



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

PŘÍPRAVA A STABILITA ORGANICKÝCH MIKRO- A NANOČÁSTIC TYPU CORE-SHELL.

PREPARATION AND STABILITY OF CORE-SHELL TYPE ORGANIC MICRO- AND
NANOPARTICLES.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

DANA BYRTUSOVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0785/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Dana Byrtusová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Příprava a stabilita organických mikro- a nanočástic typu core-shell

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - typy mikro- a nanočástic; techniky enkapsulace, přírodní fenolické látky a jejich účinky.
2. Metody - stanovení celkových polyfenolů, stanovení indovodiálních fenolických látek metodou HPLC; enkapsulační techniky, charakterizace částic DLS.
3. Experimentální část - enkapsulace vybraných fenolických látek a přírodních extraktů do organických částic typu core-shell, charakterizace částic s enkapsulovanými polyfenoly; stabilita a uvolňování aktivních složek v modelových fyziologických podmínkách.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Dana Byrtusová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá možnostmi enkapsulace polyfenolů do organických mikro- a nanočástic typu core-shell. Teoretická část je zaměřená na polyfenolické látky, jejich biologické účinky a možnosti enkapsulace do různých typů částic. Experimentální část se zabývá zjištěním množství celkových polyfenolů, celkových a jednotlivých flavonoidů a anthokyanů v guaraně, ženšenu a goji. Extrakty z těchto vzorků byly enkapsulovány do lipidových a polysacharidových částic. Enkapsulační účinnost byla stanovena spektrofotometricky. Stabilita částic byla sledovaná pomocí dynamického rozptylu světla a zeta potenciálu. Částice byly vystaveny účinku modelových tělních tekutin a modelových potravin.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on possibilities of encapsulation polyphenolic compounds in core-shell type organic micro- and nanoparticles. The theoretical part is aimed at characterization of polyphenolic compounds, their biological effects and their possibilities of encapsulation into various types of particles. The experimental part deals with the content of polyphenolic compounds, flavonoids and anthocyanins in guarana, ginseng and goji. Extracts from these samples were packed into liposomes and polysaccharide particles. Encapsulation's effectiveness was determined spectrophotometrically. The stability of particles was monitored for size and stability by dynamic light scattering. The particles were exposed to the model body fluids and model food.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyfenoly, flavonoidy, anthokyany, enkapsulace, polysacharidové částice, liposomy

KEYWORDS

Polyphenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, encapsulation, polysaccharide particles, liposomes

BYRTUSOVÁ, D. *Příprava a stabilita organických mikro- a nanočástic typu core-shell*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 51 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Ivaně Márové, Csc. za odborné vedení a všestrannou pomoc při řešení problémů. Dále bych ráda poděkovala Ing. Janě Hurtové a Ing. Petře Matouškové za cenné rady, ochotu a pomoc při zpracování experimentální části.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Polyfenoly	9
2.1.1	Flavonoidy	9
2.1.2	Anthokyany	10
2.1.3	Biologické účinky polyfenolických látek	10
2.2	Vybrané rostliny pro extrakci polyfenolických látek	11
2.2.1	Goji	11
2.2.2	Ženšen	11
2.2.3	Guarana	12
2.3	Enkapsulace	13
2.3.1	Liposomy	13
2.3.1.1	<i>Lecithin</i>	14
2.3.1.2	<i>Cholesterol</i>	14
2.3.2	Polysacharidové částice	15
2.3.2.1	<i>Alginát</i>	15
2.3.2.2	<i>Chitosan</i>	15
2.3.2.3	<i>Karboxymethylcelulóza (CMC)</i>	16
2.3.3	Enkapsulátor	16
2.4	Metody používané k charakterizaci enkapsulovaných látek a částic	17
2.4.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	17
2.4.2	Stanovení distribuce velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla	17
2.4.3	Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu	18
3	CÍLE PRÁCE	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
4.1	Použité chemikálie a přístroje	20
4.1.1	Použité chemikálie	20
4.1.2	Použité přístroje	20
4.2	Vzorky	21
4.3	Extrakce polyfenolů ze vzorků	22
4.4	Stanovení celkových polyfenolů	22
4.5	Stanovení celkových flavonoidů	22
4.6	Stanovení celkových anthokyanů	22
4.7	Stanovení jednotlivých flavonoidů metodou RP-HPLC s UV-VIS detekcí	23
4.8	Příprava částic	23

4.8.1	Příprava polysacharidových částic	23
4.8.1.1	<i>Příprava alginátových částic</i>	23
4.8.1.2	<i>Příprava chitosanových částic</i>	23
4.8.1.3	<i>Příprava alginátových částic pomocí ultrazvuku</i>	23
4.8.1.4	<i>Příprava chitosanových částic pomocí ultrazvuku</i>	23
4.8.2	Příprava lipidových částic pro enkapsulaci polyfenolů	24
4.8.2.1	<i>Příprava liposomových částic pomocí ultrazvuku</i>	24
4.8.2.2	<i>Příprava liposomových částic metodou odpařování na tenké vrstvě</i>	24
4.8.3	Příprava částic pro enkapsulaci polyfenolů pomocí enkapsulátoru	24
4.8.3.1	<i>Příprava alginátových částic</i>	24
4.8.3.2	<i>Příprava alginátových částic s jádrem</i>	24
4.8.3.3	<i>Příprava směsných částic</i>	24
4.9	Stanovení enkapsulační účinnosti	24
4.10	Stanovení stability v trávicích šťávách	24
4.10.1	Složení modelové pankreatické šťávy	24
4.10.2	Složení modelové žaludeční šťávy	24
4.10.3	Složení modelové žlučové šťávy	25
4.11	Stanovení stability v modelových potravinách	25
4.12	Stanovení velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla	25
4.13	Stanovení stability pomocí zeta potenciálu	25
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	26
5.1	Stanovení celkových polyfenolů	26
5.2	Stanovení celkových flavonoidů	26
5.3	Stanovení jednotlivých flavonoidů metodou HPLC	27
5.4	Stanovení antokyanů	28
5.5	Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu	29
5.6	Stanovení enkapsulační účinnosti	30
5.6.1	Polysacharidové částice	30
5.6.1.1	<i>Alginátové částice</i>	30
5.6.1.2	<i>Chitosanové částice</i>	30
5.6.1.3	<i>Alginátové částice připravené pomocí ultrazvuku</i>	30
5.6.1.4	<i>Chitosanové částice připravené pomocí ultrazvuku</i>	31
5.6.2	Lipidové částice	31
5.6.2.1	<i>Příprava liposomových částic s využitím ultrazvuku</i>	31
5.6.2.2	<i>Příprava lipidových částic metodou odpařování na tenké vrstvě</i>	32
5.6.3	Částice připravené na enkapsulátoru	32
5.6.3.1	<i>1% alginátové částice</i>	32

5.6.3.2	2% alginátové částice	32
5.6.3.3	1% alginátové částice – s jádrem	33
5.6.3.4	2% alginátové částice – s jádrem	33
5.6.3.5	Směsné částice alginátu a karboxymethylcelulózy – s jádrem	33
5.6.4	Porovnání enkapsulační účinnosti jednotlivých metod	34
5.7	Stanovení stability v trávicích šťávách	35
5.7.1	Vliv žaludeční šťávy	35
5.7.2	Vliv pankreatické šťávy	36
5.7.3	Vliv žlučové šťávy	36
5.8	Stanovení stability v modelových potravinách	37
5.8.1	Inkubace částic v 10% ethanolu	37
5.8.2	Inkubace v 3% kyselině octové	38
5.8.3	Inkubace v modelové vodní potravine	39
5.8.4	Inkubace v modelové tukové potravine	40
5.9	Stanovení velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla	41
5.10	Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu	42
6	ZÁVĚR	43
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	44
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	48
9	SEZNAM PŘÍLOH	49
10	PŘÍLOHY	50

1 ÚVOD

Polyfenolické sloučeniny jsou vysoce ceněnými látkami hlavně díky svým antioxidačním vlastnostem. Nové studie však potvrzují, že by mohly mít využití rovněž při léčbě různých závažných chorob, jako jsou rakovina nebo kardiovaskulární onemocnění. Bohužel, tyto přírodní látky jsou velmi citlivé na světlo, rovněž vlivem tepla rychle degradují, což snižuje jejich stabilitu a dostupnost v lidském organismu. Dalším nedostatkem je jejich svíravá a hořká chuť, která omezuje jejich použití jako doplněk stravy. Využitím techniky enkapsulace je možné těmto nedostatkům předejít [1].

Enkapsulace může být definována jako proces zachycení jedné látky uvnitř druhé látky. Dojde k vytvoření částic o velikosti mikro- nebo nanometrů. Materiály používané jako obalový materiál musí splňovat řadu kritérií, jako je možnost použití v potravinářství a biodegradabilita [2].

Cílem této práce bylo připravit různé typy částic a enkapsulovat do nich izolované polyfenolické látky, extrahované z guarany, goji a ženšenu. Byly připraveny alginátové, chitosanové a lipidové částice, u kterých byla zkoumána enkapsulační účinnost a jejich stabilita v umělých trávicích šťávách a rovněž v modelových potravinách, které simulují určité prostředí a nahrazují tak konkrétní skupinu potravin – kyselou (3% roztok kyseliny octové), vodnou (voda), alkoholickou (10% roztok ethanolu ve vodě) a tukovou (25% emulze oleje s vodou).

Přínosem této práce by mělo být použití připravených částic v reálných potravinách jakožto doplněk stravy s postupným uvolňováním polyfenolických látek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyfenoly

Polyfenoly patří k nejúčinnějším přírodním látkám působícím proti volným radikálům [3]. V dnešní době je jich známo více než 8000, avšak jen malá část je významná pro své biologické účinky [5].

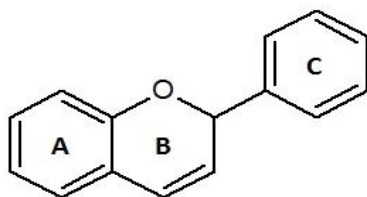
Chemicky se jedná o aromatické sloučeniny, které se vyznačují přítomností více fenolových jednotek. Na základě počtu atomu uhlíku a struktury uhlíkového řetězce je lze rozdělit do následujících skupin:

- Fenolové kyseliny
- Flavonoidy
- Stilbeny
- Lignany
- Taniny

2.1.1 Flavonoidy

Flavonoidy představují nejvýznamnější skupinu polyfenolických sloučenin. Jedná se o sekundární rostlinné metabolity, které hrají důležitou roli v mnoha aspektech fyziologie rostlin, jako jsou transport hormonů, regulace aktivních forem kyslíku, zbarvení květů a také jim pomáhají reagovat na změnu okolního prostředí [4].

Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu. Ve své molekule obsahují dva benzenové kruhy (A a B) spojené tříuhlíkovým řetězcem, který je odvozený od 2H-pyranu (C). Kruh B je spojen s pyranovým kruhem (C) v poloze C-2 [5].



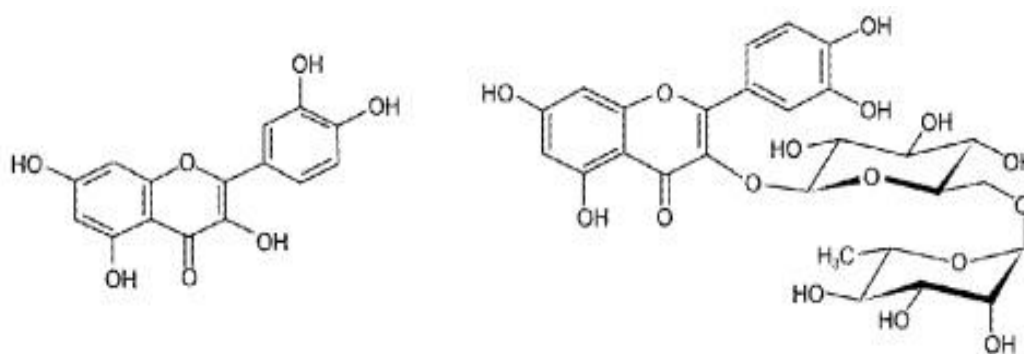
Obrázek 1: Flavan [5]

Obvykle bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace.

Flavonoidy se vyskytují buď jako volné látky nebo častěji jako O-glykosidy. Necukerná část je pak označována jako tzv. aglykon. Jako příklad lze uvést rutin, kde jeho aglykonem je pak další flavonoid quercetin (Obr.2) [5].

Podle stupně oxidace C_3 řetězce se rozeznávají následující struktury flavonoidů [5]:

- Katechiny (flavan-3-oly)
- Leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly)
- Flavanony
- Flavanonoly
- Flavony
- Flavonoly
- Anthokyanidiny

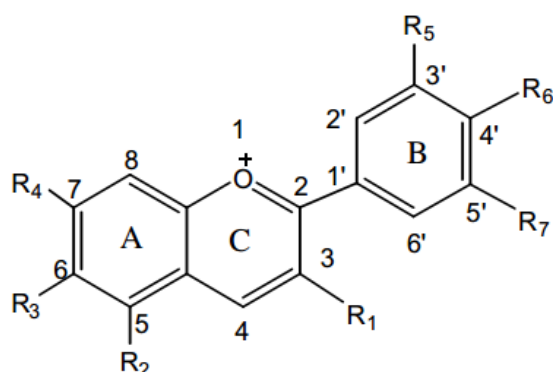


Obrázek 2: Vpravo struktura rutinu, vlevo jeho aglykon quercetin [6]

2.1.2 Anthokyany

Anthokyany tvoří nejdůležitější skupinu ve vodě rozpustných rostlinných pigmentů, patřících do skupiny flavonoidů. Tyto pigmenty jsou zodpovědné za zbarvení nejrůznějších druhů květů, ovoce a zeleniny a jsou rovněž ukazatelem zrání plodů. Barva anthokyanů závisí na mnoha faktorech, jako jsou například teplota, pH a kapalina, ve které se potravinu nachází [7, 8].

Anthokyany jsou glykosidickou formou anthokyanidinů, které jsou polyhydroxy a polymethoxy deriváty 2-fenylbenzopyryliového (flavyliového) kationtu [9].



Obrázek 3: Struktura anthokyanidinů [8]

2.1.3 Biologické účinky polyfenolických látek

Jak již bylo zmíněno, polyfenoly patří do skupiny antioxidantů. Chrání tedy buňky před oxidačním stresem vyvolaným účinkem volných radikálů, což jsou vysoce reaktivní sloučeniny s nepárovými elektrony.

Studie prokázaly, že strava bohatá na polyfenolické látky pomáhá v prevenci proti onemocněním, jako jsou kardiovaskulární choroby, rakovina, neurodegenerativní choroby nebo chronická zánětlivá onemocnění. Rovněž vykazují antimikrobiální účinky.

Rostlinné polyfenolické sloučeniny se běžně vyskytují v potravinách, jako jsou čaje, vína, ovoce, zelenina nebo luštěniny. Jejich vliv na lidský organismus je pořád v rámci diskusí a závisí na mnoha faktorech, jako jsou technologie výroby potravin, organismus (pohlaví, věk, složení střevní mikroflóry) a interakce s jinými molekulami (proteiny, trávicí enzymy).

Většina těchto látek se do těla dostává ve formě polymerů nebo glykosidů, a jejich koncentrace v krevním řečišti závisí na jejich modifikaci v průběhu metabolismu a absorpci v gastrointestinálním traktu. Suplementace polyfenolických látek uzavřených do různých

druhů kapslí a částic může výrazně zlepšit jejich dostupnost do organismu a ochranu před degradací [10].

2.2 Vybrané rostliny pro extrakci polyfenolických látek

Polyfenoly se vyskytují v řadě běžně konzumovaných potravin, jako jsou ovoce, zelenina, ale rovněž i v nápojích, jako například čaje a vína. Pro extrakci těchto antioxidantů byly v předložené práci vybrány goji, guarana a ženšen.

2.2.1 Goji

Kustovnice (*Lycium*) je keřovitá rostlina z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Z mnoha druhů tohoto rodu je pro své prospěšné vlastnosti nejvýznamnější kustovnice čínská (*L. chinense*), již plody jsou označovány názvem goji. Dorůstá do výšky až šesti metrů, květy mají fialové zbarvení.

Goji obsahují mnoho významných složek, jako jsou proteiny (do 16 %), mono a polysacharidy, mastné kyseliny, vitamíny ze skupiny B, vitamín C, karotenoidy, polyfenoly a minerály.

Kustovnice čínská je už po staletí využívána v čínské medicíně. Dle studií má antioxidační vlastnosti a pozitivní vliv na imunitu. Jsou zkoumány rovněž možné protizánětlivé a protirakovinné účinky těchto plodů [11, 12].



Obrázek 4: Plody goji [13]

2.2.2 Ženšen

Ženšen pravý (lat. *Panax ginseng*) je bylina z čeledi aralkovitých (*Araliaceae*) široce rozšířená na severovýchodě Číny a východním Rusku. Dorůstá do výšky od třiceti až do šedesáti centimetrů. Patří k nejznámějším exotickým rostlinám a je už po tisíce let používán v tradiční asijské lidové medicíně.

Podzemní část rostliny je tvořena mohutnými kořeny, dosahující délky až 20 cm a tloušťky až 3 cm. Zelená nadzemní část rostliny každoročně na zimu odumírá a na jaře z pupenů znova vyrůstá [14].

Mezi účinné látky ženšenu, které jsou v největším množství obsaženy v kořenu, patří triterpenové glykosidy neboli saponiny, označované jako ginsenosidy, jimž se připisuje nejvíce pozitivních účinků na lidský organismus. Dále jsou to polysacharidy, peptidy a mastné kyseliny.

Užívání ženšenu je možné rozlišit na dvě kategorie:

- a) Krátkodobé, soustředěné na zlepšení vytrvalosti, soustředění, imunitu, hojící procesy a odolnost vůči stresu,
- b) Dlouhodobé, k potlačení degenerativních chorob, spojených se stářím [15, 16].



Obrázek 5: Listy ženšenu [17]



Obrázek 6: Kořeny ženšenu [18]

2.2.3 Guarana

Guarana (Paulínie nápojná, lat. *Paullinia cupana*) je popínavý keř z čeledi mýdelníkovitých (*Sapindaceae*) vyskytující se na území Venezuely a severní Brazílie. Rostlina dorůstá do výšky deseti až dvanácti metrů. Plodem je červená tobolka obsahující černá semena, která jsou obalená v bílé slupce.

Nejvíce zastoupenou účinnou látkou v guaraně je kofein v množství až 6%, což je největší známé množství v rostlinné říši. Z dalších látek jsou to taniny, saponiny, purinové alkaloidy, D-katechin, epikatechin, proanthokyanidiny, flavonoidy, terpeny, proteiny, pryskyřice, vitamíny B1, B2, C, PP a stopové množství cholesterolu [19].

Tab. 1: Procentuální obsah účinných látek v semenech guarany [19]

látká	obsah [%]
Taniny	8,5-12,0
Škroby	9,0
Reziny (pryskyřice)	7,0
Amidy	5,5
Kofein	3,0-5,0
Tuky	3,0
Saponiny	0,6
Theobromin	0,25
Theofylin	0,125

Guarana se hojně využívá jako stimulant pro povzbuzení mysli, zlepšení paměti (krátkodobé i dlouhodobé) a stimulaci mozkové činnosti díky vysokému obsahu kofeinu. Z hlediska polyfenolů byly prokázány antibakteriální, antioxidační účinky, zvyšuje účinnost přípravků proti srážení krve, dále pak tlumí bolest a stimuluje odbourávání tuků (zrychluje metabolismus) a je proto vhodná jako doplněk při redukčních dietách [20].

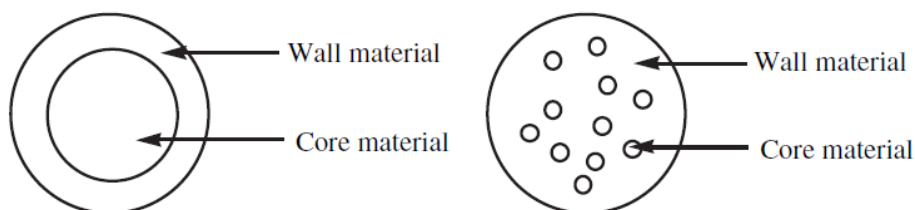
Možně nežádoucí efekty užívání mohou být spojeny s vysokým příjmem kofeinu, který může způsobit nespavost, tachykardii nebo bolesti hlavy [21].



Obrázek 7: Plody guarany [22]

2.3 Enkapsulace

Enkapsulace je proces vytváření polymerní schránky (shell) okolo kapek nebo částic materiálu jádra (core). Při enkapsulaci vznikají nejčastěji dva typy částic – první je mononukleární kapsle, která obsahuje jedno jádro, druhý typ obsahuje mnoho jader v matrixu (Obr.8). Hlavním cílem této techniky je ochrana zapouzdřeného materiálu před degradací a nepříznivými vlivy prostředí, jako jsou světlo, vlhkost nebo kyslík. Dalšími výhodami jsou menší odpařování a zamaskování nežádoucího smyslového vnímání člověka během konzumace, jako například hořké chuti polyfenolů [23].



Obrázek 8: Typy jaderných částic [23]

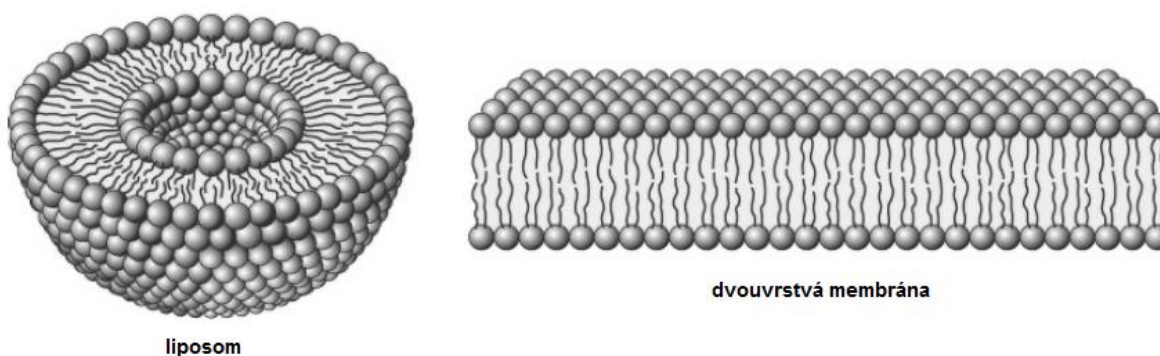
Materiály používané k enkapsulaci musí splňovat určitá kritéria pro použití v potravinářském průmyslu. Jsou to hlavně zdravotní nezávadnost, biodegradabilita a schopnost vytvořit bariéru mezi vnitřní fází a jejím okolím. Proto většinu enkapsulačních materiálů tvoří přírodní látky. Nejčastěji jsou to polysacharidy, jako je škrob a jeho deriváty (amylopektin, amylosa, dextriny), celulóza a její deriváty (karboxymethylcelulóza), rostlinné exudáty a extrakty (pektiny, karagenan, alginát), mikrobiální a živočišné polysacharidy (chitosan, xanthan a dextran). Dalšími materiály jsou lipidy, mezi které patří vosky, mastné kyseliny, fosfolipidy a glyceridy [1].

2.3.1 Liposomy

Jedná se o útvary tvořené z fosfolipidů, nejčastěji fosfatidylcholinu, cholesterolu a glykolipidů, které zde tvoří jednu či více vrstev, přičemž každá vrstva je tvořena lipidovou dvouvrstvou. Podle toho se rozlišují liposomy na unilamelární, oligolamelární a multilamelární.

Liposomy obvykle nepřesahují velikost 2 μm s tloušťkou membrány okolo 5 nm. Povrch i jádro liposomů je tvořené hydrofilními částmi lipidů, zatímco vnitřek membrány tvoří lipofilní zbytky mastných kyselin a fosfolipidů.

Díky své amfifilní struktuře se mohou liposomy využívat k enkapsulaci živin, bioaktivních molekul a léčiv. Hydrofilní molekuly mohou být enkapsulovány do vnitřního prostoru, lipofilní molekuly mohou být inkorporovány do dvojvrstev lipidů tvořících stěny liposomů [24].

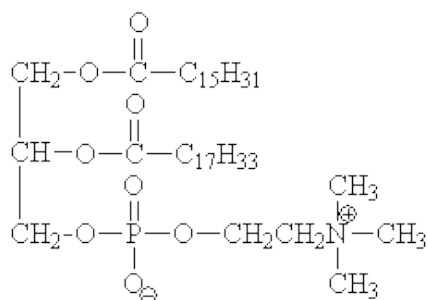


Obrázek 9: Průřez liposomu [24]

Liposomy lze připravit různými metodami, jako jsou ethanolové vstřikování, odpaření reversní fáze nebo příprava pomocí ultrazvuku [24]. Některé z těchto metod jsou popsány v experimentální části práce.

2.3.1.1 Lecithin

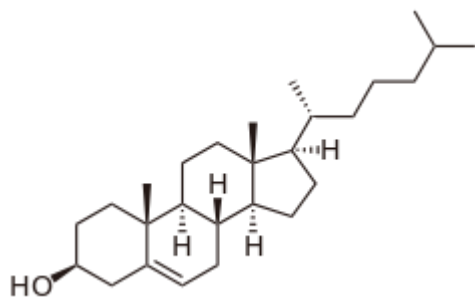
Lecithin patří mezi fosfolipidy. Chemicky se jedná o fosfatidylcholin. Nejvyšší koncentrace, kromě vaječného žloutku, je v semínkách slunečnice, vnitřnostech, másle, dále pak v zelenině a rostlinných olejích. Lecithin hraje důležitou roli v buněčném metabolismu a formuje lipidovou hmotu biologických membrán. Názvem lecitin se označuje pouze průmyslový lecitin, který je připravován rafinací rostlinného oleje. Společně s cholesterolem je nezbytnou látkou pro přípravu liposomů [25, 26].



Obrázek 10: Struktura lecitinu [27]

2.3.1.2 Cholesterol

Cholesterol patří mezi steroidy a jeho základní strukturu tvoří cyklopentanoperhydrofenantren. Je významnou složkou buněčných membrán a lipoproteinů krevní plazmy. Je rovněž nezbytný pro vznik vitamínu D a slouží jako prekurzor pro syntézu steroidních hormonů (např. aldosteron, testosteron, kortisol...) a žlučových kyselin [28, 29].



Obrázek 11: Vzorec cholesterolu [28]

2.3.2 Polysacharidové částice

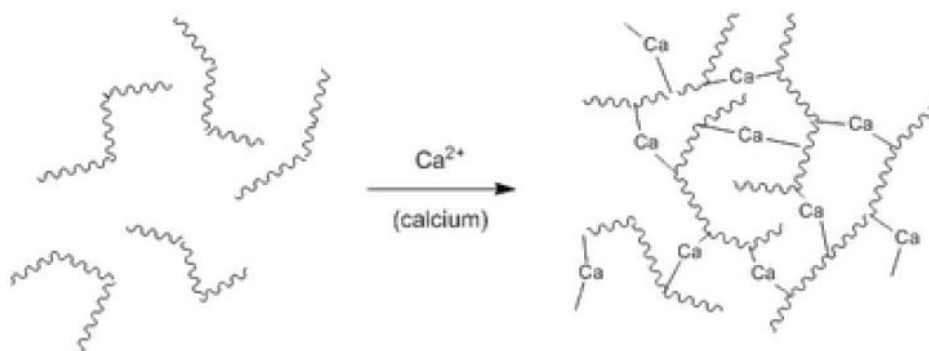
Polysacharidy sestávají z deseti a více monosacharidových podjednotek, které jsou navzájem spojeny α nebo β -glykosidovými vazbami. Můžeme je rozdělit na homoglykany, které jsou tvořeny jediným typem monosacharidové komponenty. V opačném případě se jedná o heteroglykan [30].

Většina polysacharidů jsou biokompatibilní a biodegradabilní, proto nacházejí využití ve farmaceutických a biomedicínských aplikacích hlavně jako nosiče léčiv [31].

2.3.2.1 Alginát

Alginát je ve vodě rozpustný lineární polysacharid, který se skládá ze zbytků α -L-gulonové a β -D-mannuronové kyseliny spojených 1-4 vazbami. Komerčně dostupný alginát je extrahován z hnědých mořských řas (*Phaeophyceae*), ale je možno ho získat rovněž jeho produkcí bakteriemi (*Azobacter*, *Pseudomonas*). Je vhodný pro řadu farmaceutických a biomedicínských aplikací díky jeho vlastnostem, jako jsou biodegradabilita a biokompatibilita.

Alginátové mikro- a nanočástice lze snadno získat indukčním gelováním s vápenatými ionty [32].



Obrázek 12: Spojování polymerních řetězců pomocí vápenatých iontů [33]

2.3.2.2 Chitosan

Chitosan patří mezi přírodní polymery typu polysacharidů (poly-D-glukosamin). Získává se alkalickou deacetylací chitinu, několikahodinovým varem s 50% hydroxidem sodným nebo enzymaticky působením *N*-deacetylasy. Má vynikající biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní. Lze jej použít jako systém pro transport léčiv, jehož hlavním znakem je řízené uvolňování a cílení léčiva.

Princip tvoření nanočástic je založen na interakci mezi negativně nabitými skupinami tripolyfosfátu sodného a pozitivními aminoskupinami chitosanu [34].

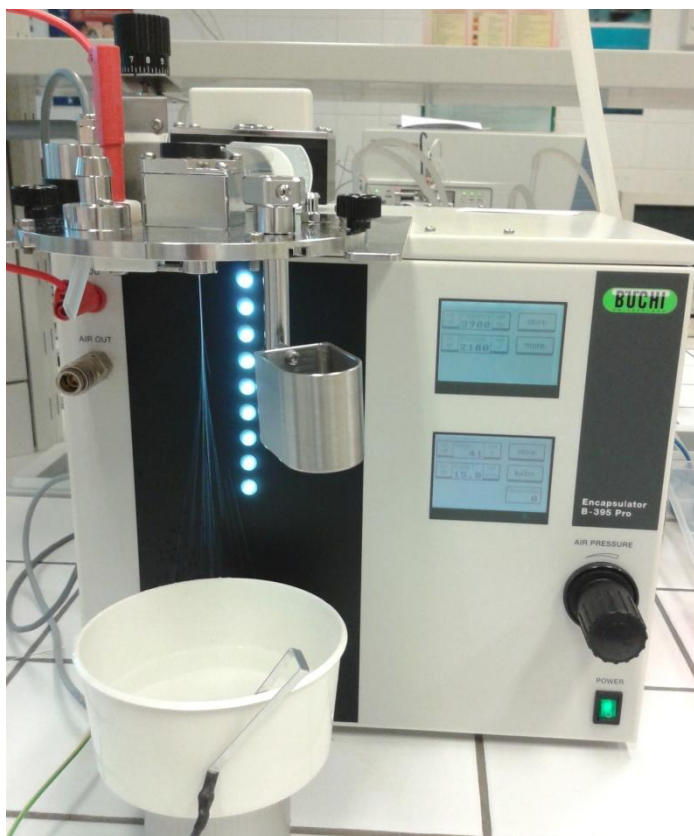
2.3.2.3 Karboxymethylcelulóza (CMC)

Karboxymethylcelulóza je derivátem celulózy obsahující karboxymethylovou skupinu ($-\text{CH}_2\text{COOH}$). Struktura je založená na jednotkách β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukopyranózy, které tvoří kostru polymeru. Má vysokou viskozitu, je netoxická a hypoalergenní.

CMC se používá k zahušťování potravinářských výrobků. Jedná se o přidanou látku (aditivum) s označením E466 [35, 36].

2.3.3 Enkapsulátor

Přístroj zobrazený níže na obrázku slouží k výrobě obalu a enkapsulaci různých látek, extraktů a mikroorganismů. Extrakt se smíchá se zapouzdřovacím polymerem a směs se nasaje do tlakové láhve nebo stříkačky. Poté je tato směs stříkačkovým čerpadlem, nebo v případě tlakové láhve vzduchem tlačena do pulzační komory. Kapalina pak prochází přes přesně provrtanou trysku a na výstupu z trysky se rozděluje do jednotlivých částic stejné velikosti. Tyto kapky procházejí elektrickým polem mezi tryskou a elektrodou, kde získají povrchový náboj. Elektrostatické odpuzivé síly způsobí rozptýlení částic dopadajících do vytvrzovacího roztoku v Petriho misce. Roztoky na Petriho misce jsou kontinuálně míchány magnetickým míchadlem, aby se předešlo shlukování částic. Po vytvoření dostatečného množství částic jsou poté zfiltrovány a použity k dalším účelům. Velikost částic závisí na několika parametrech, jako jsou frekvence vibrací, amplituda, velikost trysky, rychlost průtoku a fyzikální vlastnosti směsi produktu s polymerem. Optimální nastavení parametrů se indikují vizualizací tvorby částic v reálném čase ve světle stroboskopické lampy.



Obrázek 12: Enkapsulátor BÜCHI

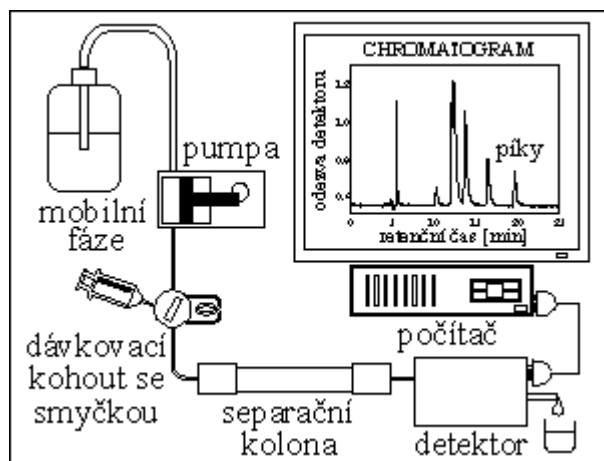
2.4 Metody používané k charakterizaci enkapsulovaných látek a částic

2.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Chromatografické metody patří do separačních metod založených na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě různé nemísitelné fáze: mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). V kapalinové chromatografii je mobilní fáze kapalina. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Mobilní fáze protéká tímto sorbentem.

Při dělení látek dochází k opakovanému ustalování rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Distribuci složek mezi těmito fázemi lze popsat distribuční konstantou. Čím vyšší je hodnota této konstanty pro určitou látku, tím delší dobu setrvávají její molekuly ve stacionární fázi, a tím větší je její retenční čas.

Nejčastějším uspořádáním kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). Při tomto uspořádání je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku [37].



Obrázek 13: Schéma kapalinové chromatografie [38]

Eluce může být provedena buď mobilní fází o konstantním složení při použití isokratické eluce nebo mobilní fází o zvyšující se eluční síle při gradientovém složení. Analyt putuje z kolony do detektoru, jehož signál je převeden do podoby chromatografického záznamu, který je nazýván chromatogram [37].

2.4.2 Stanovení distribuce velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla

Dynamický rozptyl světla (Dynamic Light Scattering, DLS) je metoda určená ke stanovení velikosti částic pomocí měření tzv. Brownova pohybu, což je chaotický pohyb molekul vyvolaný jejich náhodnými srážkami. Malé částice se pohybují rychle, velké pomaleji. Vztah mezi rychlostí a velikostí částice je definovaný pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice.

Jako zdroj světla se k měření využívá laser, který prochází přímo přes vzorek umístěný uvnitř cely. Pro měření intenzity rozptýleného světla se používá detektor v poloze buď 173° nebo 90° . Aby byla detekce uvnitř určitého rozsahu a nedošlo k přetížení detektoru vlivem velkého množství světla, používá se pro snížení intenzity laseru „zeslabovač“ (attenuator). Signál intenzity rozptylu projde na korelátor, který srovná intenzitu rozptylu v po sobě

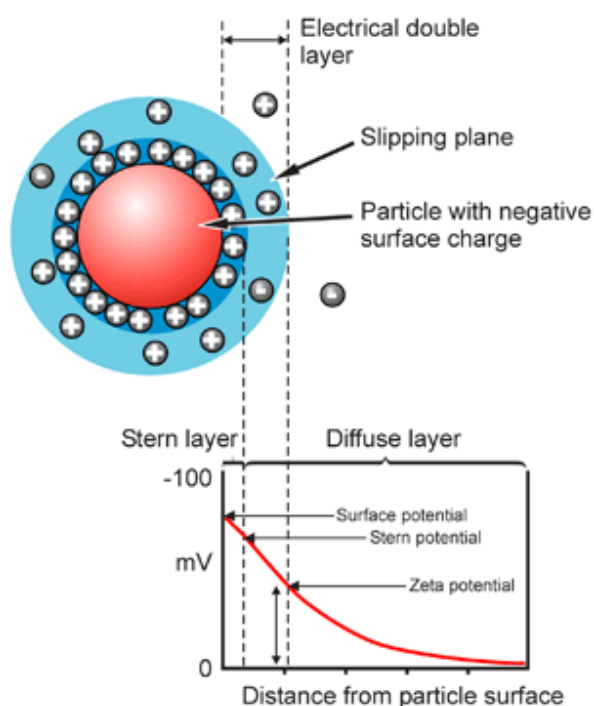
jdoucích časových intervalech. Informace z korektoru poté přejde do počítače, který analyzuje data [39, 40].

2.4.3 Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu

Analýza zeta potenciálu je technika pro určení povrchového náboje částic. Kolem každé částice existuje elektrická dvojvrstva. Ve vrstvě kapaliny, která obklopuje částici, jsou rozeznávány dvě části: vnitřní oblast, tzv. Sternova vrstva, kde jsou ionty silně vázané, a vnější, difuzní oblast, kde jsou ionty méně pevně připojeny. Při pohybu se ionty uvnitř hranice pohybují s částicí, avšak ionty za hranicí nikoliv. Tato hranice se nazývá povrch hydrodynamického smyku, nebo rovina skluzu a potenciál, který existuje na této hranici, je známý jako potenciál zeta.

Pokud částice budou vykazovat velký kladný nebo záporný potenciál, částice se budou odpuzovat a nedojde k flokulaci. V opačném případě neexistuje dostatečná síla k zabránění shlukování částic. Obecná bariéra mezi stabilní a nestabilní suspenzí je buď při +30 mV nebo -30 mV. Částice s potenciálem zeta kladnějším než +30 mV, nebo zápornějším než -30 mV se považují za stabilní.

Důležitým faktorem při měření je hodnota pH. Jestliže se k suspenzi přidá alkalický roztok, zeta potenciál klesne. Po přidání kyseliny dojde k neutralizaci nebo k získání kladného náboje [39].



Obrázek 14: Elektrická dvojvrstva [41]

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je příprava různých typů částic s enkapsulovanými polyfenolickými látkami, které byly extrahovány z guarany, ženšenu a goji. Jejich stabilita byla sledována měřením zeta potenciálu a rozpadem částic v modelových trávicích tekutinách a modelových potravinách.

V rámci experimentální části byly zkoumány následující cíle:

- Stanovení celkových polyfenolů, antokyanů, celkových flavonoidů a jednotlivých flavonoidů metodou HPLC;
- Příprava různých částic typu core-shell a enkapsulace přírodních extraktů;
- Charakterizace částic pomocí DLS;
- Stabilita a uvolňování aktivních složek v modelových fyziologických podmínkách.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Použité chemikálie

Methanol pro HPLC-Vitrum-LachNer (ČR)
Ethanol, 98%-Vitrum-LachNer (ČR)
Acetonitril for HPLC – Sigma-Aldrich (SRN)
Ethylacetát – Vitrum-LachNer (ČR)
Kyselina mléčná, 80%-Vitrum-LachNer (ČR)
Kyselina chlorovodíková, 35% - Vitrum-LachNer (ČR)
Dihydrát chloridu vápenatého – Vitrum-LachNer (SRN)
Kyselina gallová – Sigma-Aldrich (SRN)
Katechin – Sigma-Aldrich (SRN)
Rutin – Sigma-Aldrich (SRN)
Morin – Sigma-Aldrich (SRN)
Myricetin – Sigma-Aldrich (SRN)
Luteolin – Sigma-Aldrich (SRN)
Lecithin ze sóje – Serva (SRN)
Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu – Serva (SRN)
Chitosan z chitinu – Sigma-Aldrich (SRN)
Algin alginátu sodného – Sigma-Aldrich (SRN)
Tripolyfosfát sodný – Sigma-Aldrich (SRN)
Bile salts – směs kyseliny cholové a deoxycholové – Sigma-Aldrich (SRN)
Pankreatin z vepřové slinivky – Sigma-Aldrich (SRN)
Pepsin z prasečí žaludeční sliznice – Sigma-Aldrich (SRN)

Ostatní použité chemikálie byly čistoty p.a. a byly získány od běžných dodavatelů.

4.1.2 Použité přístroje

Analytické váhy – Boeco (SRN)
Centrifuga – U-32-R, Boeco (Německo)
Mikrocentrifuga – Mikro 200, Hettlich Zentrifugen
Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (VB)
Sestava HPLC, Ecom spol. s.r.o. (ČR)

- Programátor gradientu GP5
- Vysokotlaké čerpadlo LCP 4020
- Dávkovací analytický ventil smyčkový C R54157
- Termostat kolon LCO 101
- Spektrofotometrický detektor LCD 2084
- Kolona Zorbax Eclipse plus C18 (4,6 x 150 mm)

Ultrazvuk – PS 02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25 L, PowerSonic (SR)
Ultrazvukový homogenizátor – Bandelin Sonoplus – Sonorex Technik (SRN)
Vakuová odparka – HB4 Basic, HBA Labortechnik
ZetaSizer Nano ZS – Malvern (UK)
Vortex – Genius 3, IKA Vortex (SRN)
Optický mikroskop a software DinoCapture
Enkapsulátor BÜCHI B-392 Pro

4.2 Vzorky

Pro extrakci byly použity vzorky guarany, goji a ženšenu, které jsou běžně dostupné v obchodní síti:

- Guarana:
 - Název: Guarana, *Paullinia cupana*
 - Složení: Drcená semena guarany
 - Značka: EXOTIC HERBS
 - Dodavatel: Guarana Plus
 - Země původů: Brazílie



Obrázek 15: Guarana, *Paullinia cupana*

- Ženšen:
 - Název: Ženšen, *Panax ginseng*
 - Složení: Drcený kořen ženšenu
 - Značka: EXOTIC HERBS
 - Dodavatel: Guarana Plus
 - Země původů: Asie



Obrázek 16: Ženšen, *Panax ginseng*

- Goji:
 - Název: Goji, Kustovnice čínská
 - Značka: WOLFBERRY
 - Země původu: EU



Obrázek 17: Goji, Kustovnice čínská

4.3 Extrakce polyfenolů ze vzorků

Navážka vzorku byla smíchána s vodou nebo 10% kyselinou mléčnou pro lepší uvolnění polyfenolických látek ze vzorků. Směs byla ponechána po dobu 45 minut na třepačce a zfiltrována.

4.4 Stanovení celkových polyfenolů

Při reakci Folin-Ciocalteuova činidla s polyfenoly vzniká modrý komplex. Do zkumavky je přidáno 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml vody a 50 μ l vzorku. Směs je promíchána a ponechána 5 minut stát. Poté je k roztoku přidán 1 ml nasyceného uhličitanu sodného. Po 15 minutách stání je měřena absorbance při 750 nm. Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka pomocí software Microsoft Office Excel. Koncentrace neznámého vzorku je vypočítána z rovnice z grafu závislosti absorbance na koncentraci standardu, kterým je kyselina gallová.

4.5 Stanovení celkových flavonoidů

Do zkumavky je přidáno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml vody, 0,2 ml dusitanu sodného. Po pěti minutách je přidáno 0,2 ml chloridu hlinitého. Po dalších pěti minutách se k roztoku přidá 1,5 ml hydroxidu sodného a 1 ml vody. Po 15 minutách je měřena absorbance vzniklého červeného komplexu při 510 nm. Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka pomocí software Microsoft Office Excel. Koncentrace neznámého vzorku je poté vypočítána z rovnice z grafu závislosti absorbance na koncentraci standardu, kterým je katechin.

4.6 Stanovení celkových anthokyanů

5 g vzorku je rozetřeno s 20 ml methanolu okyseleného kyselinou chlorovodíkovou. Směs byla extrahována po dobu 15 minut na třepačce a poté centrifugována při 10 000 ot./min. po dobu 15 minut. Supernatant byl odlit a pevná fáze byla znovu extrahována okyseleným

methanolem. Supernatanty z obou centrifugací byly spojeny a doplněny na objem 150 ml. Vzorky byly měřeny spektrofotometricky při 528 nm. Jako blank byl použit okyselený methanol. Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr. Koncentrace byla vypočítána z kalibrační křivky závislosti absorpance na koncentraci kyaninhydrochloridu.

4.7 Stanovení jednotlivých flavonoidů metodou RP-HPLC s UV-VIS detekcí

Pro stanovení jednotlivých flavonoidů metodou HPLC byla extrakce vzorků provedena v 10% kyselině mléčné, aby došlo k uvolnění vázaných polyfenolických sloučenin.

Extrakt ze vzorku byl protřepán v ethylacetátu. Poté byla organická fáze oddělena a odpařená na rotační odparce. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze. Směs byla filtrována přes mikrofiltr s velikostí póru 0,45 µm a centrifugována na centrifuze při 10 000 ot./min po dobu 5 minut.

Pro stanovení jednotlivých flavonoidů byly použité standardy morinu, myricetinu a luteolinu, které byly rozpuštěny v absolutním ethanolu. Standard rutinu byl rozpuštěn v methanolu. Takto připravené standardy byly přidávány ke vzorkům a analyzovány metodou RP-HPLC/UV-VIS na koloně Zorbax Eclipse plus C18 při teplotě 30° C a průtoku 0,75 ml/min. Detekce byla provedena spektrofotometricky při vlnové délce 370 nm. Mobilní fáze je roztok o složení acetonitril : methanol : voda : kyselina fosforečná v poměru 30 : 20 : 49,5 : 0,5. Naměřená data byla analyzována v softwaru Clarity. Každý vzorek byl analyzován třikrát, ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka pomocí software Microsoft Office Excel.

4.8 Příprava částic

Pro přípravu částic byly používány pouze vodné extrakty. Po přípravě částic v kyselém extraktu docházelo k shlukování alginátu a u liposomů k vytváření velkých agregátů, které rychle sedimentovaly na dno nádoby.

4.8.1 Příprava polysacharidových částic

4.8.1.1 Příprava alginátových částic

6 ml 0,5% chloridu vápenatého bylo přikapáváno za stálého míchání do 20 ml extraktu, ve kterém bylo rozpuštěno 0,06 g alginátu (vznikl 0,3% roztok alginátu).

4.8.1.2 Příprava chitosanových částic

6 ml 0,5% roztoku tripolyfosfátu sodného (TTP) bylo za stálého míchání přikapáváno k 20 ml extraktu, ve kterém byla předem rozpuštěná navážka 0,06 g chitosanu s přísadkou 0,2 ml koncentrované kyseliny octové.

4.8.1.3 Příprava alginátových částic pomocí ultrazvuku

60 mg alginátu bylo rozpuštěno ve 20 ml extraktu. Vzniklá směs byla sonifikována a po malých dávkách bylo přidáváno 6 ml 0,5% roztoku chloridu vápenatého.

4.8.1.4 Příprava chitosanových částic pomocí ultrazvuku

250 mg chitosanu bylo rozpuštěno ve 40 ml extraktu a poté bylo přidáno 0,5 ml koncentrované kyseliny octové. Vzniklá směs byla ultrazvukována a po malých dávkách byly přidávány 4 ml 2% tripolyfosfátu sodného.

4.8.2 Příprava lipidových částic pro enkapsulaci polyfenolů

4.8.2.1 Příprava liposomových částic pomocí ultrazvuku

450 mg sojového lecithinu a 50 mg cholesterolu bylo přidáno k 20 ml vodného extraktu. Poté byla směs ultrazvukována.

4.8.2.2 Příprava liposomových částic metodou odpařování na tenké vrstvě

80 mg sojového lecithinu a 10 mg cholesterolu bylo rozpuštěno v 10 ml směsi chloroform : methanol v poměru 8 : 2. Roztok byl převeden do baňky a odpařen na vakuové odparce. K odparu bylo přidáno 10 ml vodného extraktu a směs byla ultrazvukována, dokud se lipidový film na baňce zcela nerozpustil.

4.8.3 Příprava částic pro enkapsulaci polyfenolů pomocí enkapsulátoru

4.8.3.1 Příprava alginátových částic

20 ml extraktu bylo smícháno s roztokem 2% alginátu. Vzniklá směs byla převedena do stříkačky a pomocí enkapsulátoru (Büchi) byla tryskou o definovaném průměru rozprašována do 50 ml 2% chloridu vápenatého, který byl nepřetržitě míchán.

4.8.3.2 Příprava alginátových částic s jádrem

20 ml extraktu bylo nasáto do stříkačky. 2% alginát byl nalit zvlášť do tlakové láhve. Pomocí dvou trysek o různých rozměrech byly tyto roztoky v enkapsulátoru směřovány a docházelo k vytvoření částic, které kapaly do vytvrzovacího roztoku (50 ml 2% chloridu vápenatého).

4.8.3.3 Příprava směsných částic

Postup je shodný s metodou popsanou v kapitole 4.8.3.1, jen obalový materiál pro enkapsulaci byl vytvořen smícháním 2% alginátu a 1% karboxymethylcelulózy v poměru 4 : 1.

4.9 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla stanovena pomocí obsahu celkových polyfenolů (kap. 4.4).

Při stanovení enkapsulační účinnosti byla nejprve změřena koncentrace polyfenolů v extraktu před enkapsulací. Poté byl extrakt enkapsulován a připravené částice byly centrifugovány při 14 000 otáčkách po dobu 30 minut. Byl odebrán vzorek supernatantu pro stanovení celkových polyfenolů.

Při stanovení enkapsulační účinnosti pomocí této metody byla vypočítána koncentrace celkových polyfenolů v extraktech před a po enkapsulaci. Po odečtení těchto hodnot bylo vypočteno enkapsulované množství polyfenolů v částicích.

4.10 Stanovení stability v trávicích šťávách

4.10.1 Složení modelové pankreatické šťávy

Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pankreatinu a 1,5 g NaHCO₃ ve 100 ml destilované vody, pH bylo upraveno na cca 8,9. Vzorky pro sledování stability byly připraveny v poměru 1:1. Po 20 minutách inkubace při 37 °C byla změřena koncentrace celkových polyfenolů a byla porovnána s původním množstvím uzavřeným v částicích.

4.10.2 Složení modelové žaludeční šťávy

Žaludeční šťáva byla připravena z 0,25 g pepsinu, který byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové a hodnota pH byla upravena na hodnotu 0,9. Vzorky pro sledování stability byly připraveny v poměru 1:1.

Po 20 minutách inkubace při 37 °C byla změřená koncentrace celkových polyfenolů a byla porovnána s původním množstvím uzavřeným v částicích.

4.10.3 Složení modelové žlučové šťávy

Žlučová šťáva byla připravena přidáním 0,8 g žlučových solí do 200 ml pufru o pH 8. Vzorky pro sledování stability byly připraveny v poměru 1:1. Po 40 minutách inkubace při 37 °C byla změřená koncentrace celkových polyfenolů a byla porovnána původním množstvím.

4.11 Stanovení stability v modelových potravinách

Stanovení stability částic ve standardních modelových potravinách bylo provedeno pomocí roztoků o přesně definovaném složení, které nahrazují určitou skupinu potravin. Pro potraviny s pH nižším než 4,5 byl použit roztok 3% roztoku kyseliny octové. Pro potraviny s pH vyšším než 4,5 byla použita voda. Pro modelové alkoholické nápoje a potraviny byl připraven 10% roztok ethanolu a pro tukové potraviny 25% roztoku oleje [42].

Částice s enkapsulovanými extrakty byly v těchto roztocích inkubovány po dobu tří dnů, jednoho týdne a jednoho měsíce. Poté byla stanovena koncentrace celkových polyfenolů, které byly uvolněné v průběhu ponechání částic v roztoku.

4.12 Stanovení velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla

Stanovení velikosti částic bylo provedeno na přístroji ZetaSizer Nano ZS. Připravené částice byly 100krát zředěny vodou a analyzovány.

4.13 Stanovení stability pomocí zeta potenciálu

Stabilita částic byla změřena stejně jako velikost částic na přístroji ZetaSizer Nano ZS pomocí Zeta Dipp Cely. Před vlastním měřením byla Zeta Dipp Cela ponořena do roztoku.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkových polyfenolů bylo provedeno podle postupu uvedeného v metodách (kap. 4.4). Extrakce byla provedena pro porovnání v 10% kyselině mléčné a v destilované vodě. Všechna měření byla provedená třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítaný průměr.

Koncentrace polyfenolů v extraktech byla vypočítaná z rovnice z kalibrační křivky kyseliny gallové:

$$A = 1,0909 \cdot c$$

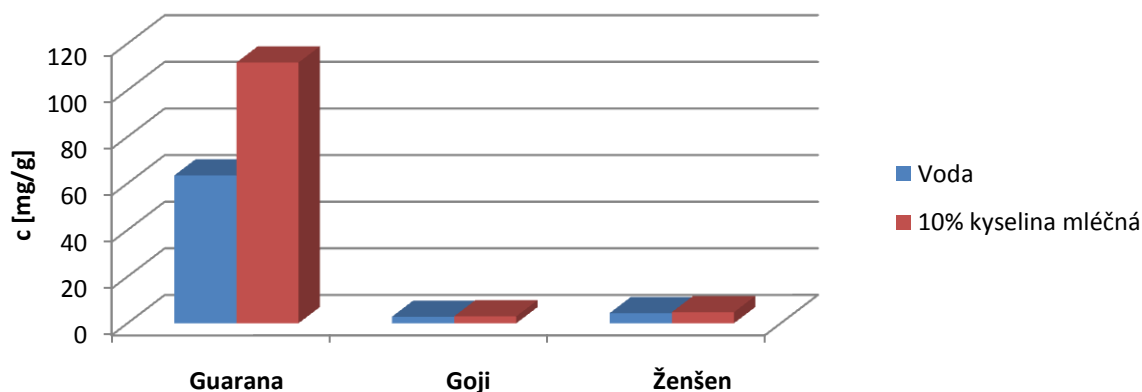
Celkový obsah polyfenolických látek byl přepočítan na mg v g suchého podílu (Příloha 1).

Jak lze vidět z tabulky 1 a grafu 1, vlivem 10% kyseliny mléčné dochází k většímu uvolnění polyfenolů ze vzorku. Tento jev je vyvolán kyselou hydrolyzou glykosidových vazeb polyfenolů a lepším uvolněním aglykonů do rozpouštědla. U guarany je to až o 43,33 % více oproti vodě, u goji o 6,08 % a ženšenu o 8,84 %.

Největší množství polyfenolů je obsaženo v guaraně s koncentrací 111,84 mg/g, což je až 23krát více než v ženšenu. Nejmenší obsah polyfenolů byl naměřen u goji, kde byla koncentrace 2,96 mg/g vzorku.

Tabulka 1: Stanovení celkových polyfenolů v extraktech

Vzorek	Koncentrace v extraktu [mg/g]	
	Voda	10% kyselina mléčná
Guarana	63,38 ± 1,26	111,84 ± 2,58
Goji	2,78 ± 0,09	2,96 ± 0,04
Ženšen	4,33 ± 0,15	4,75 ± 0,11



Graf 1: Stanovení celkových polyfenolů ve vzorcích

5.2 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů bylo provedeno podle postupu uvedeného v metodách (kap. 4.5). Extrakce byla opět pro porovnání provedena ve vodě a v 10% kyselině mléčné. Všechna měření byla provedená třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítaný průměr a SD.

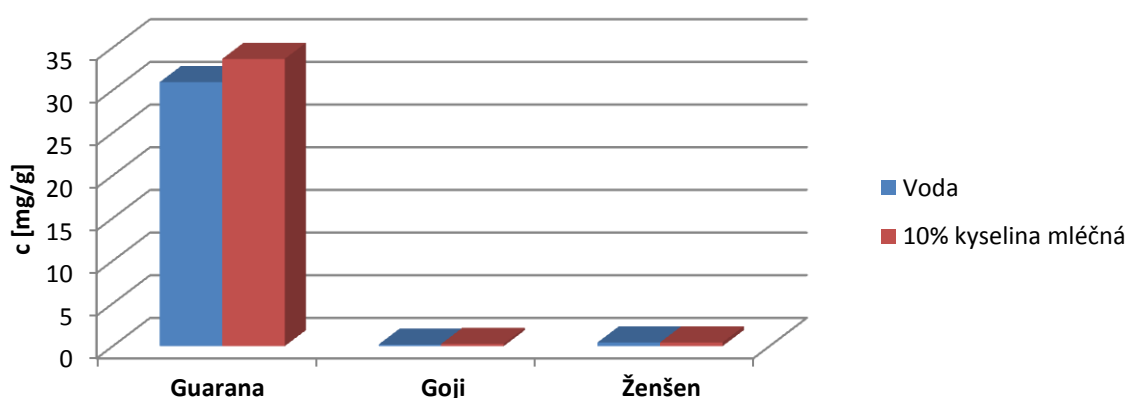
Koncentrace flavonoidů v extraktech byla vypočítaná z rovnice z kalibrační křivky katechinu:

$$A = 2,9744 \cdot c$$

Celkový obsah flavonoidů byl přepočítán mg v g sušiny. Z výsledků uvedených v tabulce 2 a grafu 2 lze vidět, že při použití 10% kyseliny mléčné se uvolňuje více flavonoidů než při extrakci ve vodném prostředí. U guarany je to o 8,11 % více oproti vodě, u goji o 26,92 % a ženšenu o 2,27 %. Největší množství flavonoidů se nachází v guaraně. Jejich koncentrace je 33,67 mg/g. Nejmenší obsah polyfenolů by naměřen u goji, kde byla koncentrace až 129krát menší než v guaraně.

Tabulka 2: Stanovení celkových flavonoidů v extraktech

Vzorek	Koncentrace v extraktu [mg/g]	
	Voda	10% kyselina mléčná
Guarana	30,94 ± 5,12	33,67 ± 2,87
Goji	0,19 ± 0,06	0,26 ± 0,08
Ženšen	0,43 ± 0,03	0,44 ± 0,02



Graf 2: Stanovení celkových flavonoidů ve vzorcích

5.3 Stanovení jednotlivých flavonoidů metodou HPLC

Stanovení jednotlivých flavonoidů bylo provedeno podle postupu uvedeného v metodách (kap. 4.6). Extrakce byla provedena v 10% kyselině mléčné z důvodu lepšího uvolňování flavonoidů. Příklad chromatogramu je uveden v Příloze 2.

Koncentrace jednotlivých flavonoidů v extraktech byly vypočítány z rovnic z kalibračních křivek vybraných standardů rutinu, morinu, myricetinu a luteolinu:

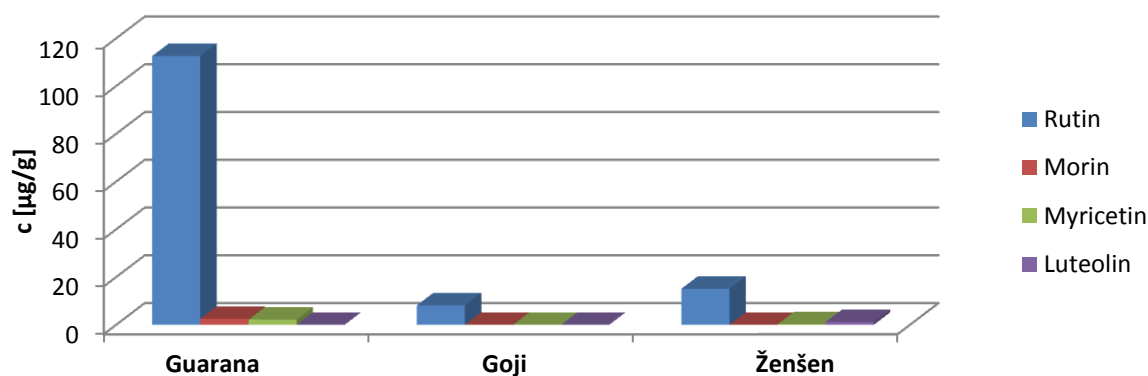
Tabulka 3: Rovnice regrese jednotlivých standardů

Standard	Regresní rovnice
Rutin	$A = 118,209 \cdot c$
Morin	$A = 144,513 \cdot c$
Myricetin	$A = 695,980 \cdot c$
Luteolin	$A = 347,840 \cdot c$

Výběr analyzovaných individuálních fenolických látek byl proveden na základě literárních údajů a dostupnosti standardů. Z těchto derivátů byl nejvíce zastoupeným flavonoidem ve všech zkoumaných vzorcích rutin. U guarany dosahuje jeho koncentrace 112,60 µg/g vzorku. Kromě toho je v guaraně rovněž přítomen i morin, myricetin a luteolin. V ženšenu byly detekovány rutin, myricetin a luteolin, v goji pouze rutin.

Tabulka 4: Koncentrace jednotlivých flavonoidů ve vzorcích

Vzorek	Rutin [$\mu\text{g/g}$]	Morin [$\mu\text{g/g}$]	Myricetin [$\mu\text{g/g}$]	Luteolin [$\mu\text{g/g}$]
Guarana	$112,60 \pm 3,58$	$2,52 \pm 0,72$	$2,20 \pm 0,12$	ND
Goji	$8,12 \pm 0,09$	ND	ND	ND
Ženšen	$15,1 \pm 1,56$	ND	$0,22 \pm 0,02$	$1,19 \pm 0,28$



Graf 3: Stanovení jednotlivých flavonoidů

5.4 Stanovení antokyanů

Stanovení anthokyanů bylo provedeno podle postupu uvedeného v metodách (kap. 4.7). Extrakce byla provedena v methanolu okyseleném kyselinou chlorovodíkovou. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a SD.

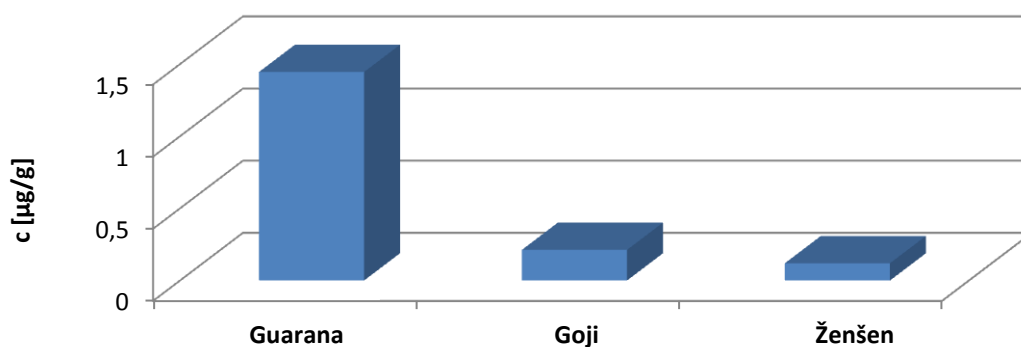
Koncentrace anthokyanů v extraktech byla vypočítána z rovnice z kalibrační křivky kyaninhydrochloridu:

$$A = 60,3368 \cdot c$$

Celkový obsah anthokyanů byl přepočítán na mg v g suchého podílu. Největší množství antokyanů bylo naměřeno opět u guarany, která je 1,45 μl . Nejnížší koncentrace se vyskytuje u ženšenu.

Tabulka 5: Stanovení obsahu antokyanů ve vzorcích

Vzorek	Koncentrace v extraktech [$\mu\text{g/g}$]
Guarana	$1,45 \pm 0,26$
Goji	$0,21 \pm 0,07$
Ženšen	$0,12 \pm 0,01$



Graf 4: Stanovení obsahu antokyanů

5.5 Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu

Připravené částice s enkapsulovanými extrakty ze vzorků guarany, goji a ženšenu byly pozorovány pomocí optického mikroskopu. Na obrázku 1 a 2 jsou vidět částice připravené na enkapsulátoru. Na obrázku č. 2 je zachycena alginátová částice v kyselém extraktu, kde je možné vidět i sraženiny, které se vytvářely při přípravě v tomto extraktu. Na obrázku č. 3 jsou alginátové částice připravené na ultrazvuku, a na obrázku č. 4 a 5 jsou zachyceny liposomy (první připravené na ultrazvuku a druhé metodou odpařování na tenké vrstvě). Na obrázku č. 6 jsou chitosanové částice připravené na ultrazvuku. Zvětšení bylo u částic připravených na enkapsulátoru 200x, u ostatních 400x.

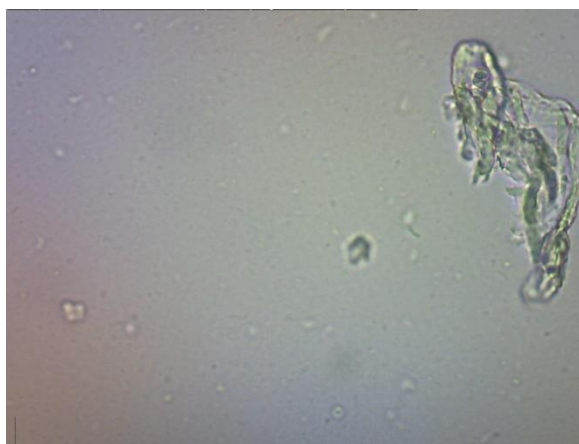
Z mikroskopických snímků je patrné, že na enkapsulátoru byly připraveny vesměs mikročástice o rozměrech několik set mikrometrů, manuálně připravené částice mohou dosáhnout i rozměrů v nm. Na obrázcích jsou rovněž zachyceny případné nečistoty a rozdílná struktura částic, jako v případě alginátu a chitosanu, kdy se jedná spíše o gel. V případě enkapsulátoru dochází k vytvoření většinou kulovitých částic.



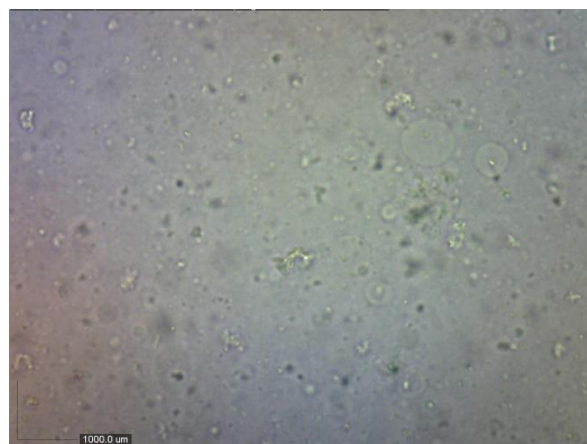
Obr. 1: Alginátové částice (enkapsulátor)



Obr. 2: Kyselý extrakt (enkapsulátor)



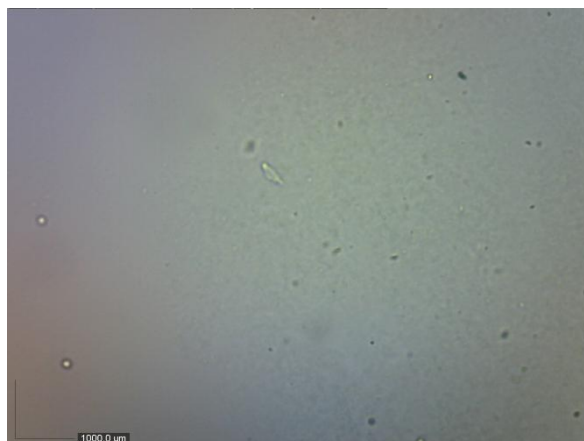
Obr. 3: Alginátové částice-ultrazvuk



Obr. 4: Liposomy-ultrazvuk



Obr. 5: Liposomy-odpař. na tenké vrstvě



Obr. 6: Chitosanové částice-ultrazvuk

5.6 Stanovení enkapsulační účinnosti

5.6.1 Polysacharidové částice

5.6.1.1 Alginátové částice

Alginátové částice byly připraveny manuálně metodou uvedenou v kapitole 4.8.1.1. V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky měření.

Touto metodou bylo dosaženo nízké enkapsulační účinnosti, která se pohybuje kolem 2 %. K největší enkapsulaci polyfenolů docházelo u guarany, k nejmenší u goji.

Tabulka 5: Enkapsulační účinnost alginátových částic

Vzorek	Koncentrace celkových polyfenolů		nezabaleno [%]	zabaleno [%]
	C _{počáteční} [mg/ml]	C _{koncová} [mg/ml]		
Guarana	37,22	36,11	97,02	2,98
Goji	6,87	6,77	98,58	1,42
Ženšen	4,78	4,67	97,81	2,19

5.6.1.2 Chitosanové částice

Chitosanové částice byly připraveny manuální metodou uvedenou v kapitole 4.8.1.2. V tabulce 6 jsou uvedeny výsledky.

Zabalené množství polyfenolů bylo největší u ženšenu, kde dosahovalo 5,18 % a nejmenší u goji, kde bylo dosaženo pouze 2,46% účinnosti.

Tabulka 6: Enkapsulační účinnost chitosanových částic

Vzorek	Koncentrace celkových polyfenolů		nezabaleno [%]	zabaleno [%]
	C _{počáteční} [mg/ml]	C _{koncová} [mg/ml]		
Guarana	37,22	35,81	96,22	3,78
Goji	6,87	6,70	97,54	2,46
Ženšen	4,78	4,53	94,82	5,18

5.6.1.3 Alginátové částice připravené pomocí ultrazvuku

Alginátové částice s využitím ultrazvuku byly připraveny manuální metodou uvedenou v kapitole 4.8.1.3. V tabulce 7 jsou uvedeny výsledky

K největší účinnosti enkapsulace docházelo u ženšenu, kde bylo enkapsulováno 37,25 % polyfenolů. Zabalení polyfenolů bylo nejmenší u goji, kde se podařilo uzavřít pouze 20,19 % z původního extrahovaného množství. Použitím ultrazvuku se podařilo zvýšit enkapsulační účinnost v porovnání s předchozími metodami. Může to být způsobeno lepším síťováním polymerních řetězců alginátu po přidavku vytvrzovacího roztoku a následné aplikaci ultrazvuku.

Tabulka 7: Enkapsulační účinnost alginátových částic na ultrazvuku

Vzorek	Koncentrace celkových polyfenolů		nezabaleno [%]	zabaleno [%]
	$C_{\text{počáteční}}$ [mg/ml]	$C_{\text{koncová}}$ [mg/ml]		
Guarana	30,34	23,56	77,64	22,36
Goji	4,86	3,88	79,81	20,19
Ženšen	4,06	2,55	62,75	37,25

5.6.1.4 Chitosanové částice připravené pomocí ultrazvuku

Chitosanové částice s využitím ultrazvuku byly připraveny metodou uvedenou v kapitole 4.8.1.4. V tabulce 8 jsou uvedeny výsledky.

Po použití ultrazvuku byla enkapsulační účinnost opět vyšší než u chitosanových částic připravených pouhým mícháním. K největšímu zabalení polyfenolů docházelo u ženšenu, kde byla účinnost 20,57 %, k nejmenšímu u goji s pouhými 5 %.

Tabulka 8: Enkapsulační účinnost alginátových částic na ultrazvuku

Vzorek	Koncentrace celkových polyfenolů		nezabaleno [%]	zabaleno [%]
	$C_{\text{počáteční}}$ [mg/ml]	$C_{\text{koncová}}$ [mg/ml]		
Guarana	82,04	68,75	83,80	16,20
Goji	12,38	11,72	94,67	5,33
Ženšen	9,00	7,15	79,43	20,57

5.6.2 Lipidové částice

5.6.2.1 Příprava liposomových částic s využitím ultrazvuku

Liposomy byly připraveny podle návodu v kapitole 4.8.2.1. V tabulce 9 jsou shrnuty výsledky.

Lipidové částice vykazovaly podobnou enkapsulační účinnost jako chitosanové a alginátové částice připravené na ultrazvuku. Tato metoda je vhodná pro guaranu, kde docházelo k největšímu zabalení polyfenolů, a to 39,90 %.

Tabulka 9: Enkapsulační účinnost liposomových částic

Vzorek	Koncentrace celkových polyfenolů		nezabaleno [%]	zabaleno [%]
	$C_{\text{počáteční}}$ [mg/ml]	$C_{\text{koncová}}$ [mg/ml]		
Guarana	38,59	23,19	60,10	39,90
Goji	5,23	4,93	94,22	5,78
Ženšen	4,48	3,62	80,78	19,22

5.6.2.2 Příprava lipidových částic metodou odpařování na tenké vrstvě

Liposomy připravené metodou odpařování na tenké vrstvě byly připraveny podle návodu v kapitole 4.8.2.2. V tabulce 10 jsou shrnuty výsledky enkapsulační účinnosti.

Výsledky jsou srovnatelné s přípravou liposomů na ultrazvuku. Největší účinnost byla prokázána u guarany, kde bylo enkapsulováno 38,24 % polyfenolů z původního množství. K nejmenšímu zabalení došlo u goji.

Tabulka 10: Enkapsulační účinnost liposomových částic

Vzorek	Koncentrace celkových polyfenolů		nezabalené [%]	zabalené [%]
	C _{počáteční} [mg/ml]	C _{koncová} [mg/ml]		
Guarana	38,59	23,83	61,76	38,24
Goji	5,23	4,86	92,89	7,11
Ženšen	4,48	3,58	79,96	20,04

5.6.3 Částice připravené na enkapsulátoru

5.6.3.1 1% alginátové částice

Alginátové částice na enkapsulátoru byly připraveny metodou uvedenou v kapitole 4.8.3.1. Pro přípravu těchto částic byly použity dvě velikosti trysek – 300 µm a 450 µm. V tabulce 11 jsou uvedeny výsledky.

Největší enkapsulační účinnost měl ženšen s tryskou 300 µm, která byla 47,61 %. Nejmenší byla stanovena u goji s tryskou 450 µm. I tak tato metoda poskytuje dobrou enkapsulační účinnost u goji v porovnání s předchozími přípravami částic. Jak rovněž vyplývá z výsledku, pro účinnější zabalení polyfenolických látek je vhodnější použít trysku s menším průměrem a tím pádem i vytvořením menších částic.

Tabulka 11: Enkapsulační účinnost 1% alginátových částic

TRYSKA 300 µm				
Vzorek	Koncentrace celkových polyfenolů		nezabalené [%]	zabalené [%]
	C _{počáteční} [mg/ml]	C _{koncová} [mg/ml]		
Guarana	31,52	22,16	70,30	29,70
Goji	3,15	1,95	61,77	38,23
Ženšen	5,38	2,82	52,39	47,61
TRYSKA 450 µm				
Vzorek	Koncentrace celkových polyfenolů		nezabalené [%]	zabalené [%]
	C _{počáteční} [mg/ml]	C _{koncová} [mg/ml]		
Guarana	31,52	20,97	66,52	33,48
Goji	3,15	2,57	81,40	18,60
Ženšen	5,38	3,23	60,05	39,95

5.6.3.2 2% alginátové částice

Alginátové částice na enkapsulátoru byly připraveny metodou uvedenou v kapitole 4.8.3.1. Pro přípravu těchto částic byly použity dvě velikosti trysek – 300 µm a 450 µm. V tabulce níže 12 jsou uvedeny výsledky.

U zvýšení koncentrace alginátu byla výsledná enkapsulační účinnost nízká. U guarany a ženšenu nepřesahovala 20 %, u goji nedocházelo k žádné enkapsulaci polyfenolických látek.

Tabulka 12: Enkapsulační účinnost 2% alginátových částic

TRYSKA 300 µm				
	Koncentrace celkových polyfenolů			
Vzorek	C _{počáteční} [mg/ml]	C _{koncová} [mg/ml]	nezabaleno [%]	zabaleno [%]
Guarana	45,76	39,81	86,99	13,01
Goji	3,78	3,78	100	0
Ženšen	4,80	3,99	83,02	16,98

5.6.3.3 1% alginátové částice – s jádrem

Alginátové částice s jádrem na enkapsulátoru byly připraveny metodou uvedenou v kapitole 4.8.3.2. Pro přípravu těchto částic byly použity dva typy trysek – vnitřní 150 µm a vnější 300 µm. V tabulce 13 jsou uvedeny výsledky.

Přípravou částic s jádrem na enkapsulátoru docházelo k největšímu zabalení polyfenolů do částic. Extrakt je tlačěn zvlášť vnitřní tryskou, obalový materiál zase větší vnější tryskou a proto je pravděpodobnost enkapsulace větší. Největší enkapsulační účinnost byla stanovena u ženšenu, kde došlo k enkapsulaci 65,74 % polyfenolických látek. Nejnižší účinnost je patrná u guarany.

Tabulka 13: Enkapsulační účinnost 1% alginátových částic

	Koncentrace celkových polyfenolů			
Vzorek	C _{počáteční} [mg/ml]	C _{koncová} [mg/ml]	nezabaleno [%]	zabaleno [%]
Guarana	31,63	19,73	62,38	37,62
Goji	4,38	2,57	58,65	41,35
Ženšen	3,94	1,35	34,26	65,74

5.6.3.4 2% alginátové částice – s jádrem

Alginátové částice s jádrem na enkapsulátoru byly připraveny metodou uvedenou v kapitole 4.8.3.2. Pro přípravu těchto částic byly použity dva typy trysek – vnitřní 150 µm a vnější 300 µm. V tabulce 14 jsou uvedeny výsledky.

Částice připravené tímto postupem dosahovaly největší enkapsulační účinnosti. U guarany dosahovala 44,58 %, u goji 42,02. U ženšenu byla naměřená účinnost 89,93 %, což je nejvyšší enkapsulační účinnost, které bylo u těchto komplexních extraktů dosaženo.

Tabulka 14: Enkapsulační účinnost 1% alginátových částic

	Koncentrace celkových polyfenolů			
Vzorek	C _{počáteční} [mg/ml]	C _{koncová} [mg/ml]	nezabaleno [%]	zabaleno [%]
Guarana	37,84	20,97	55,42	44,58
Goji	3,72	2,15	57,98	42,02
Ženšen	3,75	0,38	10,07	89,93

5.6.3.5 Směsné částice alginátu a karboxymethylcelulózy – s jádrem

Směsné alginátové částice a karboxymethylcelulózy s jádrem na enkapsulátoru byly připraveny metodou uvedenou v kapitole 4.8.3.3. Pro přípravu těchto částic byly použity dva typy trysek – vnitřní 150 µm a vnější 300 µm. V tabulce 15 jsou uvedeny výsledky měření.

U těchto částic docházelo k největšímu zabalení polyfenolů u ženšenu, kde enkapsulační účinnost dosahovala 37 %. Nejnižší účinnost byla u goji, kde bylo enkapsulováno pouhých 5 % polyfenolických látek.

Tabulka 15: Enkapsulační účinnost 1% alginátových částic

Vzorek	Koncentrace celkových polyfenolů		nezabalené [%]	zabalené [%]
	C _{počáteční} [mg/ml]	C _{koncová} [mg/ml]		
Guarana	38,36	29,70	77,42	22,58
Goji	7,56	7,18	94,96	5,04
Ženšen	7,19	4,50	62,51	37,49

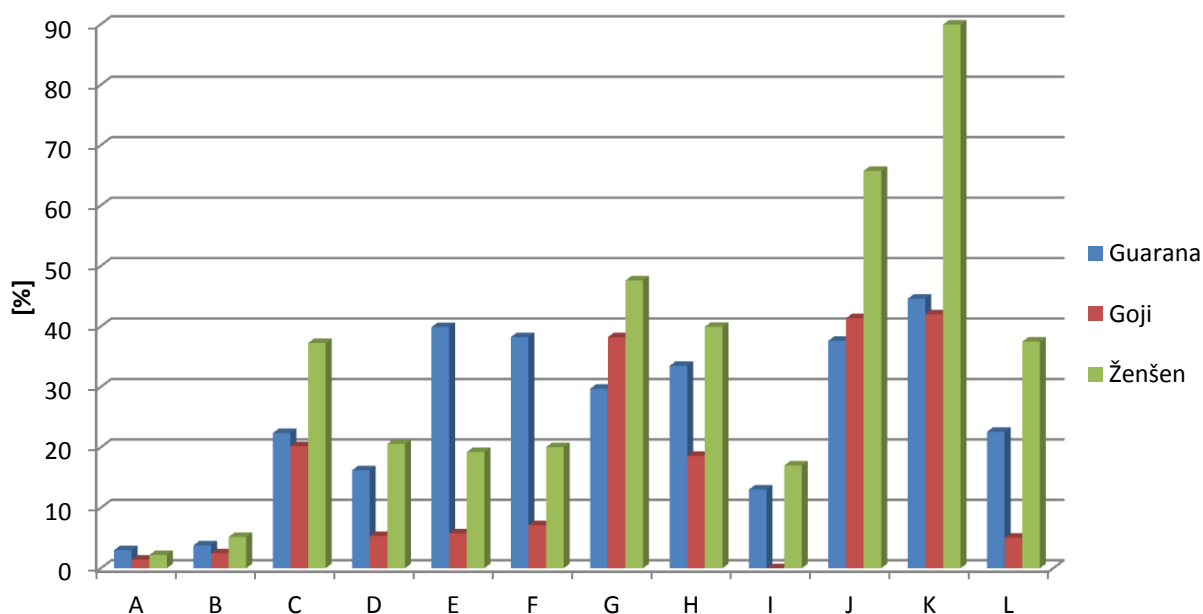
5.6.4 Porovnání enkapsulační účinnosti jednotlivých metod

Graf 5 srovnává enkapsulační účinnosti jednotlivých metod u guarany, goji a ženšenu. Nejlepší výsledky dosahuje metoda přípravy částic s 2% alginátem na enkapsulátoru. Účinnost u guarany a goji dosahuje 40%, u ženšenu je to až 89,93 %. Dobré zabalení extraktu do kapslí je možné pozorovat rovněž u obou typů liposomů, kde se účinnost pohybuje u guarany kolem 40%.

Obecně k nejlepším enkapsulačním účinnostem docházelo u ženšenu, pak u guarany a nejmenší enkapsulaci polyfenolických látek vykazovala goji.

Tabulka 16: Popisky ke grafu

	Částice		Částice
A	Alginátové částice	G	1% alginátové částice (enkapsulátor, tryska 300 µl)
B	Chitosanové částice	H	1% alginátové částice (enkapsulátor, tryska 450 µl)
C	Alginátové částice – ultrazvuk	I	2% alginátové částice (enkapsulátor)
D	Chitosanové částice – ultrazv.	J	1% alginátové částice s jádrem (enkapsulátor)
E	Liposomy – ultrazvuk	K	2% alginátové částice s jádrem (enkapsulátor)
F	Liposomy – odp. reversní fáze	L	Směsné částice alginátu a CMC (enkapsulátor)



Graf 5: Porovnání enkapsulačních metod u guarany, goji a ženšenu

Z přehledného souhrnného vyhodnocení (Graf 5) je patrné, že obecně vyšší účinnosti enkapsulace komplexních přírodních extraktů bylo dosaženo na enkapsulátoru, výhodnější bylo použití vyšší koncentrace alginátu. Enkapsulátor umožňuje přípravu core-shell částic o definované velikosti, které jsou připraveny optimalizovanou technologií, při níž je eliminován případný negativní efekt složek přírodních extraktů na proces enkapsulace. Mikročástice jsou zřejmě vhodnější aplikační forma než nanočástice.

5.7 Stanovení stability v trávicích šťávách

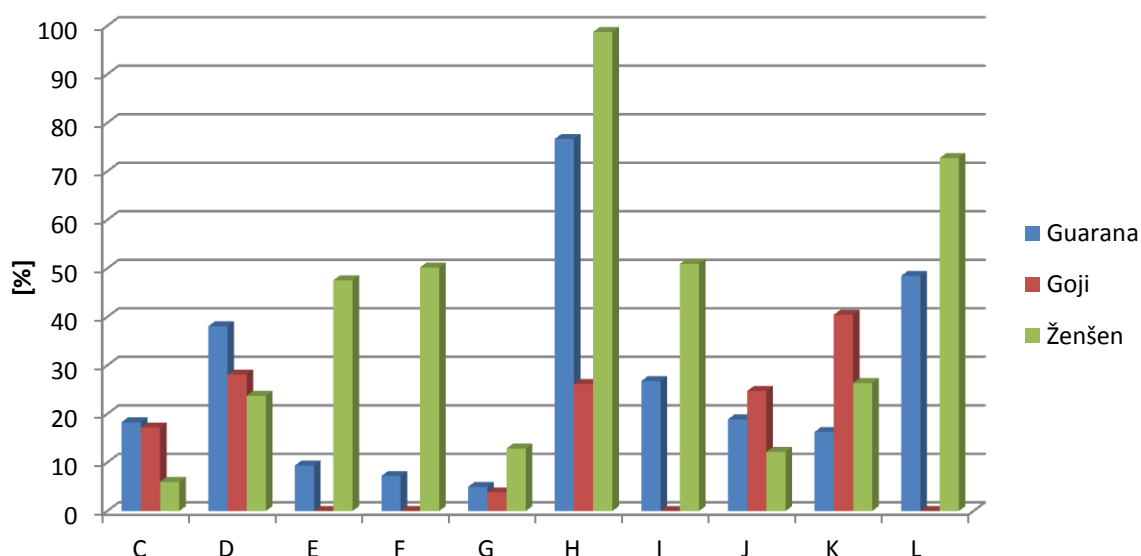
Částice připravené na enkapsulátoru byly naváženy v množství 0,25 g na 0,5 ml trávicí modelové tekutiny. U roztoku liposomů a polysacharidových částic byly částice připraveny v poměru 1 : 1 (roztok částic : trávicí šťáva). Pro spektrofotometrické stanovení stability částic pomocí uvolňování polyfenolů byly zahrnuty pouze částice s enkapsulační účinností větší než 10 %.

5.7.1 Vliv žaludeční šťávy

Vlivem žaludeční šťávy dochází k velkému uvolnění polyfenolů, to znamená, že připravené částice nejsou v tomto prostředí příliš stabilní (tabulka 17, graf 6). Největší stabilitu měly alginátové částice připravené na ultrazvuku s enkapsulovaným ženšenem a lipidové částice s enkapsulovaným extraktem z guarany, kdy uvolněné množství nepřesáhlo 10 %. Naopak nejmenší stabilita byla naměřená u 1% alginátových částic připravených na enkapsulátoru se zapouzdřeným ženšenem, kde se vlivem kyselého prostředí žaludeční šťávy uvolnilo skoro veškeré množství polyfenolů.

Tabulka 17: Procentuální uvolnění polyfenolů z částic v žaludeční šťávě

Vzorek	C [%]	D [%]	E [%]	F [%]	G [%]	H [%]	I [%]	J [%]	K [%]	L [%]
Guarana	18,31	38,07	9,38	7,22	4,99	76,68	26,79	18,89	16,29	48,47
Goji	17,20	28,14	-	-	3,85	26,19	-	24,73	40,45	-
Ženšen	6,00	23,76	47,56	50,19	12,89	98,74	50,93	12,20	26,38	72,74



Graf 6: Porovnání rozpadu částic v žaludeční šťávě

5.7.2 Vliv pankreatické šťávy

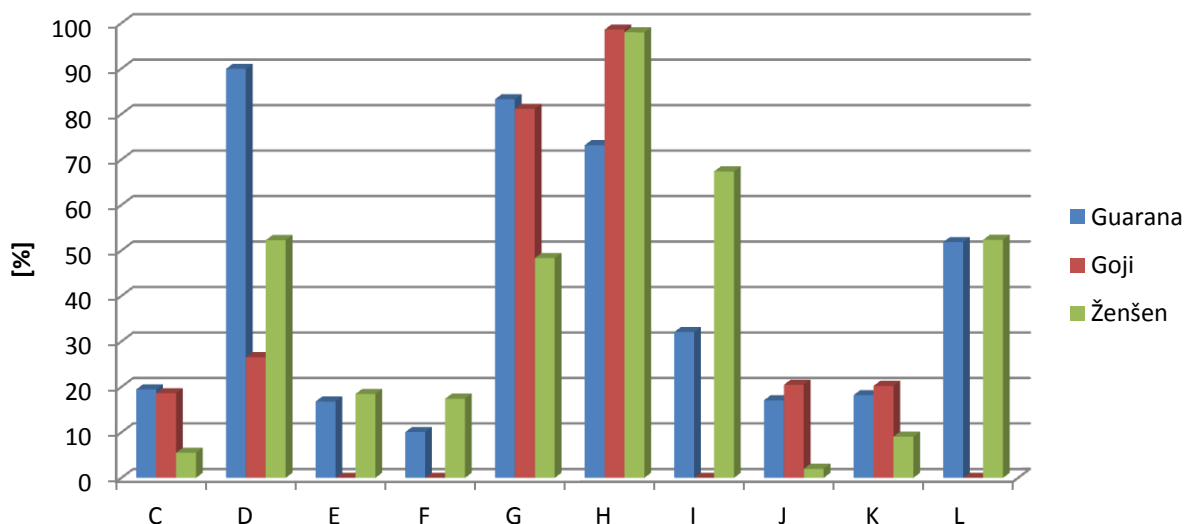
V prostředí pankreatické šťávy bylo naměřeno největší uvolňování polyfenolických látek z připravených částic (tabulka 18, graf 7). Pankreatin, jež je hlavní složkou této modelové tekutiny, tvoří směs enzymů (protézy, amylázy, lipázy). Tyto enzymy jsou schopny hydrolyzovat sacharidy, bílkoviny i lipidy [42]. Proto je rozklad v tomto prostředí velmi pravděpodobný.

K největšímu uvolňování polyfenolů docházelo u 1% alginátových částic připravených na enkapsulátoru, kde bylo rozloženo více než 80 % z původního množství enkapsulovaných látek. Jak je možno si povšimnout v tabulce, větší částice (vzorek H) se rozpadají rychleji než menší částice připravené stejnou metodou (vzorek G). Jsou tedy více stabilní.

Velmi dobrou stabilitu měly lipidové částice, kde uvolňování nepřekročilo 20 % polyfenolických látek a rovněž 1% a 2% alginátové částice s jádrem připravené na enkapsulátoru.

Tabulka 18: Procentuální uvolnění polyfenolů z pankreatické šťávy

Vzorek	C [%]	D [%]	E [%]	F [%]	G [%]	H [%]	I [%]	J [%]	K [%]	L [%]
Guarana	19,46	89,93	16,79	10,07	83,25	73,16	32,08	17,05	18,20	51,85
Goji	18,60	26,54	-	-	81,16	98,57	-	20,47	20,22	-
Ženšen	5,52	52,28	18,45	17,41	48,34	97,98	67,40	2,00	9,06	52,35



Graf 7: Porovnání rozpadu částic v pankreatické šťávě

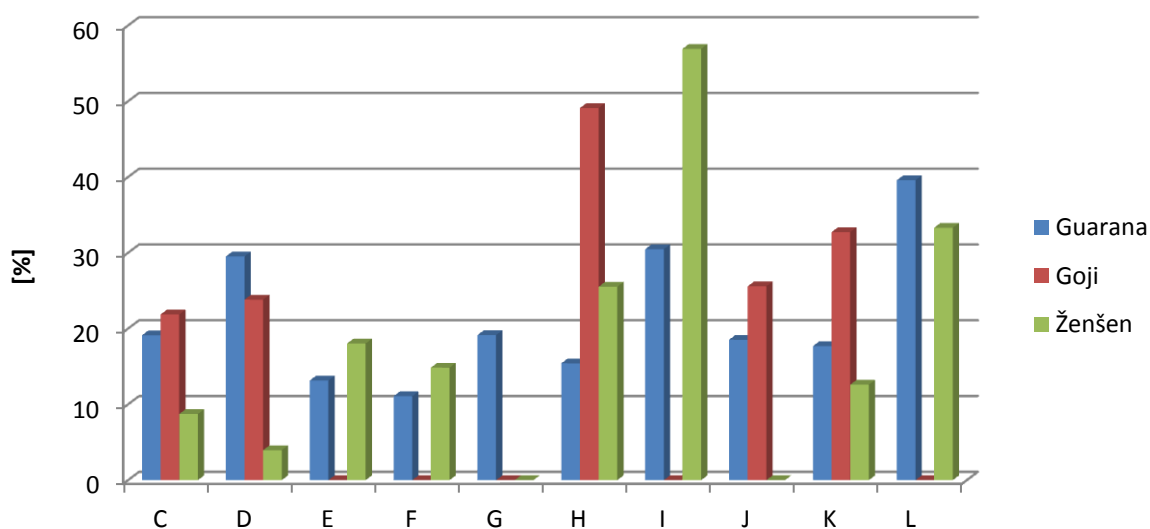
5.7.3 Vliv žlučové šťávy

Vlivem umělé žlučové modelové tekutiny dochází k nejmenšímu rozpadu připravených částic, v porovnání se žaludeční a pankreatickou šťávou (tabulka 19, graf 8). Nejmenší stabilita je pozorovatelná u 1% a 2% alginátových částic připravených na enkapsulátoru (vzorek H a I), dále pak u směsných částic alginátu a CMC (vzorek L) a chitosanových částic připravených na ultrazvuku. Největší stabilita (nejmenší rozklad částic) byla naměřená u liposomu a 1% alginátových částic s tryskou 300 µl (vzorek G).

Tabulka 19: Procentuální uvolnění polyfenolů ve žlučové šťávě

Vzorek	C [%]	D [%]	E [%]	F [%]	G [%]	H [%]	I [%]	J [%]	K [%]	L [%]
Guarana	19,12	29,52	13,15	11,08	19,15	15,42	30,48	18,53	17,69	39,58
Goji	21,87	23,83	-	-	0,00	49,11	-	25,58	32,74	-
Ženšen	8,73	3,96	18,03	14,85	0,00	25,52	56,92	0,00	12,60	33,31

Výsledky stability částic v modelovém fyziologickém prostředí umožňují odhadnout, které typy částic jsou vhodné pro cílený transport a uvolňování účinných látek v trávicím traktu. Částice, které jsou relativně stabilní v žaludeční šťávě a podstatně méně stabilní ve střevní šťávě, mohou být úspěšně využity k transportu látek do střeva a ochraně před případným negativním působením kyselého prostředí žaludku.



Graf 8: Porovnání rozpadu částic ve žlučové šťávě

5.8 Stanovení stability v modelových potravinách

Částice připravené na enkapsulátoru byly naváženy v množství 0,25 g na 0,5 ml trávicí modelové tekutiny. U roztoku liposomů a polysacharidových částic byly smíchány v poměru 1 : 1 (roztok částic : trávicí šťáva). Pro spektrofotometrické stanovení uvolňování polyfenolů byly zahrnuty pouze částice s enkapsulační účinností větší než 10 %.

5.8.1 Inkubace částic v 10% ethanolu

V 10% roztoku ethanolu docházelo k největšímu rozkladu u alginátových částic připravených na ultrazvuku a u 1% alginátových částic s tryskou 450 µm připravených na enkapsulátoru (vzorek C a H), kde se během měsíce uvolnilo v průměru 80 % enkapsulovaných látek. Jak je opět vidět, větší částice mají nižší stabilitu než menší částice připravené stejnou metodou (tabulka 20).

K nejmenšímu uvolnění polyfenolických látek docházelo u alginátových částic s jádrem připravených na enkapsulátoru (vzorek J, K, L), kde bylo uvolněno v rozmezí od 20 do 70 % zapouzdřených polyfenolů.

Tabulka 20: Rozpad částic v 10% ethanolu v průběhu týdne a měsíce

Částice		Guarana	Goji	Ženšen
C [%]	7. den	15,86	13,29	58,22
	31. den	45,85	96,17	79,48
D [%]	7. den	44,23	30,56	17,82
	31. den	52,58	51,23	34,89
E [%]	7. den	31,89	-	18,97
	31. den	62,64	-	56,52
F [%]	7. den	28,62	-	15,19
	31. den	58,19	-	46,59
G [%]	7. den	25,97	43,27	17,42
	31. den	41,25	48,08	20,15
H [%]	7. den	37,16	68,75	20,21
	31. den	80,52	84,03	23,27
I [%]	7. den	55,30	-	69,65
	31. den	64,53	-	78,67
J [%]	7. den	22,03	42,64	62,72
	31. den	23,96	49,46	72,37
K [%]	7. den	24,33	46,22	18,51
	31. den	31,37	61,63	30,71
L [%]	7. den	52,91	-	27,19
	31. den	55,24	-	33,99

5.8.2 Inkubace v 3% kyselině octové

V prostředí 3% kyseliny octové bylo nejvíce uvolněných polyfenolických látek u alginátových částic připravených na ultrazvuku s extraktem z goji (vzorek C), kde bylo uvolněno 93,34 % polyfenolů. Velká nestabilita je rovněž pozorovatelná u 1% alginátových částic s jádrem připravených na enkapsulátoru (vzorek J) s extraktem goji a ženšenu, kde byl rozpad stanoven na více než 80 % zabalených látek (tabulka 21).

Největší stabilitu vykazovaly ženšenové částice připravené na enkapsulátoru (vzorek K a L), kde se uvolnilo pouze 25 %.

Tabulka 21: Rozpad částic v 3% kyselině octové v průběhu týdne a měsíce

Částice		Guarana	Goji	Ženšen
C [%]	7. den	14,79	10,03	36,43
	31. den	50,02	93,34	45,71
D [%]	7. den	48,63	34,17	20,37
	31. den	59,10	58,35	37,84
E [%]	7. den	38,71	-	22,45
	31. den	56,98	-	59,18
F [%]	7. den	42,06	-	17,22
	31. den	48,70	-	48,62
G [%]	7. den	9,17	41,67	20,87
	31. den	25,97	43,27	22,32
H [%]	7. den	49,55	42,01	18,52
	31. den	74,32	66,84	22,95
I [%]	7. den	68,73	-	26,96
	31. den	72,99	-	42,69
J [%]	7. den	24,13	40,93	77,19
	31. den	22,21	98,92	86,84
K [%]	7. den	21,11	40,45	18,90
	31. den	33,78	63,56	25,20
L [%]	7. den	51,53	-	20,39
	31. den	55,03	-	25,83

Co se týče porovnání stability jednotlivých extraktů, největší uvolňování polyfenolických látek dochází u extraktu z goji. Nejstabilnějším extraktem je ženšen, kde ve většině případů nepřesáhla uvolněná koncentrace 50 %.

5.8.3 Inkubace v modelové vodní potravíně

Ve vodě docházelo k největšímu uvolňování polyfenolů u extraktu z goji v alginátových částicích, připravených na ultrazvuku a enkapsulátoru (vzorek C a H) a u ženšenových extraktů u lipidových částic připravených odpařením reversní fáze a u 1% alginátových částic s jádrem (vzorek F a J).

K nejmenšímu uvolnění docházelo u 1% alginátových částic (vzorek G) s enkapsulovaným ženšenem.

Voda představuje pro uchovávání částic více stabilní prostředí nežli 10% roztok ethanolu i 3% roztok kyseliny octové.

Tabulka 22: Rozpad částic ve vodě v průběhu týdne a měsíce

Částice		Guarana	Goji	Ženšen
C [%]	7. den	15,13	10,78	30,50
	31. den	44,83	81,06	35,32
D [%]	7. den	36,54	47,84	22,78
	31. den	42,71	53,90	31,33
E [%]	7. den	21,78	-	20,03
	31. den	53,87	-	67,66
F [%]	7. den	27,04	-	16,21
	31. den	51,55	-	85,08
G [%]	7. den	27,50	28,85	17,60
	31. den	32,08	32,05	19,06
H [%]	7. den	58,84	40,10	18,92
	31. den	68,13	85,94	23,19
I [%]	7. den	58,16	-	20,22
	31. den	61,70	-	35,95
J [%]	7. den	21,86	37,52	67,54
	31. den	22,51	69,92	96,49
K [%]	7. den	23,93	43,34	16,54
	31. den	36,59	58,74	32,20
L [%]	7. den	53,33	-	25,83
	31. den	51,85	-	35,35

5.8.4 Inkubace v modelové tukové potravíně

K největšímu rozpadu částic v oleji docházelo u ženšenu u 1% alginátu s jádrem, liposomů připravených na ultrazvuku a alginátových částic připravených na ultrazvuku (vzorek C, E, J), kde došlo k uvolnění více než 70 % polyfenolů (tabulka 12).

Naopak nejstabilnější částice byly s enkapsulovaným extraktem z guarany (vzorek J) a alginátové částice s enkapsulovaným ženšenem (vzorek G, H), kde se uvolnění z částic pohybovalo kolem 20 %.

Tabulka 23: Rozpad částic v oleji v průběhu týdne a měsíce

Částice		Guarana	Goji	Ženšen
C [%]	7. den	17,39	15,17	54,55
	31. den	38,78	82,46	72,70
D [%]	7. den	50,82	32,02	24,64
	31. den	57,61	54,67	32,05
E [%]	7. den	36,23	-	29,14
	31. den	67,04	-	73,39
F [%]	7. den	29,43	-	27,35
	31. den	54,91	-	70,90
G [%]	7. den	24,44	36,86	16,24
	31. den	36,67	38,46	22,05
H [%]	7. den	55,74	24,83	19,40
	31. den	61,94	55,00	22,14
I [%]	7. den	51,40	-	62,91
	31. den	61,18	-	69,87
J [%]	7. den	20,63	3,41	48,25
	31. den	20,81	56,28	82,02
K [%]	7. den	21,71	34,68	25,99
	31. den	35,99	48,15	30,04
L [%]	7. den	52,91	-	12,24
	31. den	54,18	-	27,19

5.9 Stanovení velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla

Připravené částice dosahovaly velikosti v rozmezí od 100 do 7 000 nm. Nejmenšími připravenými částicemi byly liposomy připravené pomocí ultrazvuku, které dosahovaly velikosti od 116 do 167 nm. Největší částice přesahovaly velikost 7 000 nm, a to u chitosanových částic připravených na ultrazvuku s enkapsulovaným extraktem ze ženšenu (tabulka 24).

Největšími jsou většinou částice s enkapsulovaným ženšenem. K nejmenším patří zase zabalené extrakty goji. Z toho vyplývá, že enkapsulovaná složka může mít vliv na samotnou velikost částic.

Mikročástice připravené na enkapsulátoru metodou DLS analyzovány nebyly, jejich velikost přesahuje rozsah přístroje a je dostatečně charakterizována rozměrem použitých trysek.

Tabulka 24: Hodnoty velikosti částic

Částice	Vzorek	Průměrná velikost [nm]	Velikost-1. pík [nm]	Velikost-2. pík [nm]
Liposomy-metoda odpařování na tenké vrstvě	Prázdné č.	311,75	679,25	113,80
	Guarana	321,30	626,15	93,73
	Goji	298,35	789,35	116,30
	Ženšen	332,25	393,65	421,75
Liposomy-příprava na ultrazvuku	Prázdné č.	167,00	136,20	33,80
	Guarana	116,30	124,95	5 255,00
	Goji	157,60	191,35	4 780,00
	Ženšen	120,45	139,00	2517
Chitosan-příprava na ultrazvuku	Prázdné č.	1 462,00	2 480,00	2 845,05
	Guarana	1 086,00	1 314,00	173,35
	Goji	706,55	965,65	2 143,75
	Ženšen	7 217,50	308,68	1,35
Chitosan-příprava ručně	Prázdné č.	429,90	551,15	146,7
	Guarana	462,95	497,45	100,81
	Goji	491,80	341,35	82,96
	Ženšen	2028,00	232,60	0,00
Alginát-příprava na ultrazvuku	Prázdné č.	2 379,50	762,20	52,99
	Guarana	2 404,50	230,65	71,99
	Goji	610,85	367,95	846,55
	Ženšen	1 927,00	512,95	0,00
Alginát-příprava ručně	Prázdné č.	406,40	526,15	4 458,5
	Guarana	449,35	577,05	142,00
	Goji	543,95	254,25	2 570,33
	Ženšen	848,95	250,90	5 497,00

5.10 Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu

Částice připravené na enkapsulátoru byly pro analýzu zeta potenciálu na přístroji Zetasizeru příliš velké, proto nebyly proměřeny.

Stabilní částice jsou takové, jejichž zeta potenciál je větší než +30 mV nebo menší než -30 mV. Hodnoty zeta potenciálu u liposomů a chitosanových částic připravených na ultrazvuku byly mimo interval nestability (tabulka 25). Ostatní částice byly nestabilní. Nejnižší stabilitu vykazovaly prázdné liposomy připravené na ultrazvuku, avšak při enkapsulaci extraktu se zeta potenciál snížil na stabilní hodnotu. Největší stabilitu vykazovaly liposomy připravené metodou odpaření reversní fáze.

Tabulka 25: Hodnoty zeta potenciálu částic

Částice	Prázdné částice [mV]	Guarana [mV]	Goji [mV]	Ženšen [mV]
Alginátové částice	-13,85	-14,95	-19,50	-25,70
Chitosanové částice	25,30	21,50	23,80	0,49
Allginátové částice – ultrazvuk	-15,50	-18,50	-19,05	-19,20
Chitosanové částice – ultrazvuk	47,10	44,40	39,60	14,50
Liposomy – ultrazvuk	0,03	-43,25	-35,00	-42,15
Liposomy – odpaření reversní fáze	-39,75	-38,15	-41,70	-50,00

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na přípravu a enkapsulaci polyfenolických látek extrahovaných z guarany, ženšenu a goji. V teoretické části byly popsány vlastnosti polyfenolů, možnosti enkapsulace a vlastnosti liposomů a polysacharidových částic. V experimentální části byla stanovena enkapsulační účinnost a stabilita částic v modelovém fyziologickém prostředí a v modelových potravinách.

U extraktů z guarany, ženšenu a goji bylo stanoveno celkové množství polyfenolů, flavonoidů a antokyanů. Rovněž byly kvantifikovány vybrané jednotlivé flavonoidy metodou RP-HPLC/UV-VIS. Extrakce byla provedena ve vodě a v 10% kyselině mléčné, čímž došlo k částečné hydrolýze glykosidických vazeb u polyfenolických látek. Největší množství polyfenolů bylo detekováno v extraktu z guarany při extrakci 10% kyselinou mléčnou. Nejmenší obsah polyfenolů byl nalezen u goji, což může být způsobeno mimo jiné i procesem sušení nebo nedostatečnou extrakcí ze sušených plodů. Pomocí RP-HPLC/UV-VIS byly identifikovány jednotlivé flavonoidy. U guarany to byly rutin, morin, myricetin a luteolin. U ženšenu byl identifikován rutin, myricetin a luteolin, u goji pouze rutin.

Částice byly připraveny různými metodami. Manuálně byly připraveny liposomové částice na bázi lecithinu a cholesterolu pomocí ultrazvuku a metodou odpaření reversní fáze. Další manuálně připravené částice byly alginátové a chitosanové, které byly připraveny též pomocí enkapsulátoru. Účinnost enkapsulace byla vypočítána z rozdílů koncentrací před a po enkapsulaci extraktů. K největší enkapsulaci přírodních extraktů polyfenolů docházelo u alginátových částic s jádrem připravených na enkapsulátoru, kde tato účinnost dosahovala u ženšenu až 90 %, pro guaranu a pro goji 40 %. Mezi další vhodné enkapsulační techniky patří rovněž příprava liposomů, kde se podařilo enkapsulovat 40 % extraktu z guarany. K nejmenší účinnosti docházelo u manuálně připravených alginátových a chitosanových částic.

Při stanovení stability v umělých modelových trávicích tekutinách docházelo k největšímu rozpadu v pankreatické šťávě, což mohlo být způsobeno směsí enzymů obsažených v pankreatinu. V žaludeční šťávě se nejméně rozpadaly liposomy a alginátové částice s enkapsulovaným ženšenem. Nejstabilnější prostředí byla žlučová šťáva, kde nebyl rozpad částic větší než 60 %. Při stanovení stability v modelových potravinách docházelo k největšímu uvolňování polyfenolů u enkapsulovaného extraktu z goji, kdy se ve většině případů uvolnilo po měsíci více než 80 % polyfenolů. Nejlepší stabilitu vykazoval ženšen.

Metodou dynamického rozptylu světla byla analyzována velikost a stabilita manuálně připravených částic. Velikost částic se pohybovala v rozmezí od 100 do 7 000 nm. Nejmenší velikost byla zjištěna u liposomů, kde se pohybovala v rozmezí od 116 do 167 nm. Největší byly chitosanové částice s enkapsulovaným ženšenem připravené na ultrazvuku. Z hodnot zeta potenciálu vyplývá, že mezi nejstabilnější částice lze zařadit liposomy a chitosanové částice připravené na ultrazvuku, kde se zeta potenciál pohyboval kolem 40 mV. Nejméně stabilní byly prázdné liposomy připravené na ultrazvuku, avšak díky enkapsulaci extraktu se tato hodnota stala stabilní.

Jako nejvhodnější aplikační forma pro přidání studovaných přírodních extraktů do reálných potravin by mohly být alginátové připravené na enkapsulátoru. Bylo u nich dosaženo nejvyšší enkapsulační účinnosti a rovněž vykazují dobrou stabilitu v modelových tělních tekutinách a modelových potravinách. Lze je využít k cílenému transportu a uvolňování enkapsulovaných aktivních látek v trávicím traktu a tím k dosažení vyšší biologické dostupnosti a účinnosti.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MUNIN, A., LÉVY, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*. [online]. 2011, [cit. 2014-04-20], vol. 3, pp. 793-829. Dostupný z WWW: <www.mdpi.com>.
- [2] NEDOVIC, V., a kol. An overview of encapsulation technologies for food application. *Procedia Food Science*. [online]. 2011, [cit. 2014-04-20], vol. 1, pp. 1806-1815. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [3] BUER, CH., IMIN, N., DJORDJEVIC, M.. Flavonoids: New Roles for Old Molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*. [online]. 2010, [cit. 2014-04-10], vol. 1, pp. 98-111. Dostupné z: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7909.2010.00905.x/full>>.
- [4] PALASKA, I., a kol. Use of polyphenols in periodontal inflammation. *European Journal of Pharmacology*. [online]. 2013, [cit. 2014-04-20], vol. 720, pp. 77-83. Dostupné z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [5] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin II*. Tábor: OSSIS, 2009, 19-20 s. ISBN 978-80-86659-17-6. 3
- [6] VENKATAPURA, D., BURDIPAG, K., GOLLAPALLE, V. Simultaneous determinativ of quercetin, rutin and kaempferol in the Lea extract of *Moringa oleifera* Lam. and *Raphinus sativus* Linn. by liquid chromatogramy-tandem mass spektrometry. *Journal of Chinese Integrative Medicine*. [online]. 2011, [cit. 2014-05-01], vol. 9, num. 9. Dostupné z WWW: <<http://www.jcimjournal.com/en/FullText2.aspx?articleID=jcim20110914>>.
- [7] MARCO, P., POPPI, R., SCARMINIO, I., TAULER, R. Investigation of the pH effect and UV radiation on kinetic degradation of anthocyanin mixtures extracted from *Hibiscus acetosella*. *Food chemistry* [online]. 2011, [cit. 2014-04-10], vol. 125, pp. 1020-1027. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [8] NICUJESCU, V., PAUN, N., SILION, M., POPA, M. Anthocyanin profile of blackberries and grapes. *Progress of Cryogenics and Isotopes Separation* [online]. 2013, [cit. 2014-04-10], vol. 16, pp. 119-124. Dostupný z WWW: <www.web.b.ebscohost.com>.
- [9] OVANDO, A., a kol. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. [online]. 2009, [cit. 2014-04-10], vol. 113, pp. 859-871. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [10] LEWANDOWSKA, U., a kol. Overview of Metabolism and Bioavailability Enhancement of Polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*. [online]. 2013, [cit. 2014-04-20], vol. 61, pp. 12183-12199. Dostupný z WWW: <www.pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz>.
- [11] GROSS, P., a kol. *Wolfberry: Nature's Bounty of Nutrition and Health*. BookSurge Publishing, 2006. 260 p. ISBN 1-4196-2048-7.

- [12] YOUNG, G., a kol. *Ningxia Wolfberry: The Ultimate Superfood*. Orem: Essential Science Publishing, 2006. 266 p. ISBN 0-943685-46-X.
- [13] *Permaculture Plants: Goji Berry [Wolfberry]* [online]. [cit. 2014-04-20]. Dostupné z WWW: <www.tcpermaculture.blogspot.cz/2011/12/permaculture-plants-goji-berry.html>.
- [14] *Ženšen pravý* [online]. [cit. 2014-04-21]. Wikipedie. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%BDen%C5%A1en_prav%C3%BD>.
- [15] NOCERINO, E., a kol. The aphrodisiac and adaptogenic properties of ginseng. *Fitoterapia*. [online]. 2000, [cit. 2014-04-21], vol. 71, pp. 1-5. Dostupný z WWW: <www.elsevier.com>.
- [16] ANOJD, S., a kol. Ginseng Pharmacology: Multiple Constituents and Multiple Actions. *Biochemical Pharmacology*. [online]. 1999, [cit. 2014-04-22], vol. 58, pp. 1685-1693. Dostupné z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [17] *Ženšen* [online]. [cit. 2014-04-21]. Dostupné z WWW: <<http://www.katalog-rostlin.cz/bylinky/Gynostema-pentaphyllum-Zensen-jizni-gynostena-petilista-jiaogulan.html>>.
- [18] *Ženšen-kořen života* [online]. [cit. 2014-04-21]. Dostupné z WWW: <<http://www.zdravi-info.cz/2012/12/zensen-koren-zivota/>>.
- [19] Lübeck, W.: *Guarana – elixír dlouhověkosti – detoxikace a čištění krve*. Olomouc: Fontána, 2002. ISBN 80-86179-99-0.
- [20] MAJHENIČ, L., a kol. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extract. *Food Chemistry*. [online]. 2007, [cit. 2014-04-22], vol. 104, pp. 1258-1268. Dostupné z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [21] *Kofein* [online]. [cit. 2014-04-22]. Wikipedie. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Kofein>>.
- [22] *Benefits of Guarana* [online]. [cit. 2014-04-22]. Healthy Diet Online. Dostupné z WWW: <<http://www.fitho.in/guide/fruits/guarana/>>.
- [23] FANG, Z., a kol. Encapsulation of polyphenols – a review. *Food Science and Technology*. [online]. 2010, [cit. 2014-04-23], vol. 21, pp. 510-523. Dostupné z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [24] FRANC, A., VETCHÝ, D. a kol. Lipofilní formulace pro zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek. *Chemické listy*. 2012, č. 106, s. 3-9. Dostupné z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_01_3-9.pdf>.
- [25] KUMAR, R., a kol. Lecitin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: a review. *AAPS PharmSciTech*, [online]. 2005, [cit. 2014-04-23], vol. 40, pp. 298-310. Dostupné z WWW: <www.link.springer.com>.
- [26] *Lecithin* [online]. [cit. 2014-04-25]. Chemistry compendiarious. Dostupné z WWW: <<http://chemistry.compendiarious.net/LipidsWorksheet%205.htm>>.

- [27] *Lecithin* [online]. [cit. 2014-04-25]. Fosfolipidy. Dostupné z WWW: <<http://canov.jergym.cz/lipid/ruzne/fl.htm>>.
- [28] BERG, J., a kol. *Biochemistry*. 5th ed., W. H. Freeman, 2002. 974 p. ISBN 0-7167-4684-0.
- [29] MURRAY, R. K., a kol. *Harperova biochemie*. 1. Vydání, H and H, 1998. 872 s. ISBN 80-85787-38-5.
- [30] MÁROVÁ, I., VRÁNOVÁ, D.: *Praktikum z biochemie – pracovní sešit*. FCH VUT v Brně, Brno, 2002.
- [31] LORENZO, C., a kol. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli – sensitive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [online]. 2012, [cit. 2014-04-25], vol. 65, pp. 1148-1171. Dostupné z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [32] LEE, K., a kol. Alginate: Properties and biomedical application. *Progress in Polymer Science*. [online]. 2012, [cit. 2014-04-25], vol. 37, pp. 105-125. Dostupné z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [33] *Alginate* [online]. [cit. 2014-05-03]. Dostupné z WWW: <<http://www.fooducation.org/2009/02/my-first-spherification.html>>.
- [34] VAVŘÍKOVÁ, E., VINŠOVÁ, J. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. [online]. 2009, [cit. 2014-04-25], vol. 103, pp. 56-65. Dostupné z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_56-65.pdf>.
- [35] RAMLI, N., WONG, T. Sodium carboxymethylcellulose scaffolds and their physicochemical effects on partial thickness wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*. [online]. 2010, [cit. 2014-04-25], vol. 403, pp. 73-82. Dostupné z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [36] *Přidané látky (aditiva)* [online]. [cit. 2014-05-02]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Dostupné z WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005724&docType=ART>>.
- [37] NOVÁKOVÁ, L., a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3.
- [38] *High Performance Liquid Chromatography* [online]. [cit. 2014-04-25]. Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.
- [39] *Distribuce velikosti částic a koloidní stabilita* [online]. [cit. 2014-04-26]. Dostupné z WWW: <http://tresen.vscht.cz/tmt/ESO/LOTP/LOTP_09_emulse.pdf>.
- [40] *Dynamický rozptyl světla* [online]. [cit. 2014-04-26]. Dostupné z WWW: <<http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>>.
- [41] *Dynamic Light Scattering e Potenziale zeta* [online]. [cit. 2014-04-27]. Dostupné z WWW: <<http://www.alfatest.it/listing.asp?CatID=200>>.
- [42] Vyhláška č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. ČR, 2000. Dostupné z: <<http://portal.gov.cz/zakony/zakonPar.jsp?idBiblio=49577&nr=258~2F2000&part=&name=&rpp=15#local-content>>.

- [43] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. Vydání. Praha: Academia, 1999. ISBN 80-200-0600-2.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CMC	Karboxymethylcelulóza
RP-HPLC	Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultrafialová oblast světla
VIS	Viditelná oblast světla
ND	Non Detected
SD	Směrodatná odchylka

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Kalibrační přímka pro stanovení celkových polyfenolů

Příloha 2 – Ukázka chromatogramu stanovení jednotlivých flavonoidů v guaraně

