SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 19.12.94

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/171 798

(32) Dátum priority: 22.12.93

(33) Krajina priority: US

(40) Dátum zverejnenia: 05.03.97

(86) Číslo PCT: PCT/US94/14662, 19.12.94

(21) Číslo dokumentu:

790-96

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6] :

A 61K 7/16
A 61K 7/28
A 61K 7/20
A 61K 7/30

(71) Prihlasovateľ: SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION, Philadelphia, PA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Gallopo Andrew Robert, Garfield, NJ, US;
Ibrahim Nadir Iskanda, Hackettstown, NJ, US;
Mazzanobile Salvatore, Haworth, NJ, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Zmes na redukciu alebo odstraňovanie usadených povlakov zo zubov a dentálnych protéz**

(57) Anotácia:
Kompozície na bielenie chrupu a dentálnych protéz obsahujú vo vode rozpustný tripolyfosforečnan alkalického kovu za prítomnosti alebo bez prítomnosti zdroja aktívneho kyslíka a enzymatického hydrolytického činidla.

PV 790-96

Zmes na redukciu alebo odstraňovanie usadených povlakov zo zubov a dentálnych protéz

Oblasť techniky

Vynález sa týka systému na bielenie prirodzených zubov a dentálnych protéz. Bielenie sa dosiahne použitím 5 až 25 % hmotnostných tripolyfosforečnanu alkalického kovu v dentálne prípustnom nosiči, ak sa použije iba samotný tripolyfosforečnan. Uvedený fosforečnan sa môže kombinovať so zlúčeninou, ktorá poskytuje aktívny kyslík a/alebo s enzymatickým hydrolytickým činidlom; uvedený polyfosforečnan môže byť v uvedenej zmesi s jednou alebo obidvomi látkami prítomný v množstve 1 až 25 % hmotnostných. V tomto vynáleze sa môže využiť akákoľvek orálne prípustná formulácia alebo formulácia, vhodná na dentálne protézy.

Doterajší stav techniky

Na nevhodnom sfarbovaní zubnej skloviny sa podiela niekoľko faktorov, z ktorých sa tri považujú za hlavné: i) vznik povlakov a zubného kameňa na povrchu zubov a v týchto povlakoch sa zachytávajú farbivá, ii) užívanie niektorých liečiv počas rastu zubov a iii) sfarbenie spôsobované poranením ústnej dutiny s následným vsiaknutím rozkladných produktov krvi do mineralizovanej oblasti zubov v období tvorby skloviny. Tento vynález sa prvotne týka prvého faktora alebo príčiny zmeny farby zubov, to znamená pôsobením prírodného farbiva, ktoré sa nahromaďuje na povrchu zubov.

Na bielenie zubov z kozmetického hľadiska, najmä na obnovenie jasu a lesku zubnej skloviny, ktorá je sfarbená látkami, zachytenými na povrchu zubov sa vyvinuli voľne prístupné prostriedky; v spojitosti s reklamnými účelmi a inzerciou sa u týchto prostriedkov používa tiež výraz zjasňovanie farby zubov. Hoci všetky zubné pasty a ústne vody obsahujú rôzne čistiace a leštiace prísady, niektoré usadeniny

na sklovine odolávajú týmto prísadám a nepodarí sa ich bežným spôsobom celkom odstrániť. Tieto prípravky nemusia byť tiež formulované vzhľadom na množstvo alebo druh činidla na úplné odstránenie sfarbenia alebo zožltnutia, ktoré sa vytvorilo nadmerným pôsobením farbiacej látky. Napríklad u fajčiarov sa často vytvorí sfarbená sklovina v dôsledku účinku dechtov a častíc v exhalovanom cigaretovom dyme, zachytávaných na zuboch. Ďalej značný počet potravín môže sfarbovať alebo znehodnocovať prirodzenú farbu zubnej skloviny. Jedným z príkladov môže byť konzumácia čaju ako nápoja, z ktorého sa na zubnú sklovinu ukladajú taníny vo forme čajovej usadeniny. Niektoré liečiva môžu spôsobovať sfarbovanie alebo žltnutie zubov vnikaním do zubnej hmoty, hoci tento typ sfarbovania zubov nebýva bežnou príčinou zmeny farby chrupu.

V súčasnosti sa bežne používajú tri prístupy na bielenie zubnej skloviny. Tieto spôsoby sú založené na použití abrazív, na využití oxidačných činidiel, alebo na využití hydrolytického javu na odstránenie sfarbenej hmoty, napríklad použitím produktov na báze enzýmov.

Prvý prístup je v zásade fyzikálne obrusovanie, ktorým sa má odstrániť sfarbená hmota. Na tento účel sa využívajú ostrejšie abrazíva ako sa bežne používajú v zubných pastách a môžu sa tiež označovať ako leštiace prísady. Väčšina a možno všetky tieto prípravky sú vo forme zubných pást, gélov alebo zubných čistiacich práškov a vyžadujú bezprostredný dotyk so zubami. Na úspešné odstránenie sfarbenia je nutný doplnkový účinok zubnej kefky alebo obdobné drhnutia či leštenia. Príkladmi takých výrobkov sú "Smokers Topol", výrobok spoločnosti Topol-Dep Corporation, dodávané pre fajčiarov konzumentom čajov ako prostriedky na odstraňovanie sfrabenia, spôsobeného fajčením, pitím čaju alebo obdobných nápojov.

Oxidačné činidlo predstavuje v USA najviac dodávanú a používanú prísadu do orálnych prípravkov, predávaných ako bielidla skloviny. Všetky také výrobky sú vo forme pást alebo gélov. V USA je v súčasnosti viac ako tridsať takých vý-

robkov, predávaných voľne bez lekárskeho predpisu. Oxidačná látka pôsobí uvoľňovaním radikálu, ktorý odbúrava komplex zubného povlaku s farbivom na produkt, ktorý sa môže vypláchnuť von, alebo odstrániť abrazívnym účinkom. Ak sa majú dosiahnuť dobré výsledky, takéto pôsobenie je časovo náročné; v závislosti od zdroja peroxidu a jeho koncentrácie vyžaduje táto operácia jeden a pol až osem dní, alebo až 2 až 3 mesiace.

Nedávno sa opäť dostali do pozornosti katalytické systémy, ktoré sú balené a predávané v maloobchodnej sieti súčasne s ostatnými výrobkami na starostlivosť o chrup. Katalyzátormi sú proteolytické enzýmy, bližšie sa jedná o papaín. Najmenej jeden výrobca používa druhú účinnú látku, napríklad soľ kyseliny citrónovej. Uvedené výrobky sa dodávajú vo forme pasty alebo gélu a nárokujú si označenie ako prostriedky na bielenie zubov odstraňovaním povlaku, ktorý je prestúpený zachyteným farbivom.

Podstata vynálezu

Tento vynález ponúka jedinečnú alternatívu. Využíva tripolyfosforečnanovú soľ alkalického kovu, voliteľne s peroxidom a/alebo s hydrolytickou prísadou na odstránenie sfarbenia a vybielenie zubnej skloviny.

Tento vynález zahŕňa zmes na zníženie alebo odstránenie povrchových sfarbených usadenín z prirodzených zubov a z dentálnych protéz, ktorá obsahuje dentálne prípustný prípravok, pozostávajúci z asi 5 až 25 % hmotnostných vo vode rozpustného tripolyfosforečnanu alkalického kovu.

Druhým aspektom tohto vynálezu je zmes na zníženie alebo odstránenie povrchových sfarbených usadenín z prirodzených zubov a z dentálnych protéz, ktorá tvorí dentálne prípustný prípravok, pozostávajúci z asi 5 až 25 % hmotnostných vo vode rozpustného tripolyfosforečnanu alkalického kovu, z účinného množstva zdroja aktívneho kyslíka a/alebo účinného množstva enzymatického hydrolytického činidla.

Tento vynález sa naviac týka spôsobu zníženia alebo

odstránenia povrchových sfarbených usadenín z prirodzených zubov alebo z dentálnych protéz. Tento spôsob pozostáva z toho, že sa zuby alebo dentálne protézy so sfarbeným zubným povlakom privádzajú do styku s dentálne prípustnou zmesou, obsahujúcou najmenej asi 1 % hmotnostné až 25 % hmotnostných vo vode rozpustného tripolyfosforečnanu alkalického kovu a účinné množstvo zdroja aktívneho kyslíka a/alebo účinné množstvo enzymatického hydrolytického činidla.

Ťažisko tohto vynálezu je v odstraňovaní rôznych sfarbení, ktoré lipnú na, alebo sa zachytávajú v materiáloch na povrchu zubov alebo zubných protéz. Tento vynález možno uplatniť na prirodzené zuby aj na zubné protézy, napríklad na falošné zuby. Tento vynález tiež možno využiť na predchádzanie vzniku sfarbených povrchov zubov. V podstate sa jedná o opakovane vykonávané odstraňovanie malých podielov novovytvorených usadenín, čo môžu byť vlastné sfarbené usadeniny alebo povlak, ktorý môže zachytávať sfarbené látky. Prevencia usadenín *per se* tu nemôže byť zahrnutá, ale nie je vylúčená. To znamená, že pôsobenie prípravkov podľa tohto patentu môže nejakým spôsobom chrániť proti sfarbovaniu alebo zachytávaniu sfarbenia. Či sa jedná o jeden alebo o obidva javy nie je tak dôležité ako skutočnosť, že pravidelným používaním uvedených prípravkov sa môže dosiahnuť stav, kedy používateľ ani nepostrehne, že by jeho, alebo jej zuby boli sfarbené. Pravidelné používanie uvedených prípravkov môže chrániť pred znovuvytvorením podmienok na vznik sfarbených usadenín.

Výraz sfarbené alebo sfarbenie sa tu používa zameniteľne s výrazom zmena farby a vo všeobecnosti znamená, že povrch zubnej skloviny (alebo protézy) dostáva neželané alebo neprirodzené sfarbenie, odlišné od sfarbenia pod ním sa nachádzajúcej skloviny. Tieto výrazy sa uvádzajú preto, aby sa dosiahol ich rovnaký význam v zhode s ich významom v súčasne používanej terminológii v oblastiach ochrany ústnej dutiny a starostlivosti o chrup.

Uvedené prípravky a spôsoby, zverejnené v ďalšom texte sú zamerané na používanie človekom, hoci tieto prípravky sa

môžu rovnako dobre použiť aj u iných druhov, napríklad vo výrobkoch určených na starostlivosť o domáce zvieratá.

Prvotná účinná zložka podľa tohto vynálezu zahrnuje vo vode rozpustný tripolyfosforečnan alkalického kovu. Výhodná je sodná forma tejto soli, hoci sa môže použiť výhodne aj draselná soľ alebo zmesná sodná a draselná soľ. Táto látka sa môže použiť v akejkoľvek forme, napríklad ako hydrát alebo v dehydratovanej forme.

Podiel tripolyfosforečnanovej soli bude medzi 5 až 15 % hmotnostnými z prípravku, ak sa uvedená soľ použije samotná v tuhom prípravku, čo znamená, že v uvedených hraniciach nie je ani jedno z ďalších dvoch uvedených účinných činidiel. Tuhý prípravok zahŕňa pastu, gél, prášok a podobné formulácie. Výhodný podiel uvedenej soli je približne 10 % hmotnostných, opäť, ak sa táto soľ v tuhom prípravku použije samotná.

V tekutých prípravkoch, napríklad v ústnych vodách a vyplachovacích vodách sa môže tripolyfosforečnan použiť v množstvách medzi 0,1 až 15 % (hmotnosť/objem). Viac výhodné rozmedzie obsahu uvedenej soli v ústnych a vyplachovacích vodách je 1 až 10 % (hmotnosť/objem).

Ak sa do tuhého prípravku, alebo do tekutého prípravku, ako je napríklad ústna voda, pridáva spolu s tripolyfosforečnanom aj peroxyzlúčenina alebo hydrolytický enzým, môže sa tripolyfosforečnan použiť v množstvách medzi 1 a 25 % hmotnostnými v tuhých prípravkoch a v rozmedzí približne 0,1 až 15 % (hmotnosť/objem) v prípravkoch tekutých. Výhodný podiel uvedeného fosforečnanu vo viaczložkových tuhých prípravkoch je medzi 5 až 10 % hmotnostnými, najvýhodnejší jeho podiel okolo 10 %.

Zdroj aktívneho kyslíka znamená látku, obsahujúcu väzbu kyslík-kyslík, ktorá sa môže štiepiť za vzniku aktívneho druhu (druhov) kyslíka. V tomto vynáleze sa pri použití zvýhodňujú peroxidy a hydroperoxidy. Príkladmi výhodných peroxidov sú anorganické peroxidy ako je peroxid vodíka, peruhličitany alkalických kovov, ako sú peruhličitan sodný, draselný a vápenatý; ďalej peroxid sodný, vápenatý, stronc-

natý, bárnatý, zinočnatý alebo horečnatý a perboritany. Môžu sa použiť tiež anorganické soli, ktoré obsahujú peroxid vodíka ako zložku kryštálu ako je napríklad $Na_2CO_3.3H_2O_2$ a $Na_4P_2O_7.nH_2O_2$. Ďalej sa môžu použiť niektoré organické peroxidy. Napríklad sa podľa tohto vynálezu môžu použiť peroxy zlúčeniny ako je kyselina peroctová, benzoylperoxid, monoperftalát horečnatý, m-perchlórbenzoová kyselina a hydroperoxid kumylu. Uvedené látky tvoria iba všeobecný zoznam a nevymedzujú nijakým spôsobom alebo cestou uplatnenie tohto vynálezu z hľadiska toho, aká sa použije zlúčenina s aktívnym kyslíkom.

Koncentrácia týchto zlúčenín s aktívnym kyslíkom (v ďalšom texte označované ako AOCs (Active Oxygen Compounds)), to znamená ich účinné množstvo, sa bude meniť medzi asi 0,01 % a 20 % v konečnej forme zmesi, ak sa určuje práve pred jej kontaktom so zubami alebo protézami. Tieto obsahy sa môžu počítať na základe hmotnosti, keď uvedená AOC je tuhá látka a prípravok je tiež tuhá látka. Ak je AOC kvapalina a prípravok je tuhá látka, potom sa obsah počíta tiež pomocou vyjadrenia hmotnosť/hmotnosť. Kde uvedená AOC je tuhá látka a pridáva sa do kvapaliny, napríklad do ústnej vody, percentuálny obsah sa bude podobne vyjadrovať výpočtom na základe hmotnosť/objem. Ak uvedená AOC a aj konečný výrobok sú obidve kvapaliny, potom sa percentuálny obsah počíta na základe vyjadrenia objem/objem. Vyjadrovanie percentuálnych obsahov v ďalšom texte treba chápať tak, že môže zahŕňať všetky štyri uvedené prípady; výber príslušného vyjadrovania obsahu sa ponecháva na odborníkovi podľa toho, aký prípravok formuluje.

Do uvedených prípravkov sa môžu pridávať enzýmy, ktoré štiepia bielkoviny, tuky alebo cukry. V ďalšom používaný výraz "enzymatické hydrolytické činidlo" sa používa ako skrátený výraz uvedených typov enzýmov. Tieto enzýmy sú dobre známe v oblasti enzymológie. Zvyčajne sa označujú ako proteázy, lipázy alebo amylázy. Početné články a prehľadné štúdie opisujú účinnosť uvedených enzýmov a uvádzajú ich fyzikálne a biologické charakteristiky. Pozri, napríklad,

"Advances in Enzymology and Related Subjects", John Wiley & Sons, Inc., všetky vydania a "Methods in Enzymology" Ac.Press, New York, všetky vydania.

Hydrolytické činidlo môže obsahovať jeden enzým alebo zmes daného typu enzýmov, alebo ešte ďalej zmes dvoch alebo troch typov enzýmov. Výhodné je používať samotné proteázy v kombinácii s ďalšou účinnou látkou (alebo látkami). Najviac sa zvýhodňuje použitie iba jednej proteázy. Možno však kombinovať amylázu alebo lipázu s proteázou, alebo obidva enzýmy sa môžu pridať k proteáze, čím sa získa prostriedok na enzymatické odbúravanie bielkovín, tukov a cukrov.

Všetky hydrolytické činidlá sa môžu kombinovať s tripolyfosforečnanom bez jeho škodlivého účinku na účinnosť enzymatických činidiel, alebo bez účinku enzymatických činidiel na účinnosť tripolyfosforečnanu ako takého. Na účinnosť daných enzýmov môžu vplývať niektoré parametre formulácie, ako je napríklad pH. Je dobre známe, že účinnosť enzýmov je značne ovplyvňovaná hodnotou pH prostredia. Niektoré enzýmy sú napríklad viac účinné pri pH menej ako 7, iné sú zasa najúčinnejšie v neutrálnom prostredí a iné majú najvyššiu účinnosť pri pH väčšom ako 7. Pri formulácii s určitým enzýmom treba nevyhnutne brať v úvahu hodnotu pH, pri ktorej má enzým nyjvyššiu účinnosť. Naviac môže mať pH výrobku pri jeho použití vplyv na výber enzýmu. Niektoré tripolyfosforečnany alkalických kovov, ktoré možno použiť podľa tohto vynálezu sú najviac stále v alkalickej oblasti pH. Potom sa zvýhodňuje použitie enzýmu, ktorý si zachováva svoju účinnosť aj keď je vystavený alkalickému prostrediu, alebo sa zvýhodňuje ochrana enzýmu nejakým spôsobom, ako je napríklad obaľovanie enzýmu alebo jeho plnenie do osobitného obalu, a jeho zmiešanie s fosforečnanom až pri použití.

Niektoré enzýmy, ktoré vyžadujú k svojej funkcii ión ťažkého kovu, nie sú vzhľadom na prítomnosť tripolyfosforečnanu v tomto vynáleze osobitne užitočné. Ale možno prípravok doplniť uvedeným iónom, pričom sa pridá v koncentrácii, zabezpečujúcej účinnosť enzýmu a pritom nepotláča účinok tripolyfosforečnanu na sfarbenie.

V inom uskutočnení sa niektoré enzýmy kombinujú so zložkou poskytujúcou aktívny kyslík, čím sa získa zubný prípravok s tromi aktívnymi zložkami. Oxidačné činidlá ako sú peroxidy, degradujú enzýmy, veľmi rýchlo sa inaktivujú. Zistilo sa však, že u určitých enzýmov nie je rýchlosť degradácie taká vysoká, že by enzýmy celkom a ihneď stratili svoju účinnosť, napríklad za čas kratší ako jedna minúta. Zistilo sa tiež, že zvyšková účinnosť je dostatočne vysoká na hydrolýzu bielkovín a ďalších sfarbených látok v priebehu piatich až desiatich minút. Pretože spôsoby podľa tohoto vynálezu sa vykonávajú bežne za jednu až desať minút, zahrnuje tento vynález tiež trojzložkové prípravky, v ktorých je kombinácia tripolyfosforečnanu, zdroja aktívneho kyslíka a hydrolytické činidlo, ktoré si zachováva použiteľnú účinnosť v uvedenom časovom rámci. Tieto pomerne stále enzýmy sa tu označujú ako v prostredí peroxidu účinné enzýmy.

V prostredí peroxidu účinný enzým je ktorýkoľvek enzým, ktorý má merateľnú účinnosť v 3% (hmotnosť/objem) peroxide vodíka vo vodnom prostredí pri štandardnej teplote a tlaku, čo sa stanoví kolorimetricky spôsobom Azocoll, Tomarelli,R. M., et al., J.Lab.Clin. Med., 34, 428 (1949), alebo spôsobom s dimetylkazeínom na stanovenie proteolytickej účinnosti, ako to opisuje Yaun Lin, et al., J. Biol. Chem., 244,(4) 789-793, (1969).

Stále enzýmy sa môžu odvodiť z akéhokoľvek rastlinného alebo zvieracieho zdroja, vrátane mikrobiálnych zdrojov a cicavcov. Môžu to byť neutrálne, kyslé alebo zásadité enzýmy. Proteolytický enzým bude mať schopnosť čiastočne alebo celou jeho kapacitou hydrolyzovať peptidové amidové väzby. Také enzýmy môžu tiež mať určitú inherentnú lipolytickú a/alebo amylolytickú účinnosť, pridruženú k proteolytickej účinnosti. Výhodné proteolytické enzýmy sú také, ktoré v podstate neobsahujú sulfhydrylové skupiny alebo disulfidové väzby, ktoré môžu reagovať s aktívnym kyslíkom a tak znehodnotiť aktívny kyslík aj vlastnú účinnosť enzýmu, čoho výsledkom je predčasná inaktivácia enzýmu. Môžu sa použiť tiež metaloproteázy, čo sú enzýmy obsahujúce dvojmocný kovo-

vý ión ako je vápnik, horčík alebo zinok, viazaný s proteínom, s predchádzajúcim varovaním, že uvedený fosforečnan môže vplývať na účinnosť takých enzýmov. Viac výhodnou skupinou v peroxidovom prostredí stálych proteolytických enzýmov sú serínové proteázy, najmä tie, ktoré sú odvodené z baktérií Bacillus a Streptomyces a z pliesne *Aspergillus*. V rámci tohto zoskupenia sa viac zvýhodňujú enzýmy od *Bacillus* odvodené alkalické proteázy, genericky označované ako subtilisinové enzýmy; (referencie: Deayl, L., Moser, P.W. a Wildi, B.S., "Proteases of the Genus Bacillus. II alkaline Proteases." Biotechnology and Bioengineering, Vol. XII, strany 213 až 249 (1970), Keay, L. a Moser, P.W., "Differentiation of Alkaline Proteases from *Bacillus* Species" Biochemical and Biophysical Research Comm., Vol. 34, No. 5, strany 600 až 604, (1969). Subtilizínové enzýmy sa rozdeľujú do dvoch podskupín, subtilisin A a subtilisin B. V skupine subtilizínu A sú enzýmy odvodené z takých druhov ako je *B. subtilis, B. licheniformis* a *B. pumilis*. Organizmy v tejto podskupine produkujú málo alebo vôbec neprodukujú neutrálnu proteázu alebo amylázu. Subtilizínová podskupina B pozostáva z enzýmov z takých organizmov, ako je *B. subtilis, B. subtilis* var. amylosacchariticus, *B. amyloliquefaciens* a *B. subtilis* NRRL B3411. Tieto organizmy produkujú neutrálne proteázy a amylázy na úrovni porovnateľnej s produkciou alkalických proteáz. Nakoniec sa zvýhodňujú ďalšie enzýmy, napríklad pankreatín, trypsín, kolagináza, keratináza, karboxyláza, aminopeptidáza, elastáza a aspergilo-peptidázy A a B, pronáza E (z *S. griseus*) a dispáza (z *Bacillus polymyxa*).

Výhodné proteázy sú papaín, bromelín a rôzne subtilizíny, uvedené hore.

Určovanie, oddeľovanie a čistenie enzýmov je dlho známe. V odbornej literatúre sa všeobecne uvádza veľa techník na určovanie a izoláciu enzýmov, vrátane takých enzýmov, ktoré majú proteolytickú a zmiešanú proteolytickú/amylolytickú alebo proteolytickú/lipolytickú účinnosť. Uvedené enzýmy, zahrnuté v tomto vynáleze sa môžu ľahko získať známymi

technikami z rastlín, zvierat alebo z mikrobiálnych zdrojov. S nástupom techník rekombinantných DNA sa očakáva, že sa stanú dostupnými nové zdroje a druhy enzýmov. Tieto novovytvorené enzýmy sa považujú za enzýmy, ktoré sú zahrnuté týmto vynálezom potiaľ, pokiaľ spĺňajú vpredu uvedené kritériá stálosti a účinnosti.

Podľa tohto vynálezu sa má používať účinné množstvo enzýmu. Množstvo enzýmu, ktoré sa vyžaduje na prípravu účinného zubného prípravku bude závisieť od viacerých faktorov, vrátane inherentnej účinnosti enzýmu, pH, koncentrácie solí a ak sa kombinuje s peroxidom, tiež od citlivosti na znehodnotenie peroxidmi. Ako základnú mierku možno uviesť, že účinná formulácia má obsahovať dostatok enzýmu na zabezpečenie účinnosti pri jednom použití medzi asi 0,001 až 5 Ansonovými jednotiek účinnosti, výhodne medzi 0,01 a 1 Ansonovou jednotkou. Možno použiť aj vyššie alebo nižšie množstvá enzýmov. Nižšie koncentrácie enzýmu, ako sa tu uvádzajú budú pravdepodobne prispievať k odstraňovaniu sfarbených povlakov, najmä pri použití na čistenie protéz, ktoré možno vyňať z úst a ponoriť do čistiaceho prostriedku na dlhšiu dobu, napríklad cez noc. Vzhľadom na to, že enzýmové prípravky sú iba zriedka čisté, predpokladá sa, že zdroj enzýmu sa použije v množstvách medzi asi 0,003 až 15 % (hmotnosť/hmotnosť alebo hmotnosť/objem), vzťahované na konečný použiteľný prípravok. Presné množstvo sa bude meniť v závislosti od čistoty enzýmu a treba ho prípad od prípadu stanoviť.

Uvedené prípravky sa predkladajú v takej forme, v ktorej sú pri použití v ústnej dutine bezpečné a nemajú škodlivý účinok ani pri ich náhodnom prehltnutí. V odbore orálnej starostlivosti sa vyvinuli základné typy formulácií, určili sa a vyskúšali mnohé prísady, ktoré možno bezpečne a účinne použiť do uvedených prípravkoch. Miešanie a príprava týchto prípravkov, ich spoľahlivé balenie a skladovanie je v týchto odboroch tiež dobre známe.

Na dosiahnutie najvhodnejších výsledkov bielenia mala by formulácia mať hodnotu pH medzi 7,0 a 9,0. Najvhodnejšie čistiace výsledky sa dosahujú pri pH okolo 8 vo vzťahu

k tomu, ako sa formulácia použije pri čistení zubov kefkou v ústach. Napríklad pri čistení zubnou kefkou bude prípravok vo forme zubnej pasty spravidla v ústach riedený v pomere 1 plus 2, alebo 1 plus 3 objemy vody/slín. Potom napríklad pasta alebo gél s najvhodnejším zložením na bielenie bude formulovaná tak, aby sa pri jej použití dosiahla hodnota pH medzi 7 až 9. Na nastavenie hodnoty pH prípravku možno použiť kyselinu alebo zásadu; výber činidla na úpravu pH je odborníkovi v orálnej oblasti známy na základe jeho skúseností v danej oblasti techniky. Najvhodnejšie pH z hľadiska stálosti určitého prípravku pred jeho použitím môže byť odlišné ako je uvedená oblasť a určitý prípravok môže mať inú najvhodnejšiu hodnotu pH v závislosti od použitých prísad a prídavkov.

Hoci prípravky sa môžu predkladať k použitiu v akejkoľvek forme, patent zahrnuje také uskutočnenia vynálezu, ktoré dávajú lepšie a/alebo rýchlejšie výsledky a/alebo sú pohodlnejšie pri používaní, ak výsledky porovnávame so zmesami prísad. Prípravky možno pripraviť napríklad vo forme ústneho výplachu, gumy, čistiaceho prostriedku vo forme pasty, gélu alebo prášku, alebo možno účinné zložky impregnovať do zubného špáratka alebo do dentálnej nite. Môžu sa použiť aj v aplikátoroch a ústnych vložkách, čo sú prípravky priložené na zuby a ostávajú na svojom mieste po niekoľko hodín s alebo bez zakrytí membránou, aby držali na príslušnom mieste. Hoci tento spôsob môže vykonávať odborník, predsa je prvotne určený na použitie v režime samoliečenia.

Opatera chrupu môže ďalej zahŕňať dve alebo viac formulácií uvedených prípravkov. Napríklad možno použiť ústnu vodu v spojení so zubnou pastou, pričom obidve formulácie obsahujú uvedené dve prísady. Tento režim môže prispievať na dosiahnutie čo najvhodnejších účinkov takejto starostlivosti o chrup, osobitne u zákazníkov, ktorí bežne užívajú obidva výrobky. Účinný režim môže tiež pozostávať z používania zubnej nite a zubnej pasty.

Vynález zahrnuje prípravky podľa tohto vynálezu, ktoré

majú byť formulované tak, aby sa mohli používať spôsobom a v čase, kedy spotrebiteľ normálne používa podobné výrobky. Ak sa napríklad učinné látky predkladajú vo forme ústnej vody, potom je ústna voda formulovaná tak, že návod na jej použitie je v súlade s bežným používaním ústnych vôd. Rovnako to platí pre ďalšie zubné čistiace prostriedky, zubné špáratka, dentálne nite a žúvacie gumy. Podľa tohto vynálezu sa neurčuje nejaký špecifický čas použitia prípravkov. Ak sa zvolí prístup s použitím aplikátora alebo ústnej vložky, potom je nevyhnutné udržiavať materiál v styku s chrupom po niekoľko hodín, alebo ešte viac. To ale iba v prípade, kde sa ako bežné používa rozsiahle pôsobenie prípravkov.

Výhodne budú účinné zložky formulované ako zubná pasta, tekutá pasta alebo gél. Tak napríklad sa zmieša 10 % tripolyfosforečnanu sodného (STP - sodium tripolyphosphate) s ďalšími orálne prípustnými prísadami tak, aby vznikla pasta alebo gél, ktorá sa potom plní bežným spôsobom. Spotrebiteľ potom nanesie trocha pasty alebo gélu na zubnú kefku a určitý čas šuchá kefkou svoje zuby, práve tak, ako pri použití každej inej zubnej pasty. Väčšina dentistov a výskumných pracovníkov odporúča čistiť zuby zubnou kefkou najmenej tri minúty, aby sa dosiahol čo najväčší účinok. S týmto štandardným odporúčaním však nie je všeobecný súhlas. Podobné odporúčanie platí pre rozpustné pasty a gély aj pri ich pravidelnom t.j každodennom používaní.

Môže sa použiť ktorýkoľvek nosič alebo nosiče s vylúčením alebo minimalizáciou obsahu takých nosičov, ktoré obsahujú viacmocné ióny kovov, pretože tieto ióny vytvárajú komplexy s účinnými zložkami a mohli by ich účinnosť predčasne celkom alebo čiastočne znížiť. Ďalej sa nemajú použiť oxidačné látky, lebo reagujú s redukčnými látkami. Inak sa uvedené dve účinné zložky môžu formulovať s ktoroukoľvek kompatibilnou prísadou, ktorá je tiež prípustná na použitie v orálnej dutine.

Orálne prípravky

Zubné čistiace prostriedky

Základ formulácií zubných pást, tekutých pást, gélov a zubných práškov, ktorý sa môže použiť v tomto vynáleze bude obsahovať bežne používané nosiče, spojivá, povrchovo účinné látky, zložky na udržiavanie vlhkosti, farbiace látky, pigmenty, protipovlakové látky, protibakteriálne látky, látky typu bioadhezív, abrazivá, látky proti zubnému kazu, príchute, sladidlá a podobné látky, ktoré sa môžu použiť na prípravu pást a práškov. Gély a pasty obsahujú vodu, alebo môžu byť formulované ako bezvodé.

Dentálne abrazíva sú užitočné spolu s uvedenými účinnými zložkami ako prostriedok na fyzikálne odstraňovanie materiálu, na ktorý pôsobil fosforečnan. Dlhú dobu známym zubným abrazívom sú napríklad pyrofosforečnan vápenatý, abrazíva na báze kyseliny kremičitej, oxidu hlinitého, nerozpustných metafosforečnanov, najmä teplom tvrdnúce polymérne živice a hydrogenuhličitan sodný. V patentovej a odbornej literatúre je množstvo príkladov podobných abrazív. Jeden z príkladov je v patente USA číslo 4,822.599, ktorý obsahuje celú sériu čistiacich abrazív, odkazy na komerčné zdroje a literatúru na ich prípravu. Väčšina, ak nie všetky známe abrazíva sú dostupné na trhu.

Zvolené abrazívum má byť kompatibilné s účinným fosforečnanom ako aj s každou ďalšou prísadou, ktorá môže byť sama o sebe účinná, ako sú napríklad fluoridové ióny a protibakteriálne látky. Výber abrazíva, rovnako ako u iných pást, gélov alebo práškov môže byť ovplyvnený dôsledkami kombinácie určitého abrazíva s ďalšou prísadou. Ak prípravok napríklad obsahuje fluoridové ióny a ióny pyrofosforečnanu vápenatého, pyrofosforečnan sa môže premeniť z jeho gama-formy na β-formu zahrievaním gama-formy na 700 až 900 °C, ako sa uvádza v patente USA číslo 3,112.247. Tiež nemusia byť kompatibilné niektoré protibakteriálne látky na báze kvartérnych amóniových zásad s niektorými abrazívami na báze

oxidu kremičitého. V tejto práci je výhodným abrazívom oxid kremičitý.

Koncentrácia abrazíva môže byť vo veľmi širokom rozsahu. Prípravky sa opisujú s obsahom abrazíva v koncentračnej oblasti od 5 do 80 % hmotnostných, v závislosti od abrazíva. Ďalšia koncentračná oblasť je od 10 do 50 % v závislosti od vybraného abrazíva. U výhodného abrazíva - oxidu kremičitého - sa pracuje s podielom abrazíva medzi 10 a 20 % hmotnostnými.

V prípravkoch môže byť zahrnutý zdroj fluoridových iónov. Zdroje fluoridových iónov sú viaceré. Pozri napríklad patent USA číslo 3,535.421, ktorý uvádza značný počet solí, ktoré sa môžu použiť v dentálnej oblasti. Vo väčšine zubných čistiacich prostriedkov sa zvýhodňuje ako zdroj fluoridových iónov fluorid sodný, fluorid cínatý a monofluorofosforečnan sodný.

Fluoridové ióny sa bežne pridávajú do zubných čistiacich prostriedkov v množstve postačujúcom na dodanie 3500 ppm, výhodne 1100 ppm fluoridového iónu. Keď je prípravok formulovaný tak, že fluoridový ión je iba v jednej osobitnej zložke prípravku a zmieša sa s ostatnými zložkami až pri použití prípravku, potom sa obsah zdroja fluoridových iónov v oddelenej zložke nastaví vyššie tak, aby poskytoval pri použití prípravku koncentráciu až do 3500 ppm, ale výhodne do 1100 ppm fluoridového iónu.

Pokiaľ sa týka ďalších zložiek ako sú príchute, farbivá, sladidlá, vlhkosť udržujúce látky, zahusťovadlá, spojivá a tenzidy, tieto sa celkom bežne používajú do zubných čistiacích prostriedkov.

Chuť sa nastavuje pridaním malého množstva príchute; táto zložka zanecháva v ústach pocit sviežosti. Na použitie v zubných čistiacich prípravkoch je dostupných veľa príchutí a v danej oblasti techniky je dobre známe, ako vyberať príchute a hodnotiť ich spotrebiteľkú uplatniteľnosť. Príchute sa bežne používajú na úrovni medzi asi 0,1 až 5 % hmotnostnými.

Farbivá, červené farbivo a oxid titaničitý sa v odbore

zubných čistiacich prostriedkov používajú bežne na vyfarbenie; v prípade oxidu titaničitého sa dosiahne biela farba pasty alebo prášku. Uvedené materiály sú široko dostupné, sú často používané v podobných formuláciách a sú známe odborníkom, skúseným v oblasti dentálnych prípravkov. Farbiace látky sú zvyčajne prítomné v koncentráciách od 0,1 až po 5 %.

Na zvýšenie spotrebiteľskej uplatniteľnosti sa bežne pridávajú sladidlá. V súčasnosti sa používajú takzvané umelé sladidlá, aby sa predišlo potenciálnemu vplyvu na kazenie zubov od väčšiny cukrov a iných sladidiel. Príkladom sladidiel, nespôsobujúcich zubný kaz je bežne používaný sacharín, aspartám, D-tryptofán, dihydrochalkóny, cyklamáty, xylitol a acesulfám. Sladidlá tvoria asi 0,1 až 5 % formulácie.

Látky udržujúce vlhkosť, humektantá, sa pridávajú do gélov a pást, aby sa zabránilo vysýchaniu pri styku so vzduchom, vyvolávajú pocit "vlhkosti" v ústach pri čistení kefkou. Niektoré humektantá, napríklad sorbitol sa považujú za sladidlá. Príkladmi zlúčenín, použiteľných ako humektantá v zubných čistiacich prostriedkoch sú polyalkoholy ako je glycerol, sorbitol a polyetylénglykoly. Výhodný je sorbitol (zvyčajne 70%-ný sorbitol/voda) a glycerol. V pastách a géloch sa zvyčajne používajú dve zvlhčujúce látky v množstve medzi 20 až 40 %.

Spojivá a zahusťovadlá sa môžu pridávať na zabezpečenie fyzikálnej súdržnosti pást, gélov a tekutých pást. Príkladmi týchto látok môžu byť gumy ako je xantán a akáciová guma, karagén, celulózy ako je karboxymetylcelulóza, polyoxyalkylpolyméry ako sú polyméry Pluronics, PVP materiály a niektoré polyméry, ktorých príkladom môže byť karboxyvinylový polymér (Gantrez a podobne). Posledne uvedený polymér a pravdepodobne niektoré ďalšie majú naviac výhodu v schopnosti lipnúť na povrchoch, čo je využiteľné tak, že spojivo môže slúžiť tiež na ďalší účel, na adhéziu prípravku na povrch zuba a tak viazať účinné zložky k zubu dlhšiu dobu. Gantrez je príkladom polyakrylového karboxylátového materiálu, ktorý má uvedený dvojaký účinok.

Spojivá sa zvyčajne pridávajú v množstve medzi 0,1 až 5,5 % hmotnostnými.

Povrchovo aktívne látky, tenzidy, sa do zubných čistiacich prostriedkov pridávajú na podporu odstraňovania drobných úlomkov. V týchto prípravkoch možno použiť všetky druhy tenzidov, aniónové, katiónové, neiónové, amfotérne a tenzidy založené na obidvoch iónoch. Všetky tieto zlúčeniny a tie, ktoré sú najviac využiteľné v dentálnej oblasti sú dobre opísané v literatúre. Možno napríklad odkázať na patent USA číslo 4,822.599, kde sa uvádza podrobný súpis použiteľných tenzidov. Tenzidy sú dostupné od mnohých výrobcov a môžu sa pripraviť dobre opísanými postupmi.

Tenzidy sa bežne používajú v množstve medzi 0,5 až 5 % v pastách a géloch, ale môžu sa použiť aj vo vyšších koncentráciách v niektorých dentálnych práškoch. Tenzidy sa môžu tiež použiť ako gélotvorné látky.

Dych osviežujúce látky (napríklad hydrogenuhličitan sodný) by sa mohli zahrnúť do formulácie, buď vo fosforečnanovom prípravku, alebo môžu byť osobitne ako sa opísalo v prechádzajúcom odstavci, to znamená v dvojkomorovom dávkovacom zariadení.

Aplikátory môžu slúžiť ako účinný prostriedok na odstraňovanie sfarbenia podľa tohto vynálezu. Môžu sa pripraviť vo forme cestovitého alebo vloženého materiálu, ktorý sa môže ľahko vytvarovať podľa zubov. Potom sa môže mechanicky zatlačiť na zuby ako taký, alebo sa môže vložiť do plastového rámu, vložiť a zatlačiť do úst a ponechať v ústach určitý čas, napríklad 15 až 30 minút. Po vybratí aplikátora sa odstránia aj úlomky povlaku, spôsobujúceho sfarbenie. Aplikátor sa potom odloží.

Účinné zložky sa môžu formulovať do formy ústnej vody a ako výplach úst. Ústny oplach alebo výplach bude obsahovať až do 95 % vody, do 30 % alkoholu, príchuť, polyalkoholy, látky proti zubnému kazu, látky odstraňujúce povlaky, sladidlá, farbivá a moridlá, v niektorých prípadoch konzervačné látky a dostatočné množstvo vody do stanoveného objemu.

Účinná zložka (zložky) sa môžu zabudovať do súčasne jestvujúcich formulácií ako je Cepacol (Lakeside Pharmaceuticals), Plax (Pfizer), Listerin (Warner-Lambert), Scope (Procter & Gamble) a podobne.

Koncentrácie účinného fosforečnanu v týchto výrobkoch môžu byť v rozmedzí od asi 1 % do 15 % (hmotnosť/objem), výhodne 1 až 5 %. S fosforečnanom sa môže zmiešať AOC, alebo sa môže priložiť v osobitnom dávkovači na kombinovanie s fosforečnan obsahujúcim prípravkom priamo pri použití. Podobne sa môže k fosforečnanu primiešať enzým, alebo sa môže osobitne baliť tak, aby sa zmiešal s fosforečnanom priamo pri použití. Ak sú v ústnej vode alebo výplachu prítomné všetky tri účinné látky, potom sa enzým balí osobitne. Ktorákoľvek z uvedených účinných prísad sa môže baliť ako prášok na zmiešanie a potom sa tesne pred použitím môže zriediť kvapalinou, ktorá obsahuje ostatné prísady.

Namáčací a čistiaci roztok na dentálne časti sa môže pripravovať tiež s uvedenými dvoma účinnými prísadami. Uvedené prípravky potom obsahujú vodu, tenzid, šumivú látku a ďalšie voliteľné prísady. Zubná protéza sa vyberie a vloží do roztoku, obsahujúceho tripolyfosforečnanovú soľ a nechá sa namočená niekoľko hodín. Potom sa buď očistí zubnou kefkou s odporúčaným zubným čistiacim prostriedkom, alebo sa jednoducho opláchne a znova vloží do úst. Koncentrácia účinného fosforečnanu tu je asi 1 až 20 %.

Ďalej uvedené príklady slúžia na objasnenie vynálezu a v žiadnom prípade neobmedzujú rozsah tohto vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

P r í k l a d 1

Formulácia zubnej pasty s beliacim účinkom

Ako príklad uskutočneia tohto vynálezu sa môže pripraviť zubná pasta zo zložiek a v množstvách týchto zložiek, uvedených v Tabuľke I a II.

Tabuľka I (10/15 % STP)

Zložka	Koncentrácia (%, hmotnosť/hmotnosť)	
Voda, DI	28,402	23,402
Sorbitol, 70 %-ný	26,410	26,410
Abrazívny oxid kremičitý	14,00	14,00
Tripolyfosforečnan sodný (STP)	10,00	15,00
Glycerol	10,000	10,000
Zahusťujúci oxid kremičitý	4,00	4,00
Polyetylénglykol 400, NF	3,00	3,00
Laurylsíran sodný	1,150	1,150
Oxid titaničitý	0,995	0,995
Sacharinát sodný	0,20	0,20
Xantánová guma	0,800	0,800
Príchuť	0,800	0,800
Fluorid sodný	0,243	0,243
Spolu	100,00	100,00

Tabuľka II (10 % STP a peroxid vodíka)

Zložka	Časť A	Časť B
Roztok sorbitolu (USP 70 %)	23,0901	-
Glycerol 99,5 %-ný, USP	10,00	88,00
PEG 8	3,00	-
Oxid kremičitý (Zeofree 153)	4,500	-
Oxid kremičitý (Zeodent 113)	10,000	-
Oxid titaničitý	1,447	-
Laurylsíran sodný USP	1,150	-
Sacharinát sodný, prášok USP	0,40	-
Benzoan sodný, NF	0,100	-
Xantánová guma	0,700	-
Tripolyfosforečnan sodný	20,000	-
Hydroxid sodný, 50 %-ný roztok	0,900	-
Carbopol 974P	-	2,000
Peroxid vodíka (35 %-ný)	-	10,000
Príchuť (menej ako)	1,5	-
Voda	QS	-
Spolu	100,00	100,00

Uvedené dve formulácie sa plnia do obalov, z ktorých sa dávkujú rovnaké objemy častí A a B; pomer 1 : 1 časti A : časti B je zmes na použitie na čistenie zubov kefkou alebo na čistenie protézy.

Tabuľka III (5 % STP, voliteľne s papaínom)

Zložka	Koncentrácia (%, hmotnosť/hmotnosť)	
Voda DI	28,402	28,302
Sorbitol, 70 %-ný	31,410	31,410
Abrazívny oxid kremičitý	14,00	14,00
Tripolyfosforečnan sodný (STP)	5,00	5,00
Glycerol	10,00	10,00
Zahusťujúci oxid kremičitý	4,00	4,00
Polyetylénglykol 400, NF	3,00	3,00
Laurylsíran sodný	1,150	1,150
Oxid titaničitý	0,995	0,995
Sacharinát sodný	0,200	0,200
Xantánová guma	0,800	0,800
Príchuť	0,800	0,800
Fluorid sodný	0,243	0,243
Papaín	-	0,100
Spolu	100,00	100,00

P r í k l a d 2

Belosť zubov sa merala ďalej uvedeným spôsobom.

Na stanovenie belosti sa použil upravený postup bežne používaného systému merania belosti v dentálnom odbore pri hodnotení abrazívnosti zubných čistiacich prostriedkov.

Z miestneho bitúnku sa získali hovädzie čeľuste a z nich sa zuby extrahovali v ich pôvodnom stave; nepoužilo sa nijaké predbežné čistenie zubov. Zuby sa upevnili do hlavice z dentálneho akrylátu tak, aby rozmermi vyhovovali na meranie kolorimetrom a na čistenie zariadením s kefkou; podrobný opis sa uvádza ďalej. Prvotné očistenie kefkou sa vykonalo s použitím suspenzie bežnej zubnej pasty Crest Regular a zubnej kefky OralB40 so strednými štetinami. Potom sa na kolorimetri (Hunter) stanovila počiatočná hodnota L.

Táto hodnota sa označuje ako hodnota počiatočnej belosti. Zariadenie na mechanický oter zubov pochádzalo od výrobcu Ramé-Hart, Mountain Lake, New Jersey, USA. Toto zariadenie sa často používa na skúšanie dentálnych prípravkov. Do zariadenia sa upevnia zubné kefky a uvedú sa do styku so zubami. Suspenzia zubnej pasty a vody v pomere 1:3 sa naleje do misky prístroja a simulácia čistenia sa vykonáva po dobu 6 hodín. Suspenzia zubnej pasty sa vymieňa každú hodinu. V čase 3 hodiny a v čase 6 hodín sa stanoví hodnota L. Pred meraním sa zuby opláchnu najprv deionizovanou vodou, potom sa na 1 hodinu uzatvoria do nádoby so 100%-nou vlhkosťou a až potom sa vykoná kolorimetrické meranie. Tak sa získajú L - hodnoty po 3 a po 6 hodinách.

Suspenzie zubných pást sa skúšali s cielom posúdiť, aký majú beliaci účinok. Príklad prípravy suspenzie:

Zo zložiek, uvedených v Tabuľke I sa pripravilo placebo tak, že sa vynechal STP. K časti takto pripraveného základu sa pridal STP, v množstve 5, alebo 10, alebo 15 %, a zmes sa dokonale premiešala. Pripravená zmes s STP mala pH približne 8,5. Na prípravu suspenzií s vyšším pH, sa pH nastavovalo pomocou 3 M NaOH a na znižovanie pH sa použila 3 M HCl. Všetky suspenzie sa použili ihneď po ich príprave.

Výsledky skúšok preukázali, že obsah 10 % STP a vyšší umožňuje dosiahnuť výbornú belosť zubov v porovnaní so základným placebo a že najlepšie výsledky sa dosahovali pri hodnote pH okolo 8,0.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Zmes na redukciu alebo odstraňovanie usadených povlakov zo zubov a dentálnych protéz, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje dentálne prípustný prípravok s obsahom 5 až 15 % hmotnostných vo vode rozpustného tripolyfosforečnanu sodného.

2. Zmes na redukciu alebo odstraňovanie usadených povlakov zo zubov a dentálnych protéz, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje dentálne prípustný prípravok s obsahom 1 až 25 % hmotnostných vo vode rozpustného tripolyfosforečnanu sodného, účinné množstvo zdroja aktívneho kyslíka a/alebo účinné množstvo enzymatického hydrolytického činidla.

3. Zmes na redukciu alebo odstraňovanie usadených povlakov zo zubov a dentálnych protéz, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že zahŕňa uvádzanie zubov alebo dentálnych protéz, ktoré majú povrchové usadeniny, do styku s dentálne prípustnou kompozíciou, obsahujúcou najmenej 5 až 15 % hmotnostných vo vode rozpustného tripolyfosforečnanu alkalického kovu.

4. Spôsob na redukciu alebo odstraňovanie usadených povlakov zo zubov a dentálnych protéz, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa uvádzanie zubov alebo dentálnych protéz, ktoré majú povrchové usadeniny, do styku s dentálne prípustnou kompozíciou, obsahujúcou najmenej 1 až 25 % hmotnostných vo vode rozpustného tripolyfosforečnanu alkalického kovu a účinné množstvo zdroja aktívneho kyslíka a/alebo účinné množstvo enzymatického hydrolytického činidla.