

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ VYBRANÝCH TYPŮ NANOČÁSTIC V KOSMETICE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

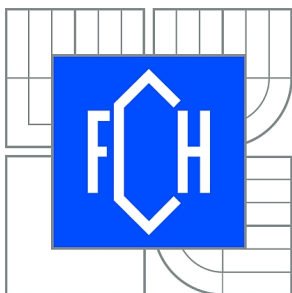
AUTHOR

JULIE HOOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ VYBRANÝCH TYPŮ NANOČÁSTIC V KOSMETICE

PREPARATION AND USE OF SELECTED NANOPARTICLES IN COSMETICS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JULIE HOOVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

prof. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0869/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Julie Hoová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Jitka Bokrová	

Název bakalářské práce:

Příprava a využití vybraných typů nanočástic v kosmetice

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše zaměřená na přehled materiálů a technik používaných pro přípravu nanočástic pro kosmetické účely
2. Zavedení a optimalizace metod enkapsulace, stanovení velikosti částic a stability v různém prostředí
3. Experimentální studie - srovnání účinnosti enkapsulace vybraných přírodních látek a stability částic v několika typech kosmetických přípravků
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

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.

Julie Hoová
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na přípravu a využití vybraných typů nanočástic v kosmetice. Teoretická část se zabývá obecnou charakterizací a využitím kofeinu, polyfenolů a vitamínu C v kosmetice. Také byly charakterizovány liposomy a možnosti enkapsulace aktivních látek získaných z přírodních zdrojů. V experimentální části byly třemi různými technikami připraveny liposomy s enkapsulovanými aktivními látkami. Účinnost enkapsulace kofeinu byla stanovena pomocí HPLC/PDA, celkových polyfenolů pomocí spektrofotometrické metody a vitamínu C pomocí titrační metody. U připravených částic byla sledována jejich velikost a stabilita metodou dynamického rozptylu světla. Také byla sledována jejich dlouhodobá stabilita v modelových podmínkách stanovením změny koncentrace nebo množství daných aktivních látek. V práci bylo zjištěno, že ko-enkapsulované liposomy jsou nejvhodnější aplikační formou z testovaných možností, a tak mohou být využity do pleťové vody či gelu. Ko-enkapsulované liposomy vykazovaly poměrně vysokou enkapsulační účinnost, dobrou stabilitu a díky vlastnostem aktivních látek vyhovují požadavkům spotřebitele kosmetického průmyslu.

ABSTRACT

The Bachelor thesis is focused on preparation and use of selected nanoparticles in cosmetics. The theoretical part deals with general characterization and use of caffeine, phenolics and vitamin C in cosmetics. Further, characterization of liposomes and possibilities of encapsulation of active substances gained from natural sources were introduced. In experimental part liposomes with encapsulated active substances were prepared by three different techniques. Encapsulation efficiency was determined by HPLC/PDA, phenolics spectrophotometrically and vitamin C by titration. Prepared particles were monitored for size and stability by dynamic light scattering. Furthermore, long-term stability of liposomes in model conditions was evaluated as the amount of the active substances released during incubation. In this work was found out that from all tested samples co-encapsulated liposomes are probably the best application form which can be used in face lotion or gel. Co-encapsulated liposomes exhibited relatively high encapsulation efficiency, good stability and thanks to quality of active substances they meet customer's requirements of cosmetic industry.

KLÍČOVÁ SLOVA: kofein, polyfenoly, vitamin C, enkapsulace, liposomy, pleťová kosmetika

KEYWORDS: caffeine, phenolics, vitamin C, encapsulation, liposomes, skin care cosmetics

HOOVÁ, J. *Příprava a využití vybraných typů nanočástic v kosmetice*. Brno, 2015. 54 s. Bakalářská práce na Fakultě chemické, Vysokého učení technického v Brně, ústav Chemie a technologie potravin. Vedoucí bakalářské práce prof. 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 děkanem FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za to, že si mě vzala pod svá křídla, a tím mi umožnila pracovat v okruhu báječných a velmi nadaných lidí. Dále Ing. Petře Matouškové za pomoc s experimentální prací, ochotu, trpělivost a za příjemně strávené chvíle v laboratoři.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Kofein	9
2.1.1	Charakterizace kofeinu	9
2.1.2	Výskyt kofeinu v přírodě	9
2.1.2.1	Kávovník	9
2.1.2.2	Čajovník	9
2.1.2.3	Guarana	10
2.1.3	Výskyt v potravinách	10
2.1.4	Výskyt v kosmetickém průmyslu	10
2.1.4.1	Účinky kofeinu v kosmetice	10
2.2	Vitaminy	11
2.2.1	Vitamin C	11
2.2.2	Vitamin C v kosmetice	12
2.3	Polyfenoly.....	12
2.3.1	Polyfenoly v kosmetice	12
2.4	Lidská kůže	12
2.4.1	Typy pleti	13
2.4.1.1	Normální pleť	13
2.4.1.2	Suchá pleť	13
2.4.1.3	Mastná pleť	13
2.4.1.4	Smíšená pleť	13
2.5	Enkapsulace	14
2.5.1	Princip	14
2.5.2	Materiály	14
2.5.3	Kritéria	14
2.5.4	Druhy enkapsulace	14
2.5.4.1	Sprejové sušení	14
2.5.4.2	Sprejové chlazení a sprejové mražení	15
2.5.4.3	Hydrogely.....	15
2.5.4.4	Emulze	15
2.5.4.5	Liposomy	15
2.6	Liposomy	15
2.6.1	Charakterizace liposomů	15
2.6.2	Příprava	16
2.6.3	Stabilita	16
2.6.4	Základní složky liposomů	16
2.6.4.1	Lecithin	16
2.6.4.2	Cholesterol	17
2.6.5	Druhy příprav liposomů	18
2.6.5.1	Ultrazvuková enkapsulace	18
2.6.5.2	Odpařování na tenké vrstvě.....	18

2.6.5.3	Metoda reverzních fází.....	18
2.7	Metody využívané k analýze částic a enkapsulovaných látek.....	18
2.7.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	18
2.7.2	UV-VIS spektrofotometrie.....	19
2.7.3	Roztoková volumetrická analýza.....	19
2.7.4	Dynamický rozptyl světla	20
2.7.5	Zeta potenciál	20
3	Cíl práce	21
4	Experimentální část	22
4.1	Použité chemikálie a přístroje.....	22
4.1.1	Chemikálie	22
4.1.2	Přístroje a pomůcky	22
4.2	Příprava extraktů s obsahem kofeinu.....	23
4.2.1	Sypaný zelený čaj.....	23
4.2.2	Sypaný černý čaj	23
4.2.3	Sypaný bílý čaj	23
4.2.4	Guarana semeno mleté	23
4.2.5	Pražená zrnková plantážní káva (100% arabica)	23
4.3	Příprava bylinného extraktu levandule	23
4.4	Příprava ovocných extraktů	24
4.5	Stanovení kofeinu metodou HPLC s PDA detekcí.....	24
4.6	Příprava liposomů.....	24
4.6.1	Ultrazvuková enkapsulace – Ultrazvuk 1	24
4.6.2	Ultrazvuková enkapsulace s přídavkem chloroformu – Ultrazvuk 2.....	24
4.6.3	Odpařování na tenké vrstvě – TLE	24
4.6.4	Metoda reverzních fází – RP-TLE	24
4.7	Stanovení enkapsulační účinnosti.....	25
4.8	Stanovení velikosti částic pomocí metody dynamického rozptylu světla	25
4.9	Stanovení stability částic	25
4.9.1	Stanovení zeta potenciálu.....	25
4.10	Stanovení polyfenolů UV-VIS spektrofotometrickou metodou.....	25
4.10.1	Příprava vzorků	25
4.10.2	Kalibrační křivka.....	25
4.11	Stanovení vitamínu C	26
4.11.1	Příprava vzorků	26
4.11.2	Standardizace odměrného roztoku 2,6-dichlorindofenolu	26
4.12	Stanovení dlouhodobé stability připravených částic v modelových podmínkách.....	26
5	Výsledky a diskuse	27
5.1	Charakteristika přírodních extraktů	27
5.1.1	Stanovení kofeinu	27
5.1.2	Stanovení polyfenolů	28
5.1.3	Stanovení obsahu vitamínu C	28
5.2	Stanovení enkapsulační účinnosti kofeinu	29

5.2.1	Enkapsulační účinnost standardního roztoku kofeinu	29
5.2.2	Enkapsulační účinnost kofeinu z přírodních zdrojů.....	30
5.2.3	Enkapsulační účinnost kofeinu z přírodních zdrojů kofeinu ko-enkapsulovaných s ovocnou složkou.....	31
5.3	Stanovení enkapsulační účinnosti polyfenolů	33
5.3.1	Enkapsulační účinnost polyfenolů z přírodních zdrojů kofeinu	33
5.3.2	Enkapsulační účinnost polyfenolů ovocných a bylinných složek.....	34
5.4	Stanovení enkapsulační účinnosti vitamínu C.....	35
5.4.1	Enkapsulační účinnost vitamínu C z ovocných složek	35
5.5	Stanovení velikosti částic	36
5.5.1	Vizualizace částic pod světelným mikroskopem	36
5.5.2	Stanovení velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla.....	37
5.5.2.1	Srovnání velikosti liposomů připravených různými metodami	38
5.5.2.2	Liposomy s enkapsulovaným přírodním extraktem připravené pomocí ultrazvukové metody – Ultrazvuk 1.....	39
5.5.3	Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu.....	41
5.6	Stanovení dlouhodobé stability připravených částic v modelových podmínkách.....	41
5.6.1	Stabilita připravených částic s enkapsulovaným kofeinem	41
5.6.1.1	Liposomy se standardem kofeinu	41
5.6.2	Liposomy s extrakty z přírodních zdrojů obsahujících kofein.....	42
5.6.2.1	Liposomy s ko-enkapsulovanými extrakty z přírodních zdrojů kofeinu a ovocné složky.....	42
5.6.3	Stabilita připravených částic s enkapsulovanými polyfenoly	43
5.6.3.1	Enkapsulace extraktů z přírodních zdrojů kofeinu pomocí ultrazvukové metody – Ultrazvuk 1.....	43
5.6.3.2	Ko-enkapsulace extraktů z přírodních zdrojů kofeinu a ovocné složky	44
5.6.4	Stabilita připravených částic s enkapsulovaným vitamínem C.....	47
5.6.4.1	Ko-enkapsulace extraktů z přírodních zdrojů s ovocnou složkou	47
5.7	Návrh vhodných liposomů s enkapsulovým obsahem přírodních extraktu a jejich kombinací pro využití v kosmetice	47
6	Závěr	49
7	Seznam použité literatury	51
8	Seznam zkratk	54

1 ÚVOD

V dnešní, velmi uspěchané době lidé nestrádají tolik jako před 100 lety. S každým novým dnem přichází nový objev nebo vynález, který lidstvu usnadňuje život, avšak na některé věci jsme my lidé stále krátkí. Největším nepřítelem člověka je čas. Čas nejde zastavit, natož vzít zpět. Již v minulých dobách se proto alchymisté snažili vynalézt tzv. „elixír mládí“, který by zastavil projevy stárnutí, navrátil uživateli tohoto zázračného léku husté a lesklé vlasy nebo vyhladil pleť. Avšak nalezení nebo vytvoření elixíru mládí se nikomu doteď nepodařilo. Do komerčně prodávaných výrobků se proto začaly přidávat látky, ať už přírodní nebo syntetické, které slibují uživateli oddálit vnější příznaky stáří. V komerčních upoutávkách se často setkáváme s přípravky obsahující kofein, které lákají na pleť bez vrásek nebo dlouhé, husté vlasy. Množství kofeinu je v těchto přípravcích však tak malé, že by nemělo docházet k negativním účinkům nebo dokonce k předávkování jako u přímého požívání potravin obsahující kofein. Přípravky dále také mohou obsahovat významné složky jako vitamin C pro rozjasnění a výživu pleti nebo polyfenoly, které chrání pokožku před škodlivými vlivy.

Bakalářská práce se zabývá možností enkapsulace kofeinu, polyfenolů a vitaminu C do membránového obalu a použitím takto připravených částic s aktivními složkami do kosmetických přípravků jako je pleťová voda nebo gel. Tato metoda byla připravena pro přenos aktivní látky na místo působení bez jakéhokoliv znehodnocení této látky.

V práci byly připraveny liposomy ze sójového lecithinu a cholesterolu. Byla zkoumána také jejich enkapsulační účinnost a stabilita.

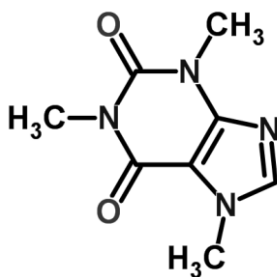
Nakonec byl navržen kosmetický přípravek s částicemi, které byly připravené nejvhodnější metodou enkapsulace a které obsahují aktivní složky. Navržený kosmetický přípravek by tak měl splňovat požadavky spotřebitele.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kofein

2.1.1 Charakterizace kofeinu

Kofein, jehož systematický název je 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-purin-2,6-dion, se řadí mezi purinové alkaloidy. Tato skupina, purinové alkaloidy, patří mezi methylderiváty xanthinu. Sumární vzorec kofeinu je $C_8H_{10}N_4O_2$ a jeho molekulová hmotnost činí 194,91 Da [1]. Kofein je bílá, pevná, krystalická látka bez zápachu, kterou nelze zapálit. Bod tání kofeinu je v rozmezí 235–239 °C [2]. Jako jedna z mála látek se vyskytuje přirozeně, a to až v 60 různých rostlinách [3]. Kofein se vyskytuje v semenech, listech a plodech mnoha rostlin, jako je kávovník, kakaovník nebo také čajovník a guarana [4]. Rovněž je přidáván do potravin pro spotřebitele, jelikož je levný a snadno dostupný [5]. Například je přidáván do mnoha energetických nápojů, analgetik nebo sirupů proti kašli [6].



Obrázek 1 Strukturální vzorec kofeinu [1]

2.1.2 Výskyt kofeinu v přírodě

2.1.2.1 Kávovník

Kávovník je velmi rozšířená rostlina, která roste v celém tropickém a subtropickém pásmu. Řadí se mezi ovocné dřeviny, která se různě kultivuje, roubuje a řízkuje pro lepší odolnost a větší zisk plodů. Kávovník patří do rodu *Coffea*, který se řadí do čeledi mořenovitých, jež zahrnuje okolo 500 rodů a 6 000 druhů.

Zrna kávovníku jsou před exportem do celého světa ještě zpracovány a zbaveny slupek.

Obsah kofeinu závisí na botanickém druhu rostliny, jejím původu a prostředí pěstování, například *C. arabica* obsahuje až 1,7 % kofeinu, *C. robusta* až 3,2 %. Dalšími alkaloidy obsaženými v kávě jsou theobromin a theofylin, které se však vyskytují v množství menším jak 0,005 % [7].

Káva je charakterizována jako povzbuzující a nealkoholický nápoj s potenciálním dopadem na lidské zdraví. Patří mezi nejvíce konzumované nápoje na světě [8].

2.1.2.2 Čajovník

Rostlina, z níž se vyrábí čaj, se botanicky nazývá *Camelia sinesis*, tedy čajovník čínský. Čajovník patří do rodu *Camelia*, který se řadí do čeledi *Theaceae*.

Čajovník lze pěstovat v širokém subtropickém až tropickém pásmu okolo rovníku.

Hlavní účinnou složkou je kofein představující 2,5–5,5 % sušiny z čajových lístků, z dalších alkaloidů obsahuje theobromin, 0,07–0,17 % sušiny, a theofylin, 0,002–0,013 % sušiny [9].

Dále se v čajích vyskytují polyfenoly, zejména flavony a katechiny, které odpovídají za chuť a barvu nápoje. Čaj má antioxidační i mírné dezinfekční účinky. Zelený čaj také obsahuje fluor, který rostlina absorbuje z půdy a okolního vzduchu. Při větší konzumaci může dojít k intoxikaci. Na druhou stranu příznivě ovlivňuje stav zubní skloviny a zpomaluje růst bakterií zodpovědných za tvorbu zubního kazu.

Čaj také patří celosvětově k nejvíce konzumovanému nápoji. Nejčastěji se setkáváme se třemi typy čajů, a to s černým, zeleným a bílým [10].

2.1.2.3 Guarana

Guarana, neboli *Paulinie cupana*, se řadí do čeledi mýdelníkovitých. Původně se vyskytovala v oblasti Amazonie, dnes je pěstována převážně v Brazílii, Venezuele a Uruguayi.

Semena, tzv. guaranové oříšky, jsou velice hořká a po rozemletí se používají do kapslí a tinktur. Obsahují 4–8 % kofeinu.

Guarana se používá podobně jako káva pro své povzbuzující účinky, udržení pozornosti a bdělosti. Povrchově rozšiřuje cévní a mízní systém, a proto je používána v přípravcích redukujících celulitidu [11].

2.1.3 Výskyt v potravinách

Kofein nalezneme v čaji, kávě, alkoholických i nealkoholických nápojích a také v čokoládě. Celkový obsah kofeinu v nealkoholických nápojích se pohybuje v rozmezí 50–250 mg v 1 l nápoje. V energetických nápojích je obsah kofeinu ještě vyšší. Průměrný obsah kofeinu v jednom šálku kávy je asi 80 mg, v instantní kávě 29–91 mg, v překapávané kávě 37–132 mg, vše vztaženo na 100 ml kávy. Množství kofeinu je samozřejmě závislé na teplotě vody a době extrakce. Čajové listy obsahují asi 2 % kofeinu v sušině. Běžný šálek čaje tak představuje jednu polovinu až jednu třetinu kofeinu ve srovnání se šálkem kávy stejné velikosti [12].

2.1.4 Výskyt v kosmetickém průmyslu

Kofein se čím dál více používá v kosmetickém průmyslu díky své biologické aktivitě a schopnosti proniknout přes kožní bariéru. Komerčně dostupné přípravky obvykle obsahují až 3 % kofeinu. Mezi nejvíce používané kosmetické produkty s obsahem kofeinu patří denní nebo noční krémy, zeštíhlující krémy a také vlasové šampóny. Krémy proti celulitidě nebo stárnutí kůže na trhu nabízejí uživateli samoléčbu s viditelnými výsledky po několika týdnech. Koncentrace proniknutí kofeinu do lidského těla ale záleží na době absorpce, tedy přímého působení kosmetického produktu na lidské kůži [13].

2.1.4.1 Účinky kofeinu v kosmetice

Kosmetické účely této látky jsou převážně ve využívání její účinné formy v produktech zabraňující vznik celulitidy, tzv. pomerančové kůže, protože zamezuje hromadění tuků v buňkách. Celulitida je nepatologický stav pokožky, který odráží strukturální změny ve vrstvě dermis a hypodermis. Zapojuje se do malého oběhového a lymfatického systému, a také se nachází v přebytečném podkožním tuku. Přibližně 85 % žen starších 20 let trpí určitým stupněm celulitidy. Nejvyšší hodnota absorpce kofeinu přes lidskou pokožku se pohybuje kolem $2,24 \pm 1,43 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$.

Kofein má také silné antioxidační účinky, které pomáhají chránit buňky proti UV záření a které navíc zpomalují stárnutí pokožky. Také podporuje růst vlasů a inhibuje aktivitu enzymu 5- α -reduktasy, který zodpovídá za vypadávání vlasů. Tento enzym přeměňuje testosteron na jeho aktivnější formu dihydrotestosteron. Na tuto přeměnu jsou nejvíce náchylné vlasové folikuly [13].

2.2 Vitaminy

Vitaminy jsou organické sloučeniny, které regulují a podporují biochemické reakce v lidském těle, které obecně není schopné je syntetizovat. Vitaminy jsou proto do těla dodávány z potravy ve stopovém množství. Samy o sobě nevytvářejí energii, ale pomáhají převádět lipidy a sacharidy na potřebnou energii.

Vitaminy se obecně dělí podle jejich rozpustnosti na vitaminy rozpustné v tucích, do této skupiny patří vitaminy A, D, E a K, a vitaminy rozpustné ve vodě, do této skupiny patří všechny ostatní vitaminy.

Vhodné množství příjmu vitamínu je také důležitým ukazatelem jejich správné funkčnosti. Vědecký výzkum potvrdil, že nadbytečný příjem některých vitamínů může vyvolávat stejné symptomy jako při jejich nedostatku. Vitaminy rozpustné v tucích se lépe udržují v těle, proto může dojít i k překročení toxické hladiny.

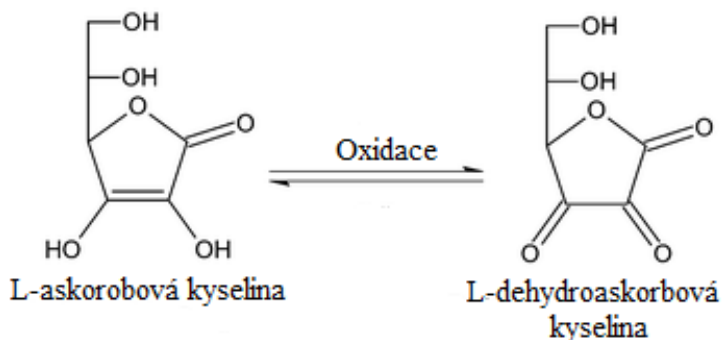
Kvalitativní a kvantitativní stanovení vitamínu v potravinách je důležitou stránkou potravinového průmyslu. Často se využívají spektrofotometrické, titrační a chromatografické metody [14].

2.2.1 Vitamin C

Vitamin C neboli kyselina L-askorbová patří mezi vitaminy rozpustné ve vodě. Je velmi labilní a oxiduje se na kyselinu L-dehydroaskorbovou. Řadí se mezi antioxidanty, které pomáhají chránit buňky před poškozením způsobeným volnými radikály. Upevňuje imunitní systém a odolnost vůči infekcím. Je důležitým kofaktorem hydroxylačných reakcí, účastní se mimo jiné biosyntézy kolagenu a adrenalinu.

Největší množství vitamínu C nalezneme v čerstvém ovoci a zelenině, a to zejména ve sladké paprice, čerstvém pomeranči, jahodách, černém rybízu nebo brokolici.

Nedostatek tohoto vitamínu se projevuje kurdějemi, měkkými a krvácejícími dásněmi, nateklými a bolavými klouby, popraskáním a krvácením pokožky nebo modřinami, což souvisí s poruchami syntézy kolagenu.



Obrázek 2 Strukturní vzorec kyseliny L-askorbové a její oxidované formy[15]

V současnosti se k jeho stanovení využívají spektrofotometrické a titrační metody za pomoci 2,6-dichlorfenolindolfenolu nebo 2,4-dinitrofenylhydrazinu. Dále se používá také kapalinová chromatografie s UV detekcí, fluorescenční detekcí, diodovým polem nebo plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem, papírová chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě.

Pro detekci vitamínu C existuje mnoho analytických postupů, ale mnohé jsou neuspokojivé a málo specifické [14].

2.2.2 Vitamin C v kosmetice

Kyselina L-askorbová se v kosmetickém průmyslu využívá jako bělicí činidlo. Kyselina je však velmi nestabilní, a proto se častěji používají její deriváty, např. askorbyl-2-fosfát hořečnatý nebo askorbyl-6-palmitát.

Díky svým antioxidačním účinkům chrání vitamin C tkáň a buňky před oxidačním poškozením [16]. Vitamin C a jeho deriváty také ovlivňují syntézu kolagenu, pomáhají udržovat pružnost pokožky a napomáhají rozjasnit a opravit poškozenou kůži [17].

2.3 Polyfenoly

Jedná se o fenolické sloučeniny v potravinách a nutraceutikách z rostlinných zdrojů. Rostliny a potraviny obsahují širokou škálu různých fenolických derivátů, včetně samotného fenolu, derivátů benzoové kyseliny, stilbenů nebo flavonoidů [14].

Polyfenoly jsou významnými antioxidanty, které pomáhají odvádět z tělesné tkáně volné oxidační radikály, čímž se snižuje poškození buněk i vznik rakoviny [10].

Analýza fenolických látek se liší podle toho, zdali chceme detekovat celkové množství fenolů nebo kvantifikovat určitou skupinu nebo třídu sloučenin. Pro jejich stanovení se využívá spektrofotometrických metod.

Pro kvantifikaci fenolických sloučenin v rostlinných materiálech byl vynalezen nespočet spektrofotometrických metod. Ty se od sebe liší v principech a jsou používány ke stanovení strukturních skupin nacházejících se ve fenolické sloučenině. Jednoduché fenoly vykazují absorpční maxima při vlnových délkách od 220 do 280 nm [14].

2.3.1 Polyfenoly v kosmetice

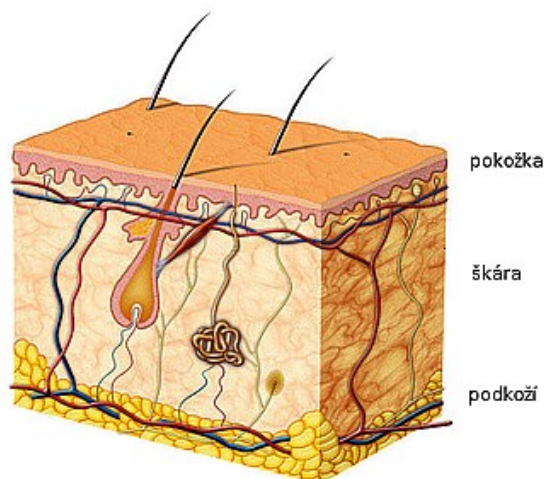
Polyfenoly se v dnešní době dodávají do kůže s cílem ji ochránit před oxidačním stresem, předčasným stárnutím nebo před kožními nemocemi. Polyfenolické extrakty mohou inhibovat kožní enzymy, které katalyzují hydrolýzu kolagenu, vlákna elastinu a kyseliny hyaluronové ve vrstvě pokožky [18]. Také chrání pokožku tím, že díky polyfenolům se lépe absorbuje a udržuje vlhkost, pokožka je tedy dostatečně hydratována. Navíc ji chrání i před slunečním zářením [19].

2.4 Lidská kůže

Lidská kůže je největším orgánem lidského těla. Tloušťka kůže se liší podle jednotlivých částí těla a pohybuje se od 0,4 mm na očních víčkách až po 4 mm na zádech. Kůže plní celou řadu funkcí, má například funkci ochrannou, termoregulační, smyslovou, vylučovací, vstřebávací atd. [20].

Kůže se skládá ze tří základních částí. Pokožka, epidermis, je zevní vrstva tvořena několika vrstvami kožních buněk a neobsahuje cévy. Přibližně každé 3 týdny dochází ke kompletní obměně pokožky. Škára, dermis, je střední vrstva kůže, která obsahuje vazivo s bohatou sítí cév a nervových zakončení. Také obsahuje cévy důležité pro regulaci tepla a imunitní buňky. Tato vrstva rozhoduje o pružnosti, mechanické odolnosti a pevnosti kůže. Podkoží, subcutis, je nejhlubší vrstvou kůže, která je tvořena řídkým vazivem a tukem. Tvoří izolační vrstvu chránící kůži proti teplotním vlivům a mechanickému poškození.

Kůže obsahuje i kožní deriváty jako jsou nehty, vlasy, chlupy, mazové a potní žlázy, mléčné žlázy a pachové žlázy [21].



Obrázek 3 Stavba kůže[20]

2.4.1 Typy pleti

Existují 4 základní typy pleti. Typ pleti je dán geneticky, avšak aktuální stav je odrazem působení různých vnitřních a vnějších faktorů, kterým je plet' vystavena.

Mezi nejčastější problémy pleti patří akné, které se projevuje především v pubertě a které s rostoucím věkem odezní. Hormonální poruchy, špatná funkce jater či trávicího systému a nevhodná strava však podporují výskyt akné i v dospělosti. Dále se setkáváme s popraskanými cévkami a vlivem stárnutí také s vráskami [22].

2.4.1.1 Normální plet'

Je optimálně vyvážená, není příliš mastná ani příliš suchá [21].

2.4.1.2 Suchá plet'

Tato plet' produkuje méně kožního mazu než normální plet' a díky tomu postrádá lipidy potřebné k zadržování vlhkosti a správnému fungování ochranné bariéry proti vnějším vlivům [21].

2.4.1.3 Mastná plet'

Tato plet' se vyznačuje zvýšenou tvorbou kožního mazu. Plet' je lesklá a obsahuje viditelné póry [21].

2.4.1.4 Smíšená plet'

Tento typ pleti je tvořen kombinací více typů [21].

2.5 Enkapsulace

2.5.1 Princip

Enkapsulace je definována jako proces zachycení jedné látky druhou, která právě tuto aktivní látku ohraničuje. Látka, která je enkapsulována se nazývá aktivní, jádro nebo též vnitřní fáze. Naopak látka, která enkapsuluje aktivní látku se často nazývá nosný materiál, kapsule, povlak nebo vnější fáze atd.

Proces enkapsulace je používán z mnoha různých důvodů a má nespočet uplatnění v různých odvětvích, například ve farmaceutickém, chemickém, textilním nebo také v environmentálním průmyslu. V technologickém odvětví se nejvíce využívá k uvolňování obsahu biologicky aktivních látek regulovanou rychlostí po delší časový úsek za specifických podmínek. Enkapsulace může být také použita k imobilizaci buněk nebo enzymů při výrobě potravinových materiálů nebo produktů fermentace. Dalším důvodem je zabránění nežádoucích reakcí s dalšími složkami v roztoku, a to především s kyslíkem a vodou. Enkapsulovaným materiálem může být látka pevného, kapalného i plynného skupenství. Velikost připravených částic se pohybuje od několika nm do mm [23].

2.5.2 Materiály

Existuje celá řada látek, která může být využita k zachycení a zabalení pevných, kapalných nebo plynných částic. Avšak využití těchto látek se liší podle toho, v jakém technologickém odvětví se používá. Jen malá část těchto částic splňuje požadavky k aplikaci v potravinách. Předpisy dané pro potravinový průmysl jsou mnohem přísnější než pro kosmetický a pro farmaceutický průmysl [24].

2.5.3 Kritéria

Pro výběr správného materiálu pro enkapsulaci není možné splnit všechny kritéria jeho použití. Je proto důležité zaměřit se především na místo působení, tedy prostředí, ve kterém má být materiál použit, na jeho aktivitu a účel. Také musí být zohledněny vnějších vlivy působící na prostředí, ve kterém se vyskytuje zabalená částice, a to změna pH, teploty nebo osmotického tlaku [24].

2.5.4 Druhy enkapsulace

K zabalení částic existuje nespočet metod. Vzhledem k tomu, že se enkapsulované částice často nacházejí převážně v kapalném prostředí, je mnoho těchto metod založených na sušení. Mezi metody patří například sprejové sušení, sprejové chlazení, sprejové mražení, fluidní vrstva, exkruze, liposomové zachycení aj. [25].

2.5.4.1 Sprejové sušení

Sprejové sušení je jednou z nejstarších a nejvíce používaných enkapsulačních metod v potravinovém průmyslu. Produkuje částice velmi dobré kvality a jejich velikost je menší jak 40 μm . I přes svou velkou využitelnost v průmyslovém odvětví, má tato metoda i své nevýhody. Největší nevýhodou je složitost zařízení a nerovnoměrné podmínky v sušící komoře. Navíc je často obtížné kontrolovat velikost částic [26]. Tato metoda je vhodná k přípravě bylinkových extraktů [23].

2.5.4.2 Sprejové chlazení a sprejové mražení

Tyto dvě metody založené na sušení jsou na pohled velmi podobné. V obou případech se do sušicí komory vhání studený vzduch, čímž nedochází k odparu vody z roztoku. Rozdíl mezi těmito metodami je v teplotě bodu tání připravených lipidů. Teplota bodu tání lipidů v případě sprejového mražení je v rozmezí 34–45 °C, u sprejového chlazení je teplota bodu tání o něco vyšší [24];[27].

2.5.4.3 Hydrogely

Hydrogely jsou nerozpustné ve vodě a mohou být připraveny pomocí kovalentních a nekovalentních vazeb. K přípravě se používá in situ polymerizace kationtových a aniontových polymerů. Polymerizace je ale zdoluhavý proces [28].

Rozsah aplikace hydrogelů je omezen jejich mechanickým chováním. Většina hydrogelů nevykazuje vysokou tažnost. Většina hydrogelů je také velmi křehkých [29].

2.5.4.4 Emulze

Tato metoda se uplatňuje v případech, kdy je aktivní látka rozpustná ve vodě. Jsou známy dva základní typy emulzí, a to voda v oleji nebo olej ve vodě. Složitější typ – voda v oleji ve vodě se využívá k vytvoření kapslí, které se vyznačují dobrou stabilitou. Tato metoda může být kombinována s jinými metodami sušení [30].

2.5.4.5 Liposomy

Liposomy jsou částice o velikosti od 30 nm do několika μm . Mohou být nazývány syntetickými analogy přírodních membrán. Mechanismus vytvoření liposomových částic je založen na hydrofilně-hydrofobní interakci mezi fosfolipidy a molekulami vody [23].

2.6 Liposomy

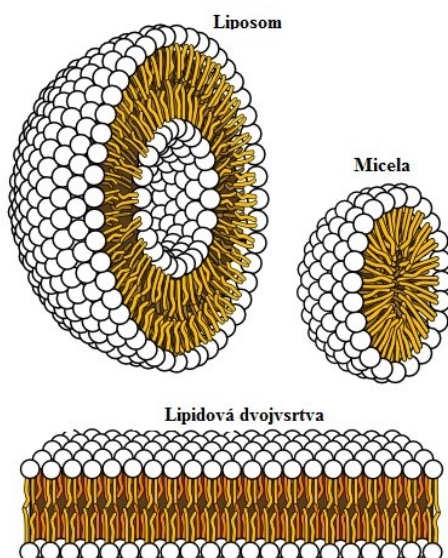
2.6.1 Charakterizace liposomů

Liposomy jsou mikroskopické lipidové útvary, sférického tvaru, přirozeně se vyskytující v mateřském mléku. Jsou to transportní systémy zabezpečující průnik látek v nich obsažených do pokožky i dále do hlubších vrstev. Podobají se kulovým měchýřkům velmi malých rozměrů tvořeným lipidovou, dvojvrstvou. Složením se velmi přibližují podobě lipidové dvojvrstvy buněčné membrány, jelikož také obsahují fosfolipidy a sterol, nejčastěji cholesterol. Liposomy byly objeveny již v 60. letech 20. století, ale až po nějaké době bylo zkoumáno jejich využití v medicíně [31];[32].

Dělí se na tři základní typy:

- Monolamelární (SUV) malé o průměru 25–50 nm
- Monolamelární (LUV) velké o průměru 200–1 000 nm
- Multilamelární (MLV) o průměru 50–10 000 nm

Velikost a stabilita liposomů určuje, jak hluboko lze dopravit transportní látky. Malé a stabilní liposomy mohou dopravit obsažené látky až do krevního oběhu, z čehož vyplývá, že s rostoucí velikostí liposomů a malé stabilitě, vedoucí k jejich rychlému rozpadu, klesá hloubka jejich průniku do pokožky [31].



Obrázek 4 Srovnání stavby liposomu, micely a lipidové dvojvrstvy[33]

2.6.2 Příprava

Základní složkou pro přípravu liposomů je kyselina fosfatidová, respektive její estery s alkoholem. Pro přípravu se nejvíce používá například fosfatidylcholin (lecithin), pro stabilizaci membrán se k němu přidává cholesterol. Díky své omezené rozpustnosti ve vodě se fosfolipidy reorganizují do dvojvrstev. Dvě vrstvy fosfolipidů obsahující hydrofobní řetězce se orientují těmito řetězci k sobě a hydrofilní fosfátovou hlavičkou k okolnímu vodnému polárnímu prostředí [32].

Liposomy se dají připravit mnoha způsoby. I přes různé složení lipidových částic, mohou být liposomy připraveny stejnou metodou. Mezi základní metody patří protřepání, nejčastěji ultrazvukem, dále odpařování na tenké vrstvě a metoda reverzních fází. K získání částic o dané velikosti, například nanočástic, je důležitá filtrace přes membránu o určité velikosti pórů.

2.6.3 Stabilita

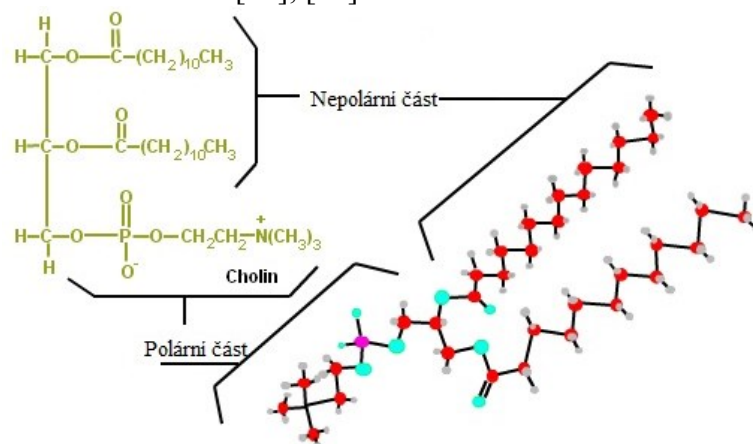
Stabilita liposomů může být posuzována jak z fyzikálního, tak i z chemického a biologického hlediska. Chemické rozložení liposomů může být způsobeno hydrolýzou nebo oxidací lipidů. Díky častému výskytu nenasyčených vazeb v hydrofilním řetězci, dochází v této části nejčastěji k oxidaci. Z fyzikálního hlediska zkoumáme stálost obsahu tuku v mikromolekule a velikost dané částice. Z biologického hlediska naopak zkoumáme prostředí, ve kterém se vytvořené liposomové částice nacházejí. Obecně jsou liposomy stabilnější při nižší teplotě, po důkladné sterilaci a teplotě 4 °C jsou stabilní dlouhodobě [34].

2.6.4 Základní složky liposomů

2.6.4.1 Lecithin

Lecithin je důležitou složkou pro přípravu liposomů. Získává se rafinací rostlinných olejů jako vedlejší produkt. Může být získáván například ze sojových bobů, slunečnicových jader a řepkových semen [34]; [35].

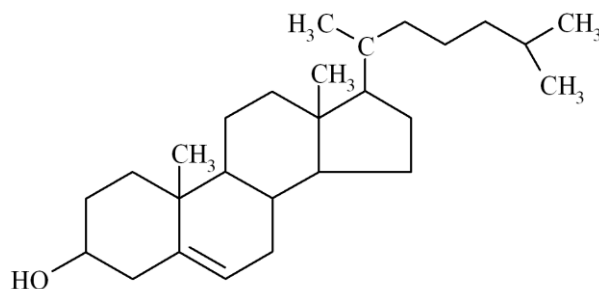
Lecithin izolovaný z přírodních materiálů se skládá z fosfolipidů, glykolipidů, sacharidů, triglyceridů a v malém množství obsahuje také vodu, steroly a volné mastné kyseliny. Z chemického hlediska má čistý lecithin strukturu fosfatidylcholinu. Široce se využívá jako přírodní emulgátor patřící mezi povrchově aktivní látky v potravinách, v kosmetice, v lékařství a také v biotechnologickém průmyslu. Vlastnosti lecithinu jsou způsobeny především povrchovou aktivitou fosfolipidů. Fosfolipidy obsahují navázaný glycerol, na kterém jsou pomocí esterové vazby navázány dvě mastné kyseliny a fosfátová skupina. Na fosfátovou skupinu se také může navázat alkoholová složka, kromě cholinu se může jednat o ethanolamin nebo inositol [34]; [35].



Obrázek 5 Struktura lecithinu [36]

2.6.4.2 Cholesterol

Cholesterol je organická sloučenina tukové povahy, která je přirozenou součástí buněk lidského těla. Řadí se mezi steroly [37]. Do organismu je přijímán z živočišných zdrojů, ale je syntetizován i v lidském těle. V těle je přenášen krví pomocí lipoproteinů. Rozlišujeme dva hlavní typy transportních forem cholesterolu, a to LDL cholesterol a HDL cholesterol [38].



Obrázek 6 Struktura cholesterolu [37]

LDL cholesterol je považován za zdraví škodlivý, protože jeho vysoká koncentrace zvyšuje riziko vzniku srdečně cévních onemocnění. V této formě je cholesterol transportován cévním řečištěm do okrajových tkání, kde se ukládá do stěny cév. HDL cholesterol je příznivý a je tak transportován přebytečný cholesterol z krevního řečiště do jater. Doporučená denní dávka by neměla překročit 300 mg. Cholesterol nalezneme především ve vaječném žloutku, mozku, svalovině, sýru, mléku i v palmovém oleji [38]. Je také významnou složkou pro enkapsulaci díky své schopnosti začlenit se do fosfolipidové dvojvrstvy ve vodném prostředí, a tak stabilizovat liposomy [30].

2.6.5 Druhy příprav liposomů

2.6.5.1 Ultrazvuková enkapsulace

Liposomy mohou být připraveny pomocí ultrazvuku. Základním materiálem je směs fosfolipidu a cholesterolu v roztoku enkapsulované složky. Takto připravená směs je opatrně dispergována pomocí ultrazvukových vln [39].

2.6.5.2 Odpařování na tenké vrstvě

Směs fosfolipidu a cholesterolu je rozpuštěná v organickém rozpouštědle, může se jednat o chloroform nebo směs chloroform:methanol v poměru 2:1. Poté dochází k odpaření organických činidel na vakuové rotační odparce. Suchý lipidový film přichycený na stěnách baňky s kulatým dnem je hydratován přidáním vodného roztoku enkapsulované složky a směs je nakonec promíchána [40]; [41].

2.6.5.3 Metoda reverzních fází

Liposomy jsou připraveny obdobným způsobem jako při odpařování na tenké vrstvě. Lipidový film je připraven odpařením organického rozpouštědla za sníženého tlaku a poté jsou lipidy znovu rozpuštěny v druhém organickém rozpouštědle, obvykle se využívá ethylether nebo isopropylether. Do směsi je poté přidán vodný roztok enkapsulované složky a organické rozpouštědlo je opět odpařeno na vakuové odparce [42].

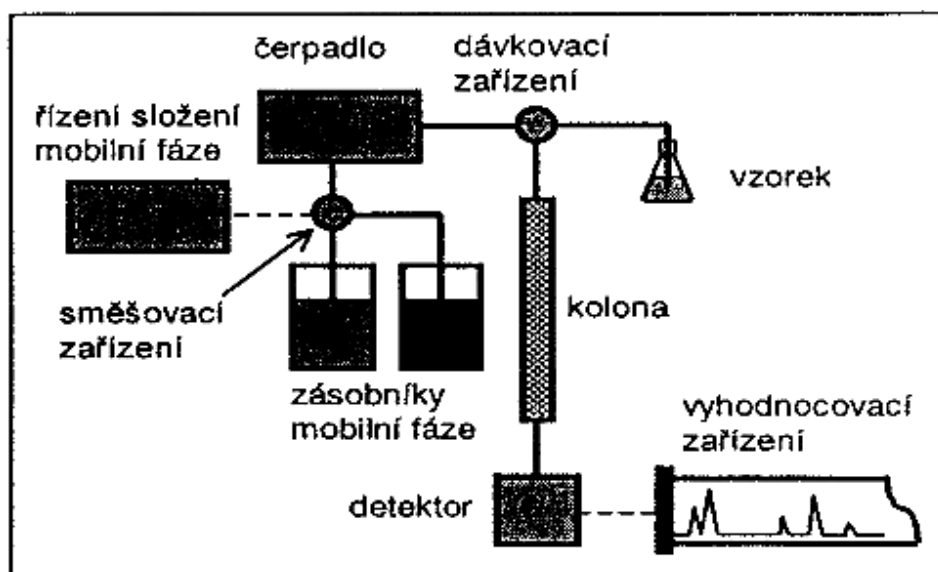
2.7 Metody využívané k analýze částic a enkapsulovaných látek

2.7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Při analýze částic s enkapsulovanou látkou lze využít vysokoúčinné kapalinové chromatografie k detekci množství enkapsulované nebo uvolněné aktivní složky.

Chromatografie patří mezi separační metody založené na existenci fázového rozhraní dvou fází, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Mobilní fáze je pohyblivá, unáší tak vzorek a obtéká nepohyblivou stacionární fázi. Složky vzorku mohou snadno adsorbovat na povrchu stacionární fáze, čímž dojde k zadržení jedné části složky více než druhé. K vyjádření dělení vzorku mezi stacionární a mobilní fázi, tedy poměr mezi množstvím látky ve stacionární fázi k mobilní, slouží distribuční konstanta. Čím větší hodnotu konstanta má, tím déle je vzorek zadržován ve stacionární fázi. Retenční čas je charakteristický pro každou látku a udává dobu, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky. Retenční objem udává objem mobilní fáze, která za tento čas protekla. Mezi rozdělovací faktory pro kapalinovou chromatografii patří výběr mobilní fáze a také výběr kolony [43].

Přístroj pro HPLC se skládá z těchto základních částí: zásobníku mobilní fáze, směšovače, čerpadla, dávkovače vzorku, kolony i popřípadě předkolony, detektoru, odpadu a vyhodnocovací jednotky. Zásobník sloučí pro dostatečné množství mobilní fáze. Směšovač slouží ke smíchání mobilní fáze ve zvoleném poměru, pokud se jedná o gradientovou eluci. Existují tři typy čerpadel, a to pneumatické, pístové a reciproční čerpadlo. V praxi se používá soubor dvou a více čerpadel kvůli předcházení pulzování, které narušuje dlouhodobý konstantní průtok mobilní fáze [44]. Detektorů existuje celá řada, mezi nejznámější patří fotometrický, refraktometrický, fluorescenční, elektrochemický detektor či hmotnostní [43].



Obrázek 7 Schéma zařízení HPLC [43]

2.7.2 UV-VIS spektrofotometrie

UV-VIS spektrofotometrie je další metodou, která se využívá při stanovení aktivních látek a k detekci jejich enkapsulovaného či uvolněného množství.

Podstatou ultrafialové a viditelné spektrometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření, o vlnové délce 200 až 800 nm, zředěnými roztoky molekul. Při interakci molekuly se zářením dochází ke změnám energie molekuly v elektronových orbitalech a ve vibračních a rotačních hladinách [45].

Transmittance T je relativní část prošlého záření a často se uvádí v procentech. Absorbance je záporný dekadický logaritmus transmittance. Je-li absorpce nulová, je nulová i absorbance. S rostoucí absorpcí záření roste i absorbance.

V této metodě se uplatňuje Lambertův-Beerův zákon. Ten udává, že absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy.

Kvalitativní analýza pomocí ultrafialového a viditelného spektra se doplňkově využívají k identifikaci neznámé organické látky. Kvantitativní analýza pomocí měření absorbance se hojně využívá k určení koncentrace sloučenin. Pracuje se obvykle metodou kalibrační křivky. Součástí spektrometru je zdroj záření, monochromátor, místo pro kyvetu se vzorkem a detektor záření [43].

2.7.3 Roztoková volumetrická analýza

Rovněž titrace je metodou, která se využívá při stanovení aktivních látek a lze ji využít i k detekci enkapsulovaného či uvolněného množství.

Princip metody spočívá v měření objemu definovaných roztoků titračního činidla, které reaguje s analyzovanou komponentou. Obsah hledané komponenty se zjišťuje z objemu a koncentrace použitého činidla po úplném zreagování titračního činidla s analytem, tedy po dosažení bodu ekvivalence.

Mezi základní typy titrací patří acidobazické, redoxní, srážecí a komplexometrické titrace. K dosažení správnosti volumetrické podmínky musí být splněn jednotný reakční průběh chemické reakce, také její dostatečná rychlost a dokonalé vymezení bodu ekvivalence [44].

2.7.4 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla je rovněž znám jako fotonová korelační spektroskopie nebo též kvazielastický rozptyl světla. Jde o metodu sloužící ke stanovení velikosti částic v nesedimentujících koloidních disperzích. Jako budící zdroj světla se využívá laser o dané vlnové délce. Tímto laserem je osvětlen vzorek. Částice, které se pohybují na základě Brownova pohybu, jsou zdrojem rozptýleného světla. Ohyb je nepřímo úměrný jejich velikosti. Velké částice ohnou paprsek pod malým úhlem a intenzita paprsku zůstává stále vysoká. U malých částic je tomu právě naopak. Přístroj určí difúzní koeficient částic, jehož hodnota závisí na třech veličinách, a to na teplotě kapaliny, na její viskozitě a na velikosti suspendovaných částic. Pokud známe teplotu a viskozitu, lze jednoduše určit pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice velikost částic. Získaná hodnota se nazývá hydrodynamický průměr odpovídající průměru koule, která by měla za stejných podmínek stejný změřený difúzní koeficient [46].

2.7.5 Zeta potenciál

Zeta potenciál je fyzikální vlastnost každé částice v suspenzi. Tato fyzikální vlastnost je tedy mírou velikosti elektrostatického náboje a je jedním z parametrů, který ovlivňuje stabilitu částic. Detailně popisuje příčiny disperze, agregace nebo flokulace [47].

Částice o zeta potenciálu menším než 30 mV jsou velmi nestabilní a naopak částice o zeta potenciálu větším jak 60 mV jsou vysoce stabilní. Stabilita částic, a tedy i zeta potenciál, je ovlivňován také pH prostředím, ve kterém se částice nacházejí.

Zeta potenciál se stanovuje pomocí elektroforetické pohyblivosti použitím Henryho rovnice. Kolem každé částice v suspenzi se vytvoří elektrická dvojvrstva. Kapalina obtékající částice se rozděluje na vnitřní a vnější difúzní oblast. V difúzní vrstvě se nachází hranice oddělující ionty pohybující se s částicí a ionty neputující s částicí. Zeta potenciál se nachází právě na této hranici [48].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo srovnat stabilitu, efektivitu a možnost využití nanočástic připravených z různého materiálu a s enkapsulovanou přírodní složkou k aplikaci do kosmetických přípravků.

1. Zpracování rešerše zaměřenou na přehled materiálů a technik používaných pro přípravu nanočástic pro kosmetické účely.
2. Zavedení optimalizace metod enkapsulace, stanovení velikosti částic a stability v různém prostředí
3. Experimentální studie – srovnání účinnosti enkapsulace vybraných přírodních látek a stability částic v několika typech kosmetických přípravků
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Chemikálie

Methanol: VWR Chemicals BDH PROLABO (UK)

Kyselina chlorovodíková 35%: Lach:NER (ČR)

Chloroform: VWR Chemicals BDH PROLABO (UK)

Diethylether: VWR Chemicals BDH PROLABO (UK)

Methanol pro HPLC: VWR Chemicals BDH PROLABO

Kofein: Sigma-Aldrich (SRN)

Lecithin ze sojových bobů: Serva (SRN)

Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu: Serva (SRN)

Uhlíčitán sodný bezvodý: Lach:NER (ČR)

2,6-dichlorindofenol: Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina L-askorbová: Sigma-Aldrich (SRN)

Carbomer 980: Sino Lion (USA)

Karboxymethylcelulóza, sodná sůl: Sigma-Aldrich (SRN)

Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (ČR)

Kyselina gallová – Sigma-Aldrich (SRN)

4.1.2 Přístroje a pomůcky

Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen: (SRN)

Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS: Malvern (UK)

Sestava HPLC Thermo Finnigan: Thermo Fischer (USA)

- Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR (Thermo, USA)
- Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR (Thermo, USA)
- Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
- Dávkovací analytický ventil smyčkový C R54157
- Vyhodnocovací systém Clarity
- Kolona Kinetex 5u C18, 4,6 x 150 mm

Analytické váhy: Boeco (SRN)

Ultrazvukový homogenizátor/dispergátor-Bandelin SonoplusHS3200-SonorexTechnik (GER)

Membránový extrudér – LiposoFast, Avestin (GER)

Vortex: Genius 3, IKA Vortex (SRN)

Optický mikroskop Intraco Micro LM 666 PV/ ∞ LED (ČR)

Software Dino-Capture 2.0 (ČR)

Spektrofotometr Thermo Spectronic Helios δ (UK)

Vakuová odparka Werke RV06-ML: IKA (SRN)

Magnetická míchačka: Lavat (ČR)

4.2 Příprava extraktů s obsahem kofeinu

Roztoky byly připraveny podle návodu na obalu.

4.2.1 Sypaný zelený čaj – Formosa Gunpowder, země původu Tchaj-wan

Sušené lístky byly zality vodou o teplotě 70–80 °C v poměru 1,5 dl na 1 čajovou lžičku (2,820 0 g). Připravený čaj byl ponechán k louhování 2–3 minuty. Poté byl přefiltrován přes dvojitou gázu.

4.2.2 Sypaný černý čaj – Gunpowder Black, země původu Čína

Sušené lístky byly zality vroucí vodou v poměru 1,5 dl na 1 čajovou lžičku (2,191 8 g). Připravený čaj byl ponechán k louhování 3–5 minut. Poté byl přefiltrován přes dvojitou gázu.

4.2.3 Sypaný bílý čaj – Pai Mu Tan, země původu Čína

Sušené lístky byly zality vodou o teplotě přibližně 90 °C v poměru 1,5dl na 1 čajovou lžičku (1,979 1 g). Připravený čaj byl ponechán k louhování 5 minut. Poté byl přefiltrován přes dvojitou gázu.

4.2.4 Guarana semeno mleté – Paullinia cupana, země původu Brazílie

1 čajová lžička (2,475 6 g) byla zamíchána do vroucí vody. Poté byl připravený roztok přefiltrován přes dvojitou gázu.

4.2.5 Pražená zrnková plantážní káva (100% arabica) – Brazilia Santos, země původu Brazílie

Zrnka kávy byly pomocí mlýnku rozemlety. Na 1 porci byly použity 2 kávové lžičky mleté kávy (1,981 3 g). Káva byla zalita horkou vodou o teplotě 93–94 °C. Připravený roztok byl ponechán chvíli k louhování a poté byl přefiltrován přes dvojitou gázu.



Obrázek 8 Příprava nápojových extraktů, zleva zelený čaj, černý čaj, bílý čaj a guarana

4.3 Příprava bylinného extraktu levandule

Sušené květy levandule (0,100 2 g) byly zality 10 ml horké vody a roztok byl ponechán k louhování 15 minut. Poté byl roztok přefiltrován přes dvojitou gázu.

4.4 Příprava ovocných extraktů

Šťáva z citronu, pomeranče a kiwi byla získána odšťavněním příslušného ovoce. Díky dužině byla šťáva velmi hustá, proto byla šťáva přefiltrována přes dvojitou gázu. Roztoky byly dále odstředěny při 7 500 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Takto připravené roztoky byly ponechány pro další měření.

4.5 Stanovení kofeinu metodou HPLC s PDA detekcí

K analyzování extraktů a stanovení všech sloučenin z potravin je důležité nalézt účinnou a rychlou analytickou metodu. K tomuto stanovení se obvykle využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s reverzní fází. Vzorky kofeinu byly aplikovány na kolonu pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 μ l. Dělení směsi probíhalo na koloně Kinetex 5u C 18 s reverzní fází při 30 °C. Eluce byla použita izokratická při průtoku mobilní fáze 0,6 ml·min⁻¹. Mobilní fází byla směs methanolu a vody v poměru 60:40. Vzorky byly detekovány na PDA detektoru při vlnové délce 270 nm. Z chromatogramů o různých koncentracích kofeinu byly zjištěny plochy píků a sestavena externí kalibrační křivka pro kvantitativní stanovení koncentrace kofeinu.

4.6 Příprava liposomů

4.6.1 Ultrazvuková enkapsulace – Ultrazvuk 1

V 10 ml roztoku enkapsulované složky bylo rozmícháno 180 mg sójového lecithinu a 20 mg cholesterolu. Roztok byl ultrazvukován po dobu jedné minuty při intenzitě 70 %. Kádinka s roztokem byla při ultrazvukování ponořena do studené vodní lázně, aby se předcházelo příliš vysokému zahřátí roztoku, což by mohlo vést k rozpadu liposomů.

4.6.2 Ultrazvuková enkapsulace s přidavkem chloroformu – Ultrazvuk 2

K 10 ml enkapsulované složky byl přidán 1 ml chloroformu se 100 mg sójového lecithinu a 10 mg cholesterolu. Směs byla 1 minutu ultrazvukována za vzniku emulze. Kádinka s roztokem byla při ultrazvukování ponořena do studené vodní lázně, aby se předcházelo příliš vysokému zahřátí roztoku, což by mohlo vést k rozpadu liposomů. Na závěr byl z emulze mícháním na magnetické míchačce při 50 °C odpařen chloroform.

4.6.3 Odpařování na tenké vrstvě – TLE

80 mg sójového lecithinu a 10 mg cholesterolu bylo rozpuštěno v 10 ml směsi chloroformu a methanolu v poměru 80:20. Roztok byl přelit do odpařovací baňky a na vakuové odparce byl odpařen do sucha. K vytvořenému lipidovému filmu bylo přidáno 10 ml enkapsulováno vzorku a směs byla střídavě míchána na vortexu a ultrazvuku do úplného rozpuštění lipidového filmu ze stěn baňky.

4.6.4 Metoda reverzních fází – RP-TLE

50 mg sójového lecithinu a 12,5 mg cholesterolu bylo rozpuštěno ve směsi chloroformu a methanolu v poměru 80:20. Roztok byl přelit do odpařovací baňky a na vakuové odparce odpařen do sucha. Vytvořený lipidový film byl rozpuštěn v 8 ml etheru. K tomuto roztoku byly přidány 2 ml enkapsulovaného vzorku.

Směs byla dále s přestávkami ultrazvukována po dobu 1 minuty do vytvoření emulze. Poté byl ether odpařen na vakuové odparce a vzniklá vodná suspenze byla doplněna destilovanou vodou na konečný objem 10 ml.

4.7 Stanovení enkapsulační účinnosti

Vzorek kofeinu po enkapsulaci danými metodami byl centrifugován 5 minut při 14 800 otáčkách za minutu, supernatant byl slit, zředěn v určitém poměru a byla v něm stanovována pomocí HPLC koncentrace zbylého volného kofeinu, stejně tak jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody.

4.8 Stanovení velikosti částic pomocí metody dynamického rozptylu světla

Velikost částic různě připravených vzorků liposomů byla stanovena na přístroji Zetasizer Nanoseries, který využívá dynamického rozptylu světla. Tento přístroj měří časovou závislost kolísání intenzity rozptýleného světla dané Brownovým pohybem částic. Analýza intenzity rozptýleného světla umožňuje určit difúzní koeficient částic a vypočítat distribuci velikosti částic v daném vzorku.

Připravené částice byly zředěny Mili-Q vodou a analyzovány.

4.9 Stanovení stability částic

4.9.1 Stanovení zeta potenciálu

Měření zeta potenciálu bylo provedeno na přístroji Zetasizer Nanoseries. Měření je založeno na technice „Laser Doppler Velocimetry“, tedy na tom, jak rychle se pohybují částice v kapalině za působení elektrického pole. Zeta potenciál je rozdíl potenciálů na pohybovém rozhraní, který se ustavuje při relativním pohybu tuhé fáze s elektrickou dvojvrstvou vůči roztoku. Znaménko je opačné než znaménko iontů vnější vrstvy elektrické dvojvrstvy. Čím větší náboj částice nese, tím je stabilnější.

4.10 Stanovení polyfenolů UV-VIS spektrofotometrickou metodou

4.10.1 Příprava vzorků

Do zkumavky byl pipetován 1 ml 10x zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 50 μ l vzorku. Takto připravený roztok byl ponechán v klidu 5 minut. Poté byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a takto připravený vzorek byl ponechán ke stání 15 minut. Po uplynulé době byl vzorek zředěn v poměru 1:1 a poté byla proměřována absorbance vzorků při vlnové délce 750 nm.

4.10.2 Kalibrační křivka

Do zkumavky byl pipetován 1 ml 10x zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 50 μ l vzorku kyseliny galové o koncentraci 0,1 – 0,7 mg·ml⁻¹. Takto připravený roztok byl ponechán v klidu 5 minut. Poté byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a takto připravený vzorek byl ponechán ke stání 15 minut. Po uplynulé době byla proměřována absorbance vzorků při vlnové délce 750 nm.

4.11 Stanovení vitamínu C

4.11.1 Příprava vzorků

4 ml vzorku byly rozpuštěny v malém množství 2% kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 100 ml a po rysku doplněn 2% kyseliny chlorovodíkové. Z takto připraveného roztoku bylo pipetováno 25 ml do titrační baňky a roztok byl titrován odměrným roztokem 2,6-dichlorindofenolem o koncentraci $0,0005 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do lososově růžového zbarvení stálého minimálně 15 sekund.

4.11.2 Standardizace odměrného roztoku 2,6-dichlorindofenolu

Navážka 10 mg kyseliny L-askorbové byla rozpuštěna v malém množství 2% kyseliny chlorovodíkové a následně kvantitativně převedena do 10 ml odměrné baňky, objem byl doplněn po rysku 2% kyselinou chlorovodíkovou. Do titrační baňky bylo pipetováno 10 ml 2% kyseliny chlorovodíkové a 1 ml standardu. Takto připravený roztok byl titrován odměrným roztokem 2,6-dichlorindofenolem o koncentraci $0,0005 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do lososově růžového zbarvení stálého minimálně 15 sekund.

4.12 Stanovení dlouhodobé stability připravených částic v modelových podmínkách

U vybraných částic byla použitím membránového extrudéru velikost upravena na průměrnou hodnotu 100 nm. Částice byly poté přidány do modelového vodného roztoků a uchovávány při laboratorní teplotě a především při snížené teplotě než je teplota laboratorní. Ve stanovených intervalech byl proveden odběr roztoku pro stanovení obsahu uvolněných složek.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

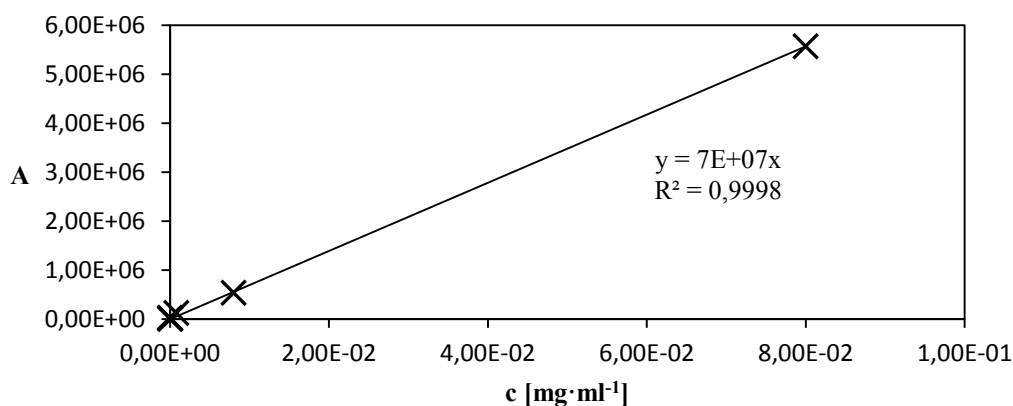
Tato práce byla zaměřena na studium enkapsulace vybraných přírodních extraktů s obsahem kofeinu pro aplikaci v kosmetice. Byly testovány možnosti enkapsulace extraktů kávy, černého čaje, zeleného čaje, bílého čaje a guarany. Dále byly tyto extrakty kombinovány s ovocnými a bylinnými extrakty. V práci byly použity extrakty pomeranče, citronu, kiwi a levandule. Všechny přírodní extrakty byly nejprve charakterizovány a následně použity k enkapsulaci. Dále bylo sledováno jejich chování a stabilita v prostředí modelového kosmetického produktu.

5.1 Charakteristika přírodních extraktů

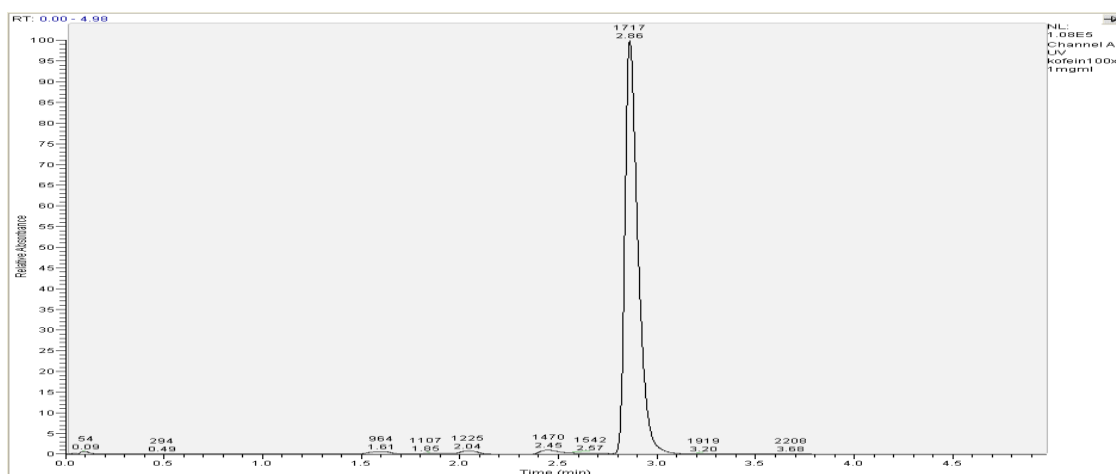
Přírodní extrakty byly charakterizovány na obsah kofeinu, polyfenolů a vitaminu C. Příprava extraktu pro stanovení obsahu kofeinu a polyfenolů byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 4.2. Ovocné extrakty pro charakterizaci polyfenolů a obsahu vitaminu C byly připraveny dle postupu v kapitole 4.4. Bylinný extrakt levandule byl připraven dle postupu v kapitole 4.3.

5.1.1 Stanovení kofeinu

Stanovení množství kofeinu bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.5 za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Obr. 9, 10). Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr ze dvou měření (Tab. 1).



Obrázek 9 Kalibrační křivka pro kvantitativní stanovení kofeinu



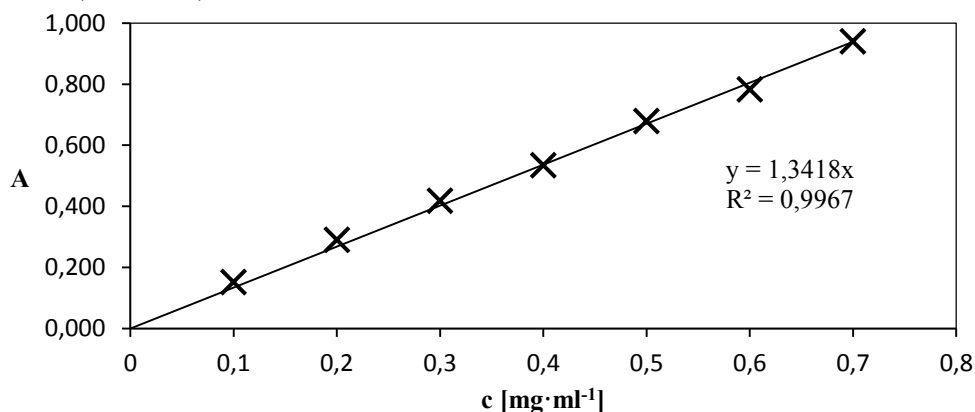
Obrázek 10 Chromatogram kofeinu ze stanovení kalibrační křivky na HPLC

Tabulka 1 Naměřené hodnoty obsahu kofeinu v jednotlivých přírodních extraktech

Přírodní zdroj	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
Obsah kofeinu [mg·g ⁻¹]	74,79	83,35	73,54	121,99	104,06

5.1.2 Stanovení polyfenolů

Stanovení polyfenolů bylo provedeno pomocí reakce s Folin-Ciocalteovým činidlem. Jako standard byla použita kyselina gallová (Obr. 11). Přesný postup je uveden v kapitole 4.10. Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr ze dvou měření (Tab. 2, 3).



Obrázek 11 Kalibrační křivka pro kvantitativní stanovení polyfenolů

Tabulka 2 Naměřené hodnoty obsahu polyfenolů v jednotlivých přírodních extraktech

Přírodní zdroj	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva	Levandule
Obsah polyfenolů [mg·g ⁻¹]	38,00	87,50	98,95	81,10	55,80	41,12

Tabulka 3 Naměřené hodnoty obsahu polyfenolů v jednotlivých ovocných extraktech

Ovocná složka	Citron	Kiwi	Pomeranč
Obsah polyfenolů [mg·ml ⁻¹]	0,05	0,02	0,01

5.1.3 Stanovení obsahu vitamínu C

Obsah vitamínu C v ovocných extraktech byl stanoven titračně dle návodu uvedeného v kapitole 4.11. Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr ze dvou měření (Tab. 4).

Tabulka 4 Naměřené hodnoty obsahu vitamínu C v jednotlivých ovocných extraktech

Ovocná složka	Citron	Kiwi	Pomeranč
Obsah vitamínu C [mg·ml ⁻¹]	1,00	0,39	0,32

5.2 Stanovení enkapsulační účinnosti kofeinu

5.2.1 Enkapsulační účinnost standardního roztoku kofeinu

Zásobní roztok kofeinu byl připraven z 10 mg kofeinu, které byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky 100 ml. Odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl dále použit k enkapsulaci. Vzorek kofeinu po enkapsulaci danými metodami byl centrifugován 5 minut při 14 800 otáčkách za minutu, supernatant byl slit, zředěn ve vhodném poměru a byla v něm stanovována pomocí HPLC koncentrace zbylého volného kofeinu, stejně jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr ze dvou měření. Metody pro přípravu jednotlivých typů liposomů jsou uvedeny v kapitole 4.7.

Tabulka 5 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 1

		Koncentrace kofeinu v roztoku	
Zabaleno [%]	Nezabaleno [%]	$c_{\text{počáteční}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$	$c_{\text{konečná}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$
64,12	35,88	0,100	0,036

Tabulka 6 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 2

		Koncentrace kofeinu v roztoku	
Zabaleno [%]	Nezabaleno [%]	$c_{\text{počáteční}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$	$c_{\text{konečná}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$
64,12	35,88	0,100	0,036

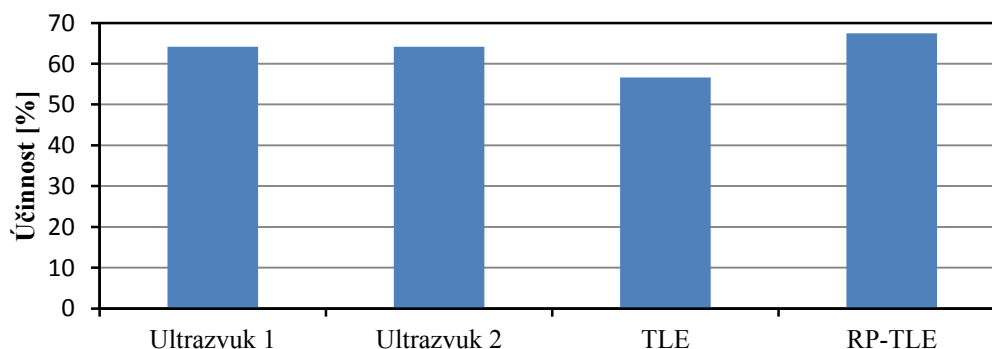
Tabulka 7 Liposomy připravené metodou TLE

		Koncentrace kofeinu v roztoku	
Zabaleno [%]	Nezabaleno [%]	$c_{\text{počáteční}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$	$c_{\text{konečná}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$
56,64	43,36	0,100	0,043

Tabulka 8 Liposomy připravené metodou RP-TLE

		Koncentrace kofeinu v roztoku	
Zabaleno [%]	Nezabaleno [%]	$c_{\text{počáteční}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$	$c_{\text{konečná}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$
67,43	32,57	0,100	0,033

Enkapsulační účinnost kofeinu u jednotlivých metod byla srovnatelná, což je zřejmé z obrázku 12.



Obrázek 12 Porovnání enkapsulační účinnosti kofeinu u jednotlivých metod

Nejvyšší účinnost 67,43 % byla stanovena u metody RP-TLE, avšak vytvořené částice nedosahovaly vhodné stability, agregovaly a sedimentovaly. Nejvhodnější metodou byla tedy metoda za použití ultrazvuku, kde byly částice stabilní a účinnost byla až 64,15 % (Tab. 5–8, Obr. 12).

5.2.2 Enkapsulační účinnost kofeinu z přírodních zdrojů

Roztoky z přírodních zdrojů kofeinu byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.2. Poté byly extrakty enkapsulovány, centrifugovány 5 minut při 14 800 otáčkách za minutu, supernatant byl slit, zředěn v poměru 1:9 na 1 ml a pomocí HPLC byla změřena koncentrace kofeinu v jednotlivých roztocích, stejně jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr ze dvou měření. Metody pro přípravu jednotlivých typů liposomů jsou uvedeny v kapitole 4.6.

Tabulka 9 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 1

Koncentrace kofeinu [mg·ml ⁻¹]		Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
	Před enkapsulací	1,947	1,693	1,210	1,761	1,343
	Po enkapsulaci	0,562	0,584	0,514	0,747	0,557
Enkapsulační účinnost [%]		71,15	65,50	57,55	57,55	58,51

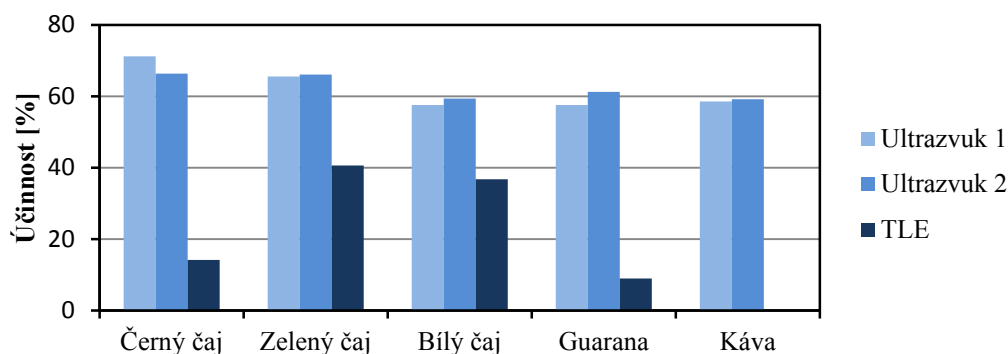
Tabulka 10 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 2

Koncentrace kofeinu [mg·ml ⁻¹]		Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
	Před enkapsulací	1,947	1,693	1,210	1,761	1,343
	Po enkapsulaci	0,683	0,574	0,491	0,683	0,549
Enkapsulační účinnost [%]		66,36	66,07	59,38	61,24	59,14

Tabulka 11 Liposomy připravené metodou TLE

Koncentrace kofeinu [mg·ml ⁻¹]		Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
	Před enkapsulací	1,947	1,693	1,210	1,761	1,343
	Po enkapsulaci	1,511	1,156	1,071	1,603	1,392
Enkapsulační účinnost [%]		14,18	40,62	36,72	8,97	0,00

Nejvyšší enkapsulační účinnost kofeinu získaného z přírodních zdrojů byla stanovena ve všech případech u metod s využitím ultrazvuku, což je zřejmé z obrázku 13.



Obrázek 13 Srovnání enkapsulační účinnosti kofeinu extraktů z přírodních zdrojů kofeinu u jednotlivých metod

Obě metody ultrazvuku byly srovnatelné, přičemž pomocí metody Ultrazvuk 1 u extraktu z černého čaje byla účinnost až 71,15 % a pomocí metody Ultrazvuk 2 u extraktu ze zeleného čaje byla účinnost až 66,07 %. Enkapsulace pomocí metody TLE byla stanovena ve všech případech nejnižší oproti metodám ultrazvuku. Nejvyšší účinnost pomocí této metody byla stanovena u extraktů ze zeleného a bílého čaje, kdy dosahovala až 40,62 % (Tab. 9–11, Obr. 13).

5.2.3 Enkapsulační účinnost kofeinu z přírodních zdrojů kofeinu ko-enkapsulovaných s ovocnou složkou

Roztoky z přírodních zdrojů a ovocných složek byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.2 a 4.4. Extrakty z přírodních zdrojů a ovocných složek byly smíchány v poměru 8:2. Poté byly extrakty enkapsulovány, centrifugovány 5 minut při 14 800 otáčkách za minutu, supernatant byl slit, zředěn v poměru 1:9 na 1 ml a pomocí HPLC byla změřena koncentrace kofeinu v jednotlivých roztocích, stejně jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr ze dvou měření. Metody pro přípravu jednotlivých typů liposomů jsou uvedeny v kapitole 4.6.

Tabulka 12 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 1

Koncentrace kofeinu [mg·ml ⁻¹]	Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
	Ovocná složka	Citron	Citron	Kiwi	Pomeranč	Pomeranč
	Před enkapsulací	1,639	1,567	1,456	2,013	1,375
	Po enkapsulaci	0,370	0,344	0,385	0,448	0,357
Enkapsulační účinnost [%]		71,79	72,57	66,92	72,16	67,54

Tabulka 13 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 2

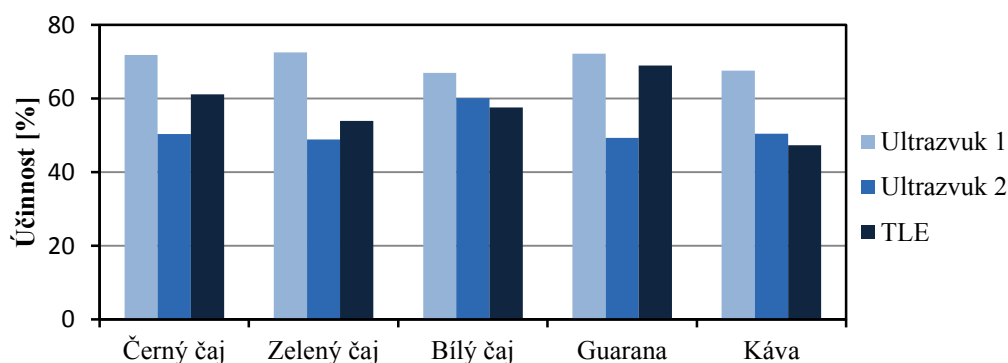
Koncentrace kofeinu [mg·ml ⁻¹]	Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
	Ovocná složka	Citron	Citron	Kiwi	Pomeranč	Pomeranč
	Před enkapsulací	1,639	1,567	1,456	2,013	1,375
	Po enkapsulaci	0,651	0,641	0,442	0,816	0,545
Enkapsulační účinnost [%]		50,38	48,89	62,08	49,31	50,42

Tabulka 14 Liposomy připravené metodou TLE

Koncentrace kofeinu [mg·ml ⁻¹]	Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
	Ovocná složka	Citron	Citron	Kiwi	Pomeranč	Pomeranč
	Před enkapsulací	1,639	1,567	1,456	2,013	1,375
	Po enkapsulaci	0,510	0,577	0,494	0,501	0,578
Enkapsulační účinnost [%]		61,10	53,96	57,60	68,92	47,28

Výběr kombinací ovocné složky a přírodních zdrojů kofeinu byl spíše intuitivní, přičemž byl brán zřetel zejména na kompatibilitu chutí a byly využity již ověřené kombinace (čaj a citron nebo čokoláda s příchutí pomeranče apod.). Přidáním ovocné složky mohlo dojít jednak k ovlivnění enkapsulace kofeinu, dále k celkovému navýšení množství polyfenolů v roztoku navíc doplněný o vitamin C. Komplexní produkt připravený ko-enkapsulací by mohl být dobře přijímán spotřebiteli a představuje funkční potravinovou komponentu nového typu.

Nejvyšší enkapsulační účinnost kofeinu získaného ko-enkapsulací přírodních zdrojů kofeinu a ovocných složek byla stanovena ve všech případech u metody Ultrazvuk 1, což je zřejmé z obrázku 14. Metody Ultrazvuk 2 a TLE byly srovnatelné.



Obrázek 14 Srovnání enkapsulační účinnosti kofeinu ko-enkapsulovaných extraktů z přírodních zdrojů a ovocných složek

Nejvyšší enkapsulační účinnost metody Ultrazvuk 1 byla stanovena u extraktu ze zeleného čaje, kdy dosahovala až 72,57 %. Nejméně se enkapsuloval kofein z extraktu z kávy pomocí metody TLE, kdy enkapsulační účinnost dosahovala pouhých 47,28 % (Tab. 12–14, Obr. 14).

5.3 Stanovení enkapsulační účinnosti polyfenolů

5.3.1 Enkapsulační účinnost polyfenolů z přírodních zdrojů kofeinu

Roztoky z přírodních zdrojů kofeinu byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.2. Vzorek s polyfenoly po enkapsulaci danými metodami byl centrifugován 5 minut při 14 800 otáčkách za minutu, supernatant byl slit, zředěn v poměru 1:1 v 1 cm kyvetě a byla v něm stanovována pomocí spektrofotometrické metody koncentrace zbylých volných polyfenolů, stejně jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr ze dvou měření. Metody pro přípravu jednotlivých typů liposomů jsou uvedeny v kapitole 4.6.

Tabulka 15 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 1

Koncentrace polyfenolů [mg·ml ⁻¹]		Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
	Před enkapsulací	0,370	1,096	0,435	1,338	0,737
	Po enkapsulaci	0,359	1,032	0,409	0,747	0,725
Enkapsulační účinnost [%]		2,97	5,91	6,01	44,19	1,67

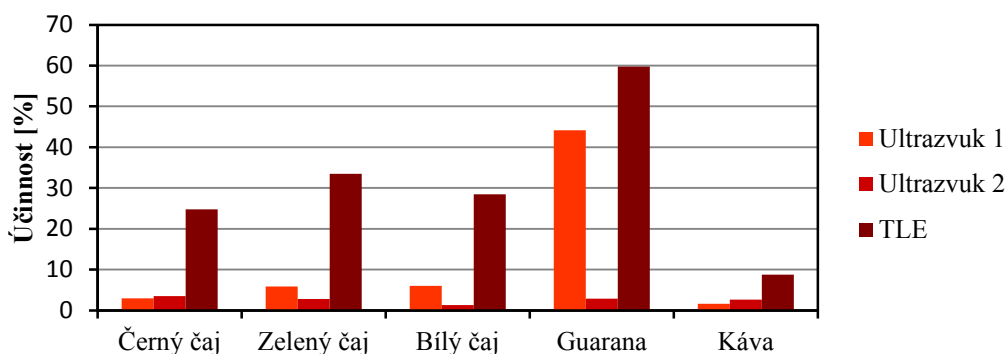
Tabulka 16 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 2

Koncentrace polyfenolů [mg·ml ⁻¹]		Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
	Před enkapsulací	0,370	1,096	0,435	1,338	0,737
	Po enkapsulaci	0,357	1,065	0,429	1,230	0,718
Enkapsulační účinnost [%]		3,51	2,83	1,36	2,86	2,65

Tabulka 17 Liposomy připravené metodou TLE

Koncentrace polyfenolů [mg·ml ⁻¹]		Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
	Před enkapsulací	0,370	1,096	0,435	1,338	0,737
	Po enkapsulaci	0,279	0,729	0,312	0,539	0,903
Enkapsulační účinnost [%]		24,75	33,47	28,43	59,75	8,76

Enkapsulační účinnost celkových polyfenolů z přírodních zdrojů kofeinu není tak vysoká jako v případě enkapsulace kofeinu, u kterého byla nejúčinnější metodou ultrazvuková metoda. Při enkapsulaci polyfenolů byla nejúčinnější metodou metoda TLE, což je zřejmé z obrázku 15. Enkapsulační účinnost metody TLE dosahovala u extraktu z guarany až 59,75 %. Ultrazvukovou metodou se poměrně velké množství polyfenolů neenkapsulovalo. Nejvyšší enkapsulační účinnost pomocí metody Ultrazvuk 1 byla stanovena u extraktu z guarany, kdy dosahovala 44,19 %, a pomocí metody Ultrazvuk 2 u extraktu z černého čaje, kdy dosahovala pouhých 3,51 % (Tab. 15–17, Obr. 15).



Obrázek 15 Srovnání enkapsulační účinnosti polyfenolů z přírodních zdrojů kofeinu u jednotlivých metod

5.3.2 Enkapsulační účinnost polyfenolů ovocných a bylinných složek

Roztoky z ovocných a bylinných složek byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.3 a 4.4. Vzorek s polyfenoly po enkapsulaci danými metodami byl centrifugován 10 minut při 7 500 otáčkách za minutu, supernatant byl slit, zředěn v poměru 1:1 v 1 cm kyvetě a byla v něm stanovována pomocí spektrofotometrické metody koncentrace zbylých volných polyfenolů, stejně jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr ze dvou. Metody pro přípravu jednotlivých typů liposomů jsou uvedeny v kapitole 4.6.

Tabulka 18 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 1

Koncentrace polyfenolů [mg·ml ⁻¹]		Citron	Pomeranč	Kiwi	Levandule
Před enkapsulací		1,250	0,866	0,685	0,412
Po enkapsulaci		0,516	0,272	0,170	0,116
Enkapsulační účinnost [%]		58,73	68,54	75,18	71,90

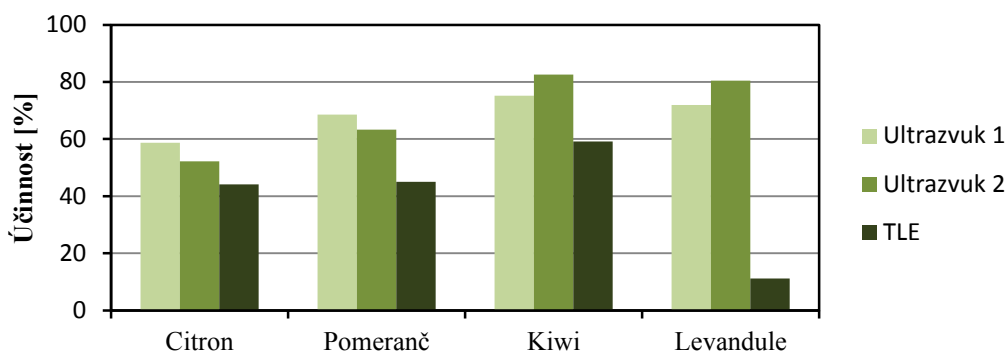
Tabulka 19 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 2

Koncentrace polyfenolů [mg·ml ⁻¹]		Citron	Pomeranč	Kiwi	Levandule
Před enkapsulací		1,250	0,866	0,685	0,412
Po enkapsulaci		0,598	0,318	0,119	0,008
Enkapsulační účinnost [%]		52,17	63,32	82,59	80,50

Tabulka 20 Liposomy připravené metodou TLE

Koncentrace polyfenolů [mg·ml ⁻¹]		Citron	Pomeranč	Kiwi	Levandule
Před enkapsulací		1,250	0,866	0,685	0,888
Po enkapsulaci		0,655	0,421	0,311	0,789
Enkapsulační účinnost [%]		44,13	45,00	59,17	11,24

Nejvyšší enkapsulační účinnost polyfenolů získaných ze tří druhů ovoce a jedné bylinky byla stanovena ve všech případech u metod ultrazvuku, a to především u metody Ultrazvuk 1, což je zřejmé z obrázku 16.



Obrázek 16 Srovnání enkapsulační účinnosti polyfenolů ovocných a bylinné složky u jednotlivých metod

Nejvyšší účinnost pomocí této metody byla stanovena u extraktu z kiwi a dosahovala až 75,18 %. Rovněž u extraktu kiwi byla stanovena nejvyšší účinnost metody Ultrazvuk 2, která dosahovala až 82,59 %. Enkapsulace pomocí metody TLE byla stanovena obecně ve všech případech nejnižší oproti metodám ultrazvuku. Nejvyšší účinnost pomocí této metody byla stanovena u extraktu z kiwi, kdy dosahovala až 59,17 % (Tab. 18–20, Obr. 16).

5.4 Stanovení enkapsulační účinnosti vitaminu C

5.4.1 Enkapsulační účinnost vitaminu C z ovocných složek

Roztoky z ovocných složek byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.4. Ovocné extrakty po enkapsulaci danými metodami byly centrifugovány 10 minut při 7 500 otáčkách za minutu, supernatant byl slit a použit na titrační stanovení vitaminu C, stejně jako ve vzorku před enkapsulací. Pomocí zjištěné spotřeby odměrného roztoku 2,6-dichlorindofenolinu bylo zjištěno množství kyseliny L-askorbové ve vzorcích. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr ze dvou měření. Metody pro přípravu jednotlivých typů liposomů jsou uvedeny v kapitole 4.6.

Tabulka 21 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 1

Množství kyseliny L-askorbové [mg]		Citron	Pomeranč	Kiwi
	Před enkapsulací	25,07	15,61	15,98
	Po enkapsulaci	20,89	7,52	12,68
Enkapsulační účinnost [%]		16,65	51,85	20,63

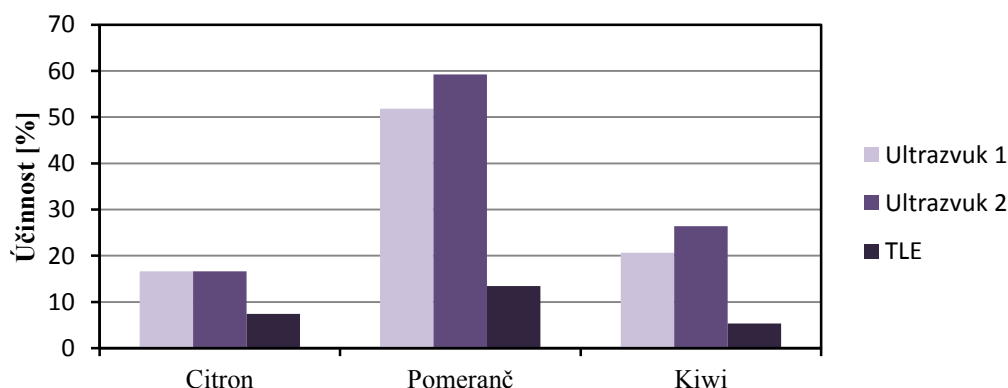
Tabulka 22 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 2

Množství kyseliny L-askorbové [mg]		Citron	Pomeranč	Kiwi
	Před enkapsulací	25,07	15,61	15,98
	Po enkapsulaci	20,89	6,36	11,76
Enkapsulační účinnost [%]		16,65	59,23	26,41

Tabulka 23 Liposomy připravené metodou TLE

Množství kyseliny L-askorbové [mg]		Citron	Pomeranč	Kiwi
	Před enkapsulací	25,07	15,61	15,98
	Po enkapsulaci	23,20	13,51	15,13
Enkapsulační účinnost [%]		7,45	13,44	5,34

V případě enkapsulace kyseliny L-askorbové byla nejvyšší účinnost stanovena u metod Ultrazvuk 2, ale ani v tomto případě se od nich stanovené účinnosti metod Ultrazvuk 1 tolik neliší, což je zřejmé z obrázku 17.



Obrázek 17 Srovnání enkapsulační účinnosti kyseliny L-askorbové ovocných složek u jednotlivých metod

Celkově byla nejvyšší účinnost stanovena u extraktů z pomeranče, kdy bylo pomocí metody Ultrazvuk 2 enkapsulováno až 59,23 % kyseliny L-askorbové a pomocí Ultrazvuk 1 až 51,85 %. Enkapsulace pomocí metody TLE byla stanovena obecně ve všech případech nejnižší oproti metodám ultrazvuku. Nejvyšší účinnost pomocí této metody byla stanovena u extraktu z pomeranče, kdy dosahovala 13,44 % (Tab. 21–23, Obr. 17).

5.5 Stanovení velikosti částic

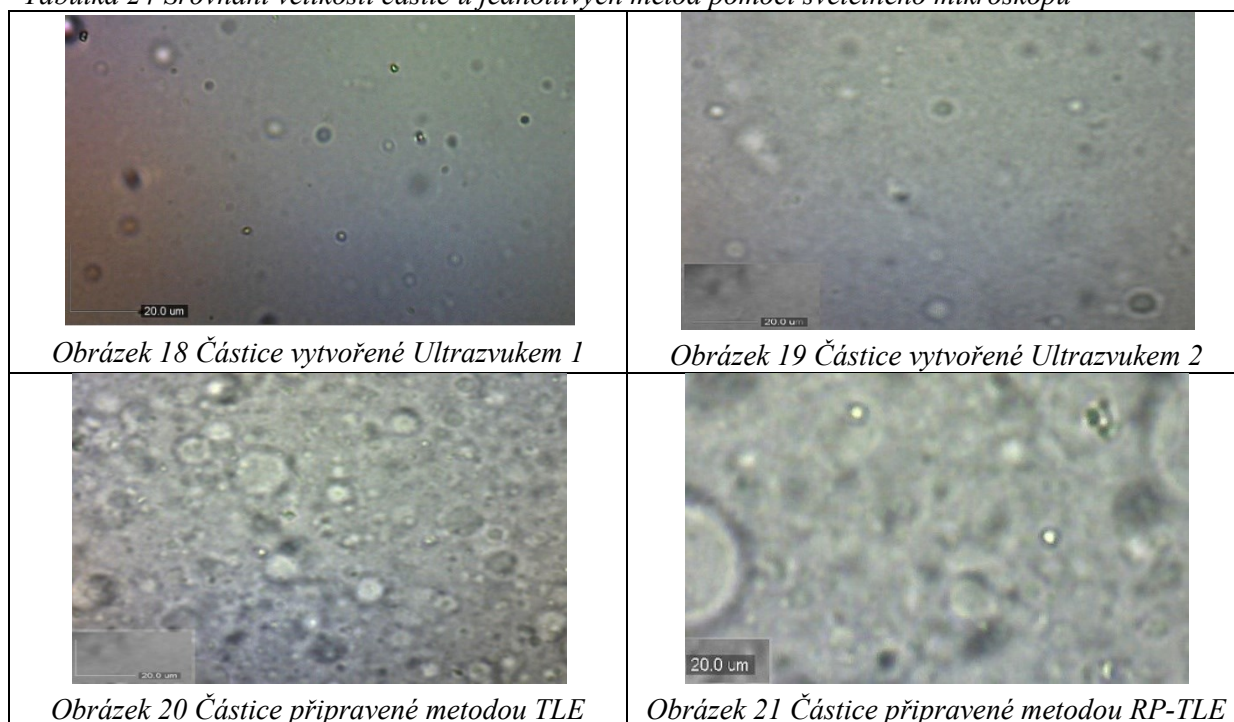
5.5.1 Vizualizace částic pod světelným mikroskopem

Velikosti a tvar všech připravených částic byla pozorována pod světelným mikroskopem s kamerou. Velikost zvětšení byla ve všech případech 2 000krát. Především, byl sledován vliv velikosti částic v závislosti na druhu použité metody a enkapsulované složky.

U všech enkapsulovaných přírodních extraktů byl zaznamenán stejný trend, kdy nejmenší částice byly detekovány v případě částic připravených metodami za použití ultrazvuku a naopak největší částice byly pozorovány po přípravě metodami RP-TLE a TLE.

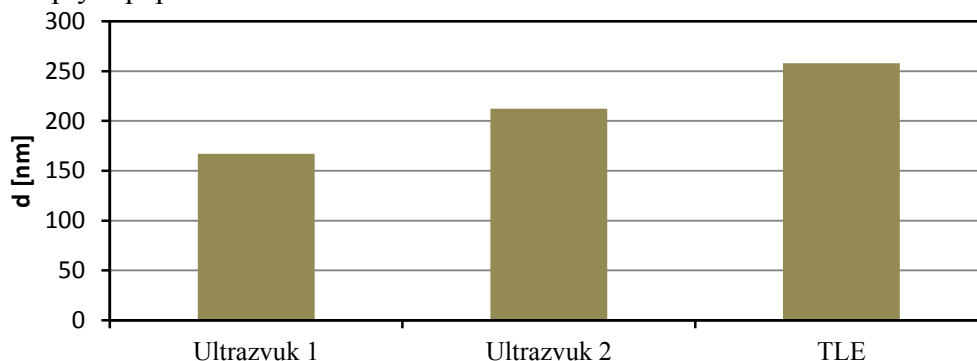
Pro představu jsou v následující tabulce 24 uvedeny jako příklad obrázky liposomů s enkapsulovaným kofeinem pro jednotlivé metody.

Tabulka 24 Srovnání velikosti částic u jednotlivých metod pomocí světelného mikroskopu



5.5.2 Stanovení velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla

Velikost liposomových částic byla stanovena za pomoci přístroje Zetasizer Nano ZS. Metoda stanovení velikosti částic je zde založena na měření rozptylu světla, tzv. DLS (dynamický rozptyl světla, „Dynamic Light Scattering“). Procházející paprsek je rozptylován pohybem částic, přičemž platí závislost, kdy s menším průměrem částic roste rychlost pohybu, a tím i rychlost rozptylu paprsku.

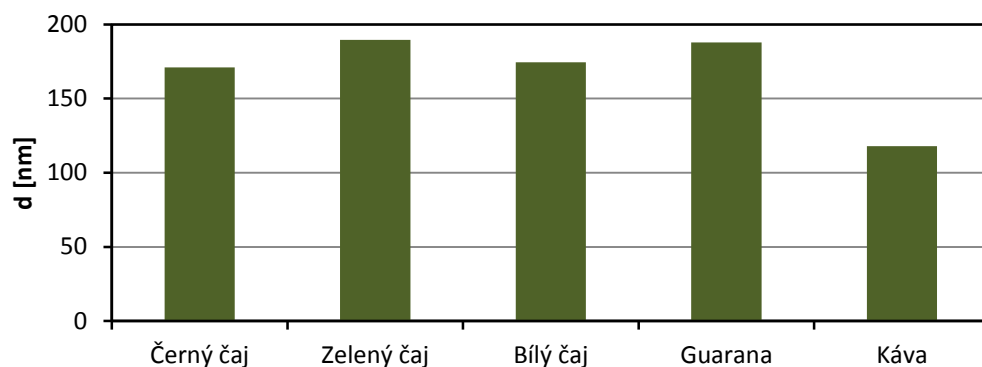


Obrázek 22 Srovnání velikosti částic u jednotlivých metod stanovenou pomocí metody DLS

Největší velikost částic vykazovaly částice připravené metodou TLE, což je patrné z obrázku 22. Tyto částice dosahovaly průměrné velikosti až 260 nm.

Současně tyto částice lehce agregovaly a byly méně stabilní než částice připravené ultrazvukovou metodou, jejich velikost se pohybovala v rozmezí 170 – 212 nm.

Dále byla stanovena velikost částic připravených metodou ultrazvuku, do kterých byl enkapsulován kofein z jednotlivých extraktů, viz obrázek 23. Velikost takto připravených částic se pohybovala v rozmezí 170 – 190 nm, jen u extraktu z kávy byla velikost o poznání nižší a pohybovala se kolem 118 nm.



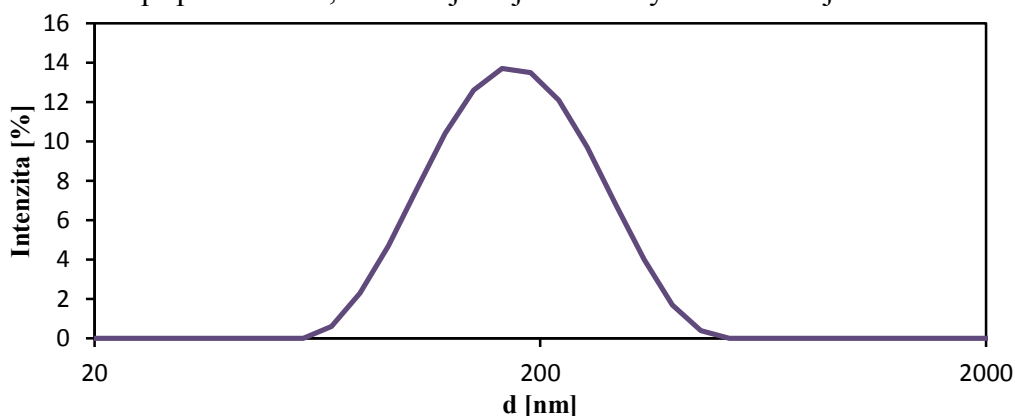
Obrázek 23 Srovnání velikostí částic jednotlivých extraktů vytvořených metodou ultrazvuk 1 a stanovených metodou DLS

5.5.2.1 Srovnání velikosti liposomů připravených různými metodami

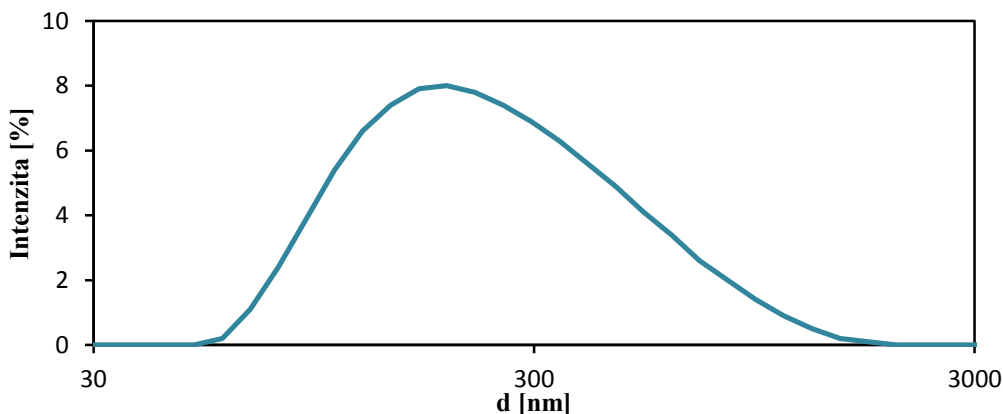
Velikost částic připravených pomocí ultrazvukové metody se pohybovala v rozmezí 68,06 – 458,7 nm (Obr. 24).

Velikost částic připravených pomocí ultrazvukové metody s přidavkem chloroformu se pohybovala v rozmezí 58,77 – 1 718 nm (Obr. 25).

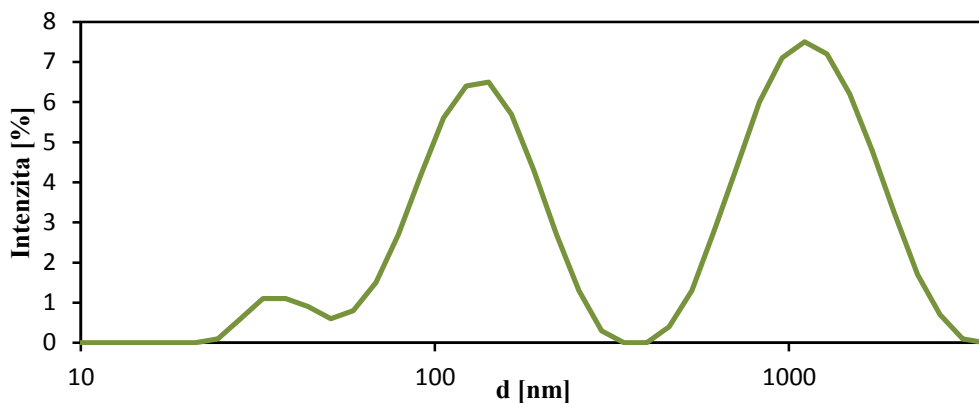
Velikost částic připravených pomocí metody TLE se pohybovala v rozmezí 28,21 – 3 580 nm (Obr. 26). Částice vytvořené pomocí této metody vykazovaly největší velikost ze všech tří použitých metod k přípravě částic, ale také jako jediné měly velikost nesjednocenou.



Obrázek 24 Závislost intenzity rozptylu světla na velikosti a distribuci částic připravených ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 1



Obrázek 25 Závislost intenzity rozptylu světla na velikosti a distribuci částic připravených ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 2

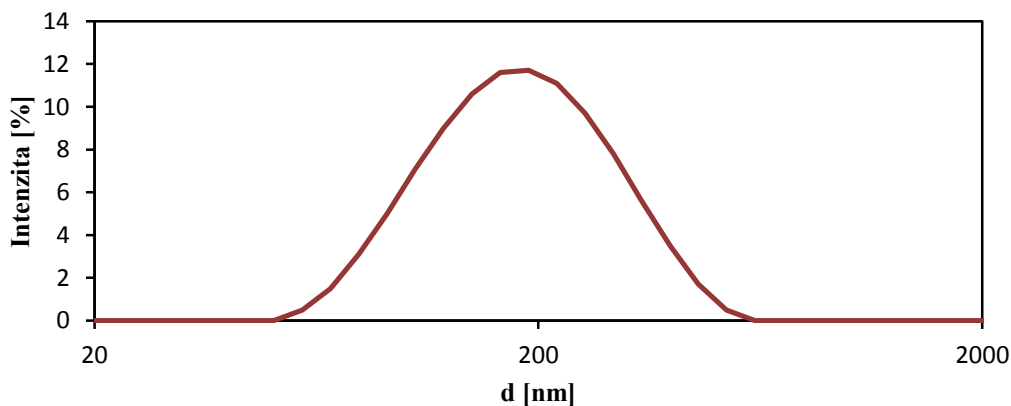


Obrázek 26 Závislost intenzity rozptylu světla na velikosti a distribuci částic připravených metodou TLE

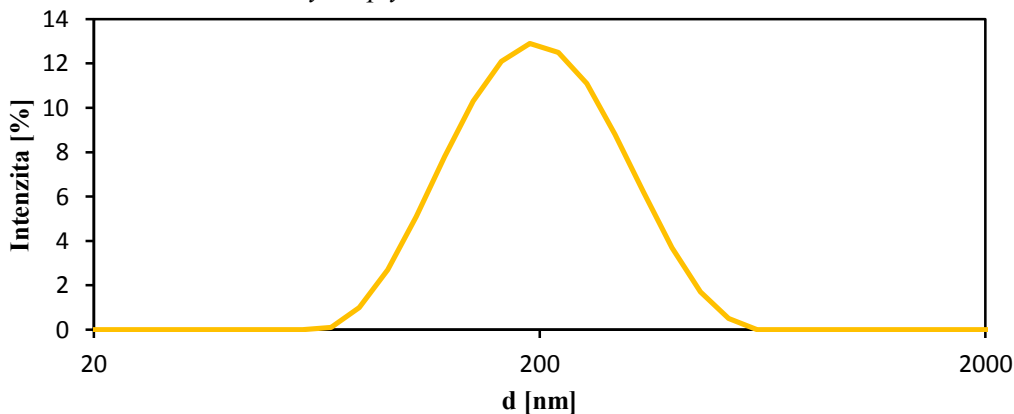
5.5.2.2 Liposomy s enkapsulovaným přírodním extraktem připravené pomocí ultrazvukové metody – Ultrazvuk 1

Částice připravené pomocí ultrazvukové metody měly sjednocenou velikost, která se ve všech případech podobala.

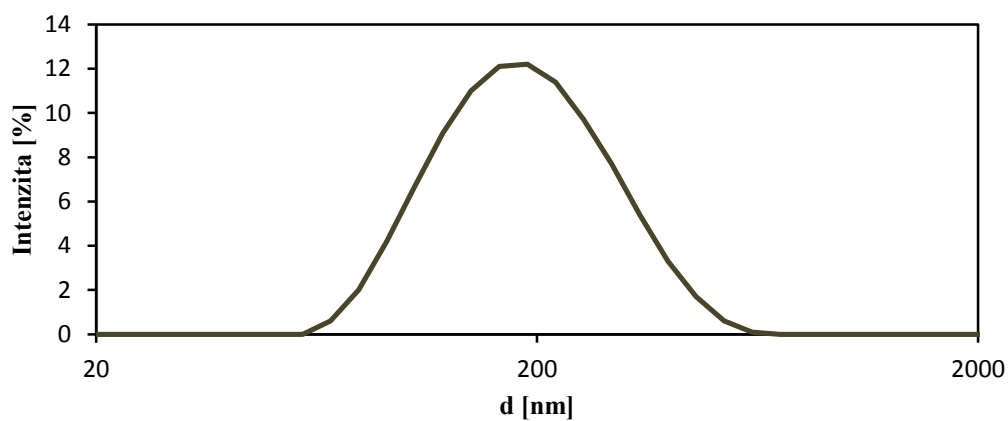
Nejmenší velikost vykazovaly částice s enkapsulovaným extraktem z kávy, jejichž velikost se pohybovala od 50,75 do 190,1 nm. Naopak největší velikost měly částice s enkapsulovaným extraktem z levandule, jejichž velikost se pohybovala od 37,84 do 825 nm (Obr. 27– 32).



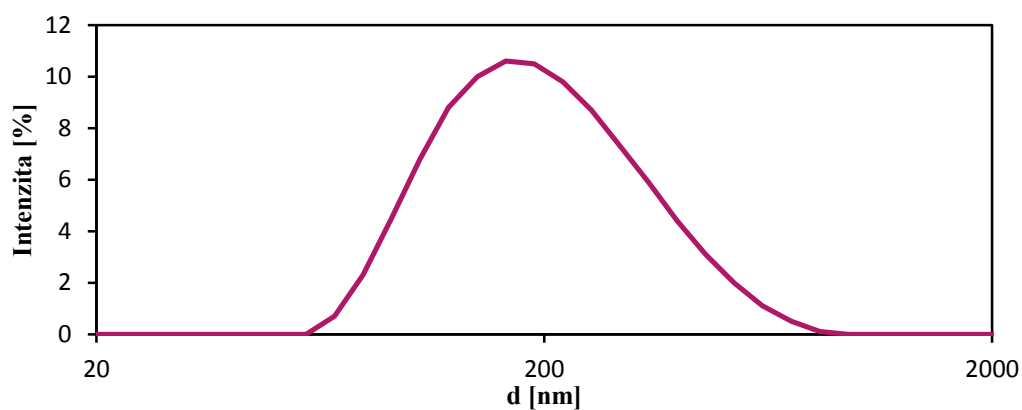
Obrázek 27 Závislost intenzity rozptylu světla na velikosti a distribuci částic u černého čaje



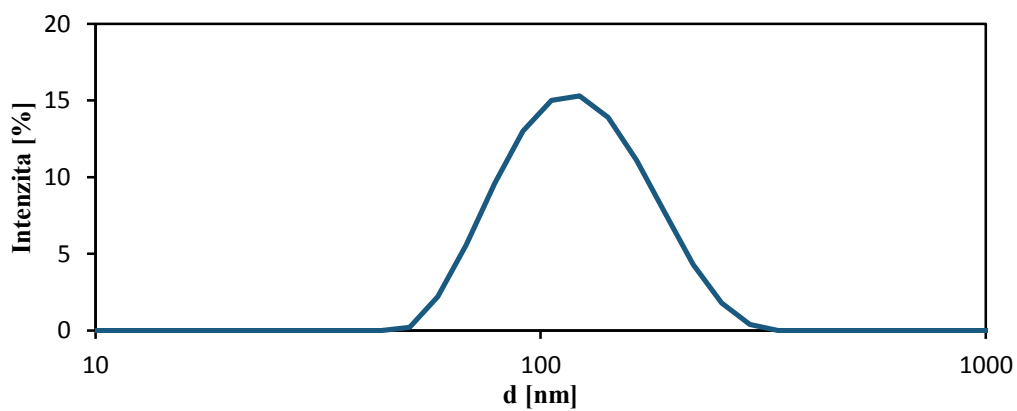
Obrázek 28 Závislost intenzity rozptylu světla na velikosti a distribuci částic zeleného čaje



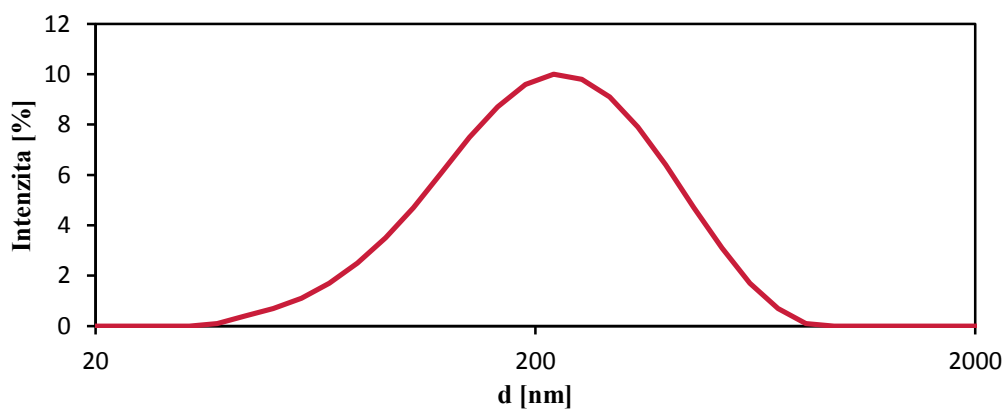
Obrázek 29 Závislost intenzity rozptylu světla na velikosti a distribuci částic bílého čaje



Obrázek 30 Závislost intenzity rozptylu světla na velikosti a distribuci částic guarany



Obrázek 31 Závislost intenzity rozptylu světla na velikosti a distribuci částic kávy



Obrázek 32 Závislost intenzity rozptylu světla na velikosti a distribuci částic u levandule

5.5.3 Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu

Stabilita liposomových částic byla měřena pomocí přístroje Zetasizer Nano od firmy Malvern Instruments Ltd.

Tabulka 25 Naměřené hodnoty zeta potenciálu u jednotlivých metod

Metoda	Ultrazvuk 1	Ultrazvuk 2	TLE	RP-TLE
ZP [mV]	– 33,40	– 43,77	– 47,47	– 39,97

Tabulka 26 Naměřené hodnoty zeta potenciálu

Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
ZP [mV]	– 49,00	– 51,77	– 47,47	– 37,00	– 40,20

Naměřené hodnoty zeta potenciálu vytvořených částic se ve všech případech nacházely mimo interval nestability, který se nachází mezi – 30 mV až 30 mV. Je možné tedy o všech o částicích tvrdit, že jsou stabilní (Tab. 25, 26). U částic připravených bez kofeinu byl největší zeta potenciál 47,47 mV stanoven u metody TLE, naopak nejmenší zeta potenciál 33,40 mV byl stanoven u metody Ultrazvuk 1. U částic připravených s kofeinem z nápojových extraktů pomocí ultrazvukové metody byl naměřen větší zeta potenciál než u částic bez kofeinu připravených stejnou metodou. Největší zeta potenciál – 51,77 mV byl stanoven u enkapsulovaného extraktu ze zeleného čaje a naopak nejmenší – 37,00 mV u extraktu z guarany.

5.6 Stanovení dlouhodobé stability připravených částic v modelových podmínkách

Částice s enkapsulovaným standardním kofeinem, extrakty z přírodních zdrojů a kombinace extraktů z přírodních zdrojů a ovocných složek byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.6. Velikost částic byla poté upravena pomocí membránového extrudéru na průměrnou hodnotu 100 nm. Dále byl použit postup uvedený v kapitole 4.12. Po uplynutí daného časového intervalu bylo vždy proměřeno množství uvolnění kofeinu, polyfenolů a množství kyseliny L-askorbové a získané výsledky byly porovnány.

5.6.1 Stabilita připravených částic s enkapsulovaným kofeinem

5.6.1.1 Liposomy se standardem kofeinu

Změna koncentrace kofeinu připravených částic nebyla po 1 týdnu detekována, proto byly částice uchovávány delší dobu, a to 3 týdny. Výsledky procentuálního uvolnění kofeinu jsou uvedeny v tabulce 27, ze které vyplývá, že k menšímu uvolňování množství kofeinu dochází při snížené teplotě.

Tabulka 27 Srovnání stability liposomů udržovaných při různé teplotě

Metody příprav liposomů		Ultrazvuk 1	Ultrazvuk 2	TLE	RP-TLE
3 týdny [%]	Laboratorní teplota	12,11	17,50	0,00	0,00
	Snížená teplota	0,00	31,06	0,00	0,00

Při laboratorní teplotě nebyla po 3 týdnech detekována změna koncentrace kofeinu u metod TLE a RP-TLE. Nejvíce kofeinu se uvolnilo u částic připravených pomocí metody Ultrazvuk 2, a to 17,50 %. Při snížené teplotě nebyla detekována změna koncentrace kofeinu u metod Ultrazvuk 1, TLE a RP-TLE. Kofein se tedy uvolnil pouze u částic připravených pomocí metody Ultrazvuk 2, a to 31,06 % (Tab. 27).

5.6.2 Liposomy s extrakty z přírodních zdrojů obsahujících kofein

Změna koncentrace kofeinu částic s extrakty z přírodních zdrojů, které byly připraveny pomocí metody Ultrazvuk 1, byla po 1 týdnu proměřena. Změna nebyla detekována nebo byla nepatrná, proto lze usuzovat, že částice byly stabilní a nerozpadaly se.

Tabulka 28 Srovnání stability liposomů připravených ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 1

Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
3 týdny [%]	0,00	30,95	0,00	18,77	0,00

Koncentrace kofeinu byla proměřena po 3 týdnech, kdy se v některých případech část kofeinu již uvolnila. Změna koncentrace kofeinu nebyla detekována u částic s enkapsulovaným extraktem černého čaje a kávy. Naopak nejvíce kofeinu se uvolnilo z částic s extraktem zeleného čaje, a to až 30,95 % (Tab. 28).

5.6.2.1 Liposomy s ko-enkapsulovanými extrakty z přírodních zdrojů kofeinu a ovocné složky

Také u částic připravených ko-enkapsulací extraktů z přírodních zdrojů kofeinu a ovocné složky nebyla po 1 týdnu detekována změna koncentrace kofeinu nebo byla minimální. Částice se nerozpadaly a byly stabilní.

Tabulka 29 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 1

Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
Ovocná složka	Citron	Citron	Kiwi	Pomeranč	Pomeranč
3 týdny [%]	32,76	27,39	7,75	44,96	25,25

Tabulka 30 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 2

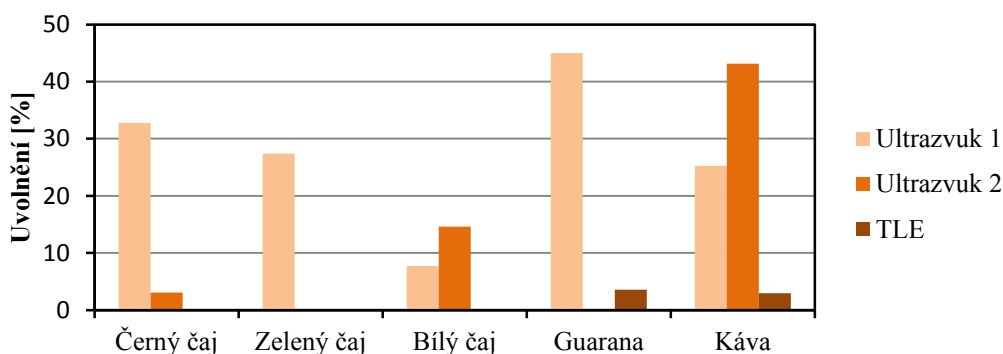
Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
Ovocná složka	Citron	Citron	Kiwi	Pomeranč	Pomeranč
3 týdny [%]	3,08	0,00	14,62	0,00	43,14

Tabulka 31 Liposomy připravené metodou TLE

Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
Ovocná složka	Citron	Citron	Kiwi	Pomeranč	Pomeranč
3 týdny [%]	0,00	0,00	0,00	3,56	2,97

Koncentrace kofeinu byla tedy proměřena po 3 týdnech, kdy se část kofeinu již uvolnila. Z diagramu, viz obrázek 33, je patrné, že se nejméně kofeinu uvolnilo z částic připravených pomocí metody TLE. Změna koncentrace kofeinu nebyla detekována u částic s extrakty

z černého, zeleného a bílého čaje. Nejvíce kofeinu se pak uvolnilo z částic s extraktem z guarany, a to až 3,56 %. Touto metodou však bylo zároveň enkapsulováno nejmenší množství kofeinu, proto mohlo docházet k tak malému uvolňování kofeinu do roztoku. Naopak k největšímu uvolnění kofeinu docházelo u částic připravených pomocí metody Ultrazvuk 1. Změna koncentrace kofeinu byla nejnižší u extraktu z bílého čaje, kdy dosahovala 7,75 % a nejvyšší u extraktu z guarany, kdy dosahovala 44,96 % (Tab. 29–31).



Obrázek 33 Srovnání změny koncentrace kofeinu ko-enkapsulovaných extraktů skladovaných po dobu 3 týdnů

5.6.3 Stabilita připravených částic s enkapsulovanými polyfenoly

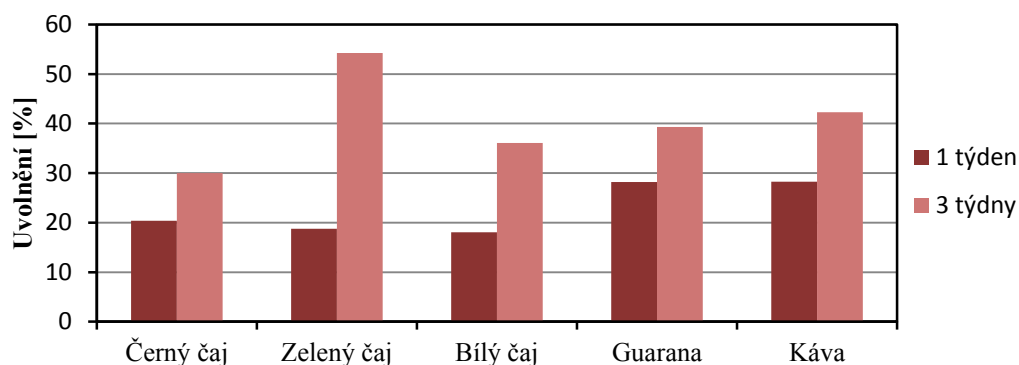
5.6.3.1 Enkapsulace extraktů z přírodních zdrojů kofeinu pomocí ultrazvukové metody – Ultrazvuk 1

Tabulka 32 Srovnání stability liposomů připravených ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 1

Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
1 týden [%]	20,38	18,74	18,07	28,17	28,24
3 týdny [%]	30,00	54,25	36,09	39,30	42,27

Koncentrace polyfenolů extraktů z přírodních zdrojů kofeinu, enkapsulovaných pomocí metody Ultrazvuk 1, se po 1 týdnu navýšila (Obr. 34). Nejmenší množství polyfenolů se uvolnilo z částic s enkapsulovaným extraktem z bílého čaje, a to 18,07 %. Naopak nejvíce se uvolnilo z částic s enkapsulovaným extraktem z kávy, a to až 28,24 % (Tab. 32).

Po 3 týdnech byla koncentrace polyfenolů znova proměřena a z diagramu (Obr. 34), je zřejmé, že došlo opět k nárůstu uvolněných polyfenolů. Nejmenší množství polyfenolů se uvolnilo z částic s enkapsulovaným extraktem z černého čaje, a to 30,00 %. Naopak nejvíce se uvolnilo z částic s enkapsulovaným extraktem ze zeleného čaje, a to až 54,25 % (Tab. 32).



Obrázek 34 Srovnání změny koncentrace celkových polyfenolů enkapsulovaných extraktů kofeinu

5.6.3.2 Ko-enkapsulace extraktů z přírodních zdrojů kofeinu a ovocné složky

Tabulka 33 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 1

Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
Ovocná složka	Citron	Citron	Kiwi	Pomeranč	Pomeranč
1 týden [%]	22,02	8,69	1,88	6,87	5,71
3 týdny [%]	26,45	19,90	20,02	9,66	24,84

Tabulka 34 Liposomy připravené ultrazvukovou metodou – Ultrazvuk 2

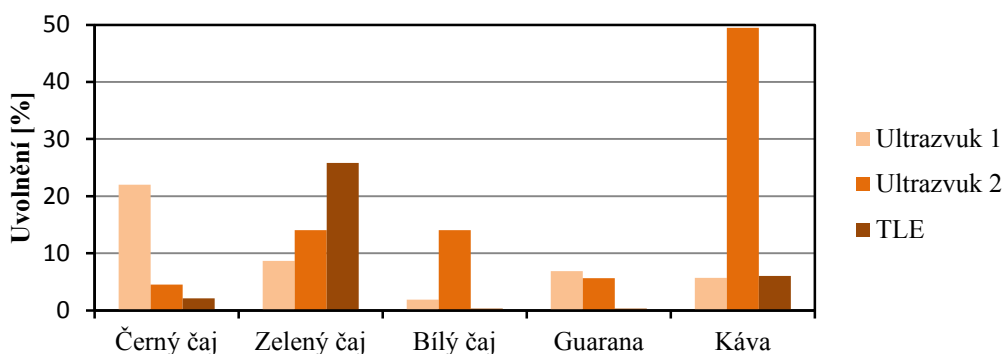
Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
Ovocná složka	Citron	Citron	Kiwi	Pomeranč	Pomeranč
1 týden [%]	4,52	14,07	14,04	5,66	49,48
3 týdny [%]	11,64	15,12	16,93	13,37	56,37

Tabulka 35 Liposomy připravené metodou TLE

Extrakt kofeinu	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
Ovocná složka	Citron	Citron	Kiwi	Pomeranč	Pomeranč
1 týden [%]	2,13	25,83	0,31	0,35	6,02
3 týdny [%]	15,21	31,13	18,78	6,85	21,37

Koncentrace polyfenolů ko-enkapsulovaných extraktů se po 1 týdnu navýšila u všech tří metod (Obr. 35).

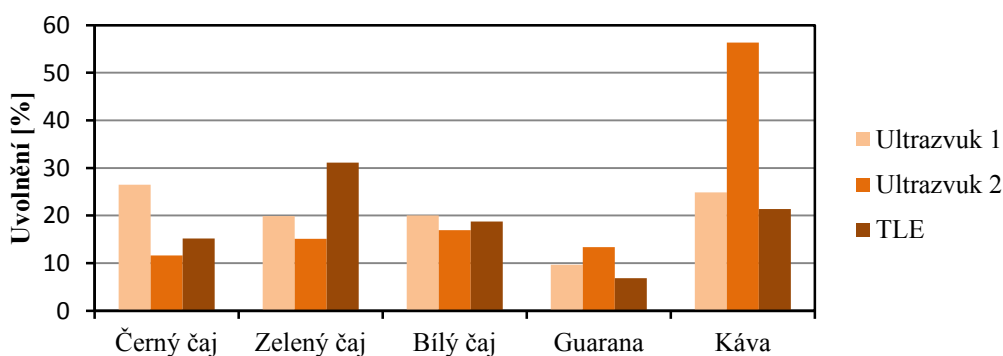
Nejvíce polyfenolů se uvolnilo z částic připravených metodou Ultrazvuk 1 s enkapsulovaným extraktem z kávy, a to až 49,48 %. Naopak nejméně celkových polyfenolů se uvolnilo z částic připravených metodou TLE s enkapsulovaným extraktem z bílého čaje, a to pouhých 0,31 %, a guarany, a to 0,35 % (Tab. 33–35).



Obrázek 35 Srovnání změny koncentrace celkových polyfenolů ko-enkapsulovaných extraktů u jednotlivých metod za 1 týden

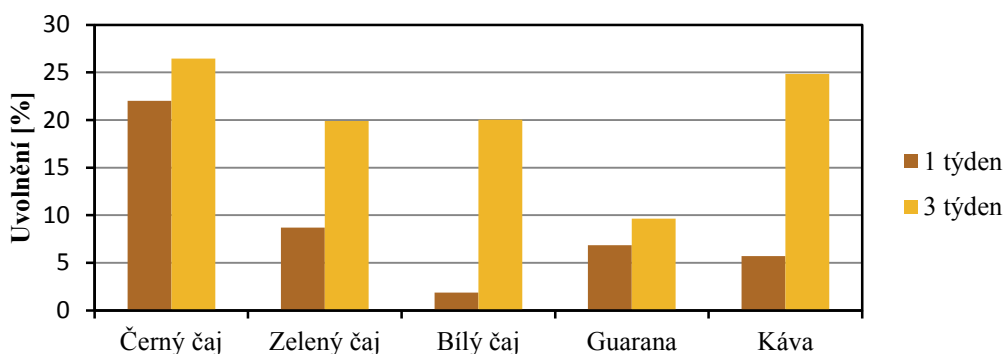
Koncentrace polyfenolů ko-enkapsulovaných extraktů byla proměřena znova po 3 týdnech, kdy se uvolnilo ještě větší množství, než tomu bylo po 1 týdnu (Obr. 36).

Největší množství uvolněných polyfenolů bylo opět stanoveno u částic připravených metodou Ultrazvuk 2 s enkapsulovaným extraktem z kávy, a to až 56,37 %. Naopak nejméně se po 3 týdnech uvolnilo obecně z částic s enkapsulovaným extraktem z guarany, kdy se například pomocí metody TLE uvolnilo pouhých 6,85 % (Tab. 33–35).



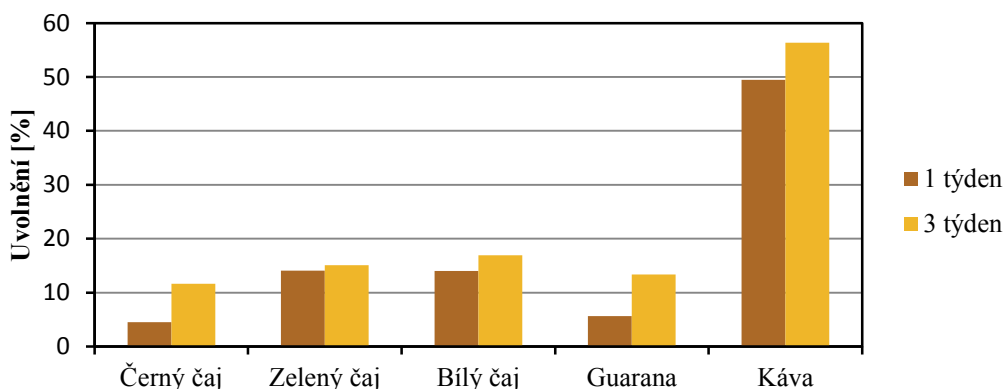
Obrázek 36 Srovnání změny koncentrace celkových polyfenolů ko-enkapsulovaných extraktů u jednotlivých metod za 3 týden

Z diagramu (Obr. 37), je zřejmé, že docházelo k postupnému uvolňování polyfenolů z částic připravených metodou Ultrazvuk 1. Po 1 týdnu se nejméně celkových polyfenolů uvolnilo z částic s enkapsulovaným extraktem z bílého čaje, a to 1,88 %, a nejvíce z částic s enkapsulovaným extraktem z černého čaje, a to 22,02 %. Po 3 týdnech bylo stanoveno nejmenší množství uvolněných celkových polyfenolů u částic s enkapsulovaným extraktem z guarany, a to 9,66 %, a nejvíce u částic s enkapsulovaným extraktem z černého čaje, a to 26,45 % (Tab. 33).



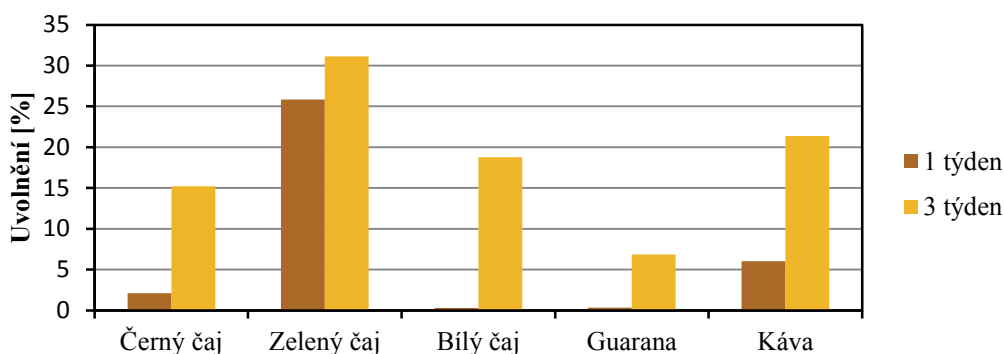
Obrázek 37 Srovnání změny koncentrace celkových polyfenolů ko-enkapsulovaných extraktů pomocí metody Ultrazvuk 1v daném časovém intervalu

Z diagramu (Obr. 38), je zřejmé, že docházelo k postupnému uvolňování polyfenolů z částic připravených metodou Ultrazvuk 2, avšak nedocházelo k tak výrazným změnám jako u metody Ultrazvuk 1. Po 1 týdnu se nejméně polyfenolů uvolnilo z částic s enkapsulovaným extraktem z černého čaje, a to 4,52 %, a nejvíce z částic s enkapsulovaným extraktem z kávy, a to 49,48 %. Po 3 týdnech bylo stanoveno nejmenší množství uvolněných polyfenolů u částic s enkapsulovaným extraktem z černého čaje, a to 11,64 %, a nejvíce u částic s enkapsulovaným extraktem z kávy, a to až 56,37 % (Tab. 34).



Obrázek 38 Srovnání změny koncentrace celkových polyfenolůko-enkapsulovaných extraktů pomocí metody Ultrazvuk 2 v daném časovém intervalu

Z diagramu (Obr. 39), je zřejmé, že docházelo k postupnému uvolňování polyfenolů z částic připravených metodou TLE. Po 1 týdnu se nejméně polyfenolů uvolnilo z částic s enkapsulovaným extraktem z bílého čaje, a to pouhých 0,31 %, a nejvíce z částic s enkapsulovaným extraktem ze zeleného čaje, a to 25,83 %. Po 3 týdnech bylo stanoveno nejmenší množství uvolněných polyfenolů u částic s enkapsulovaným extraktem z guarany, a to 6,85 %, a nejvíce u částic s enkapsulovaným extraktem ze zeleného čaje, a to 31,13 % (Tab. 35).



Obrázek 39 Srovnání změny koncentrace celkových polyfenolů ko-enkapsulovaných extraktů pomocí metody TLE v daném časovém intervalu

5.6.4 Stabilita připravených částic s enkapsulovaným vitaminem C

5.6.4.1 Ko-enkapsulace extraktů z přírodních zdrojů s ovocnou složkou

Stabilita částic s enkapsulovaným vitaminem C nelze přesně posoudit, jelikož již po 1 týdnu u všech tří jednotlivých metod docházelo k takřka 100% degradaci volného vitaminu C. Nelze jednoznačně říci, zda došlo k uvolňování a zároveň k současné degradaci vitaminu C.

5.7 Návrh vhodných liposomů s enkapsulovým obsahem přírodních extraktu a jejich kombinací pro využití v kosmetice

Jako nejvhodnější liposomy pro kosmetickou aplikaci byly zvoleny liposomy připravené pomocí metod s využitím ultrazvuku, a to především pomocí metody Ultrazvuk 1. Tyto částice vykazovaly dobrou stabilitu a u všech enkapsulovaných extraktů bylo dosaženo vysoké enkapsulační účinnosti kofeinu. Také dlouhodobá stabilita připravených částic vyhovovala aplikačním požadavkům, například u liposomů s extrakty z kávy, černého a bílého čaje nedošlo po 3 týdnech k uvolnění žádného kofeinu. Testované extrakty zeleného, bílého, černého čaje, guarany i kávy jsou tedy vhodné k použití do omlazující kosmetiky. Během skladování nedocházelo k výraznému uvolňování kofeinu, přičemž lepší stability bylo vždy dosaženo při uchovávání částic při nižší teplotě.

Pro zlepšení účinků kosmetického výrobku byly extrakty obohaceny o ovocnou složku a tyto směsi byly ko-enkapsulovány. Takto připravené částice vykazovaly opět vysokou enkapsulační účinnost kofeinu, polyfenolů i vitaminu C a bylo dosaženo i vyšší dlouhodobé stability v porovnání s liposomy se samotnými extrakty z přírodních zdrojů kofeinu.

Ko-enkapsulované liposomy jsou nejvhodnější aplikační formou z testovaných možností. Nejvhodnější aplikační forma by byla pleťová kosmetika, zejména pleťová voda či gel. Vhodné množství přidávaných liposomů do pleťové vody bylo 10 %. Takto připravená kosmetika by obsahovala dostatečné množství aktivních látek jako kofein, polyfenoly a antioxidanty aj. Současné nebyla pozorována vizuální změna finálního výrobku. V případě gelu lze použít vyšší koncentraci liposomů, a to až do 25 %, kdy dochází k mírné vizuální změně, a to z hustě bílé barvy do zakalené mléčné. V případě gelu lze tedy docílit vyšší koncentrace aktivní složky. V našem případě byl gel zahuštěn carbomerem, což je jedna z nejpoužívanějších gelotvorných látek v kosmetickém průmyslu (Tab. 36). Další možností přípravy gelu bylo zahuštění pomocí CMC.

Tabulka 36 Srovnání připravených gelů zahuštěných pomocí carbomeru

		
<i>Obrázek 40 Čistý gel</i>	<i>Obrázek 41 Gel s přídavkem liposomů</i>	<i>Obrázek 42 Gel s přídavkem enkapsulovaného extraktu z kávy a pomeranče</i>

Porovnáním obou produktů, pleťové vody a gelu, se jako účinnější aplikační forma jeví gel, ve kterém mají částice větší dlouhodobou stabilitu. Dále lze připravit výrobek s vyšší koncentrací liposomů se zabaleným kofeinem a dalšími aktivními látkami. Také při aplikaci na pokožku díky delší době působení může být dosaženo vyššího účinku. Takto připravený gel by byl vhodný nejen jako čistící kosmetika, ale také v aplikaci jako pleťová maska pro maximální účinek. Pokud by se připravený výrobek používal jako noční kosmetika, přidaly by se do něj i částice s extraktem z levandule. Částice by postupně uvolňovaly levandulovou vůni, která by pozitivně působila na smysly spotřebitele.

U liposomů byla dále sledována difúze z vodného do nepolárního prostředí, kde byl v souladu s literaturou prokázán prostup liposomů do pokožky a jejich následný rozpad. Aktivní látky, a to především kofein, jsou tak pomocí liposomů přenášeny na místa působení ve vrstvě pokožky obsahující tuk [49].

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na přípravu a využití vybraných typů nanočástic v kosmetice. V teoretické části byl charakterizován kofein, polyfenoly, vitamin C, také plet', dále možnosti enkapsulace a vlastnosti liposomů. V experimentální části byla vyhodnocena enkapsulační účinnost kofeinu, polyfenolů a vitaminu C z připravených extraktů, a také stabilita částic připravených pomocí tří metod.

Jako nejvhodnější pro enkapsulaci standardního roztoku kofeinu byly vyhodnoceny metody za pomoci ultrazvuku. Nejvyšší účinnost byla stanovena u metody Ultrazvuk 2, díky které se podařilo enkapsulovat až 64,15 % kofeinu a připravené částice vykazovaly dobrou stabilitu. Při enkapsulaci kofeinu z přírodních zdrojů, a to z černého, zeleného a bílého čaje, dále z guarany a kávy byla nejvyšší enkapsulační účinnost stanovena opět u metod s využitím ultrazvuku, a to u enkapsulovaného extraktu z černého čaje s účinností 71,15 %. Účinnost enkapsulace u ko-ekapsulovaných extraktů z přírodních zdrojů a ovocné složky se nelišila od enkapsulace samotných přírodních extraktů. Ovocné složky, extrakt z citronu, pomeranče a kiwi, tedy negativně neovlivňovaly enkapsulaci kofeinu z přírodních zdrojů, v některých případech naopak došlo k vyššímu zabalení kofeinu. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla stanovena u částic připravených metodou Ultrazvuk 1 s extraktem z černého čaje, kdy bylo zabaleno až 71,79 % kofeinu.

Dále byla stanovena enkapsulační účinnost polyfenolů z přírodních zdrojů kofeinu, ovocných složek a bylinné složky, levandule. Enkapsulace polyfenolů z přírodních zdrojů nebyla tak úspěšná jako v případě kofeinu. Pomocí ultrazvukových metod byla enkapsulační účinnost velmi malá a nejvíce se tedy uplatnila enkapsulace pomocí metody TLE, kdy nejvyšší účinnost enkapsulace byla stanovena u extraktu z guarany a dosahovala 59,75 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost polyfenolů u ovocných složek byla stanovena u kiwi, a to pomocí metody Ultrazvuk 2, kdy bylo zabaleno až 82,59 % polyfenolů. Účinnost ultrazvukových metod byly jinak v tomto případě opět srovnatelné.

Pro kosmetické účely je také důležitý vitamin C, proto byla stanovena i enkapsulační účinnost vitaminu C získaného z ovocných složek. Nejvyšší enkapsulační účinnost vykazovaly částice připravené pomocí ultrazvukových metod, především metodou Ultrazvuk 2. Největší množství vitaminu C se zabalilo z extraktu z pomeranče, a to až 59,23 %.

Stabilita připravených částic byla stanovena pomocí zeta potenciálu. Všechny částice vykazovaly výbornou stabilitu, jelikož se jejich zeta potenciál nacházel mimo oblast nestability. Navíc u částic s kofeinem z extraktů byl naměřen větší zeta potenciál než u částic bez kofeinu připravených stejnou metodou.

Dlouhodobá stabilita částic byla analyzována v modelových podmínkách, a to ve vodě simulující prostředí plet'ové vody a v gelu. Po uplynutí 1 týdne nebylo zaznamenáno žádné uvolnění kofeinu ve všech typech připravených částic. Po uplynutí 3 týdnů již došlo k částečnému rozpadu některých částic, a tím i k uvolnění kofeinu. Částice připravené metodou Ultrazvuk 1 byly stabilní a nárůst koncentrace kofeinu byl zaznamenán pouze u zeleného čaje a guarany, kdy došlo k uvolnění až 30,95 % kofeinu. Také částice s ko-ekapsulovanými extrakty z přírodních zdrojů kofeinu a ovocné složky byly stabilní. Po 3 týdnech se nejméně kofeinu uvolnilo z částic připravených metodou TLE, přičemž nejvíce se uvolnilo z částic s extraktem s guarany a pomeranče, a to pouhých 3,56 %.

Touto metodou se však mnoho kofeinu neenkapsulovalo, proto mohlo dojít k tak malému uvolnění kofeinu. Vhodnější metodou se tedy jevila metoda Ultrazvuk 2, kdy u částic s extraktem ze zeleného čaje a guarany nedošlo k žádnému uvolnění kofeinu a u ostatních částic s extrakty se kofeinu uvolnilo 3,08–43,14 %.

Polyfenoly se v liposomech neudržovaly tak dobře jako kofein. Již po 1 týdnu byl zaznamenán nárůst koncentrace uvolněných polyfenolů. S delším časovým úsekem uchovávání docházelo k výraznějšímu uvolňování těchto aktivních látek. Nejstabilnější byly částice s extraktem z černého čaje připravené metodou Ultrazvuk 1, kde došlo k uvolnění pouze 30 % polyfenolů po 3 týdnech. U ko-enkapsulovaných částic byla nejstabilnější částice s guaranou, kdy se nejméně polyfenolů uvolnilo z částic připravených metodou TLE a to pouhých 6,85 %. I v tomto případě se však touto metodou mnoho polyfenolů neenkapsulovalo.. Vhodnější metodou se tedy jeví metoda Ultrazvuk 2, kdy se z částic uvolnilo množství polyfenolů v rozmezí 11,64–56,37 %.

Stabilita částic s enkapsulovanými extrakty nelze posoudit podle množství uvolňovaného vitamínu C, jelikož docházelo k jeho takřka 100% degradaci. Mohlo i nemuselo tedy docházet k uvolňování a současně k degradaci vitamínu C.

Jako nejvhodnější částice pro kosmetické účely byly vybrány liposomy připravené ultrazvukovou metodou. Tyto částice měly dobrou stabilitu a u všech připravených částic byla také stanovena vysoká enkapsulační účinnost. Také dlouhodobá stabilita připravených částic vyhovovala aplikačním požadavkům, například u liposomů s extrakty z kávy, černého a bílého čaje nedošlo ani po 3 týdnech k uvolnění žádného kofeinu.

Testované extrakty zeleného, bílého, černého čaje, guarany i kávy jsou tedy vhodné k použití do omlazující kosmetiky. Navíc pro zlepšení kvality a stability liposomů byly extrakty obohaceny o ovocnou, popřípadě bylinnou složku a takto ko-enkapsulované liposomy byly stanoveny jako nejlepší varianta. Účinkem kofeinu lze docílit převážně vyhlazení pleti. Přidáním ovocné složky lze pak pleť rozjasnit a dodat potřebnou pružnost a svěžest. Takto účinný přípravek je vhodný pro denní aplikaci. Naopak pokud kofein kombinujeme s extraktem z levandule, nejen že se navýší odolnost pleti vůči poškození, ale také uvolňování levandulové vůně může pozitivně ovlivnit smysly spotřebitele. Jako nejvhodnější aplikační forma obsahující liposomy byla na základě výsledků této práce navržena pleťová voda nebo gel, používaný jako pleťová maska, který díky delší době působení na pokožce vykazuje i lepší účinek.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *ChemSpider: Search and share chemistry* [online]. 2014 [cit. 2014-11-16]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/>
- [2] Bezpečnostní list. In: *Carlo Erba Reagents* [online]. 2014-11-30 [cit. 2014-12-01]. Dostupné z: www.carloerbareagents.com
- [3] *Center of Science in the Public Interest: Caffeine Content Food & Drugs* [online]. 2014-11 [cit. 2014-12-01]. Dostupné z: <http://www.cspinet.org/>
- [4] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin II*. Vyd. 3. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [5] SAHOO, P. Molecular recognition of caffeine in solution and solid state. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2015, vol. 58, s. 26-47 [cit. 2015-01-04]. DOI: 10.1016/j.bioorg.2014.11.002. Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [6] CHU, Y. *Coffee: emerging health effects and disease prevention*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell/IFT Press, 2012, xxiv, 324 p. IFT Press series. ISBN 04-709-5878-2
- [7] VESELÁ, P. *Kniha o kávě: průvodce světem kávy s recepty na její přípravu*. Vyd. 1. Praha: Smart Press, 2010, 238 s. ISBN 978-80-87049-34-1
- [8] HUI, Y. a EVRANUZ, E. *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, c2012, xix, 801 p. ISBN 978-143-9849-040.
- [9] BELITZ, H., GROSCH, W. a SCHIEBERLE, P. *Food chemistry*. 4th rev. and extended ed. Berlin: Springer, c2009, xliv, 1070 p. ISBN 978-3-540-69933-0
- [10] THOMA, M. *77 čajů pro laiky i labužníky*. Praha: Slovart, 2014. ISBN 978-80-7391-871-2
- [11] Topvet: Česká rodinná výrobní firma. *Guarana: Paulinie nápojná* [online]. 2009 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: <https://www.topvet.cz/herbar/>
- [12] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin III*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [13] HERMAN, A., HERMAN, A.P. Caffeine's Mechanisms of Action and Its Cosmetic Use. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 2013, vol. 26, issue 1, s. 8-14 [cit. 2014-12-01]. DOI: 10.1159/000343174. Dostupné z: <http://www.karger.com/>
- [14] ÖTLEŞ, S. *Methods of analysis of food components and additives*. 2nd ed. Boca Raton: Taylor, 2012, xiv, 519 p. ISBN 978-143-9815-526
- [15] Energetika biochemických dějů. In: *Biochemie: Energetika biochemických dějů* [online]. 2015 [cit. 2015-03-22]. Dostupné z: <http://www.mojchemie.cz/>
- [16] WANG, Ch., WU, S. Simultaneous determination of l-ascorbic acid, ascorbic acid-2-phosphate magnesium salt, and ascorbic acid-6-palmitate in commercial cosmetics by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2006, vol. 576, issue 1, s. 124-129 [cit. 2015-04-18]. DOI: 10.1016/j.aca.2005.12.017. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/>
- [17] HAN, R., LIU, L., LI, J., DU, G., a CHEN, J.. Functions, applications and production of 2-O-d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2012, vol. 95, issue 2, s. 313-320 [cit. 2015-04-18]. DOI: 10.1007/s00253-012-4150-9. Dostupné z: <http://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/>

- [18] ZILLICH, O. V. a kol. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2013, vol. 35, issue 5, s. 491-501 [cit. 2015-04-19]. DOI: 10.1111/ics.12072.
Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/>
- [19] WEI, X. a kol. Protective Effects of Tea Polysaccharides and Polyphenols on Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, vol. 57, issue 17, s. 25-33 [cit. 2015-04-19]. DOI: 10.1079/9781845931124.0025.
Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/>
- [20] Hojení ran. *Anatomie lidské kůže* [online]. 2015 [cit. 2015-04-13].
Dostupné z: <http://www.hojeni-ran.cz/>
- [21] Eucerin. *Znalost kůže: Typ pleti* [online]. 2015 [cit. 2015-04-13].
Dostupné z: <http://www.eucerin.cz/>
- [22] HAMMELMANN, I. *Krásná a zdravá pleť*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2006, 98 s. Zdraví. ISBN 80-247-1510-4.
- [23] NEDOVIC, V. a kol. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, vol. 1, s. 1806-1815 [cit. 2014-12-28]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/>
- [24] ZUIDAM, N. J. a NEDOVIĆ, V.. *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* [online]. London: Springer, 2009, s. 31-100 [cit. 2015-03-22]. ISBN 1441910077
- [25] GIBBS, B. F., a kol. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* [online]. 1999, vol. 50, issue 3, s. 385-390 [cit. 2015-03-22]. DOI: 10.1016/b978-0-12-404568-2.00029-7.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [26] MILANOVIC, J. a kol. Microencapsulation of Flavors in Carnauba Wax. *Sensors* [online]. 2010, vol. 10, issue 1, s. 901-912 [cit. 2015-03-22].
DOI: 10.3390/s100100901. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/>
- [27] ALVIM, I. D. a kol. Use of the spray chilling method to deliver hydrophobic components: physical characterization of microparticles. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* [online]. 2013, vol. 33, s. 34-39 [cit. 2015-03-22].
DOI: 10.1590/S0101-20612013000500006. Dostupné z: <http://www.scielo.br/>
- [28] WANG, Q. a kol. High-water-content mouldable hydrogels by mixing clay and a dendritic molecular binder. *Nature* [online]. 2010, vol. 463, issue 7279, s. 339-343 [cit. 2015-03-22]. DOI: 10.1038/nature08693. Dostupné z: <http://www.nature.com/>
- [29] SUN, J. a kol. Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature* [online]. 2012, vol. 489, issue 7414, s. 133-136 [cit. 2015-03-22]. DOI: 10.1038/nature11409.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [30] WEBSTER, T. J. *Safety of Nanoparticles From Manufacturing to Medical Applications* [online]. Springer Science, 2009, [cit. 2012-04-20], 239 s. ISBN 978-0-387-78607-0. Dostupný z: www.springerlink.com.
- [31] FEŘTEKOVÁ, V. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 3. rozšíř.vyd. Praha: MAXDORF, 2000, 336 s. ISBN 80-859-1219-8

- [32] *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. Editor Marc Paye, André O Barel. New York: Taylor, 2006, 1003 s. ISBN 15-744-4824-2.
- [33] Liposomy. *CHEM:Atomy i cząsteczki* [online]. 2011 [cit. 2014-12-01]. Dostupné z: <http://brain.fuw.edu.pl/>
- [34] MOGHIS, A. *Lipids in nanotechnology: Bioactive Egg Compounds*. Urbana, IL: AOCS Press, 2012, s. 53-68. ISBN 9781613449967.
Dostupné z: <http://app.knovel.com/>
- [35] BASU, S. C., BASU, M. *Liposome Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press, 2002, 249 s. ISBN 0-89603-845-9.
- [36] Phospholipids. *TutorVista.com* [online]. 2014 [cit. 2015-03-30].
Dostupné z: <http://chemistry.tutorvista.com/>
- [37] Frontier Lifeline. *Demystifying cholesterol and lipoproteins* [online]. 2011 [cit. 2015-04-12]. Dostupné z: <https://frontierlifeline.wordpress.com>
- [38] Obezita.cz. *Zvýšená koncentrace cholesterolu a tuků* [online]. 2015 [cit. 2015-04-12].
Dostupné z: <http://www.obezita.cz/>
- [39] Ultrasonic Liposome Preparation. *Hielscher: Ultrasound Technology* [online]. 2014 [cit. 2014-12-30]. Dostupné z: <http://www.hielscher.com/>
- [40] HADIAN, Z., a kol. Formulation, Characterization and Optimization of Liposomes Containing Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids; A Methodology Approach. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2014, vol. 13, issue 2, s. 393-404 [cit. 2014-12-29]. Dostupné z: <http://web.b.ebscohost.com/>
- [41] Avanti Polar Lipids, Ing. *Preparation of liposomes* [online]. 2014 [cit. 2014-12-29].
Dostupné z: <http://www.avantilipids.com/>
- [42] LAOUI, A., a kol. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* [online]. 2012, vol. 1, issue 2, s. 147-168 [cit. 2014-12-29]. DOI: 10.1166/jcsb.2012.1020.
Dostupné z: www.researchgate.net
- [43] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 1996, 203 s. ISBN 80-902155-0-5
- [44] SOMMER, L. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. Brno: VUTUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0
- [45] SOMMER, L. *Analytická spektrometrie I*. Brno: Univerzita J. E. Purkyně, 1986. ISBN 17-019-86.
- [46] Využití dynamického rozptylu světla k měření viskozity. *ChemPoint* [online]. 2012 [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/>
- [47] Zeta potential. *Malvern* [online]. 2015 [cit. 2015-04-15].
Dostupné z: <http://www.malvern.com/>
- [48] Zeta potential. *TAPPI* [online]. [2012-04-20]. Dostupné z: <http://www.tappi.org/>.
- [49] Liposomy. 2009. *Celostní medicína* [online]. [cit. 2015-05-08].
Dostupné z: <http://www.celostnimedicina.cz/>

8 SEZNAM ZKRATEK

Použité jednotky

g – gram
mg – miligram
μg – mikrogram
l – litr
dl – decilitr
ml – mililitr
h – hodina
mm – milimetr
μm – mikrometr
nm – nanometr
°C – stupně Celsia

Ostatní

SUV – Small unilamellar vesicles, malé monolamelární částice
LUV – Large unilamellar vesicles, velké monolamelární částice
MLV – Multilamellar vesicles, mnoholamelární částice
TLE – Thin Layer Evaporation, metoda odpařování na tenké vrstvě
RP-TLE – Reverse Phase-Thin Layer Evaporation, metoda odpařování na tenké vrstvě reverzních fází
HPLC – High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PDA – Photodiode array, fotodiodové pole
DLS – Dynamic Light Scattering, dynamický rozptyl světla
UV – ultrafialová oblast
VIS – viditelná oblast
HDL – High Density Lipoproteins, lipoproteiny o vysoké hustotě
LDL – Low Density Lipoproteins, lipoproteiny o nízké hustotě