzv. šikimátová cesta (vznikajú napríklad kumaríny, furokumaríny a fenolové látky).

Esenciálne oleje nie sú rozpustné vo vode, čo má vplyv na spôsob ich použitia. Esenciálne oleje sú veľmi koncentrované a silné, preto sa pred užitím napríklad v aromaterapii značne riedia. Napríklad v masážnom oleji sú použité 2 - 3% esenciálneho oleja, zvyšok tvorí olejová báza. Neriedené esenciálne oleje sa využívajú len zriedka a vo veľmi špecifických prípadoch.

Uchovávať by sa mali najlepšie vo vzduchotesných fľašiach z tmavého skla, pretože sú veľmi prchavé a na vzduchu sa veľmi rýchlo vyparujú [25]. Najvhodnejšie pre uchovávanie esenciálnych olejov je fialové sklo, ktoré zvyšuje, respektíve chráni bioaktivitu olejov. Fialové sklo ponúka unikátnu kombináciu absolútnej ochrany pred prienikom viditeľného spektra svetla a priestupnosť pre UV a infračervené žiarenia.

Zloženie konkrétneho esenciálneho oleja sa môže líšiť v závislosti od metódy použitej na extrakciu oleja, nadmorskej výške, podnebie, používanie hnojív a pesticídov, typu pôdy,

času zberu alebo geografickej oblasti. Ak je silica získaná metódou destilácie, tak závisí zloženie od teploty a dĺžky destilačného procesu, a tiež koľkokrát bola silica destilovaná [24].

Ďalším faktorom ovplyvňujúcim zloženie je, z akej časti rastliny bol olej získaný - napr. esenciálny olej získaný zo semien koriandra bude mať úplne iné zloženie ako olej získaný z nezrelých listov koriandra [26].

Esenciálny olej sa vyznačuje dvoma alebo troma hlavnými zložkami v pomerne vysokých koncentráciách (20 - 70 %) v porovnaní s ostatnými zložkami, ktoré sú prítomné v stopových množstvách. Všeobecne platí, že tieto hlavné komponenty určujú biologické vlastnosti esenciálneho oleja [24].

3.4 Výroba

Pripraviť esenciálny olej nie je jednoduché. Napríklad zo šesťdesiatich tisíc ružových kvetov možno získať iba 25 g ružového oleja. Destiláciou suchých levanduľových kvetov možno získať o trochu viac - zo 100 kg sa pripraví 3 litre oleja. Na získanie 15 ml oleja je potrebné viac ako dvadsaťpäť kilogramov rastlinnej hmoty. Niektoré rastliny sa musia trhať v určitú dennú dobu a iba ručne, aby sa v slnečnom svite neodparila z okvetných lístkov silica. Niektoré stromy, z ktorých sa esenciálne oleje vyrábajú, musia byť staré minimálne tridsať rokov a vyššie ako deväť metrov, než je možné ich vyťať a ich drevo použiť na destiláciu.

Množstvo esenciálnych olejov vyrobených na celom svete sa veľmi líši. Ročná produkcia niektorých esenciálnych olejov presahuje 35 000 ton, zatiaľ čo u iných môže dosiahnuť len niekoľko kilogramov [27]. Získavanie aromatických látok z rastlín možno vykonať niekoľkými spôsobmi.

3.4.1 Destilácia vodnou parou

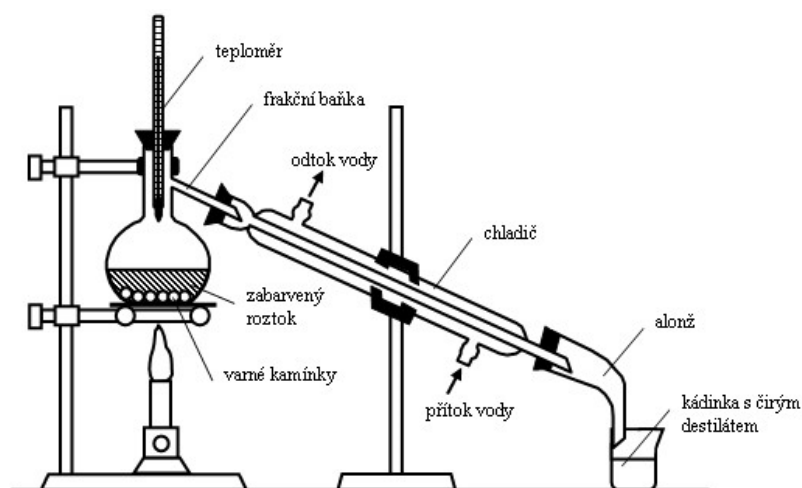
Táto metóda je v súčasnosti najviac používaná, a to zvlášť pre získanie tepelne odolných esenciálnych olejov. Destilácia vodnou parou patrí medzi najmenej šetrný spôsob získavania silice, pretože sa pri nej poškodzujú jemnejšie zložky silice [28].

Destilácia prebieha v aparátúre, ktorá sa skladá zo štyroch častí: nádrž na rastliny, zariadenia na výrobu pary, chladič a nádrž na olej. Kilogramy či tony kvetov, rastlín alebo častí rastlín sa nasyjú do nádrže z medi, prípadne ušľachtilej ocele. Zahrievaním vzniká para a tlak, para je privádzaná k rastlinnému materiálu a dochádza k postupnému uvoľňovaniu silice. Horúca vodná para sa mieša s kvapôčkami rastlinnej silice, ktoré potom kondenzujú, a z povrchu

vody sa zbiera esenciálny olej. Voda a esencie prechádzajú „labutím krkom“ a zrážajú sa v trubici, ktorá prechádza chladičom. Voda a výťažok sa samozrejme oddelia, pretože majú rozdielnu hustotu. Takto získaná prefiltrovaná esencia sa chráni pred teplom, svetlom a vzduchom v hermeticky uzavretých sudoch, z ktorých sa stáča do fľaštičiek z farebného skla. Destilačná voda, obsahujúca doteraz nerozpustené drobné čiastočky éterického oleja sa opatrne prečerpá do iných sudov. Je určená na výrobu parfumov, k aromaterapii alebo pre potreby potravinárskeho priemyslu. Táto kvetová voda má rôznu kvalitu, závislú na tom, či sa jedná o rastliny, rastúce divoko v prírode alebo biologicky pestované, dôležitú úlohu zohráva aj kvalita vody.

Každý olej má špecifické podmienky destilácie. Napríklad mäta sa destiluje 40 minút, levanduľa 1,5 hodiny, klinček 4 - 5 hodín. Hustota oleja ovplyvňuje aj rýchlosť jeho odparovania [29].

Obr. 3 Schéma destilácie vodnou parou [30]



3.4.2 Hydrodestilácia

Hydrodestilácia je relatívne jednoduchá metóda získavania silice z rastlinnej hmoty. Táto metóda je jednou z najstarších metód extrakcie a je v praxi stále hojne používaná. Prírodný produkt je ponorený do vody a zahrieva sa k varu. Esenciálny olej je vytiahnutý vodnou parou. Keď destilát kondenzuje späť do kvapaliny, esenciálny olej sa ľahko oddelí od vody, pretože pláva na hladine. Avšak, niektoré vonné chemikálie sú rozpustné vo vode destilátu, a tak musia byť z destilátu ďalším destilačným krokom odstránené alebo extrahované inými prostriedkami. Jednou z výhod hydrodestilácie je to, že teplota oleja nikdy stúpne nad 100 °C, a tak je tepelný rozklad minimalizovaný [28].

3.4.3 Mechanické lisovanie

Niektoré rastlinné silice je lepšie získavať lisovaním, nie destiláciou. Táto metóda sa používa najmä pre citrusové plody. Esenciálne oleje sa v oplodí citrusov nachádzajú blízko povrchu šupky, a tak sú ľahko získavané jednoduchým stlačením a skarifikáciou (jemným prepichnutím šupky), čím sa narušia malé olejové vaky v kôre citrusu. Olej potom jednoducho vyteká von, kde je zachytávaný do nádoby s filtrom. Lisovanie môže byť uskutočňované formou vytlačenia alebo strojového spracovania. Prvá metóda je tradičnejšia a pomáha vytvoriť veľmi čistý esenciálny olej [16].

3.4.4 Extrakcie organickými rozpúšťadlami

U najcitlivejšieho rastlinného materiálu, ako sú napríklad kvety, a u materiálu, ktorý obsahuje iba malé množstvo esenciálneho oleja, sa využíva proces extrakcie pomocou prchavých rozpúšťadiel. Hlavnou výhodou tejto metódy je jej šetrnosť, ale výsledné esenciálne oleje obsahujú okrem olejov samých ešte neprchavé vosky a rastlinné farbivá [25].

Pri získavaní silice z kvetov sa používajú rôzne rozpúšťadlá ako je hexán, petroléter, metanol alebo etanol, ktoré do seba silicu absorbujú. Prvý produkt, presýtený vonnými látkami, sa nazýva „konkrét“. Vedľa vonných látok obsahuje tento konkrét ešte látky balastné, najmä uvedené vosky; oddeľujú sa ich rozpustením v teplom liehu a vysušené mrazom. Použité rozpúšťadlo obsahujúce menej vonných látok, sa teda znovu použije pri ďalšom vymývaní. Hustá hmota konkrét sa zmieša s alkoholom, prefiltruje sa a ochladí na 12 - 15 °C, potom sa znovu filtruje, aby sa odstránili nerozpustné rastlinné vosky. Výsledný výluh je vymrazený a filtrovaný za vzniku tzv. laváže, z ktorej je potom oddestilovaný etanol. Takto získaný extrakt (po odstránení balastných látok) sa označuje ako absolútny, preto sa nazýva absolue. Absolue je najčistejšia a najkoncentrovanejšia forma esenciálneho oleja. Špecifickou metódou extrakcie je takzvaná Soxhletova extrakcia. Pri tejto metóde dochádza pri macerácii k zahrievaniu celého objemu macerátov [28].

3.4.5 Saturácia vôňou kvetov

Táto výrobná metóda je určená hlavne na extrakciu esencií z chúlolistivých kvetov, ktoré sa nesmú príliš zahriať. Jedná sa o veľmi vzácne silice (napríklad u silice z kvetov jazmínu). Saturácia vôňou kvetov je vlastne extrakcia kvetov do tuku. Kvety sa kladú na sklenené dosky, potreté živočíšnym tukom bez pachu (bravčový, hovädzí). Tieto vrstvy sa obnovujú každé tri až štyri dni. Výsledná látka je známa ako pomáda, ktorá môže byť použitá

ako taká, alebo je ďalej možné ju znova extrahovať etanolom, aby sa získal absolútny extrakt. Saturácia vôňou kvetov sa môže vykonávať za studena bezpachým tukom alebo za tepla maceráciou horúcim tukom. Táto metóda je zastaraná, pretože je nákladná a časovo náročná. Stále však možno nájsť výrobcov, ktorým ešte záleží na výrobe drahých esencií z kvetov jazmínu, tuberózy, pomarančovníka, narcisov, fialiek a pod. a ešte používajú výrobný proces saturácie vôňou kvetov [31].

3.4.6 Superkritická fluidná extrakcia (SFE)

Vysoko kvalitné silice sa získavajú extrakciou pomocou oxidu uhličitého v superkritická stave. Extrakcia superkritickým oxidom uhličitým je separačný proces, ktorý využíva skutočnosť, že nad kritickou teplotou (31 °C) nemožno oxid uhličitý ďalším zvyšovaním tlaku skvapalniť. Vysoko stlačený plyn potom v superkritickom stave vykazuje mimoriadne vlastnosti, s rastúcou hustotou vracia totiž schopnosť rozpúšťať látky. Ide o fyzikálny proces, pri ktorom nedochádza k žiadnej chemickej reakcii ani k uvoľňovaniu tepla. CO₂ je udržiavaný pod tlakom v kvapalnom stave v uzavretom systéme s rastlinou, z ktorej sa uvoľňuje silica. Pretože za normálnych podmienok je CO₂ plyn, za zníženia tlaku sa zmení na paru a po extrakcii sa odparí a zostane čistá silica. Tento spôsob sa dnes považuje za dokonalejší ako destilácia. Niektorí odborníci sa domnievajú, že týmto procesom vznikajú vysoko kvalitné a čisté esenciálne oleje, zatiaľ čo iní sú k takto získaným olejom kritickí. Proces vyžaduje veľmi nákladné špeciálne vybavenie, a preto sú oleje získané touto cestou veľmi ťažko dostupné a drahé [28].

3.4.7 Mikroextrakcia tuhých fáz

Ide o alternatívu vyššie spomenutých techník. Táto technika redukuje použitie organických (toxických) rozpúšťadiel a podstatne skracuje dobu extrakcie, pretože umožňuje automatizáciu postupu pri príprave vzorky. Významnými znakmi tejto alternatívy sú jednoduchosť, nízke obstarávacie a prevádzkové náklady, rýchlosť a tiež selektivita a citlivosť v spojení s vhodnou detekčnou metódou [32].

3.5 Ylang Ylang

Rod *Cananga* sa skladá z dvoch druhov rastlín, a to, *Cananga* vonná a *Cananga latifolia*. *C. odorata* je trváci tropický strom, ktorý rastie prirodzene v krajinách juhovýchodnej Ázie, ako

sú Filipíny a Malajzia, a tiež sa prirodzene vyskytuje na niekoľkých tichomorských ostrovoch, vrátane Austrálie. Za to, že bola zavedená do Číny, Indie, Afriky a Ameriky vďaka svojmu hospodárskemu významu.

Ylang-ylang je éterický olej z rastliny *Cananga odorata*, ktorý je využívaný vo veľkom meradle vo voňavkárskom priemysle. Éterické oleje získané pomocou parnej destilácie z rastliny sú používané predovšetkým v kozmetickom priemysle, ale aj v potravinárskom priemysle [33].

Boli vykonané mnohé štúdie, ktoré dokumentovali chemické zloženie esenciálneho oleja ylang-ylang vytlačeného z rôznych častí *C. odorata*. V jednom z reportov, bolo preukázané, že ylang-ylang silice obsahujú monoterpenové uhľovodíky, monoterpen obsahujúci kyslík, seskviterpenové uhľovodíky, seskviterpeny obsahujúce kyslík, benzenoidy, acetáty, benzoan, a fenoly.

Taktiež boli preukázané mnohé biologické účinky vychádzajúce zo zloženia ylang ylang. Ide najmä o antibakteriálne, antiprotozoálne, anifungicídne a antioxidantné účinky. Tento olej pôsobí najmä proti rod. *Bacillus*, *Stafylokokus aureus* či dokonca aj beta hemolytický streptokok. Taktiež je účinný aj na *E.coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Olej ylang-ylang pôsobí aj anti melanogenéze, čím pomáha riešiť kožné problémy, najmä hyperpigmentácie.

Rozsiahly literárny prieskum preukázal, že *C. odorata* je liečivá a aromatická rastlina, so širokým spektrom farmakologických účinkov, ktoré majú značný význam v poľnohospodárstve a v priemysle so spotrebným tovarom. Zložky, ako napríklad *O*-metylmoschatoline, liriodenin, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, germacrene D, a *p*-karyofylen boli uznané ako bioaktívne molekuly, ktoré majú antimikrobiálne účinky. Linalool je ďalšia zlúčenina, ktorá bola preukázaná, že vykazuje insekticídne a protizápalové účinky. Okrem toho, že sa experimentálne preukázalo, že *C. odorata* má tiež antibiofilmné, antioxidantné, antidiabetické, hmyz odpudzujúce, antihyperglykemické, sedatívne a relaxačné vlastnosti [33].

3.6 Elemi olej

Elemi olej je esenciálny olej zo stromu *Canarium luzonicum*. Bežne sa tiež používa názov Manila Gum Elemi. Tento strom sa vyskytuje najmä na Filipínach a v juhovýchodnej Ázii. Prvýkrát bol olej z tohto stromu extrahovaný pomocou vodnej destilácie v roku 1990.

Pomocou Shimadzu chromatografie a spektrofotometrie bolo detegovaných niekoľko látok, ktoré tento jedinečný olej vytvárajú. Hlavný komponent elemi oleja je limonén. Niektoré

štúdie hovoria o jeho zastúpení v 23 - 54 %, avšak niektoré aj o 80 % zastúpení. Ďalej majú zastúpenie aj α -felandréne diméry v trans aj cis formách. Tieto diméry sú zodpovedné za fotosenzibilitu oleja. V skúmaných vzorkách boli zastúpené aj elemol, sabinén, terpinolén, elemicín .

Tento esenciálny olej sa využíva najmä pri hojení hnisavých rán, má antiseptické účinky, je mukolytický a veľmi sa využíva aj pri upokojení a úzkostiach.

3.7 Geranium

Pelargonium graveolens je druh z rodu *Pelargonium* a je často nazývaný pelargónia, pretože spadá do rodiny Geraniaceae. *P. graveolens* je vysoký trvalý aromatický ker, ktorý môže dosiahnuť výšku až 1,3 m a laterálny rast až 1 m [34].

Silica *P. graveolens* je vo veľkej miere používa v parfumérii a kozmetický priemysel. Jedná sa o nepostrádateľný aromatický olej, s hlavnými zložkami citronellool, geraniol, linalool. Boli preukázané jeho relaxačné účinky na hladké svalstvo.

Geranium olej sa tiež stal dôležitým pre starostlivosť o pleť, pretože je dobrý pri otváraaní kožných pórov a dokonale čistý masťnú pleť. Bolo tiež zistené, že tento olej môže mať použitie pri znižovaní bolesti kvôli postherpetickej neuralgii, ako aj liečenie úplavice, hemoroidov, zápalu, ťažkých menštruačných bolestí, podporuje vylúčenie toxínov [34].

V Tadžikistane sa pelargónia pestuje v priemyselnom rozsahu a približne 3,5 ton geranievej silice sa vyrába každý rok.

Pomocou plynovej chromatografie a spektrofotometrie bolo preukázaných niekoľko hlavných zloženie tohto oleja. Najväčšiu zložku oleja patrí linalool. Medzi základné komponenty patrí geraniol a citronelol. Kvalitu olej určuje najmä pomer týchto dvoch zlúčenín. Ďalej v oleji nachádzame najmä ružové oxidy, propionátové éstery a mnohé iné [34].

Jeho využitie je naozaj široké. Využíva sa pri zažívacích ťažkostiach, pri zápaloch močovo-pohlavného systému, pri menopauze, na ekzémy a suchú pokožku. Priaznivo pôsobí proti stresu.

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

4 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE

4.1 Chemikálie

- Hyaluronan sodný 243 kDa, Contipro
- Hyaluronan sodný 600 kDa, Contipro
- Hyaluronan sodný 1180 kDa, Contipro
- Tween 85, Sigma-Aldrich
- 100% Přírodní éterický olej Elemi (Canarium Iuzonicum, Francúzko), Nobilis Tilia
- 100% Přírodní éterický olej Geranium (Pelargonium graveolens, Egypt), Nobilis Tilia
- 100% Přírodní éterický olej Ylang-Ylang (Canaga odorata var. genuina, Komory), Nobilis Tilia
- Destilovaná voda

4.2 Pomôcky a prístroje

- Analytické váhy
- Magnetické miešadlo
- Vortex (V-1 plus, Biosan)
- Tenziometer, Krüss K20 Easydyne
- Konduktometer inoLab Cond 7110
- Rotačný viskozimeter, Myr V2-L
- Zeta sizer Nano ZS, Malvern Instruments, Ltd.
- Plynový chromatograf, DANI Master GC Fast Gas Chromatograph
- Pipety
- Laboratórne sklo

5 METODIKA

5.1 Příprava vzoriek

Pre experimentálnu časť diplomovej práce sa pripravilo 15 vzoriek. Najprv boli pripravené roztoky hyaluronanu sodného o 3 rôznych molekulových hmotnostiach (243 kDa, 600kDa, 1180 kDa).

Roztoky hyaluronanu 0,5 % hm. boli rozpustené v 500 ml destilovanej vode za neustáleho miešania a zahrievania. Po úplnom rozpustení boli roztoky vychladené na pokojovú teplotu.

Pripravili sa 3 zásobné roztoky aktívnych látok zmiešaním éterických olejov (Elemi, Geranium, Ylang-ylang) a neionického tenzidu Tween 85. Namiešali sa v pomere 1:4 (1ml Tween 85 a 4 ml esenciálny olej).

Následne sa nachystalo 15 vzoriek (Tab.1). Vzorky sa premiešali ručne a pomocou vortexu.

Tab. 1 Příprava vzoriek

Číslo vzorky	Názov vzorky	Molekulová hmotnosť HYA	Příprava
1.	243 HYA	243 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného
2.	600 HYA	600 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného
3.	1180 HYA	1180 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného
4.	243 HYA+TWEEN	243 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 0,2 ml Tween 85
5.	600 HYA+TWEEN	600 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 0,2 ml Tween 85
6.	1180 HYA+TWEEN	1180 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 0,2 ml Tween 85
7.	243 HYA+TWEEN+ELEMI	243 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 1ml roztok aktívnych látok(Elemi+Tween 85)
8.	600 HYA+TWEEN+ELEMI	600 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 1ml roztok aktívnych látok(Elemi+Tween 85)
9.	1180 HYA+TWEEN+ELEMI	1180 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 1ml roztok aktívnych látok(Elemi+Tween 85)
10.	243 HYA+TWEEN+GERANIUM	243 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 1ml roztok aktívnych látok(Geranium+Tween 85)

11.	600 HYA+TWEEN+GERANIUM	600 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 1ml roztok aktívnych látok(Geranium+Tween 85)
12.	1180 HYA+TWEEN+GERANIUM	1180 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 1ml roztok aktívnych látok(Geranium+Tween 85)
13.	243 HYA+TWEEN+YLANG-YLANG	243 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 1ml roztok aktívnych látok(Ylang-Ylang+Tween 85)
14.	600 HYA+TWEEN+YLANG-YLANG	600 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 1ml roztok aktívnych látok(Ylang-Ylang+Tween 85)
15.	1180 HYA+TWEEN+YLANG-YLANG	1180 kDa	100ml 0,5%hm roztok hyaluronanu sodného + 1ml roztok aktívnych látok(Ylang-Ylang+Tween 85)

5.1.1 Skladovanie vzoriek

Hyaluronan sodný sa skladuje v uzavretých nádobách pri teplote 2 - 8 °C, z tohto dôvodu sme vzorky uchovávali v chladničke. Pred každým meraním sa vzorky nechali samovoľne vytemperovať na laboratórnu teplotu. Všetky metodiky sa stanovovali z 1-krát pripravovaných vzoriek.

5.2 Chromatografická analýza esenciálnych olejov

5.2.1 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia (GC) je separačná analytická metóda, ktorou analyzujeme zmesi plynov alebo látok, ktoré pri 450 °C možno previesť do plynného skupenstva. Umožňuje analyzovať len látky, ktoré majú dostatočný tlak nasýtených pár, sú tepelne stále a majú relatívnu molekulovú hmotnosť menšiu než 1000. GC sa nedá použiť na separáciu makromolekúl, organických a anorganických solí. V takom prípade sa používa chemická zmena analytu na deriváty, ktoré sa už pomocou GC dajú analyzovať.

V GC sa vzorka dávkuje do prúdu pomocného (nosného) plynu, analyzované zložky sa vyparujú a prenášajú ďalej chromatografickou kolónou vo forme pár s pomocou plynu ako mobilnej fázy. Používa sa inertný nosný plyn preto interakcia mobilnej fázy a analytu nie je významná. Separácia zložiek v kolóne prebieha na základe rôznej schopnosti interagovať so stacionárnou fázou, pretože sa kontinuálne distribujú medzi nosný plyn a stacionárnu fázu a ich pohyb sa oproti nosnému plynu spomaľuje charakteristicky pre danú zložku. Detektor

indikuje zóny zložiek ktoré vystupujú z kolóny. signál z detektora sa vyhodnocuje a z časového priebehu intenzity signálu sa určia analytické charakteristika zložiek analytu a kvantitatívne zastúpenie zložiek [48].

5.2.2 Plynová chromatografia s plameňovo-ionizačným detektorom

Detekčný princíp je založený na zmene elektrickej vodivosti v cele detektora. K ionizácii molekúl zložiek vymytých z kolóny dochádza vo vzduchovo-vodíkovom plameni, horiacom medzi dvoma elektródami, ktoré je pod vplyvom jednosmerného elektrického napätia 300 V. Jeden pól meracieho obvodu sa privádza k dýze a druhý na zbernú elektródu. Nosný plyn sa pred vstupom do dýzy mieša s vodíkom, vzduch sa privádza okolo dýzy. Pri prechode samotného nosného plynu je prúd pomerne malý. V prítomnosti organickej zložky sa elektrický prúd zväčší v závislosti od počtu iónov, ktoré sa vytvoria pri horení v plameni z molekúl analytu. Detektor má univerzálne použitie, deteguje všetky látky okrem anorganických pár a plynov, má veľký lineárny rozsah. Je ale deštruktívny, keďže zložky analytu sa vždy rozložia [48].

5.2.3 Chromatografická analýza esenciálnych olejov

Stanovovali sa jednotlivé zložky troch esenciálnych olejov – Elemi, Geranium, Ylang-ylang (Obr. 4). Zastúpenie jednotlivých zložiek sa zisťovalo na plynovom chromatografe DANI Master GC Fast Gas Chromatograph s kolónou Zebron™ ZB-5MS s kapilárnou kolónou 30 m × 0,25 mm × 0,5 μm, nepolárnou a plameňovým ionizačným detektorom (FID) (Obr. 5). Nosný plyn bol dusík s prietokom 25 ml/min., vodík s prietokom 40 ml/min, a vzduch s prietokom 280 ml/min. Teplotný profil bol zvyšovaný z počiatočných 50 °C na 120 °C rýchlosťou 6 °C/min a do 230°C rýchlosťou 15 °C/min, a na koniec bola teplota kolóny 230 °C 15 min. Teplota injektoru pri nástreku bola 200 °C a teplota detektoru bola 270 °C. Celkový čas analýzy bol nastavený na 35 min. Objem nástreku bol 1 μl vzorky. Vzorky esenciálnych olejov elemi a geranium boli pripravené zmiešaním 1 ml dichlórmetánu a 1 μl esenciálneho oleja. Vzorka Ylang-ylang bola pripravená zmiešaním 1 ml dichlórmetánu a 10 μl esenciálneho oleja. Tento pomer riedenia sa zvolil pre lepšiu viditeľnosť píkov a stanovovaných látok. Celkový čas analýzy bol nastavený na 34 min.



Obr. 4 Analyzované esenciálne oleje



Obr. 5 Plynový chromatograf DANI master GC Fast Gas Chromatograph

5.3 Stanovenie povrchového napätia

Štruktúra kvapalín je zložitá a jej chovanie výrazne závisí od charakteru medzimolekulárnych síl v kvapaline. Sily pôsobiace na molekulu v objemovej fáze sa líšia od síl pôsobiacich v povrchovej vrstve. Ak chceme presunúť molekulu z objemovej fázy do povrchovej vrstvy, je potrebné vykonať prácu potrebnú k prekonaniu výslednej sily. Každý povrchovej vrstve tak odpovedá povrchová energia σ , ktorá je definovaná ako práca, ktorú je nutné vykonať,

aby sa povrch uvažovanej sústavy zväčšil o jednotku plochy pri konštantnom objeme. Vyjadruje hodnotu energie pripadajúca na jednotku plochy fázového rozhrania. Povrchová energia sa vyjadruje rovnicou (1) [35].

$$\sigma = \frac{dA}{dS} \quad (1)$$

Kde:

- σ povrchová energia [$J \cdot m^{-2}$]
- dA práca [J]
- dS plocha [m^2]

Povrchové napätie γ je definované ako sila F v rovine povrchu, ktoré pôsobí na jednotku dĺžky l , vyjadrená rovnicou (2).

$$\gamma = \frac{dF}{dl} \quad (2)$$

Kde:

- γ povrchová energia [$N \cdot m^{-1}$]
- dF elementárna sila [N]
- dl dĺžka myšlieného elementárneho rezu povrchu kvapaliny v rovine kolmej k danému povrchu [m]

5.3.1 Meranie povrchového napätia

Povrchové napätie sa dá experimentálne stanoviť mnoho spôsobmi. Metódy stanovenia rozdeľujeme na statické, semistatické a dynamické.

Statické metódy sú založené na pozorovaní ustáleného rovnovážneho stavu. To umožňuje získať skutočné rovnovážne hodnoty, čo je veľmi dôležité pri štúdiu roztokov. Na rovnovážnych rozhraniach je tu odlišná koncentrácia od koncentrácie v objemovej fázy, prípadne dochádza aj k orientácii molekúl. Obidva tieto deje vyžadujú určitú dobu k ustaveniu, na čo nie je dostatok času u rýchlo obnovujúcich sa povrchov. Ak je dosiahnutá rovnováha, sú hodnoty povrchového napätia na čase nezávislé a v ideálnom prípade sú nezávislé aj na spôsobe merania. Najpoužívanejšie statické metódy sú :

- metóda kapilárnej elevácie,
- metóda merania vzostupu kvapalina a zvislej doske,

- metóda Wilhelmyho doštičky,
- analýza profilu kvapiek a bublín,
- metóda rotulúcej kvapky.

Semistatické metódy sú podobne ako statické založené na dosiahnutie rovnovážneho stavu, v prípade, že je rovnováha nestabilná. Je nutné, aby sa zvolila optimálna rýchlosť potrebnú k priblíženiu sa k rovnovážnemu stavu, aby stanovenie nebolo príliš dlhé a získané výsledky s blížili k skutočným rovnovážnym hodnotám. Používajú sa :

- metóda maximálneho pretlaku v bubline,
- odtrhávajúce metódy,
- stalagmetrické metódy.

Dynamické metódy sa používajú pre štúdium výrazne nerovnovážnych stavov povrchových vrstiev kvapalín a sledujú zmeny v povrchovom napätí a c relaxačnom stave v malom časovom rozmedzí. Používajú sa

- metóda oscilujúceho prúdu,
- meranie rozptylu svetla,
- sledovanie kapilárneho vlnenia na fázovom rozhraní,
- oscilujúca kvapka [36].

5.3.2 Wilhemmyho metóda

Metóda je pomenovaná po nemeckom chemikovi a vedcovi Ludwigu Ferdinandovi Wilhelmy. Je to odtrhávacia metóda, ktorej princípom je meranie sily potrebnej k odtrhnutiu tenkej doštičky od fázového rozhrania. Doštička definovaných rozmerov, dobre zmáčaná stanovenou kvapalinou ,ktorá sa upevní na vahadlo váh a ponorí sa do kvapaliny. Na povrchu doštičky sa tvorí z oboch strán menisky ,ich tvar a maximálna výška vzostupu je určená Laplace-Youngovou rovnicou. Pri pohybe doštičky smerom hore je vyvíjaná sila F , ktorá rastie a tesne pred odtrhnutím dosahuje maxima. Pre tenkú doštičku, ak šírka je zanedbateľná vzhľadom k jej dĺžke, pre povrchové napätie platí vzťah z rovnice (3).

$$\gamma = \frac{F}{2.l.\cos\theta} \quad (3)$$

V prípade úplného zmáčania ($\theta=0$)sa rovnica upravuje na vzťah(4).

$$\gamma = \frac{F}{2.l} \quad (4)$$

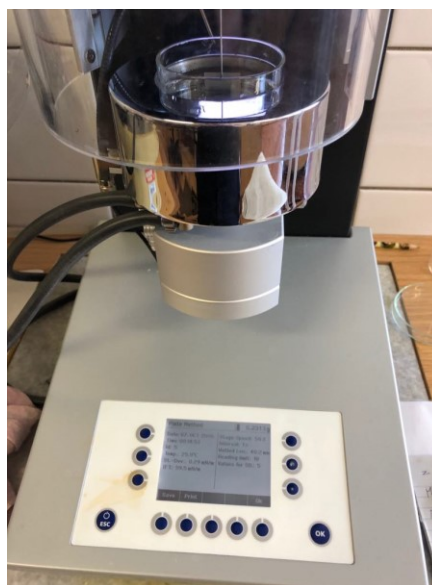
Kde:

- γ povrchové alebo medzifázové napätie [$N.m^{-1}$]
- l dĺžka doštičky [m]
- F sila [N]

Metóda je úspešne aplikovateľná, pri dodržiavaní určitých pravidiel. Kvôli vysokej citlivosti váh musí byť obvod doštičky konštantný po celej jej výške. Z hľadiska zloženia a morfológie musí byť povrch doštičky homogénny.

5.3.3 Stanovenie povrchového napätia Wilhemyho doštičkovou metódou

Povrchové napätie sa merala Wilhemyho metódou na tenziometri Krüss K20 Easydyne. Stanovenie prebiehalo pri laboratórnej teplote 25°C. Pred každým meraním sa platinová doštička dôkladne opláchla destilovanou vodou a acetónom a následne vyžihala nad plameňom až do oranžového zafarbenia doštičky. Doštička sa zavesila na držiak a pomocou otáčavého kolieska na boku prístroja sa posunula kadička so vzorkou tak, aby sa hladina vzorky takmer dotýkala doštičky. Pred meraním bola hladina vzorky ustálená a doštička v pokoji. Po spustení merania sa doštička klesla pod povrchovú vrstvu vzorky a zmeria 10 hodnôt, z ktorých sa zobrazila priemerná hodnota povrchového napätia. Výsledky merania sú uvedené ako priemery a smerodajné odchýlky desiatich meraní jednej vzorky.



Obr. 6 Tenziometer Krüss K20 Easydyne

5.4 Stanovenie viskozity

5.4.1 Viskozimetria

Viskozita je základnou veličinou v reológii. Charakterizuje tokové napätie a určuje mieru vnútorného odporu materiálu voči vnútornému zaťaženiu, tzv. odpor proti toku. Podľa zaťaženia ju rozlišujeme na smykovú a elongačnú viskozitu. Podľa spôsobu merania sa rozdeľuje na dynamickú a kinematickú viskozitu, ktoré sú vzájomne závislé [37].

Šmykové napätie (5) je vyvolané vnútorným trením, teda viskozitou kvapaliny. Je úmerne zmene rýchlostí v smere kolmom na smer pohybu podľa Newtonovho vzťahu.

$$\tau = \eta \frac{dv}{dy} \quad (5)$$

Kde:

- τ šmykové napätie [Pa]
- η dynamická viskozita [Pa·s]
- $\frac{dv}{dy}$ gradient rýchlosti v smere kolmom na smer pohybu

Dynamická viskozita η je definovaná ako tangenciálna sila pôsobiaca na jednotku plochy, ktorá je potrebná k posunu jednej vrstvy kvapaliny oproti druhej vrstve, udržovanej v jednotkovej vzdialenosti [38].

Kinematická viskozita je definovaná ako pomer dynamickej viskozity a hustoty danej látky. Je definovaná vzťahom (6) [39].

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (6)$$

Kde:

- ν Kinetická viskozita [$m^2 \cdot s^{-1}$]
- η Dynamická viskozita [Pa·s]
- ρ Hustota kvapaliny [kg/m^3]

Viskozita sa meria mnohými spôsobmi [40].

Prístroje používané k meraniu viskozity sa rozdeľujú do nasledovných kategórii [41]:

- Kapilárne viskozimetre

- Rotačné viskozimetre
- Pádové viskozimetre
- Vibračné viskozimetre
- Ultrazvukové viskozimetre
- Vysokoteplotné šmykové viskozimetre

V tejto práci sa meranie viskozity prevádzalo pomocou rotačného viskozimetra, preto mu bude venovaná väčšia pozornosť.

5.4.2 Rotačný viskozimeter

Pracuje na princípe merania sily, nutnej k otáčaniu valca alebo iného rotačného telesa ponoreného do kvapaliny. Vreteno sa otáča pevnou a dobre definovanou rýchlosťou. nameraná sila sa udáva v mPa.s. Meranie môže prebiehať pomocou rôznych druhov rotačných vretien, umožňuje veľký rozsah rýchlostí, čo umožňuje veľkú variabilitu meraní. Pri newtonovských kvapalinách u ktorých ich hodnota nezávisí na tokových podmienkach (veľkosť vretena a rýchlosť otáčania) sa dá určiť presná a jednoznačne definovaná viskozita. U neneutronovských kvapalín sa nestanoví len jedna hodnota viskozity. Viskozitná charakteristika sa dá popísať pomocou tokovej krivky alebo s pomocou relatívnej viskozity To je číslo ktoré udáva hodnotu zdanlivej viskozity za presných experimentálnych podmienok. (rovnaké vreteno, rovnaký objem vzorky, rovnaká nádoba, rovnaká rýchlosť otáčok, rovnaká teplota). Používa sa ku stanoveniu rozdielu medzi rôznymi vzorkami kvapalín [42].

5.4.3 Stanovenie viskozity

Viskozita vzoriek sa stanovila pomocou rotačného viskozimetra Myr V2-L Tento prístroj meria dynamickú viskozitu kvapaliny. Je vhodný pre rýchle stanovenia viskozity. Meranie bolo realizované pri teplote laboratórnej teplote 25°C. Princíp stanovenia spočíva v tom, že vreteno (špindl) je ponorené do testovaného vzorku a meria sa sila, ktorá je potrebná k prekonaniu odporu toku kvapaliny. Výsledkom odklonu vretena od pružiny a rýchlosti rotácie je otáčavý moment, ktorý je priamo odčítaný ako hodnota viskozity v mPa.s . Meralo sa pri rôznych rýchlostiach od 1,5 - 100 rpm. Pri meraní viskozity sa pozorovala závislosť smykovej rýchlosti a viskozity.



Obr. 7 Viskozimeter Myr V2-L

5.5 Stanovenie veľkosti častíc

5.5.1 Rozptyl svetla

Rozptyl svetla je primárnou metódou používanou k charakterizácii molekulové hmotnosti a veľkosti molekúl.

Medzi metódy analýzy pomocou statického rozptylu svetla patri širokouhlý a viacuhlový rozptyl svetla. Statický rozptyl svetla umožňuje priame meranie prípadne extrapoláciu na nulovú koncentráciu, čím sa dá zistiť priemerná molekulová hmotnosť, polydisperzita, polomer zotrvačnosti (gyračný polomer), polomer otáčania, tuhosť reťazca, stupeň vetvenia alebo molekulárnu expanziu [43].

5.5.2 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla (niekedy označovaný ako fotónová korelačná spektroskopia alebo elastický rozptyl svetla) je technika na meranie veľkosti častíc typicky v sub-mikrónovej oblasti.

Dynamický rozptyl svetla meria Brownov pohyb a vzťahuje sa na veľkosť častíc. Brownov pohyb je náhodný pohyb častíc v dôsledku bombardovania molekulami rozpúšťadla, ktoré ich obklopujú. Normálne sa DRS zaoberá meraním častíc suspendovaných v kvapaline. Čím väčšia je častica, tým pomalší bude Brownov pohyb. Menšie častice sú poháňané molekulami rozpúšťadla a tým sa pohybujú rýchlejšie.

Pre DLS je potrebná presne známa teplota, pretože sa vyžaduje znalosť viskozity (viskozita kvapaliny závisí od jej teploty). Teplota tiež musí byť stabilná, inak konvekčné prúdy vo vzorke spôsobia náhodné pohyby, ktoré zničia správnu interpretáciu veľkosti.

Analýza prebieha pomocou dopadu monochromatického svetla, väčšinou z laserového zdroja do roztoku s časticami, ktoré konajú Brownov pohyb. Dôjde k interakcii svetla s časticami k interferencii a k Dopplerovemu posunu. Výsledkom je zmena frekvencie rozptýleného žiarenia oproti primárnemu žiareniu, ktorá súvisí s veľkosťou častíc. Keďže sa častice v kvapaline pohybujú, bude podľa Dopplerovho princípu dopadať na detektor svetlo s vyšou alebo nižšou frekvenciou podľa toho či sa častice pohybujú smerom k detektoru alebo od detektoru. Mení sa vzdialenosť, ktorá musí rozptýlene svetlo k detektoru uraziť a toto svetlo potom môže interferovať v závislosti na vzdialenosť medzi časticou a detektorom. Výsledkom je fluktuácia intenzity rozptýleného žiarenia okolo jej priemernej hodnoty. Čím sa budú častice pohybovať rýchlejšie, tým rýchlejšie bude dochádzať ku zmene intenzity rozptýleného svetla. rýchlosť týchto zmien závisí na veľkosti molekúl, teplote a viskozite rozpúšťadla ako bolo už spomínané.

Na meranie veľkosti častíc v diplomovej práci bol použitý Zetasizer Nano ZS od firmy Malvern (UK), ktorý meria veľkosť častíc, deteguje intenzitu rozptýleného svetla pod uhlom 173° , teda pri spätnom rozptyle. Meranie pri spätnom rozptyle je prospešne. Laserový paprsok nemusí pri meraní prechádzať celou vzorkou, čím znižuje pôsobenie mnohonásobného rozptylu. Účinok mnohonásobného rozptylu je minimálny pri 180° , tzn že pri 173° umožňuje merať koncentrovanejšie vzorky [44].

Nedostatkem metódy DLS je jej citlivosť na prítomnosť rôznych typov agregátov a nečistôt. Prach a väčšie častice môžu spôsobiť interferenciu, ktorá môže ovplyvniť výslednú veľkosť častíc vo vzorke [45].

5.5.3 Stanovenie veľkosti častíc

Ako bolo už spomínané, pre meranie veľkostí častíc vzoriek bolo použité zariadenie Zetasizer Nano ZS. Táto metóda je založená na rozptyle svetla. Pred samotným meraním sa nastavila hodnota refrakčného indexu pre hyaluronan, ktorá je 1,6666. Meranie bolo realizované pri teplote 25°C .

Nameralo sa všetkých 15 vzoriek, z hľadiska správnosti a presnosti výsledkov sú zverejnené a diskutované výsledky merania vzoriek 243 HYA, 243 HYA+TWEEN,

243 HYA+TWEEN+ELEMI, 243 HYA+TWEEN+GERANIUM, 243 HYA+TWEEN+YLANG-YLANG. Hodnoty stanovenia veľkostí častíc u HYA s vyššou molekulovou hmotnosťou (600 kDa, 1180 kDa) boli mimo rozsah zariadenia Zetasizer, preto sú tieto výsledky chybné a nepravdivé a vo výsledkoch nebudú zverejňované.

Na stanovenie sa používali štandardné kyvety, do ktorých sa pipetovali vzorky dvakrát prefiltrované cez filter. Rovnako bola prefiltrovaná aj destilovaná voda, ktorá sa použila na riedení vzoriek.

Vzorky boli následne pripravené: Vzorky čistých roztokov HYA sa nachystali zmiešaním 50 μ l vzorky a 1 ml dH₂O. U vzoriek roztokov HYA so zmesami aktívnych látok sa zmiešalo 25 μ l vzorky a 1 ml dH₂O.

Kyveta sa pred vložením do zariadenia očistila pomocou obrúska, kvôli odstráneniu nečistôt a vlhkosti, ktoré by mohli spôsobiť chyby vo výsledkoch. Výsledné dáta boli automaticky zaznamenané do programu Zetasizer.

5.6 Stanovenie zeta potenciálu

5.6.1 Zeta potenciál

Vznik sieťového náboja na povrchu častíc ovplyvňuje distribúciu iónov okolo meziplošnej oblasti, čo má za následok zvýšenú koncentráciu opačných iónov (iónov s opačným nábojom, než má častica) tesne u povrchu. Okolo každej častice existuje elektrická dvojvrstva. Vrstva kvapaliny obklopujúca časticu existuje v dvoch oblastiach : vnútorná oblasť, nazývaná Sternova vrstva, kde sú ióny silno viazané a vonkajšia difúzna oblasť, kde sú ióny slabšie viazané. Vnútri difúznej vrstvy existuje teoretická hranica, v ktorej ióny a častice tvoria stabilnú jednotku. Keď sa častice pohybujú (napr. kvôli gravitácii), ióny vo vnútri hranice sa pohybujú s ňou, ale všetky ióny za hranicou s časticou neputujú. Táto hranica sa nazýva povrch hydrodynamického smyku, alebo rovina sklzu. Potenciál, ktorý existuje na tejto hranici, je známy ako zeta potenciál.

Hodnota zeta potenciálu indikuje možné správanie disperzie a naznačuje potenciálnu stabilitu koloidného systému. Častice s potenciálom zeta kladnejším ako +30 mV, alebo zápornejším ako -30 mV sa považujú za stabilné a nemajú tendenciu flokulovať. Častice, ktoré majú zeta potenciál medzi -30mV až +30 mV, vykazujú tendenciu ku koagulácii.

Táto skutočnosť je najvýraznejšia v izoelektrickom bode, keď sa zeta potenciál rovná 0 mV. Existuje mnoho faktorov, ktoré majú vplyv na zeta potenciál, ako je typ častíc, koncentrácia častíc, pozadia elektrolytu, pridávanie ďalších látok (ťažké kovy, povrchovo aktívne látky atď.). Hlavný vplyv na hodnoty zeta potenciálu má pH. So zmenou pH môžeme dosiahnuť stabilný alebo nestabilný systém. Meranie zeta potenciálu je tiež metóda, ktorá nám umožňuje získať predstavu o charaktere samotného povrchu častíc a potom aj o procesoch prebiehajúcich na tomto povrchu (napr. adsorpcia), iónovú výmenu, modifikáciu. Experimenty spojené s meraním zeta potenciálu sú ďalším faktorom, ktorý nám pomáha vysvetliť princípy povrchu častíc a interakcie okolia [46] [47].

5.6.2 Stanovenie zeta potenciálu

Zeta potenciál sa tiež meral na prístroji Zetasizer Nano ZS (Obr. 6). Pred samotným meraním sa nastavila hodnota refrakčného indexu pre hyaluronan, ktorá je 1,6666. Meranie bolo realizované pri teplote 25 °C. Vzorky sa plnili do kyvety s elektródou. Pri jej plnení sa dbalo na to, aby kyveta bola naplnená po rysku a aby v nej neboli bubliny vzduchu. Po naplnení sa dôkladne očistila od nečistôt.

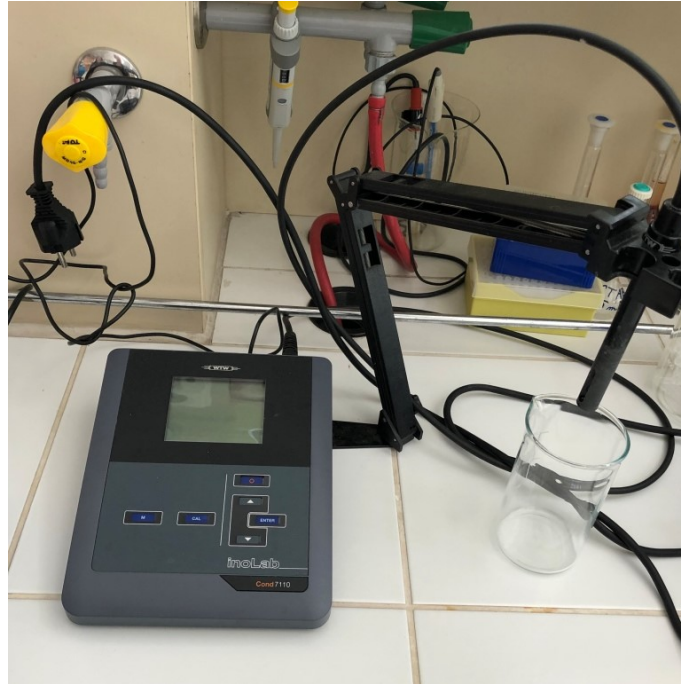
Meralo sa 15 vzoriek. Vzorky čistých roztokov HYA sa pripravili nariadením 1,5 ml vzorky a 3 ml dH₂O. Vzorky roztokov HYA so zmesami aktívnych látok sa pripravili z 300 µl vzorky a 3 ml dH₂O. Výsledky stanovenia boli automaticky zaznamenané v programe Zetasizer.



Obr. 8 Zetasizer Nano ZS

5.7 Stanovenie vodivosti

Hodnoty vodivosti boli namerané na konduktometri inoLab Cond 7110. Každá vzorka bola zmeraná pomocou vodivostnej meriacej cely, ktorá bola ponorená do vzorky. Po zapísaní výsledkov bola opláchnutá destilovanou vodou až do ustálenia mernej hodnoty.



Obr. 9 Konduktometer inoLab Cond 7110

6 VÝSLEDKY A DISKUZIA

6.1 Chromatografická analýza esenciálnych olejov

V tejto časti diplomovej práce sú zhrnuté výsledky analýz esenciálnych olejov Elemi, Geranium a Ylang-ylang. Zastúpenie látok v esenciálnych olejoch sú vyhodnotené v tabuľkách a grafoch, ktoré boli zaznamenané do programu počas samotnej analýzy.

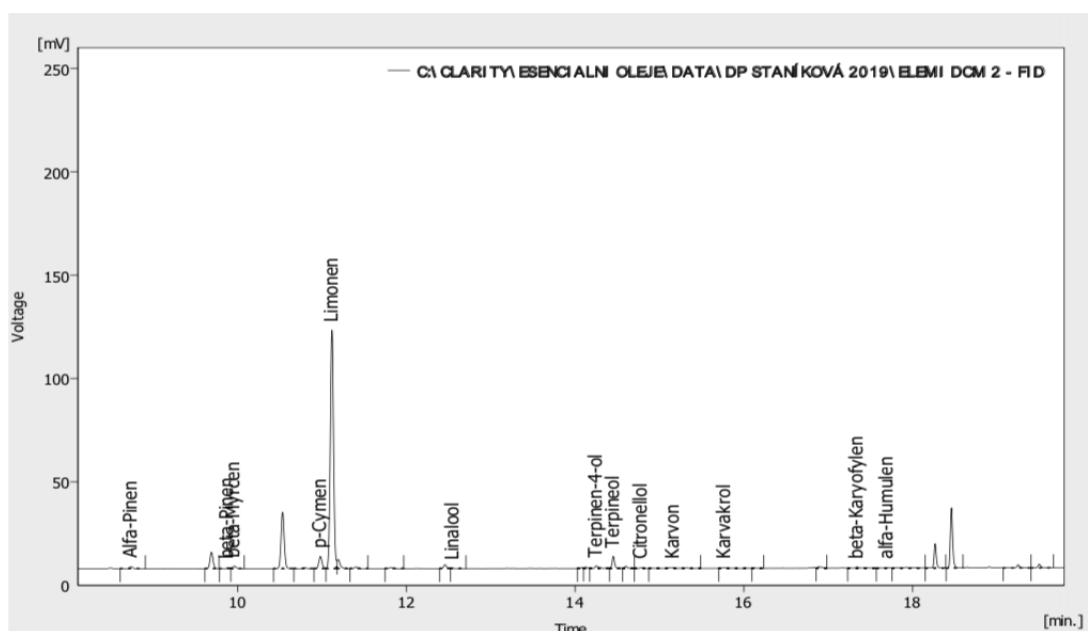
6.2 Chromatografická analýza esenciálneho oleja elemi

Tabuľkové hodnoty percentuálneho zastúpenia jednotlivých konstituentov esenciálneho oleja sú nasledujúce : (+)- Limonene 26,9-65,0 %, elemol 2,8-17,3 %, α -phellandrene 4,3-15,1 %, elemicin 1,8-10,6 %, p-cymene 1,4-7,7 %, α - pinene 0,4-5,4 %, 1,8-cineole <2,5 %, β -myrcene 0,6-2,4 %, β -phellandrene 0,8-1,6 %, sabinene 1,3-5,9 %, β -pinene 0,3-1,0 %, methyleugenol 0,2-0,3 %.

Z nameraných hodnôt vyplýva, že obsah najviac zastúpenej zložky (limonen) odpovedá tabuľkovým hodnotám, ktoré sú uvedené vyššie. Z obsahu ďalších konstituentov sa môže uviesť p-cymene, jeho zastúpenie sme namerali v rozsahu 2,8 %. Táto hodnota odpovedá taktiež intervalu tabuľkových hodnôt štandardu. V prípade terpineolu sme namerali obsah 2,2 %. Tabuľková hodnota však v literatúre dohľadaná nebola. V prípade konstituentu β -pinen sme namerali hodnotu 0,2 %. V tomto prípade s pohybujeme mimo hodnoty uvedené v štandarde. To mohlo byť spôsobené nepresnosťou merania, prípadne nesprávnym odpočítaním. Taktiež je treba zdôrazniť podmienky pestovania východzej suroviny, na ktorej je obsah konstituentov závislý. V prípade konstituentov β -myrcen sme namerali hodnotu, ktorá je na spodnej hranici tabuľkového intervalu. Obsah ďalších tabulovaných konstituentov nie sme schopní kvantitatívne popísať, lebo nie sú príslušné štandardy. Z nameraných výsledkov vyplýva, že stanovovaný esenciálny olej Elemi odpovedá štandardom.

Tab. 2 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Elemi

Esenciálny olej - elemi					
Názov zložky	Retenčný čas [min]	Plocha [%]	Názov zložky	Retenčný čas [min]	Plocha [%]
α -Pinen	8,74	0,4	Terpineol	14,453	2,2
β -Pinen	9,887	0,2	Citronellol	14,783	0,2
β -Myrcen	9,963	0,6	Karvon	15,163	0,5
p-Cymen	10,98	2,8	Karvakrol	15,773	0,3
Limonen	11,12	55	β -Karyofylen	17,343	0,3
Linalool	12,55	0,1	α -Humulen	17,697	0,1
Terpinen-4-ol	14,25	0,8			



Obr. 10 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Elemi

6.2.1 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Geranium

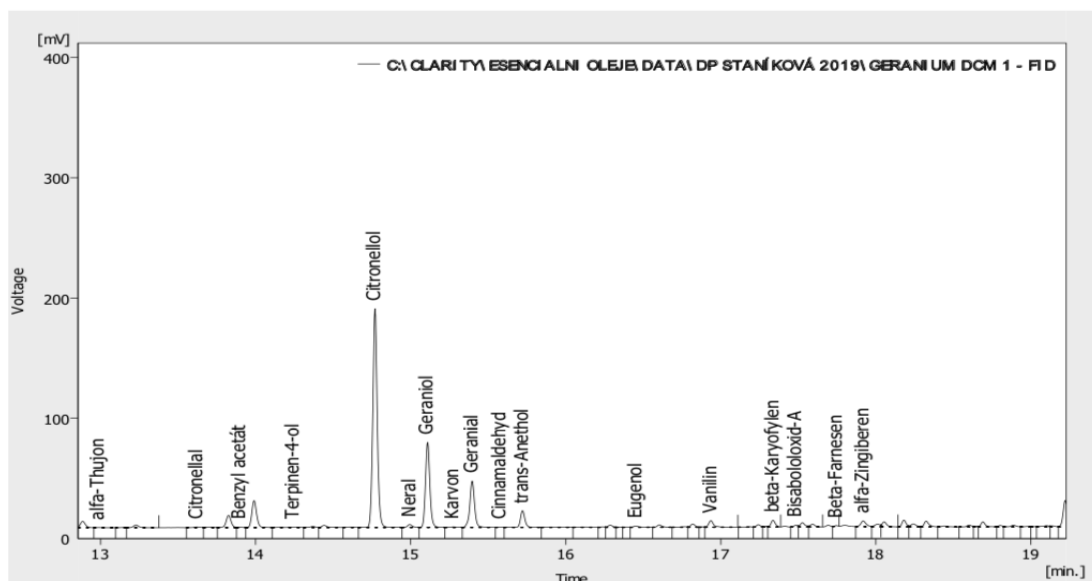
Tabuľkové hodnoty jednotlivých konstituentov esenciálneho oleja Geranium sú nasledovné: citronellol 24,8-27,7%, geraniol 15,7-18,0%, linalool 0,5-8,6 %, citronellyl formate 6,5-6,7 %, isomenthone 5,7-6,1 %, 10-epi- γ -eudesmol 5,5-5,7 %, geranyl formate 3,6-3,7 %, geranyl butyrate 1,5-1,9 %, geranyl tiglate 1,5-1,9 %, β -karyofylen 1,2-1,3 %, Guaia-6,9-diene 0,3-1,2 %, germacrene D 0,3-1,2 %, geranyl propionate 1,0-1,1 %, (Z)-Rose oxide 0,9-1,0 %, 2-phenylethyl butyrate 0-1,0 %.

Z nameraných hodnôt sa zistilo, že najobsiahlejšia zložka v esenciálnom oleji Geranium je citronellol s obsahom 33,4 %. Táto hodnota prevyšuje hodnoty uvedené v štandarde. Príčina veľkej odchýlky nameraných hodnôt a štandardu môže byť zapríčinená chybami pri meraní,

klimatickými alebo pestovateľskými podmienkami. Ďalší z hlavných konstituentov je geraniol s obsahom 13 %, ktorý odpovedá intervalu tabuľkových hodnôt. Medzi ďalšie konstituenty patri linalool s obsahom 4,3 % a β -karyofylen s obsahom 1,2. Obidve zložky sú v intervale s porovnávaným štandardom. Geranial s obsahom 7,9 % a benzyl acetát s obsahom 2,2 % v porovnávačej literatúre neboli uvedené. Obsah ďalších tabulovaných konstituentov nemožno kvantitatívne popísať, z dôvodu chýbajúcich štandardov pre ich stanovenie.

Tab. 3 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Geranium

Esenciálny olej - Geranium					
Názov zložky	Retenčný čas [min]	Plocha [%]	Názov zložky	Retenčný čas [min]	Plocha [%]
α -Pinen	8,723	0,6	Geranial	15,403	7,9
β -Myrcen	9,95	0,1	trans-Anethol	15,727	2,7
p-Cymen	10,97	0,1	Eugenol	16,457	0,2
Limonen	11,103	0,2	Vanilin	16,94	1,3
Linalool	12,633	4,3	β -Karyofylen	17,34	1,2
Citronellal	13,63	0,1	Bisabololoxid-A	17,417	0,2
Benzyl acetát	13,833	2,2	α -Humulen	17,697	0,3
Terpinen-4-ol	14,247	0,1	β -Farnesen	17,747	0,3
Citronellol	14,773	33,4	α -Zingiberen	17,92	1,9
Geraniol	15,113	13	Benzyl benzoát	20,423	0,1
Karvon	15,28	0,2			



Obr. 11 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Geranium

6.2.2 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Ylang-ylang

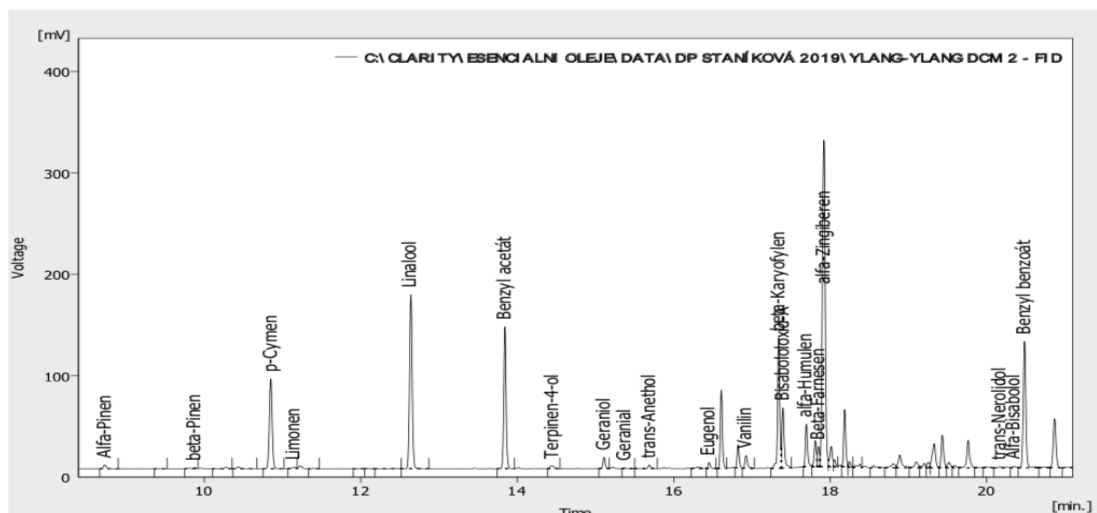
Tabuľkové hodnoty štandardov jednotlivých konstituentov esenciálneho oleja Ylang-ylang z porovnávaného zdroja [20] sú nasledovné:

Germacrene D 28,2 %, benzyl benzoate 9,1 %, (E,E)- α -farnesene 8,6 %, benzyl 7,9 %, linalool 7,4 %, β -Karyofylen 7,1 %, geranyl acetate 3,7 %, p-cresyl methyl ether 3,3 %, (E,E)-farnesyl acetate 2,6 %, α -caryophyllene 2,5 %, (E)-cinammyl acetate 2,4 %, (E,E)-farnesol 2,3 %, methyl benzoate 2,0 %, (Z)-3-hexen-1-yl- benzoate, 1,6 %, bicyclogermacrene 1,0 %, α -cadinol 1,0 %, 3-methyl-2-bute-1-yl acetate 1,0 %, isoeugenol 0,2 %.

Z nameraných hodnôt vyplýva, že najobsiahlejšia zložka esenciálneho oleja Ylang-ylang je α -Zingiberen s obsahom 20,7 %. Tento konstituent sa nenachádza v porovnávacích štandardoch, ani vo vyhľadávanej literatúre. Konstituent sa mohol dostať do vzorku pri výrobných procesoch esenciálneho oleja alebo chybou, ktorá mohla nastať pri meraní. Ďalší z najobsiahlejších konstituentov je linalool s obsahom 9,9 %, ktorý je vyšší ako hodnoty zo štandardu. Hodnotu zložky β -Karyofylen bola nameraná v obsahu 9,2 %, ktorá bola taktiež vyššia ako hodnoty štandardu. Benzyl acetát bol nameraný v obsahu 6,9 % a benzyl benzoát v obsahu 7,2. V obidvoch prípadoch je obsah konstituentov nižší ako sa udáva v štandardoch. Rozdielnosť porovnávacích hodnôt mohlo byť spôsobené nepresnosťou merania, prípadne nesprávnym odpočítaním. Taktiež je treba zdôrazniť podmienky pestovania východzej suroviny, na ktorej je obsah konstituentov závislý. Obsah ďalších tabulovaných konstituentov nemožno kvantitatívne popísať, z dôvodu chýbajúcich štandardov pre ich stanovenie.

Tab. 4 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Ylang-ylang

Esenciálny olej - Ylang-Ylang					
Názov zložky	Retenčný čas [min]	Plocha [%]	Názov zložky	Retenčný čas [min]	Plocha [%]
α -Pinen	8,73	0,2	trans-Anethol	15,687	0,2
β -Pinen	9,88	0,1	Eugenol	16,453	0,3
β -Myrcen	9,953	0,1	Vanilin	16,923	0,8
p-Cymen	10,85	5,4	β -Karyofylen	17,34	9,2
Limonen	11,147	0,1	α -Humulen	17,697	2,3
Eukalyptol	11,23	0,2	β -Farnesen	17,85	1
Linalool	12,64	9,9	α -Zingiberen	17,92	20,7
Benzyl acetát	13,843	6,9	trans-Nerolidol	20,17	0,3
Terpinen-4-ol	14,447	0,2	α -Bisabolol	20,35	0,2
Geraniol	15,11	0,6	Benzyl benzoát	20,483	7,2
Karvon	15,22	0,1			



Obr. 12 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Ylang-ylang

6.3 Stanovenie povrchového napätia

Namerané výsledky povrchového napätia sú uvedené v nasledujúcich tabuľkách. Boli namerané hodnoty povrchového napätia u troch molekulových hmotností HYA, HYA+TWEEN a HYA+TWEEN+esenciálny olej. V prípade vzoriek HYA môžeme konštatovať, že došlo ku zníženiu povrchového napätia oproti rozpúšťadlu (vody). Výraznú odchýlku od tohto tvrdenia je možné nájsť pre vzorku HYA o molekulovej hmotnosti 600 kDa. V tomto prípade úbytok povrchového napätia bol oproti rozpúšťadlu nepatrný. Tento výsledok mohol byť spôsobený nepresnou prípravou meranej vzorky alebo nedokonalým vyčistením meranej platinovej doštičky. Môžeme však povedať, že vzorka bola meraná opakovane, kde došlo k odčítaniu rovnakých hodnôt. V prípade roztoku HYA+TWEEN 85 došlo k ďalšiemu výraznému zníženiu hodnôt povrchového napätia. Hodnoty týchto povrchových napätí oscilujú okolo 37 mN/m a táto hodnota nezávisí na molekulovej hmotnosti kyseliny hyalurónovej. V prípade prídavku rastlinných extraktov dochádza k ďalšiemu zníženiu povrchového napätia. V prípade esenciálneho oleja elemi bola dosiahnutá hodnota 30,9 mN/m pre roztok HYA o molekulovej hmotnosti 243 kDa. V prípade HYA o molekulovej hmotnosti 600 kDa bola nameraná hodnota 31,8 mN/m a pre HYA 1180 kDa hodnota 33,9 mN/m. Z týchto výsledkov plynie, že so znižujúcou sa molekulárnou hmotnosťou HYA klesá v prípade esenciálneho oleja Elemi aj povrchové napätie výsadného roztoku. Podobný trend môžeme pozorovať aj pre esenciálny olej Geranium. Je však nutnosť zdôrazniť, že rozptyl hodnôt povrchového napätia v závislosti na molekulovej hmotnosti HYA, nie je vý-

razný. V prípade esenciálneho oleja Ylang-ylang dochádza k rovnakým záverom. To znamená, že hodnota povrchového napätí roztoku klesá so znižujúcou molekulovou hmotnosťou použitej kyseliny hyalurónovej.

Tab. 5 Namerané hodnoty povrchového napätia

Molekulová hmotnosť vzorky 243kDa		Molekulová hmotnosť vzorky 600kDa		Molekulová hmotnosť vzorky 1180kDa	
Vzorka	IFT [N/m]	Vzorka	IFT [N/m]	Vzorka	IFT [N/m]
HYA	57,7±0,07	HYA	70,20±0,09	HYA	59,50±0,29
HYA+TWEEN	37,80±0,05	HYA+TWEEN	36,90±0,09	HYA+TWEEN	37,50±0,19
HYA+TWEEN+ELEMI	30,90±0,06	HYA+TWEEN+ELEMI	31,80±0,09	HYA+TWEEN+ELEMI	33,90±0,17
HYA+TWEEN+GERANIUM	31,10±0,07	HYA+TWEEN+GERANIUM	31,50±0,08	HYA+TWEEN+GERANIUM	32,40±0,13
HYA+TWEEN+YLANG-YLANG	32,50±0,09	HYA+TWEEN+YLANG-YLANG	33,60±0,09	HYA+TWEEN+YLANG-YLANG	35,8±0,2

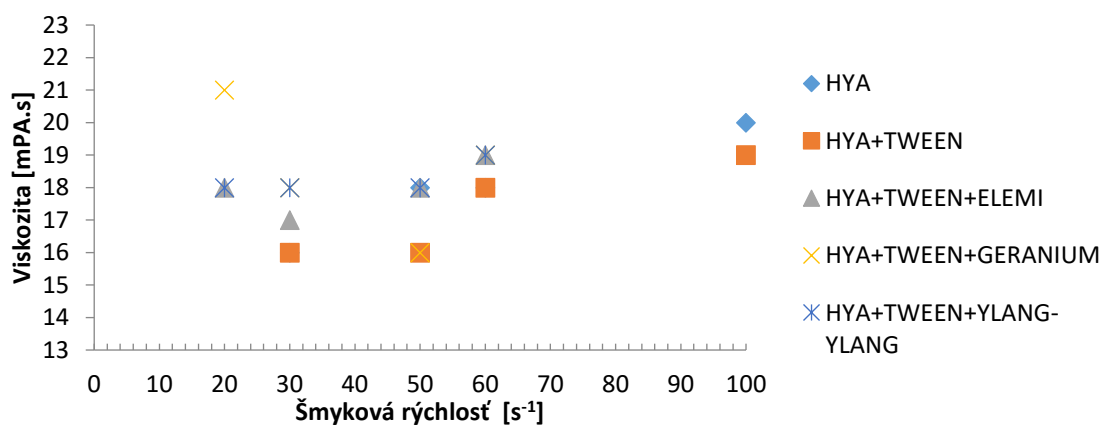
6.4 Stanovenie viskozity

Výsledky merania viskozity vzoriek sú uvedené v tabuľkách a grafoch vyššie. Z nameraných výsledkov plynie, že viskozita roztoku HYA veľmi výrazne závisí na jeho molekulovej hmotnosti. V prípade molekulovej hmotnosti 243 kDa sa pohybuje okolo 18 mPa.s, pre 600 kDa je to približne 95 mPa.s, a pre molekulovú hmotnosť 1180 kDa dosahuje hodnota viskozity približne 1000 mPa.s. Tento výsledok odpovedá tabuľkovým hodnotám a praktickému použitiu HYA. Je zrejmé, že pre rôzne aplikácie sú potrebné rôzne viskozity kozmetických prostriedkov. Našou úlohou bolo, skúmať vplyv pridaných prírodných extraktov na celkovú hodnotu viskozity, to znamená sledovanie jej vzájomnej interakcie. Z nameraných výsledkov vyplýva, že HYA o molekulovej hmotnosti 243 kDa nedochádza k žiadnym výrazným zmenám viskozity so zmenou zloženia meraného roztoku. Inak povedané, prídavok tenzidu tween 85 a prídavok esenciálnych olejov Elemi, Geranium, Ylang-ylang výrazným spôsobom nemení hodnotu viskozity vzoriek. K podobnému záveru dochádza aj v prípade HYA o molekulovej hmotnosti 600 kDa. Z nameraných výsledkov plynie, že dokonca s prídavkom surfaktantu Tween 85 dochádza k miernemu nárastu hodnôt viskozity, čo platí aj pre prídavok esenciálneho oleja Elemi a Ylang-ylang. V prípade esenciálneho oleja Geranium viskozita naopak mierne klesla. Celkom rozdielny záver plynie z merania viskozity HYA o molekulovej hmotnosti 1180 kDa. Z nameraných hodnôt je zrejmé, že prídavok tenzidu Tweenu 85 výrazne znižuje hodnoty viskozity z pôvodných približne 1000 mPa.s na 680 mPa.s. Tento úbytok môže byť dôsledkom vzájomnej interakcie surfaktantu a reťazca polysacharidu o takto vysoké molekulové hmotnosti. Ďalej je nutné povedať, že hodnoty

viskozity sa stále znižujú aj s prídavkom esenciálnych olejov. K najväčšiemu poklesu nameranej viskozity došlo v prípade prídavku esenciálneho oleja Geranium, kde namerané hodnoty dosahovali približne 500 mPa.s., čo je polovica hodnoty viskozity pre pôvodný roztok HYA.

Tab. 6 Namerané hodnoty viskozity (243kDa)

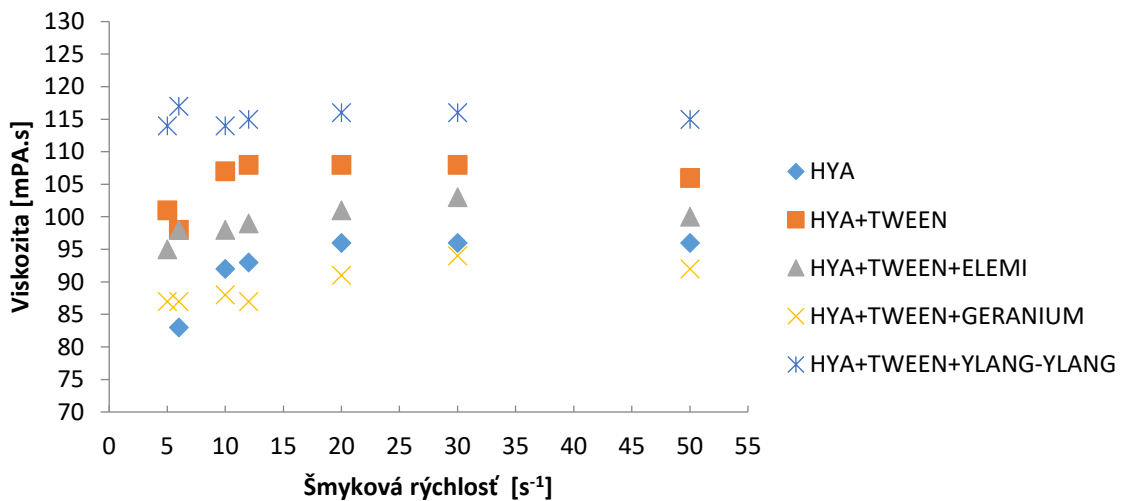
Molekulová hmotnosť vzorky 243kDa		
Vzorka	Šmyková rýchlosť [s ⁻¹]	Viskozita [mPA.s]
HYA	30	16
	50	18
	60	18
	100	20
HYA+TWEEN	30	16
	50	16
	60	18
	100	19
HYA+TWEEN+ELEMI	20	18
	30	17
	50	18
	60	19
HYA+TWEEN+GERANIUM	20	21
	30	18
	50	16
	60	19
HYA+TWEEN+YLANG-YLANG	20	18
	30	18
	50	18
	60	19



Obr. 13 Graf závislosti viskozity na šmykovej rýchlosti (243kDa)

Tab. 7 Namerané hodnoty viskozity (600kDa)

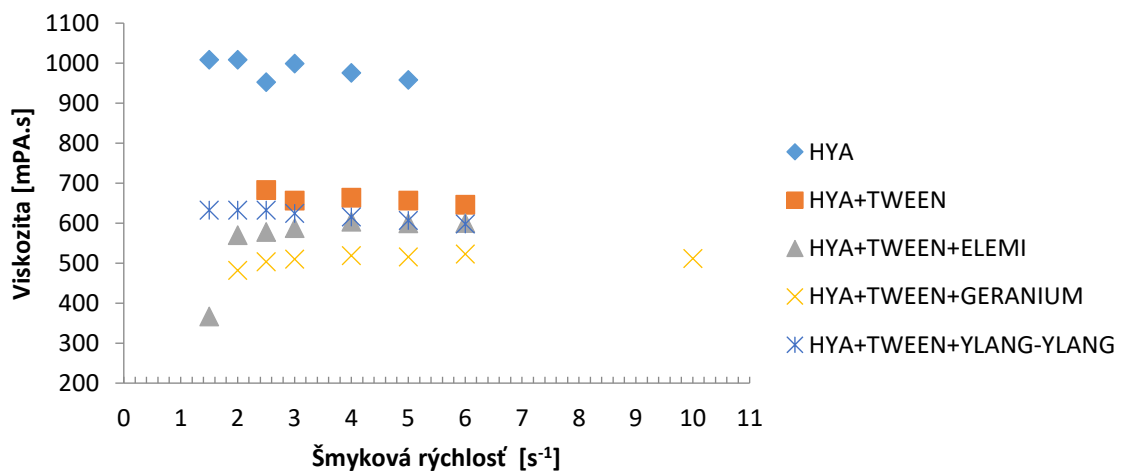
Molekulová hmotnosť vzorky 600kDa					
Vzorka	Šmyková rychlost' [s ⁻¹]	Viskozita [mPA.s]	Vzorka	Šmyková rychlost' [s ⁻¹]	Viskozita [mPA.s]
HYA	6	83	HYA+TWEEN+GERANIUM	5	87
	10	92		6	87
	12	93		10	88
	20	96		12	87
	30	96		20	91
	50	96		30	94
HYA+TWEEN	5	101	HYA+TWEEN+YLANG-YLANG	50	92
	6	98		5	114
	10	107		6	117
	12	108		10	114
	20	108		12	115
	30	108		20	116
HYA+TWEEN+ELEMI	50	106		30	116
	5	95		50	115
	6	98			
	10	98			
	12	99			
	20	101			
	30	103			
	50	100			



Obr. 14 Graf závislosti viskozity na šmykovej rýchlosti (600kDa)

Tab. 8 Namerané hodnoty viskozity (1180kDa)

Molekulová hmotnosť vzoriek 1180kDa					
Vzorka	Šmyková rýchlosť [s ⁻¹]	Viskozita [mPA.s]	Vzorka	Šmyková rýchlosť [s ⁻¹]	Viskozita [mPA.s]
HYA	1,5	1009	HYA+TWEEN+GERANIUM	2	482
	2	1009		2,5	504
	2,5	953		3	510
	3	999		4	519
	4	976		5	516
	5	958		6	523
HYA+TWEEN	2,5	683		10	512
	3	657	HYA+TWEEN+YLANG-YLANG	1,5	633
	4	664		2	633
	5	657		2,5	633
6	646	3		625	
HYA+TWEEN+ELEMI	1,5	367		4	616
	2	570		5	607
	2,5	578	6	598	
	3	588			
	4	604			
	5	600			
	6	601			



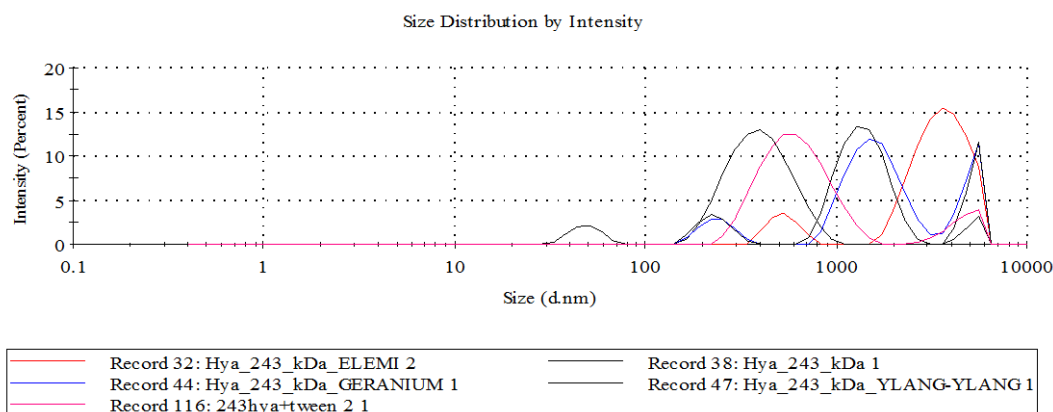
Obr. 15 Graf závislosti viskozity na šmykovej rýchlosti (1180kDa)

6.5 Stanovenie veľkosti častíc

Pre nami pripravené vzorky bola meraná hodnota veľkosti častíc pomocou prístroja Zetasizer. Výsledné hodnoty sú súhrne uvedené v nasledujúcej tabuľke distribučná funkcia veľkosti častíc je graficky znázornená v nasledujúcich grafoch. Z výsledkov plynie, že pre HYA 1180 kDa a 600 kDa vychádza hodnota veľkosti častíc na samotnej hranici merateľnosti, prípadne až za ňou. Rovnako to môžeme povedať o všetkých ďalších vzorkách, ktoré z týchto roztokov vychádzajú. Jedinou hodnovernou merateľnou vzorkou bola HYA o molekulovej hmotnosti 243 kDa. Z výsledkov plynie, že priemerná veľkosť častíc bola 326,6 nm. Po pridaní surfaktantu Tween 85 došlo vzájomnou interakciou k nárastu strednej hodnoty veľkosti častíc na 567 nm. Po prídavku prírodných extraktov došlo vplyvom interakcie k ďalšiemu významnému nárastu strednej hodnoty veľkosti častíc, tak ako je uvedené v tabuľke (Tab. 9). Je nutné poznamenať že uvedené hodnoty nie sú u týchto troch vzoriek celkom presné, lebo sa nachádzajú na samotnej hranici merateľnosti prístroja. Obecne však môžeme povedať, že používané esenciálne oleje vplyvom interakcie s HYA výrazne zvyšuje jej veľkosť častíc.

Tab. 9 Namerané hodnoty veľkosti častíc (243kDa)

Molekulová hmotnosť vzoriek 243kDa	
Vzorka	Veľkosť častíc [d.nm]
HYA	326,6
HYA+TWEEN	567
HYA+TWEEN+ELEMI	2341
HYA+TWEEN+GERANIUM	1775
HYA+TWEEN+YLANG-YLANG	1664



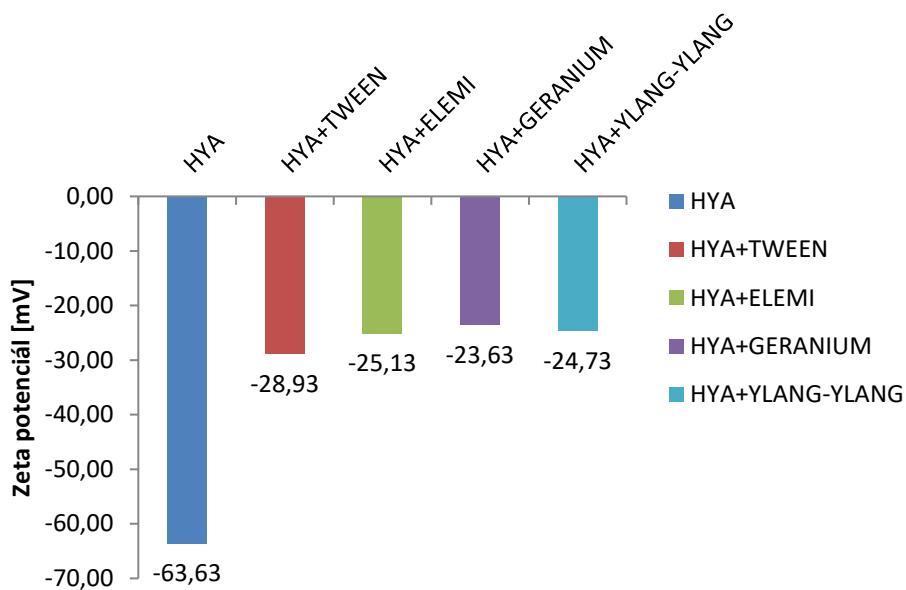
Obr. 16 Graf nameraných hodnôt veľkosti častíc (243kDa)

6.6 Stanovenie zeta potenciálu

Pre všetky vzorky bola nameraná hodnota zeta potenciálu. Namerané výsledky sú spracované do následných tabuliek. Z nameraných výsledkov vyplýva, že roztoky HYA vykazujú pomerne vysokú stabilitu. Podľa očakávania hodnoty zeta potenciálu nadobúdajú veľkosti menej než -50mV . Po prídavku surfaktantu Tweenu 85 dochádza ku zvýšeniu hodnôt zeta potenciálu. To znamená, že stabilita klesá. Je nutné zdôrazniť, že najväčší vplyv má prídavok surfaktantu na HYA o molekulárnej hmotnosti 243 kDa, kde hodnota zeta potenciálu zrástla z $-63,63\text{ mV}$ na $-28,93\text{ mV}$. V prípade HYA molekulárnej hmotnosti 600 kDa bol tento rozdiel nižší. Rast sme zaznamenali z $-51,1\text{ mV}$ na $-41,83\text{ mV}$. V prípade HYA o molekulárnej hmotnosti 1180 kDa došlo k zvýšeniu zeta potenciálu z $-67,8\text{ mV}$ na $-51,50\text{ mV}$. Namerané výsledky naznačujú, že v prípade veľmi krátkych dĺžkach reťazca môže mať prídavok surfaktantu Tween 85 veľmi výrazný vplyv na ich elektrokinetické vlastnosti. Elektrokinetické vlastnosti sú ďalej ovplyvnené prídavkom esenciálnych olejov. V prípade roztoku HYA o molekulovej hmotnosti 243 kDa k veľkému nárastu hodnôt zeta potenciálu nedochádza. Iná situácia dochádza pre HYA o molekulovej hmotnosti 600 kDa a 1180 kDa, kde pre esenciálny olej geranium, prichádza k pomerne výraznému rastu. Môžeme zhrnúť, že prídavkom surfaktantu a esenciálnych olejov stabilitu roztoku HYA znižujeme v dôsledku ich interakcie.

Tab. 10 Namerané hodnoty zeta potenciálu (243 kDa)

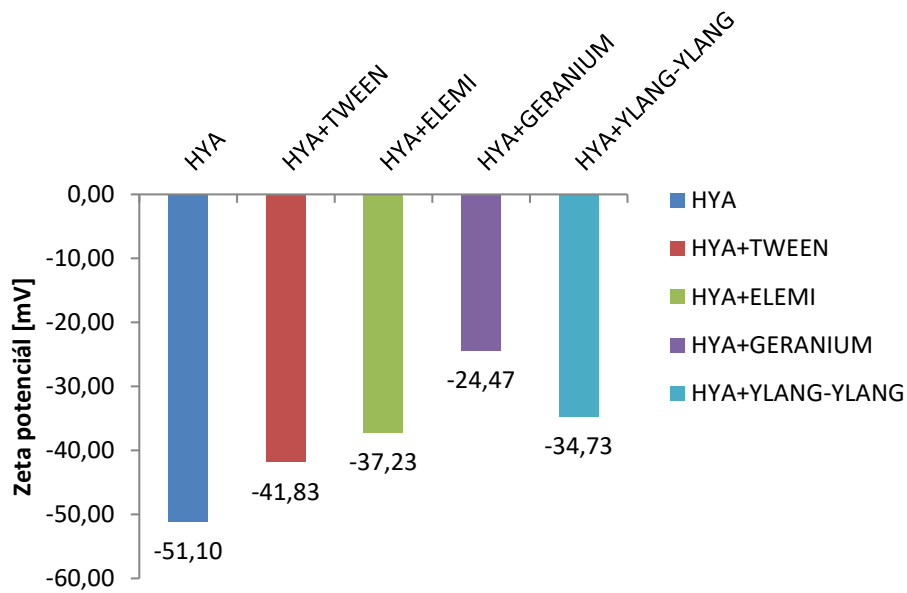
<i>Molekulová hmotnosť vzoriek 243kDa</i>			
Vzorka	Meranie č.	Zeta potenciál [mV]	Ø Zeta potenciál [mV]
HYA	1	-61,8	-63,63±2,32
	2	-62,2	
	3	-66,9	
HYA+TWEEN	1	-29	-28,93±0,25
	2	-28,6	
	3	-29,2	
HYA+ELEMI	1	-26,3	-25,13±1,25
	2	-23,4	
	3	-25,7	
HYA+GERANIUM	1	-23,2	-23,63±0,42
	2	-24,2	
	3	-23,5	
HYA+YLANG-YLANG	1	-24,8	-24,73±0,17
	2	-24,5	
	3	-24,9	



Obr. 17 Graf nameraných hodnôt zeta potenciálu (243 kDa)

Tab. 11 Namerané hodnoty zeta potenciálu (600 kDa)

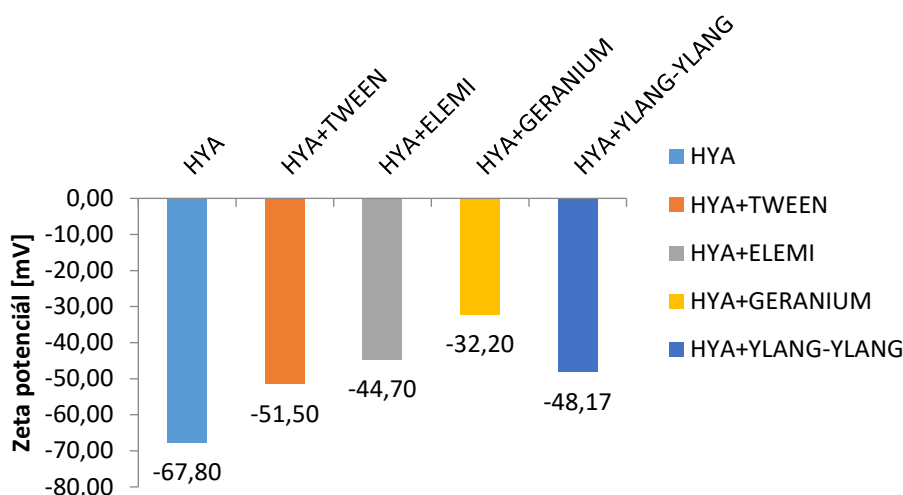
Molekulová hmotnosť vzoriek 600kDa			
Vzorka	Meranie č.	Zeta potenciál [mV]	Ø Zeta potenciál [mV]
HYA	1	-56,3	-51,1±9,17
	2	-38,2	
	3	-58,8	
HYA+TWEEN	1	-40,9	-41,83±0,82
	2	-42,9	
	3	-41,7	
HYA+ELEMI	1	-38,9	-37,23±1,20
	2	-36,7	
	3	-36,1	
HYA+GERANIUM	1	-23,8	-24,46±0,68
	2	-24,2	
	3	-25,4	
HYA+YLANG-YLANG	1	-35,1	-34,73±0,29
	2	-34,7	
	3	-34,4	



Obr. 18 Graf nameraných hodnôt zeta potenciálu (600 kDa)

Tab. 12 Namerané hodnoty zeta potenciálu (1180 kDa)

<i>Molekulová hmotnosť vzoriek 1180kDa</i>			
Vzorka	Meranie č.	Zeta potenciál [mV]	Ø Zeta potenciál [mV]
HYA	1	-68,7	-67,8±2,41
	2	-70,2	
	3	-64,5	
HYA+TWEEN	1	-52,8	-51,5±1,02
	2	-50,3	
	3	-51,4	
HYA+ELEMI	1	-46,2	-44,7±1,31
	2	-44,9	
	3	-43	
HYA+GERANIUM	1	-30,1	-32,2±1,60
	2	-32,5	
	3	-34	
HYA+YLANG-YLANG	1	-47,7	-48,16±1,51
	2	-50,2	
	3	-46,6	



Obr. 19 Graf nameraných hodnôt zeta potenciálu (1180 kDa)

6.7 Stanovenie vodivosti

Hodnoty výsledkov vodivosti roztokov boli zistené konduktometricky.

Namerané výsledky pre jednotlivé vzorky sú v nasledujúcich tabuľkách, kde je zaznamenaná priemerná hodnota pre jednotlivé meranie. Z nameraných výsledkov plynie, že vodivosť roztoku HYA veľmi výrazne závisí na jeho molekulovej hmotnosti. V prípade molekulovej hmotnosti HYA 1180 kDa bola hodnota vodivosti najvyššia. V prípade vzorky HYA o molekulovej hmotnosti 243 kDa a 600 kDa, môžeme povedať, že prídavok surfaktantu Tween 85 hodnotu vodivosti nezmenil, rovnako ako prídavok esenciálnych olejov. V prípade HYA 1180 kDa však dochádza prídavkom surfaktantu k veľmi výraznému poklesu vodivosti. Kde sa jedná o ďalší prídavok esenciálnych olejov, potom sa hodnota príliš nemení. Obecne môžeme konštatovať, že prídavok surfaktantu alebo esenciálnych olejov u všetkých vzoriek HYA nehrá významný vplyv na hodnotu jej vodivosti.

Tab. 13 Namerané hodnoty vodivosti

Molekulová hmotnosť vzoriek 243kDa		Molekulová hmotnosť vzoriek 600kDa		Molekulová hmotnosť vzoriek 1180kDa	
Vzorka	Vodivosť [μ S/cm]	Vzorka	Vodivosť [μ S/cm]	Vzorka	Vodivosť [μ S/cm]
HYA	774	HYA	743	HYA	825
HYA+TWEEN	764	HYA+TWEEN	750	HYA+TWEEN	710
HYA+TWEEN+ ELEMI	764	HYA+TWEEN+ ELEMI	744	HYA+TWEEN+ ELEMI	691
HYA+TWEEN+ GERANIUM	761	HYA+TWEEN+ GERANIUM	747	HYA+TWEEN+ GERANIUM	720
HYA+TWEEN+ YLANG-YLANG	743	HYA+TWEEN+ YLANG-YLANG	750	HYA+TWEEN+ YLANG-YLANG	705

ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bola príprava, charakterizácia a vzájomná interakcia hyaluronových roztokov o molekulových hmotnostiach 243 kDa, 600 kDa a 1180 kDa s esenciálnymi olejmi Elemi, Geranium a Ylang-ylang a s použitým tenzidom Tween 85.

Praktická časť sa venovala chromatografickej analýze esenciálnych olejov Elemi, Geranium, Ylang-ylang od firmy Nobilis, stanovovalo sa zastúpenie jednotlivých konstituentov a ich koncentrácie v esenciálnych olejoch. Výsledky stanovili značné rozdiely medzi nameranými hodnotami a štandardom. Esenciálne oleje sú rastlinné produkty a to znamená, že klimatické, sezónne a geografické podmienky ovplyvňujú koncentráciu zložiek. Rovnako izolačná technika do vysokej miery ovplyvňuje obsah konstituentov esenciálnych olejov.

Ďalšia časť diplomovej práce bola venovaná stanoveniu povrchového napätia Wilhelmyho metódou. Z nameraných výsledkov vyplýva, že povrchové napätie klesá so znižujúcou sa molekulovou hmotnosťou HYA. Po prídavku surfaktantu Tween 85 povrchové napätie výrazne kleslo. Najnižšie hodnoty povrchového napätia boli s prídavkom esenciálnych olejov.

Ďalším sledovaným parametrom bola viskozita, ktorá sa stanovila pomocou rotačného viskozimetra. Z nameraných výsledkov plynie, že viskozita roztoku HYA veľmi výrazne závisí od molekulovej hmotnosti. V prípade HYA (243 kDa) nedochádza k žiadnym výrazným zmenám viskozity so zmenou zloženia meraného roztoku. U vzoriek HYA (600 kDa) prichádza k podobnému záveru. Z nameraných hodnôt plynie, že s prídavkom surfaktantu Tween 85 dochádza k miernemu nárastu hodnôt viskozity, čo platí aj pre prídavok esenciálneho oleja Elemi a Ylang-ylang. V prípade esenciálneho oleja Geranium viskozita naopak mierne klesla. Celkom rozdielny záver plynie z merania viskozity HYA (1180 kDa), kde je zrejmé, že prídavok tenzidu Tween 85 výrazne znižuje hodnoty viskozity. Tento úbytok môže byť dôsledkom vzájomnej interakcie surfaktantu a reťazca polysacharidu o takto vysoké molekulové hmotnosti. Ďalej je nutné povedať, že hodnoty viskozity sa stále znižujú aj s prídavkom esenciálnych olejov.

Pre meranie veľkostí častíc vzoriek bolo použité zariadenie Zetasizer Nano ZS. Hodnoty výsledkov sa vyhodnotili u HYA (243 kDa), u HYA s vyššou molekulovou hmotnosťou (600 kDa, 1180 kDa) sa výsledky nepoužili, pretože boli mimo rozsah merania zariadenia. Z nameraných hodnôt HYA (243 kDa) plynie, že veľkosť častíc sa zvýšila po prídavku surfaktantu Tween 85 a po prídavku prírodných extraktov došlo vplyvom interakcie k ďalšiemu výraznému nárastu hodnoty veľkosti častíc.

Hodnoty zeta potenciálu taktiež vyhodnotilo zariadenie Zetasizer Nano ZS. Zo stanovenia vyplýva, že roztoky hyaluronanov sú stabilné. Po prídavku surfaktanta a esenciálnych olejov prišlo k výraznému vzrastu hodnôt zeta potenciálu. Táto interakcia má výrazný vplyv na jeho elektrokinetické vlastnosti a na zníženie stability roztokov HYA.

V poslednej časti bola konduktometricky meraná vodivosť. Z nameraných výsledkov plynie, že vodivosť roztoku HYA závisí na jeho molekulovej hmotnosti a prídavok tenzidov a prírodných extraktov nemá vplyv na hodnotu jej vodivosti.

Kozmetika s obsahom hyaluronanu je veľmi žiadaná a na kozmetickom trhu existuje široké spektrum výrobkov. V kombinácií s esenciálnymi olejmi tvorí atraktívnu zmes aktívnych látok, ktorá môže byť veľmi účinná pri starostlivosti o pleť a telo a použitá v kozmetických výrobkoch. Štúdium a dosiahnuté výsledky interakcie hyaluronanu sodného a prírodných extraktov môžu byť prínosom pri výrobe kozmetiky.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] VANDAMME, E. J., A. STEINBÜCHEL a S. De BAETS. *Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. Biopolymers, vol. 5. ISBN 3-527-30226-3.
- [2] ALMOND, A. Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Science*. 2007, vol. 64, no. 13, s. 1591-1596. ISSN 1420-682X.
- [3] Hyaluronic acid. Wikipedia [online]. Last edited 2019-04-07 [cit. 2019-04-03].
Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Hyaluronic_acid
- [4] BROWN, M. B. a S. A. JONES. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology*. 2004, vol. 19, iss. 3, s. 308-318. ISSN 1468-3083.
- [5] LAPČÍK, L. jr. et al. Kyselina hyaluronová – příprava, štruktúra, vlastnosti, aplikácia. *Chemické listy*. 1991, roč. 85, č. 3, s. 281-299. ISSN 0009-2770.
- [6] HASCALL, V. C. a T. C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. Dec. 15, 1997, vol. 1, a1 [cit. 2019-04-02]. ISSN 1349-9416.
Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [7] SCOTT, J. E.: Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution: Some Biological Consequences. *Glycoforum* [online]. Mar. 15, 1998, vol. 2, a1 [cit. 2019-04-03]. ISSN 1349-9416. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [8] SLÍVA, J. a J. MINÁRIK. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*. 2009, roč. 4, č. 1-2, s. 75-79. ISSN 1802-1298.
- [9] STUHLMEIER, K. M. Aspects of the biology of hyaluronan, a largely neglected but extremely versatile molecule. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2006, vol. 156, no. 21-22, s. 563-568. ISSN 0043-5341.
- [10] NEČAS, J., L. BARTOŠÍKOVÁ, P. BRAUNER a J. KOLÁR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinari Medicina*. 2008, vol. 53, no. 8, s. 397-411. ISSN 0375-8427.

- [11] LONGAS, O. M. Hyaluronan in Aging. In: Chemistry and Biology of Hyaluronan. Edit. H. Garg a Ch. Hales. Amsterdam: Elsevier Science, 2004, s. 351-366. ISBN 9780080443829.
- [12] LAPČÍK, L. et al. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. Chemical Reviews. 1998, vol. 98, no. 8, s. 2663-2684. ISSN 0009-2665.
- [13] MELANDER, C. a K. TØMMERAAS. HyaCare, Radically Shifting the Paradigm of Hyaluronic Acid Production. Novozymes Biopolymer. 2007, no. 47, s. 6-7.
- [14] MICHL, J. Světové patenty z Dolní Dobruče. Euro. 2006, vol. 39, s. 64–65.
- [15] KURHAJEC, S. et al. Extrakty ako moderná lieková forma pre prírodné liečivá. Chemické listy [online]. 2017, roč. 111, č. 2, s. 251-257 [cit. 2019-04-05]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2017_04_251-257.pdf
- [16] BASER, K. H. C. a G. BUCHBAUER. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Boca Raton: CRC Press, 2010. ISBN 978-1-4200-6315-8.
- [17] SOLGI M. a M. GHORBANPOUR. Application of essential oils and their biological effects on extending the shelf-life and quality of horticultural crops. Trakia Journal of Sciences [online]. 2014, no. 2, s. 198-210 [cit. 2019-04-07]. ISSN 1313-3551. Dostupné z: <http://tru.uni-sz.bg/tsj/Vol.%2012,%20N2,%202014/M.Solgi.pdf>
- [18] CAN BAŞER, K. H. a F. DEMIRCI. Chemistry of Essential Oils. In: Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability. Ed. R. G. Berger. New York: Springer, 2007, s. 43-86. ISBN 978-3-540-49338-9.
- [19] HAMID, A. A. et al. Essential oils: Its medicinal and pharmacological uses. International Journal of Current Research [online]. 2011, vol. 3, iss. 2, s. 86-98 [cit. 2019-03-27]. ISSN 0975-833X. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/229041773_Essential_oils_Its_medicinal_and_pharmacological_uses
- [20] TISSERAND, R. a R. YOUNG. Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals. 2nd Edition. New York: Churchill Livingstone, 2013. ISBN 978-0443062414.
- [21] BULÁNKOVÁ, I. Léčivé rostliny na naší zahradě. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1274-1.

- [22] AL-TAMIMI M. A., B. RASTALL a I. M. ABU-REIDAH. Chemical Composition, Cytotoxic, Apoptotic and Antioxidant Activities of Main Commercial Essential Oils in Palestine: A Comparative Study. *Medicines* [online]. 2016, vol. 3, no. 4 [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2305-6320/3/4/27>
- [23] BAKKALI F. et al. Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, vol. 46, iss. 2, s. 446-475 [cit. 2019-03-29]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>
- [24] BUCKLE J. *Clinical aromatherapy: Essential Oils in Practice*. 2nd Edition. New York: Churchill Livingstone, 2003. ISBN 0-443-07236-1.
- [25] FARRER-HALLSOVÁ, G. *Aromaterapie od A do Z, Podrobný průvodce světem esenciálních olejů*. Praha: Metafor, 2007. ISBN 978-80-7359-086-4.
- [26] BURT S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, vol. 94, iss. 3 [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504001680>
- [27] MCGILVERYOVÁ, C. *Aromaterapie, masáž, jóga*. Praha: Svojtka & Co., 2003. ISBN 80-7237-705-1.
- [28] AMPARO, S. a A. CHISVERT. *Analysis of Cosmetic Products*. Amsterdam: Elsevier Science, 2007. ISBN 978-0-444-52260-3.
- [29] GROSJEANOVÁ, N. *Velká kniha aromaterapie*. Olomouc: Fontána, 2003. ISBN 80-7336-084-5.
- [30] Destilace. Učebnice chemie pro 8. ročník ZŠ [online]. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <http://www.zschemie.euweb.cz/smesi/smesi16.html>
- [31] KANTOVÁ, J. a J. KANT. *Přírodní léčiva: homeopatie, éterické oleje, krystaly, domácí léky*. Bratislava: Slovart, 2004. ISBN 80-7209-547-1.
- [32] MLEJOVÁ, V. et al. Aplikace mikroextrakce tuhou fází pro analýzu bylinných silic. *Chemické listy* [online]. 2010, roč. 104, č. 4, s. 166-171 [cit. 2019-03-29]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_03_166-171.pdf
- [33] TAN, L. T. H. et al. Traditional Uses, Phytochemistry, and Bioactivities of *Cananga odorata* (Ylang-Ylang). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*

- [online]. 2015, vol. 4 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4534619/>
- [34] SHAROPOV, F. S., H. ZHANG a W. N. SETZER. Composition of geranium (Pelargonium graveolens) essential oil from Tajikistan. American Journal of Essential Oils and Natural Products [online]. 2014, vol. 2, no. 2, s. 13-16 [cit. 2019-04-10]. ISSN 2321-9114. Dostupné z: <http://www.essencejournal.com/pdf/2014/vol2issue2/PartA/2-2-8-979.pdf>
- [35] SEDLAŘIKOVÁ, J. Chemie a technologie tenzidů II. [online]. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, [n.d.] [cit.2019-04-30]. Dostupné z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/Services/Downloader.ashx?id=134&disposition=inline>
- [36] BARTOVSKÁ, L. a M. ŠIŠKOVÁ. Co je co v povrchové a koloidní chemii [online]. Verze 1.0. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005 [cit. 2019-04-02]. Kapitola Měření povrchového a mezifázového napětí. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_povrchoveho_a_mezifazoveho_napeti.html
- [37] Kontrolní a zkušební metody [učebný text]. Ústav fyziky a materiálového inženýrství Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně [online]. 2011 [cit. 2017-09-15]. Kapitola 3. Reologie. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_03.pdf
- [38] VISWANATH, S.D. et al. Viscosity of liquids: Theory, estimation, experiment and data. New York: Springer, 2007. ISBN 1-4020-5481-5.
- [39] Mechanika tekutin [učebný text]. Technická univerzita v Košiciach [online]. Last modification 2018-06-22 [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: https://ooze.fberg.tuke.sk/wp-content/uploads/2017/12/Mechanika-tekutin_skripta-1.pdf
- [40] SZABO, E. Meranie viskozity Ubbelohdeovým viskozimetrom a stanovenie aktivačnej energie viskózného toku propán-2-olu [učebný text]. Přírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave [online]. Aktualizované 2017-09-01 [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: https://fns.uniba.sk/fileadmin/prif/chem/kfz/laboratorne-cvi-cenia/Viskozimetria_1.9.2017.pdf
- [41] RENNER, V. Technická měření. Integrovaná střední škola, Slaný [online]. ©2006 [cit. 2019-03-29]. Dostupné z: http://xyz12345.wz.cz/tmr/zkousky_provoz_mat.html

- [42] TOMAN, Michal. Srovnání výsledků měření viskozity "nenewtonských" kapalin získaných různými metodami měření [online]. Brno, 2008 [cit. 2019-04-13]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Daniel Vlk. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/cq5wn/>
- [43] COWMAN, M. a S. MATSUOKA. Experimental Approaches to Hyaluronan Structure. Carbohydrate Research [online]. 2005, vol. 340, no. 5, s. 791-809 [cit. 2019-03-29]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/7955330_Experimental_approach_to_hyaluronan_structure
- [44] DLS technical note, MRK 656-01, Dynamic light scattering: an introduction in 30 min. In: Malver Instruments [online]. [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: https://warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/intro_to_dls.pdf
- [45] BRAR S.K. a M. VERMA. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. Trends in analytical chemistry [online]. 2011, vol. 30, no. 1, s. 4-17 [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/223882009_Measurement_of_nanoparticles_by_light-scattering_techniques
- [46] MARSALEK, R. Zeta Potential – Applications. IPCBEE - International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering [online]. 2012, vol. 35, s. 15-19 [cit. 2019-04-03]. ISSN 2010-4618. Dostupné z: <http://www.ipcbee.com/vol35/004-ICEII2012-E007.pdf>
- [47] Zeta potenciál zeta. Malvern Zetasizer Nano ZS [online]. Department of Condensed Matter Physics Faculty of Mathematics and Physics, Charles University [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [48] LABUDA, Ján et al. Analytická chémia. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2014. ISBN 978-80227-4242-9.

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

COOH	Karboxylová kyselina
HA	Kyselina hyalurónová
HYA	Hyaluronan sodný
OH	Hydroxylová skupina
UV	Ultrafialové žiarenie
O ₂	Kyslík
IBSA	Spoločnosť Institut Biochimique SA zo Švajčiarska
SFE	Superkritická fluidná extrakcia
CO ₂	Oxid uhličitý
GC	Plynová chromatografia
FID	Plameňový ionizačný detektor
DLS	Dynamický rozptyl svetla
ZP	Zeta potenciál

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1 Štruktúra kyseliny hyalurónovej [3]	15
Obr.2 a) primárna štruktúra kyseliny hyalurónovej, b) sekundárna štruktúra kyseliny hyalurónovej, c) schematické znázornenie siete molekuly kyseliny hyalurónovej ako výsledok intermolekulárnych interakcií [4].....	16
Obr. 3 Schéma destilácie vodnou parou [30].....	32
Obr. 4 Analyzované esenciálne oleje.....	42
Obr. 5 Plynový chromatograf DANI master GC Fast Gas Chromatograph	42
Obr. 6 Tenziometer Krüss K20 Easydyne	45
Obr. 7 Viskozimeter Myr V2-L	48
Obr. 8 Zetasizer Nano ZS	51
Obr. 9 Konduktometer inoLab Cond 7110	52
Obr. 10 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Elemi	54
Obr. 11 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Geranium	55
Obr. 12 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Ylang-ylang	57
Obr. 13 Graf závislosti viskozity na šmykovej rýchlosti (243kDa)	59
Obr. 14 Graf závislosti viskozity na šmykovej rýchlosti (600kDa)	60
Obr. 15 Graf závislosti viskozity na šmykovej rýchlosti (1180kDa)	61
Obr. 16 Graf nameraných hodnôt veľkosti častíc (243kDa).....	62
Obr. 17 Graf nameraných hodnôt zeta potenciálu (243 kDa).....	64
Obr. 18 Graf nameraných hodnôt zeta potenciálu (600 kDa).....	65
Obr. 19 Graf nameraných hodnôt zeta potenciálu (1180 kDa).....	66

ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1 Príprava vzoriek.....	39
Tab. 2 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Elemi	54
Tab. 3 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Geranium	55
Tab. 4 Chromatografická analýza esenciálneho oleja Ylang-ylang	56
Tab. 5 Namerané hodnoty povrchového napätia	58
Tab. 6 Namerané hodnoty viskozity (243kDa).....	59
Tab. 7 Namerané hodnoty viskozity (600kDa).....	60
Tab. 8 Namerané hodnoty viskozity (1180kDa).....	61
Tab. 9 Namerané hodnoty veľkosti častíc (243kDa)	62
Tab. 10 Namerané hodnoty zeta potenciálu (243 kDa)	63
Tab. 11 Namerané hodnoty zeta potenciálu (600 kDa)	64
Tab. 12 Namerané hodnoty zeta potenciálu (1180 kDa)	65
Tab. 13 Namerané hodnoty vodivosti.....	66