

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

katedra farmaceutické technologie

Formulace a granulometrie nanoemulzí rostlinných olejů

diplomová práce

Julie Muchová

Hradec Králové 2011

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 6. 5. 2011

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali při vytváření této diplomové práce.

Především bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za odborné vedení diplomové práce, poskytování cenných rad a pomoc při zpracování výsledků.

Dále bych ráda poděkovala panu Ing. Robertu Šťastnému z firmy Neotec Praha za laskavé zapůjčení zařízení IKA Magic LAB®.

Obsah

ABSTRAKT.....	7
ABSTRACT.....	8
ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	9
1. ÚVOD.....	10
2. NANOEMULZE.....	12
2.1. Definice emulzí.....	12
2.2. Definice nanoemulzí.....	12
2.3. Výhody nanoemulzí.....	13
2.4. Příprava nanoemulzí.....	14
2.4.1. Teplotní inverze fází.....	14
2.4.2. Vysokoenergetická emulgace.....	14
2.4.2.1. Vysokotlaká emulgace.....	15
2.4.2.2. Mikrofluidizace.....	15
2.4.2.3. Ultrazvuková emulgace.....	16
2.5. Fyzikální vlastnosti emulzí.....	16
2.5.1. Destabilizace emulzí.....	17
2.6. Využití nanoemulzí.....	18
2.6.1. Nanoemulze pro perorální podání.....	19
2.6.2. Nanoemulze pro intravenózní podání.....	19
2.6.3. Nanoemulze pro topické podání.....	20
2.6.4. Nanoemulze v kosmetice.....	20
2.6.5. Rozpouštění špatně rozpustných léčiv.....	21
2.6.6. Redukce bolesti a podráždění.....	22
2.6.7. Zlepšení farmakokinetiky.....	22
2.6.8. Cílené dodávání léčiv.....	22
2.6.8.1. Aktivní targeting.....	22
2.6.8.2. Pasivní targeting.....	23
3. KOLOIDNÍ NOSIČOVÉ SYSTÉMY PRO LÉKY.....	25
3.1. Nanočástice.....	26
3.2. Funkční potraviny.....	27
3.2.1. Stopové prvky a nutraceutika.....	27
3.3. Principy použití.....	28
3.4. Fyzikální nestabilita.....	29

3.5. Chemická nestabilita.....	29
3.6. Struktura	30
3.7. Viskozita.....	31
3.8. Vůně a chuť	31
3.9. Vzhled.....	31
3.10. Průhlednost	32
3.11. Bělost	32
3.12. Barva.....	33
3.13. Biodostupnost	33
3.14. Příklady aplikací	34
4. ROSTLINNÉ OLEJE.....	36
4.1. Hroznový olej	36
4.2. Lněný olej.....	37
4.3. Olivový olej	37
4.4. Perillový olej.....	39
4.5. Podzemnicový olej.....	40
4.6. Sojový olej	40
5. NANOEMULZE ROSTLINNÝCH OLEJŮ.....	42
5.1. Použité přístroje	42
5.2. Chemikálie.....	42
5.3. Složení nanoemulze	43
5.4. Postup přípravy nanoemulze.....	44
5.5. Měření velikosti částic	44
5.6. Emulze připravené za použití homogenizátoru Diax 900, Heildolph.....	45
5.6.1. Emulze se sojovým olejem.....	45
5.6.2. Emulze se sojovým olejem s přídavkem triacetinu, polysorbátu 20 nebo lecitinu...	46
5.6.3. Emulze se sojovým olejem s přídavkem triacetinu	47
5.6.4. Emulze se sojovým olejem s přídavkem triacetinu a polysorbátu 20.....	48
5.6.5. Emulze se sojovým olejem s přídavkem triacetinu a polysorbátu 20 – vliv režimu míchání	48
5.7. Emulze připravené za použití zařízení IKA Magic LAB®.....	49
5.7.1. Postup přípravy emulze	49
5.7.2. Emulze lišící se druhem oleje.....	50
5.7.3. Emulze s hroznovým olejem	51
5.7.4. Emulze s hroznovým olejem lišící se koncentrací emulgátoru	51
5.7.5. Emulze s hroznovým a olivovým olejem – vliv doby homogenizace	52
5.7.6. Emulze s hroznovým a olivovým olejem – vliv intenzity homogenizace	53

5.7.7. Emulze s koenzymem Q10 a vitamínem E.....	54
5.7.8. Emulze s perillovým olejem.....	54
5.7.9. Emulze s olivovým olejem.....	55
5.7.10 Emulze s různým složením emulgátoru.....	55
6. TABULKA VÝSLEDKŮ A OBRÁZKY.....	57
7. DISKUZE.....	74
7.1. K tématu práce.....	74
7.2. K objemu a koncentraci emulze se sojovým olejem, koncentraci emulgátoru a teplotě.....	75
7.3. Vliv změny viskozity a mezipovrchového napětí olejové fáze.....	75
7.4. Vliv doby a režimu míchání při různé viskozitě a mezipovrchovém napětí vnitřní olejové fáze.....	76
7.5. Vliv kvalitativního složení oleje a jeho směsi s polysorbátem 20.....	76
7.6. Vliv koncentrace oleje ze semen vinné révy.....	77
7.7. Vliv koncentrace emulgátoru na homogenizaci oleje ze semen vinné révy.....	77
7.8. Vliv typu oleje, koncentrace emulgátoru a doby homogenizace.....	78
7.9. Vliv typu oleje, koncentrace emulgátoru, intenzity a doby homogenizace.....	79
7.10. Vliv příměsí lipofilních látek do oleje z hroznového vína při různých koncentracích emulze.....	79
7.11. Vliv teploty a koncentrace emulgátoru při homogenizaci různě koncentrovaných emulzí z olivového oleje.....	80
7.12. Vliv složení a koncentrace emulgátoru při homogenizaci emulze.....	80
8. ZÁVĚRY.....	82
9. LITERATURA.....	83
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	88
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	89

ABSTRAKT

V teoretické části této práce jsou definovány nanoemulze, je popsána jejich příprava a výroba, fyzikální vlastnosti a využití. V další části je pozornost věnována koloidním nosičům aktivních látek, funkčním potravinám a charakteristikám rostlinných olejů. Těžiště práce je v experimentu. Byla připravena řada submikronových emulzí typu o/v obsahujících ve vnitřní fázi různé rostlinné oleje. Nanoemulze byly připraveny pomocí dispergace vsádkovým nebo kontinuálním homogenizátorem typu stator-rotor. Vzorky připravené modifikací složení a postupu byly hodnoceny z hlediska granulometrických charakteristik, především podílu nadmikronových částic. Bylo prokázáno, že teplota nemá silný vliv na měřenou charakteristiku. Se zvyšováním koncentrace emulze se snižuje účinnost procesu dispergace. Jako vhodný se projevil emulgátor ze směsí lecitinu a polysorbátu 20. Modifikace složení olejové fáze látkami snižujícími její viskozitu a mezipovrchové napětí se neseťkala s úspěchem. Modelové aktivní látky inkorporované do vnitřní fáze neovlivnily negativně granulometrické parametry. Intenzita homogenizace regulovaná poloměrem rotoru nebo frekvencí jeho otáček je nejsilnějším faktorem ovlivňujícím velikost částic. Došlo se k závěru, že je možno využít laboratorní zařízení daného typu pro přípravu kvalitních submikronových emulzí. Výhodou metody je její možnost škálování a validace. Výsledky studie bude nutno doplnit sledováním stability.

ABSTRACT

In the theoretical part of this thesis are presented definitions of nanoemulsions, there are described their preparation and production methods, physical properties and their application are also included. In the next part is attention paid to colloidal carriers of active ingredients, functional foods, and characteristics of vegetable oils. The focus of the work is on the experimental part. There were prepared many submicron emulsions of the o/w type containing various vegetable oils in the inner phase. These nanoemulsions were prepared by using dispersion method by batch type or continuous type homogenizers of the stator-rotor principle. The samples prepared by composition and process changes were evaluated on the granulometry point of view, especially was monitored the fraction of upper micron size. It was proven that temperature doesn't influence the measured characteristics. If the concentration of the emulze is rising the efficiency of the dispersion process is decreasing. As an appropriate emulsifier was found the mixture of lecithin and polysorbate 20. The adjustment of inner phase in the viscosity and tensioactivity by the additives was not successful. Model active substances incorporated into inner phase did not influence negatively granulometric parameters. The strongest factor influencing the particle size is the intensity of homogenisation controlled by the rotor radius or by its movement. It was concluded that it is possible to use the laboratory version of dispersion and homogenisation equipment to prepare sufficient quality submicron emulsions. The advantage of the method is its possibility of scaling up and validation. It is necessary to complete the results of the study by stability testing procedure.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Téma práce bylo formulováno s ohledem na snahy o vypracování nosiče v kapalném skupenství vhodného k aplikaci malých množství výrazně lipofilních látek v kategorii doplňků stravy. Jako nejvhodnější forma byla vybrána emulze typu o/v s vnitřní fází tvořenou rostlinným olejem. Úkolem bylo vybrat vhodný rostlinný olej ve vhodné koncentraci, využít emulgátor akceptovatelný pro danou kategorii výrobků ve vhodné koncentraci a ve vhodném složení. Cílem bylo vypracovat takový postup, který by vedl k získání emulzí s maximálním podílem olejových částic v submikronové velikosti. K přípravě nanoemulzí bylo zadáno využít metodu homogenizace vysokoobrátkovým zařízením typu Ultra-Turrax v laboratorní verzi s možností škálování postupu.

1. ÚVOD

Nanoemulze se skládají z nanokapiček jedné nemísitelné tekutiny dispergované v druhé. Většina léčiv je hydrofobních, což vede k jejich omezené rozpustnosti ve vodě. Proto se výzkum v podávání léků primárně zaměřuje na dodávání ve vodě nerozpustných léčiv. Emulze typu o/v mají vnitřní olejovou fázi, stabilně dispergovanou ve vodě, která může sloužit jako rezervoár pro hydrofobní léčiva. Jestliže jsou emulze používány pro topické podání, nanoemulze jsou díky své malé velikosti částic atraktivní pro parenterální podání. Vedle možnosti solubilizace hydrofobních léčiv, jsou nanoemulze vhodné ke snížení bolestivosti a dráždění po injekčním podání, zlepšují farmakokinetiku léčiv, umožňují nové způsoby podání léčiv a mohou být využity pro prodloužené nebo cílené uvolňování.

Koloidní disperze nacházejí své uplatnění v širokém spektru technologií a při výrobě různých produktů, jako jsou potraviny, kosmetika, barvy a léky. Využití koloidních disperzí v oblasti dodávání stopových prvků a nutraceutik do funkčních potravin závisí do značné míry na typu aktivní molekuly a na formě produktu (kapalná, polotuhá, tuhá). Začlenění stopových prvků nebo nutraceutik do produktu může ohrozit jeho funkčnost. Problémy, se kterými se často setkáváme, jsou nechtěné změny ve fyzikálně-chemické stabilitě produktu, vzhledu, struktury, chuti, vůně a biodostupnosti, a to v důsledku nestability nebo interakcí s ostatními přísadami.

Koloidní disperze tedy představují slibné nosičové systémy pro nutraceutika a stopové prvky. Mezi očekávané přínosy související s jejich používáním patří: kontrola rovnováhy mezi rozpustností a dispersibilitou dané látky v produktu, stabilita produktu, ovlivňování povrchových vlastností a morfologie částic, konečně také možnost měnit rychlost rozpouštění sloučenin a jejich biodostupnost. Jako každá nová technologie, tak i koloidní nosičové systémy čelí náročným požadavkům na jejich zpracování. Je také nutné podrobně porovnat náklady s přínosy, aby bylo možné správně posoudit potenciál dané technologie. Je samozřejmě také nezbytné prokázat její bezpečnost před použitím.

TEORETICKÁ ČÁST

2. NANOEMULZE

2.1. Definice emulzí

Emulze jsou definovány jako dvě nemísitelné fáze dispergované jedna v druhé. (1) Definice podle The United States Pharmacopeia, 2006 zní: emulze je dvoufázový systém, ve kterém je jedna kapalina dispergovaná v druhé ve formě malých kapiček. Emulze nejsou termodynamicky stabilní, ale jejich stabilita může být zlepšena přidáním povrchově aktivní látky. U emulzí rozlišujeme spojitou a dispergovanou fázi. Dispergovaná fáze je obsažena v menším objemovém procentu. Byly studovány vysoce koncentrované emulze, které obsahovaly více než 50% dispergované fáze, ovšem díky jejich vysoké viskozitě nebyly vhodné pro intravenózní podání léků.

Disperze oleje ve vodě, které jsou zajímavější pro uplatnění ve farmacii, se označují jako emulze o/v. Emulgátor pro emulze o/v je typicky více rozpustný ve vodné fázi. Emulze opačného typu jsou označovány jako emulze v/o a jsou stabilizovány povrchově aktivní látkou, která je více stabilní v olejové fázi.

2.2. Definice nanoemulzí

Nedostatek termodynamické stability je rysem všech emulzí, takže velikost částic je jediným zbývajícím rozlišovacím kritériem. The US government's National Nanotechnology Initiative definuje nanotechnologii jako: „pochopení a kontrola hmoty o rozměrech zhruba 1-100 nm“, a tato definice je běžně používána ve světě. V souladu s touto definicí se jako nanoemulze označují emulze s velikostí částic menší než 100 nm. Je ovšem prokázáno, že vlastnosti emulzí se nezmění okamžitě po překročení velikosti 100 nm.

Dle jiné definice spadá velikost částic nanoemulzí typicky do rozsahu 20-200 nm a je pro ně typická úzká distribuce velikosti částic.(2)

Podle jiných autorů jsou nanoemulze definovány jako heterogenní systém, skládající se ze dvou nemísitelných kapalin dispergovaných jedna v druhé, kde je

průměr částic emulze menší než 1000 nm. (3) Většinou se ovšem průměrná velikost částic pohybuje v rozmezí 100-500 nm. Jako synonymum se pro nanoemulze používají termíny jako miniemulze, ultrajemné emulze nebo submikronové emulze.

Nanoemulze jsou často označovány jako průsvitné nebo průhledné, zatímco klasické emulze jsou charakteristicky neprůhledné nebo mléčně bílé. (4) Pokud mají být emulze průsvitné, musí být velikost jejich částic menší než je vlnová délka viditelného světla. Optické vlastnosti emulzí závisí také na objemové frakci dispergované fáze. Mléčně bílá emulze se může stát po zředění průhlednou, ačkoli nedochází k redukci velikosti částic.

Uvádí se také, že nanoemulze jsou stabilní vůči sedimentaci a krémovatění. (3) To je zdůvodněno tím, že u menších částic je Brownův pohyb dost velký na to, aby překonal vliv gravitace. (4) Nicméně krémovatění není závislé jen na velikosti částic, ale také na relativní hustotě daných fází. Například emulze typu o/v s hustotou oleje 0,97 g/ml bude mnohem více rezistentní vůči krémovatění, než emulze o/v s hustotou oleje 1,8 g/ml, i když obě tyto emulze budou mít stejnou velikost částic.

2.3. Výhody nanoemulzí

- nanoemulze mají větší celkový povrch a větší volnou energii než makroemulze, a proto se používají jako efektivní transportní systémy
- nanoemulze mohou být připraveny v různých formách, jako jsou pěny, krémy, kapaliny nebo spreje
- nanoemulze nejsou toxické ani dráždivé, a proto je lze snadno aplikovat na kůži a sliznice
- nanoemulze obsahují povrchově aktivní látky, které jsou schváleny k lidské spotřebě (GRAS) a proto mohou být podávány také enterálně
- nanoemulze nepoškozují zdraví lidí ani zvířat, a tudíž u nich mohou být používány k léčebným účelům (2)

2.4. Příprava nanoemulzí

Příprava nanoemulzí vyžaduje dodávání energie. Tato energie může být dodávána buďto pomocí mechanického zařízení nebo chemickým potenciálem daných složek. (5)

Potřebné množství dodané energie pro vznik emulzí se ovšem liší. Důležitou oblastí výzkumu je nízkoenergetická příprava emulzí, také nazývaná spontánní emulgace nebo samo-emulgace. V tomto případě vzniká emulze spontánně, po přidání oleje a povrchově aktivní látky do vody, a to z důvodu snížení povrchového napětí po přidání tenzidu. Tento způsob vzniku emulzí je používán v případě orálního podávání léčiv, kdy jemnými pohyby v gastrointestinálním traktu je dodávána veškerá potřebná energie.

2.4.1. Teplotní inverze fází

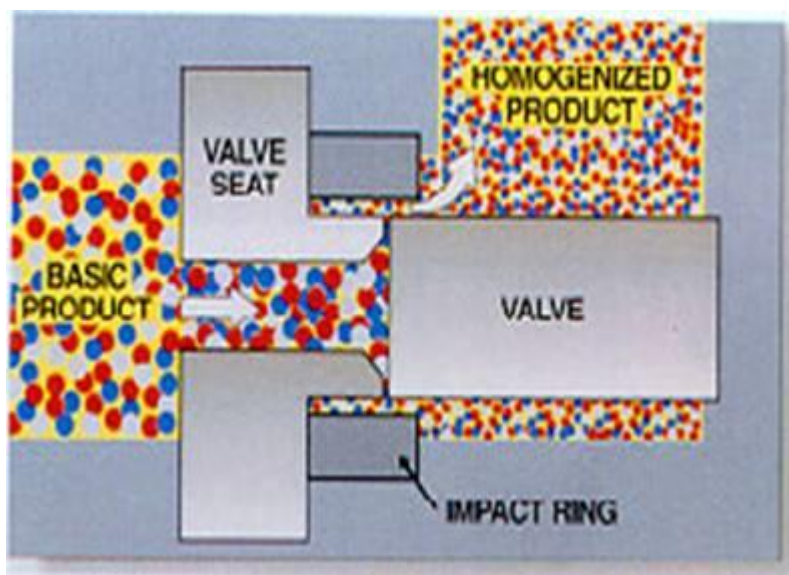
Neionické tenzidy obsahující polyoxyethylenovou polární skupinu se stávají při zvyšování teploty lipofilnějšími. (5) Tenzid, který je lépe rozpustný ve vodné fázi, je při nízké teplotě výhodněji používán pro přípravu emulzí o/v, ale při zvýšené teplotě umožňuje vznik emulzí v/o. Tato teplota, při které dochází k inverzi fází se nazývá PIT (phase-inversion temperature). (6) Emulgace při teplotě PIT je výhodná a vyžaduje minimální dodávání energie, ale vzniklé částičky jsou nestabilní. (7) Rychlým ochlazením (nebo zahřátím) může vzniknout kineticky stabilní emulze s malými kapičkami a úzkou distribucí velikosti. (8) Tato metoda je široce používána při průmyslové výrobě emulzí. (9)

2.4.2. Vysokoenergetická emulgace

Metody vysokoenergetické emulgace vyžadují použití mechanických zařízení, jako jsou vysokotlaký homogenizér, mikrofluidizér nebo ultrazvukový generátor.

2.4.2.1. Vysokotlaká emulgace

Za pomoci vysokotlakého homogenizéru lze připravit nanoemulze s extrémně malou velikostí částic (do 1 μm). Směs vnější a vnitřní fáze je protlačována přes malý otvor pod velmi vysokým tlakem (500 – 5000 Pa). Při tom dochází k intenzivní turbulenci a působením smykových sil vznikají velmi malé částice emulze. Homogenizátory různých konstrukcí jsou vhodné jak pro laboratorní, tak pro průmyslovou výrobu emulzí. Tato technika má vysokou účinnost, jedinou nevýhodou je vysoká spotřeba energie a zvýšení teploty v průběhu přípravy emulze. (10)



Obr.1 Vysokotlaká homogenizace

2.4.2.2. Mikrofluidizace

Mikrofluidizér je zařízení, které se používá nejčastěji ve farmaceutickém průmyslu pro přípravu emulzí.(11). Při přípravě emulzí pomocí mikrofluidizéru jsou dva proudy tekutiny protlačovány úzkým otvorem a následně dochází k jejich srážce pod vysokým tlakem. Vysoké smykové síly, které vznikají v důsledku kolize umožňují vznik jemné emulze s úzkou distribucí velikosti částic. Hrubá emulze (o průměru částic větším než 1 μm) se připraví nějakou jinou metodou a velikost částic této emulze je poté redukována použitím mikrofluidizéru. Konečná velikost a distribuce částic závisí jak na složkách emulze (množství tenzidu, procentuální objem oleje), tak na

parametrech zpracování (čas, teplota, tlak). Se snižující se velikostí kapiček, je nutno dodávat při přípravě emulzí více energie.

2.4.2.3. Ultrazvuková emulgace

Ultrazvuková emulgace je také efektivní při redukcí částic emulzí do nanovelikostí. Je však vhodná především pro použití v laboratorních podmínkách, nikoli při výrobě. (12)

Emulze typu olej ve vodě jsou významnými nástroji pro dodávání hydrofobních bioaktivních molekul do řady potravních produktů. Příprava velmi jemných emulzí je významná především v průmyslu nápojů. Zde emulze umožňují přidání nové ingredience, aniž by byla významně ovlivněna jasnost výsledného roztoku. Emulze s velikostí částic 135 \pm 5 nm byly připraveny za použití směsi lněného oleje, vody a Tweenu 40 jako povrchově aktivní látky. Dodávaná ultrazvuková frekvence byla 20-24 kHz. Výsledky byly porovnatelné s emulzemi připravenými pomocí mikrofluidizéru při použití tlaku 100 MPa. Pro efektivní ultrazvukovou emulgaci je klíčové určit optimální intenzitu energie, která bude dodávána do systému, protože nadměrné dodání energie může vést ke zvýšení velikosti částic.

Příprava emulzí olej ve vodě je běžným způsobem zpracování potravin. Použití ultrazvuku k tomuto účelu může být srovnatelné nebo dokonce lepší, pokud se jedná o velikost částic a energetickou účinnost, v porovnání s klasickou rotor-stator dispergací. Je to také praktičtější způsob s ohledem na náklady na výrobu, kontaminaci zařízení a aseptickou přípravu, než při použití mikrofluidizéru. Ultrazvuková příprava nanoemulzí je použitelná u řady potravních složek. (13)

2.5. Fyzikální vlastnosti emulzí

I když to nejsou termodynamicky stabilní systémy, má dlouhodobá kinetická stabilita emulzí zásadní význam pro jejich komerční použití, především pro aplikaci léků. Mezi důležité proměnné, které slouží ke sledování fyzikální a chemické stability patří velikost částic, viskozita, osmolarita, zeta potenciál, pH a vodivost daných složek.

(14) Nanoemulze často obsahují nenasycené lipidy, které mohou být náchylné k oxidaci nebo hydrolyze.

2.5.1. Destabilizace emulzí

Emulze obecně, včetně nanoemulzí, jsou destabilizovány následujícími mechanismy: krémoatění (nebo sedimentace), flokulace, koalescence nebo Ostwaldovo zrání.

Při krémoatění dochází k oddělení složek emulze na základě hustoty kapiček a tento proces je řízen gravitační silou. Ačkoli je krémoatění považováno za nežádoucí, tento proces nemá za následek nevratné rozbití emulze. Olej, který je méně viskózní než voda bude stoupat, zatím co olej, který má vyšší hustotu, se bude usazovat na dně (sedimentace).

Flokulace je proces, při kterém se seskupení dvou, nebo více kapiček chová kineticky jako celek, ale jednotlivé kapičky si stále udržují svoji identitu. (1) Je to reverzibilní proces, ale může vést ke koalescenci, která je ireversibilní.

Při koalescenci dochází ke kolizi a následné ireversibilní fúzi dvou kapiček. Konečným důsledkem koalescence je kompletní separace fází. Flokulace předchází koalescenci, tudíž se k zabránění koalescence používají stejné metody, jako k zabránění flokulace. Viskózní film povrchově aktivní látky adsorbovaný na mezipovrchu je často dostatečný k prevenci koalescence, a to jak u nanoemulzí, tak i u makroemulzí. Při stejné polymerní tloušťce, bude stabilizace nanoemulzí vyšší, protože vrstva polymeru bude připadat na procentuálně větší povrch.

Ostwaldovo zrání je růst velikosti kapiček emulze, což je způsobeno difúzí obsahu jedné kapičky do druhé. Hnací silou tohoto růstu je rozdíl v chemickém potenciálu kapiček, který obvykle není podstatný u kapiček větších než 1 μm . Ostwaldovo zrání tudíž primárně ovlivňuje nanoemulze a je nejzávažnějším projevem jejich nestability. (15) Při Ostwaldově zrání se velké částice stávají většími na úkor menších částic a průměrná velikost částic se kontinuálně zvětšuje. V ideální situaci, pokud je v emulzi perfektní monodisperzní distribuce částic, nedochází k Ostwaldovu zrání, protože zde nejsou rozdíly v rozpustnosti částic související s jejich velikostí.

Tudíž úzká distribuce částic je mnohem rezistentnější ke zrání, než široká distribuce částic. Přidáním druhé, ve vodě méně rozpustné látky, se může zrání zpomalit. (16)

Ostwaldovo zrání vyskytující se u nanoemulzí má také význam pro farmaceutický průmysl. Rychlost zrání stanovuje jasná kritéria, podle kterých se posuzuje přijatelnost výroby. U emulzí je požadována stabilita nejméně 18 měsíců. (14). Podle rychlosti zrání můžeme odhadnout dlouhodobou stabilitu emulze a podle toho stanovit dobu expirace. Pokud je rychlost zrání velmi rychlá, nanoemulze není vhodná pro farmaceutické využití.

Nestabilita emulzí může mít také další nevýhody. Pro emulze, které jsou určeny pro parenterální injekce, FDA (Food and Drug Administration) vyžaduje, aby byly sterilní. Nejpoužívanější metodou sterilizace je konečná tepelná sterilizace například pomocí autoklávu, ta může ovšem často ovlivnit fyzikální stabilitu emulze. Navíc, emulze jsou často pro větší stabilitu skladovány při teplotě 5°C, což je další překážkou v používání a uchovávání těchto produktů. (14)

2.6. Využití nanoemulzí

Vývoj nových metodik pro emulgaci bifázických systémů o/v umožňuje přípravu nanoemulzí, které jsou stabilní a díky malé velikosti částic jsou vhodné pro intravenózní podání hydrofobních léčiv. Kombinací různých tenzidů, dalších přísad a lipidů se rozšířilo použití nanoemulzí na široké spektrum léků. Použití nanoemulzí pro dodávání léčiv umožnilo vývoj nových terapeutických možností. Účinnost a bezpečnost používání nanoemulzí u lidí byla prokázána u řady schválených produktů a současný výzkum zaměřený na užitečnost a aplikovatelnost nanoemulzí se neustále rozšiřuje.

Řada významných studií, týkajících se nanoemulzí jako nosičů léčiv, se objevila v letech 1990-2000. (17) Nanoemulze byly široce studovány pro orální, topické i intravenózní podání léčiv.

2.6.1. Nanoemulze pro perorální podání

Nanoemulze se používají ke zlepšení biodotupnosti hydrofobních léčiv po jejich perorálním podání. Byla proto připravena nanoemulze typu o/v obsahující paclitaxel, vnitřní fáze byla tvořena olejem z piniových oříšků, vnější fáze byla voda a jako emulgátor byl použit vaječný lecitin. Stearylamin a deoxycholová kyselina udělovaly emulzi kladný a záporný náboj. Velikost částic nanoemulze byla v rozmezí 90-120 nm a zetapotenciál byl +34 mV až 245 mV. Po perorálním podání této nanoemulze se v systémovém oběhu nacházela výrazně vyšší koncentrace paclitaxelu, než při podání samotného vodného roztoku. Výsledky této studie tedy naznačují, že nanoemulze představují vhodný způsob, jak zvýšit biologickou dostupnost hydrofobních léčiv. (18)

Coenzym Q10 (CoQ10), také známý jako ubichinon, je nezbytný pro tvorbu energie v buňkách a je to také významný antioxidant. Vzhledem k tomu, že je CoQ10 vysoce lipofilní, je jeho biodostupnost po perorálním a topickém podání nízká. Bylo zkoušeno mnoho způsobů, jak zlepšit jeho vstřebávání. Poslední výzkumy naznačují, že zapouzdřením CoQ10 do nanoemulzí se podstatně zlepšil jeho biodostupnost. Byly vyvinuty také nové dvojité nanoemulze obsahující CoQ10 a tokoferol. (2)

2.6.2. Nanoemulze pro intravenózní podání

Jako první byly pro intravenózní podání schváleny nanoemulze stabilizované fosfolipidy ze sojového oleje (19) a začaly se klinicky používat jako doplňky stravy již před více než 40-ti lety. S průměrem částic kolem 300 nm, spadají do nano rozsahu, což z nich dělá první terapeuticky využitelné nanoemulze. K emulgaci byl použit vaječný nebo sojový lecitin obsažen v oleji z přírodních rostlinných zdrojů (sojový olej). Phosphatidylcholin (PC) je primární složkou lecitinu, ale jeho koncentrace se liší v závislosti na způsobu čištění. Lipoid E80, běžně používaná povrchově aktivní směs, obsahuje 80 % PC. Phosphatidylethanolamin je druhou nejvýznamnější složkou lecitinu, následují malá množství phosphatidylserinu a phosphatidylinositolu.

Intravenózní emulze, jako parenterální produkty, musí splňovat následující požadavky: sterilita, izotonicita, apyrogenita, netoxicitá, biologická rozložitelnost a fyzikální a chemická stabilita. (20) Biokompatibilita emulzí pro parenterální výživu a jejich schválení FDA, je předurčuje k tomu, aby se staly šablonou pro budoucí vývoj nanoemulzí. První příklady nanoemulzí pro podávání léčiv byly koncepčně podobné

nutričním emulzím. V posledních letech, se vývoj inovativních emulzních přípravků zaměřuje především na používání různých emulgujících olejů a polymerních emulgátorů.

2.6.3. Nanoemulze pro topické podání

Různé nanoemulze typu voda v oleji byly připraveny za použití sorbitan monooleatu (Span 80), polyoxyethylen 20 sorbitan monooleatu (Tween 80), olivového oleje a vody. U těchto nanoemulzí byla testována schopnost přenosu hydrofilní rozpuštěné látky – inulinu po jejich topické aplikaci, a to jak u holých, tak u ochlupených myší. Přenos inulinu inkorporovaného do nanoemulze byl významně vyšší (5 – 15x) v porovnání s hodnotami získanými za použití micelárních disperzí. Rychlost a rozsah přenosu inulinu přes srst myší byl značně závislý na hydrofilně-lipofilní rovnováze (HLB) směsi povrchově aktivních látek v nanoemulzi. Nanoemulze připravené za použití směsi tenzidů s nižší HLB vykazovaly výrazně vyšší rychlost a rozsah transportu. Nanoemulzí zprostředkovaný transport byl také závislý na velikosti molekuly hydrofilní rozpuštěné látky a na povaze vodné fáze. Přenos inulinu pomocí nanoemulzí byl také ovlivněn vlastnostmi zvířecí kůže, jako je tloušťka stratum corneum a typ folikulů. Z těchto poznatků vyplývá, že nanoemulze typu voda v oleji, které jsou kompatibilní s lipofilním prostředím vlasových folikulů, usnadňují přenos takto inkorporovaných látek. To také znamená, že transport probíhá především transfolikulárně. (21)

2.6.4. Nanoemulze v kosmetice

Nanoemulze nacházejí své uplatnění také v kosmetických přípravcích. Zde zajišťují především správné rozptýlení a následné snadné vstřebání účinných látek do všech vrstev kůže. Vzhledem k jejich lipofilní vnitřní fázi, jsou nanoemulze vhodnější pro přepravu lipofilních látek než lipozomy. Podobně jako lipozomy, podporují nanoemulze vstřebávání účinných látek pokožkou a tím zvyšují jejich koncentraci v kůži. Další výhodou nanoemulzí je malá velikost jejich částic, tím se zvyšuje celkový povrch a následně se usnadňuje transport aktivních složek do kůže. Kromě toho jsou také velmi důležité vlastní bioaktivní účinky samotných nanoemulzí. Nanoemulze snižují trans-epidermální ztráty vody a tím posilují bariérovou funkci kůže. Nanoemulze jsou používány v kosmetice také proto, že u nich nedochází ke krémoatění,

sedimentaci, flokulaci a koalescenci. Začlenění potenciálně dráždivě povrchově aktivní látky lze předejít tím, že se při výrobě emulze použijí vysokoenergetická zařízení.

Nanoemulze typu olej ve vodě především minimalizují ztráty podkožní vody, zlepšují reparační procesy v kůži a usnadňují průnik účinné látky. V současné době, se nanotechnologie využívá již u mnoha produktů, především se jedná o přípravky na opalování, hydratační krémy a krémy proti stárnutí. (2)

2.6.5. Rozpouštění špatně rozpustných léčiv

Rozpouštění špatně rozpustných léčiv je nejvýznamnějším využitím nanoemulzí. Lorazepam je podáván intravenózně k premedikaci a sedaci před operací. Je většinou podáván jako roztok v organickém rozpouštědle, jako je propylenglykol. Nejvyšší koncentrace, které můžeme dosáhnout ve vodném rozpouštědle (5% dextroza ve vodě) je 0,05 mg/ml. Emulze stabilizovaná fosfolipidem ze sojového oleje umožňuje stabilně emulgovat lorazepam při koncentraci 1 mg/ml. To je dvacetinásobné zvýšení, což umožňuje významnou redukci objemu potřebného pro injekční aplikaci (22)

Zatímco rozpouštění pomocí emulzí bylo aplikováno na řadu lipofilních léčiv, nemůže být tradičně použito pro léčiva, která mají omezenou rozpustnost v olejích. Jedním ze způsobů, jak lze překonat tento nedostatek, je umístění léčiva přímo do mezivrchové vrstvy lecitinu. Toho dosáhneme rozpuštěním léčiva společně s lecitinem v organickém rozpouštědle, odpařením rozpouštědla a následným využitím této směsi k de novo emulgaci. Naneštěstí je tato metoda nepraktická pro použití v průmyslovém měřítku. Müller a spolupracovníci vymysleli metodu rozpuštění látek v mezivrchové vrstvě, která je využitelnější ve velkém měřítku a nazývá se SolEmuls®. Při této metodě jsou pevné nanokrystaly léčiv homogenizovány s komerčně dostupnou emulzí bez nutnosti použít organické rozpouštědlo. Touto cestou byli schopni stabilně emulgovat carbamazepin (23), itraconazol, ketoconazol a amphotericin B.

2.6.6. Redukce bolesti a podráždění

V místě intravenózní aplikace mohou některá léčiva způsobovat lokální podráždění. Tato léčiva, stejně tak, jako různé kosolventy ve vodných roztocích, mohou také způsobit flebitidu a zánět žil, což vede k bolesti nebo k zarudnutí. Nanoemulze snižují spotřebu kosolventů a umožňují enkapsulaci léčiv, která by jinak mohla být dráždivá a tímto umožňují redukovat lokální dráždění po injekční aplikaci.

2.6.7. Zlepšení farmakokinetiky

Farmakokinetika se zabývá osudem vnějších látek v organismu, zvláště rozsahem a rychlostí absorpce, distribucí, metabolismem a exkrecí sloučenin. Hlavním cílem výzkumu v podávání léků obecně, a u nanoemulzí speciálně, je ovlivnění těchto parametrů s cílem zlepšit účinky léků.

Nalbuphine je léčivo odvozené od morfinu a jeho výhodou je to, že po vysazení nezpůsobuje významné abstinenční příznaky. Nicméně díky krátkému eliminačnímu poločasu a špatné biodostupnosti po orálním podání, musel být podáván injekčně každých 3 – 6 hodin. Proto byla připravena nanoemulze pro parenterální podání obsahující nalbuphine a jeho proléčivo. Jako hlavní emulgátor byl použit vaječný phospholipid. Při jejím zkoušení in vivo, farmakokinetický profil ukazoval, že se plazmatická koncentrace nalbuphinu a jeho proléčiva po inkorporaci do nanoemulze zvýšila. (24)

2.6.8. Cílené dodávání léčiv

Při targeting se jedná o přímé dopravování léčiva do cílové tkáně. Existují dva druhy targeting: pasivní a aktivní. Při aktivním targeting je do stabilizační vrstvy začleněna sekundární složka, která slouží k rozpoznávání specifických míst. Při pasivním targeting závisí konečné umístění léčiva na velikosti a povrchových vlastnostech částic.

2.6.8.1. Aktivní targeting

Při aktivním targeting se mění povrch nosičů léčiv. Ty jsou spojeny s ligandy, které jsou rozpoznávány specifickými receptory na povrchu buněk cílových tkání.

Vzhledem k tomu, že interakce receptor – ligand je vysoce selektivní, umožňuje aktivní targeting přesnější zasažení požadované tkáně. (25)

Rychle dělicí se buňky, jako jsou rakovinové buňky, potřebují ke stavbě svých buněčných membrán větší množství cholesterolu. LDL lipoproteiny jsou přirozenými nosiči esterů cholesterolu v lidském těle a proto některé tumory zvyšují aktivitu svých LDL–receptorů. Proto byly vyvinuty nanoemulze, které obsahují estery cholesterolu, napodobující přirozené LDL částice. Například: nanoemulze obsahující paclitaxel, který byl rozpuštěn v cholesteryl oleatu a stabilizován vaječným phosphatidylcholinem. U pacientů s gynekologickými nádory (nádor ovaria, nádor endometria nebo cervikální karcinom) byla studována farmakokinetika této nanoemulze a její schopnost koncentrovat toto léčivo v nádorech. Ukázalo se, že paclitaxel v nanoemulzi byl stabilní v krevním oběhu a jeho farmakokinetický profil byl lepší v porovnání s komerční formulací. Navíc v maligních tkáních byla 3,5x větší koncentrace paclitaxelu, než v tkáních normálních. Tyto výsledky podporují další klinické studie nanoemulzí obsahujících paclitaxel. (26)

2.6.8.2. Pasivní targeting

Dodávání léčiv do specifických míst je umožněno také prostřednictvím pasivního targeting, který je založen především na změně velikosti injekčně podávaných částic. Tradiční emulze pro parenterální výživu se skládají z částic o velikosti 200-300 nm. Tyto částice rychle vstupují do jater a tím jsou odstraněny z cirkulace. Použitím stejných složek, které se nacházejí ve výživových emulzích (sojový olej a vaječný lecitin), byly připraveny nanoemulze s průměrem částic 25-50 nm a 200-300 nm. Menší částice byly pomaleji vychytávány játry, což vedlo k prodloužení jejich plazmatického poločasu. Do takto připravené nanoemulze bylo začleněno protizánětlivé léčivo – dexamethason palmitát (DMP). Je známo, že zánětlivá místa mají propustnější stěny kapilár, což umožňuje malým částicím průchod pasivní difúzí. Menší nanoemulze s prodlouženým plazmatickým poločasem procházejí do místa zánětu s větší účinností a přinášejí tam tak 3x větší množství DMP, než větší částice. (27)

V jiném případě, mohou být játra cílovým místem působení léčiv, což vyžaduje použití větších částic. ALL-trans retinová kyselina (ATRA) je protirakovinová látka, která se používá k léčbě jaterních metastáz. Po orálním podání je její biodostupnost značně variabilní, proto bylo navrženo zlepšení její biodostupnosti pomocí intravenózního podání. Byla připravena nanoemulze ze sojového oleje, stabilizovaná vaječným fosfatidylcholinem/cholesterolem, do které byla inkorporována ATRA. Průměr částic byl 133 nm. Použitím této emulze se statisticky zvýšila akumulace tohoto léčiva v játrech, což vedlo k redukci počtu metastatických uzlin a snížení hmotnosti jater. (28)

3. KOLOIDNÍ NOSIČOVÉ SYSTÉMY PRO LÉKY

Některé léky mají přesně dané rozmezí koncentrace, při které přinášejí pacientovi největší prospěch. Pokud se koncentrace těchto léků v organismu pohybuje mimo toto rozmezí, mohou působit buď toxicky, nebo naopak nemají pro člověka žádný terapeutický přínos.

V důsledku pomalého pokroku v léčbě závažných chorob, je zapotřebí vyvinout takový multidisciplinární přístup, který umožní cílené dodávání léčiv do určitých tkání. Proto byly navrženy nové možnosti, jak kontrolovat farmakokinetiku, farmakodynamiku, toxicitu, imunogenitu a účinnost léčiv. Tato strategie se označuje jako „drug delivery system“ (DDS) – tedy „systém dodávání léků“ a je založena na interdisciplinárním přístupu, kde se kombinují polymerní vědy, farmacie, chemie a molekulární biologie. (29)

Existuje několik dobře prostudovaných koloidních nosičových systémů. Klasickými příklady jsou lipozomy, mikroemulze a micely, které vznikají z amfifilních molekul, jako jsou blokované kopolymery, fosfolipidy nebo povrchově aktivní látky. Jako nosiče léčiv se také používají rozpustné polymery, mikročástice z nerozpustných nebo biologicky rozložitelných přírodních a syntetických polymerů. Tyto nosiče mohou být pomalu rozložitelné, reagující na určité podněty (citlivé na změnu pH nebo teplotu) a dokonce i cílené (mohou být spojeny se specifickými protilátkami proti určitým strukturám v cílové tkáni). Koloidní částice jsou většinou ve formě disperze pevná látka v kapalině nebo pevná látka v plynu. Všechny tyto systémy byly zkoumány pro orální podání léků s různým stupněm úspěšnosti.

V současné době se vyvíjí mnoho systémů pro podávání léků s cílem minimalizovat degradaci a ztráty léčiva, snížit jeho nežádoucí vedlejší účinky, zvýšit biologickou dostupnost a zajistit co největší kumulaci léčiva v požadované tkáni. Pro úspěšný rozvoj těchto metod je důležité především řízené uvolňování léčiv a jejich následná biodegradace. Pro trvalé, nebo kontinuální podávání léků se využívají polymery, ze kterých se lék uvolňuje kontrolovanou rychlostí a to v důsledku jeho difúze z polymeru nebo degradací polymeru v průběhu času. Pulzní uvolňování léků je také významná metoda, kterou se napodobuje přirozený způsob, jakým tělo produkuje

hormony - například inzulín. Tato metoda využívá polymery, které reagují na specifické podněty (změna pH, teploty nebo vystavení světlu).

Další přístupy v dodávání léčiv se zaměřují na překonávání fyziologických bariér, jako je například hematoencefalická bariéra, s cílem zlepšit účinek podávaných léčiv. Hledají se také alternativní a přijatelné cesty pro podávání léčiv bílkovinné povahy, neboť tato léčiva jsou po perorálním podání v gastrointestinálním degradována.

Již přes 20 let přináší nanotechnologie v oblasti poskytování léků obrovské úspěchy. (30) Zlepšuje se technika dodávání léků, tím se minimalizuje jejich toxicita a zlepšuje účinnost, což má zásadní význam nejen pro pacienty, ale také pro farmaceutické společnosti.

3.1. Nanočástice

Nanočástice jsou považovány za submikronové koloidní systémy skládající se z polymerů nebo látek lipidového typu. Nanočástice mohou absorbovat nebo enkapsulovat léčivo, čímž ho chrání před chemickou a enzymatickou degradací. Dělí se na nanosféry a nanokapsuly. Nanokapsuly jsou vezikulární systémy, ve kterých je léčivo umístěné v dutině obklopené polymerní membránou, zatímco nanosféry jsou matricové systémy, ve kterých je léčivo rovnoměrně rozptýleno.

Nanočástice jako nosiče léčiv, mohou být tvořeny jak z biologicky rozložitelných, tak nerozložitelných polymerů. V posledních letech jsou biologicky rozložitelné polymerní nanočástice využívány k řízenému uvolňování léčiv, cílenému zasažení požadovaného orgánu nebo tkáně, jako nosiče DNA v genové terapii a také proto, že umožňují podání bílkovin, peptidů a genů perorální cestou. (31,32,33)

Dalším typem nanočástic, který je odlišný od polymerních forem, jsou pevné lipidové nanočástice (SLN – solid lipid nanoparticle), jejichž lipidové jádro je při pokojové teplotě pevné. Během přípravy SLN je pevný lipid nejprve roztaven, poté následuje jeho emulgace za vzniku emulze typu o/v a poté ochlazení, což umožňuje jeho opětovné ztuhnutí. Vzhledem k podobnosti přípravy a složení, se tyto částice také nazývají „emulze s pevnými kapénkami tuku“.

Nanočástice jsou jako systémy pro dodávání léčiv používány s velkým úspěchem. Využívají se k léčbě rakoviny, v genové terapii, léčbě AIDS, radioterapii, při dodávání antibiotik, vakcín a virostatik. Umožňují také kombinovat diagnózu a terapii, což představuje jeden z nejdůležitějších nástrojů v nanomedicíně. Hlavním cílem vývoje je zlepšit stabilitu nanočástic v biologickém prostředí, umožnit biodistribuci aktivních látek, zlepšit targeting, transport, uvolňování a přechod léčiv přes biologické bariéry. Cytotoxicita nanočástic nebo jejich degradačních produktů však zůstává závažným problémem a proto se výzkum zaměřuje především na zlepšení jejich biokompatibility.

3.2. Funkční potraviny

Jednou z rozvíjejících se oblastí je využití koloidních disperzí pro přípravu funkčních potravin. Funkční potraviny jsou stále oblíbenější mezi spotřebiteli a to v důsledku zvyšujících se znalostí o funkčních složkách a jejich vlivu na lidské zdraví a fyziologické funkce. V dnešní době spotřebitelé řeší některé zdravotní problémy, jako jsou kardiovaskulární onemocnění a obezita, raději pomocí potravinových produktů, než léků. Plán funkčních potravin pro dodávání stopových prvků a nutraceutik je velkou technologickou výzvou. (34)

3.2.1. Stopové prvky a nutraceutika

Nejčastější stopové prvky jsou vitamíny a minerály. Jsou nezbytné pro lidský růst a vývoj, ale většina z nich není produkována v lidském organismu a musí být dodávány prostřednictvím potravy a doplňků stravy. Vitamíny můžeme rozdělit do dvou skupin: rozpustné ve vodě a rozpustné v oleji. Jejich rozpustnost a reaktivita do značné míry ovlivňuje jejich použití v potravinách. Minerály jsou další velmi důležité součásti lidské stravy a jsou důležité pro růst a zdraví. Minerály nejsou produkovány lidským tělem a také musí být dodávány prostřednictvím potravy a doplňků stravy. Zdrojem minerálů jsou anorganické a organické soli, ať už jednoduché soli zcela rozpustné ve vodě (CaCl_2), komplexy (NaFeEDTA) nebo mírně rozpustné soli (ZnO , FePO_4 , CaCO_3).

Různé minerály jsou významné pro svůj výživový potenciál. Mezi nejdůležitější patří vápník, který je především důležitý pro zdraví kostí. Dále železo, ve vztahu

k duševnímu vývoji a anémii. Draslík snižuje vysoký krevní tlak a tím zlepšuje kardiovaskulární zdraví. Různé stopové prvky mají rovněž výživový potenciál. Sem patří měď, selen, hořčík a zinek. Jsou to především důležité antioxidanty. Měď, zinek a hořčík jsou součástí různých enzymů a selen je součástí glutathion peroxidázy. Podrobnější zkoumání je třeba v oblasti stopových prvků s ohledem na jejich metabolické vztahy k jiným živinám a potenciální toxicitu.

Nutraceutika nejsou nezbytná pro lidský život, ale mají pozitivní efekt na celkové zdraví a prevenci různých nemocí. Nutraceutika jsou často bioaktivní molekuly, nebo fytochemikálie, což jsou bioaktivní molekuly odvozené z rostlin. Kompletní fyziologická role fytochemikálií není plně objasněna a je prováděno mnoho výzkumů, které mají odhalit jejich vliv na lidské zdraví. (34)

3.3. Principy použití

Pod pojmem funkčnost výrobku si lze představit výrobu, strukturu, konzistenci, stabilitu, vzhled, chuť, vůni a biodostupnost jeho jednotlivých složek. Je důležité zajistit stabilitu stejně jako správnou chuť konečného produktu. Bohužel nutraceutika a stopové prvky způsobují často problémy vzhledem k jejich fyzikálně chemickým vlastnostem, nebo v důsledku interakcí s dalšími složkami přítomnými v produktu. Tím je pak ohrožena funkčnost produktu. Například, příprava produktu není možná díky omezené rozpustnosti složek, změně struktury nebo vzhledu, klesající fyzikální a chemické stabilitě, modifikované chuti a v některých případech může být nepříznivě ovlivněna i biodostupnost.

Existují dvě možnosti jak zavést funkční složku do produktu: buď jako rozpustnou, nebo jako nerozpustnou (dispergovanou) složku. V závislosti na specifitě daných sloučenin může nastat několik problémů. Toto můžeme ukázat na příkladě dodávání vápníku. Pokud je vápník použit ve formě rozpustné soli (jako je chlorid vápenatý), je snadné připravit tento produkt jednoduchým rozpuštěním. Tato forma vápníku je biodostupná, ale má hořkou chuť a způsobuje stabilitní problémy v důsledku interakcí s proteiny, zvláště rostlinnými proteiny nebo s vápník-senzitivními biopolymery (pektin, alginát). Na druhou stranu, pokud je vápník přidán v nerozpustné formě velkých částic, jako je uhličitan nebo fosforečnan vápenatý, může způsobovat

opotřebením zařízení při zpracování a může také docházet k jeho sedimentaci, pokud je produkt tekutý. Sediment na dně obalu je nevzhledný a vápník není vhodný pro dlouhodobou spotřebu. Proto je nutné najít rovnováhu mezi rozpustností a disperzibilitou aktivních složek. Obecným řešením těchto problémů je použití koloidních systémů, které jsou nerozpustné v produktu, ale rozpouští se v gastrointestinálním traktu po konzumaci. A navíc, koloidní disperze by měly být dostatečně malé na to, aby u nich nedocházelo k projevům fyzikální nestability, jako je například sedimentace. (35)

3.4. Fyzikální nestabilita

Koloidní disperze vykazují mimořádnou stabilitu proti gravitací řízenému jevu (krémovatění nebo sedimentace), což je zvláště důležité pro tekuté produkty. Stabilitu koloidních systémů ke gravitací podmíněným jevům lze využít pro přípravu stabilních produktů s prodlouženou dobou použitelnosti a zvýšenou stabilitou při pokojové teplotě. Správně stabilizované disperze v průběhu sušení mohou být použity jako instantní nápoje s vylepšenou dispergovatelností.

Ostwaldovo zrání je další problém související s nanočásticemi a nanoemulzemi. Díky nízké rozpustnosti ve vnější fázi, přechází hmota z menších částic a kapiček do větších. Ostwaldovo zrání je proces, při kterém se velké částice stávají ještě většími a malé zanikají. Ačkoli je ve většině případů zrání krystalů považováno za nežádoucí jev, může být Ostwaldovo zrání využito k tvorbě dutých koloidních částic a pro jemné doladění velikosti částic. (36)

3.5. Chemická nestabilita

Chemické nestability odrážejí chemickou povahu jednotlivých složek a jejich schopnost podílet se na chemických reakcích buď samostatně nebo za přítomnosti dalších složek. Oxidace a světlem indukovaná oxidace patří mezi nečastější problémy. Přidání stopových prvků a nutraceutik může významně komplikovat toto téma. Většina nutraceutik (například antioxidanty jako jsou polyfenoly) a vitamínů jsou nestabilní a podléhají oxidaci během skladování (vitamin C). Na druhou stranu, stopové prvky,

jako je například železo a měď hrají velmi důležitou roli v oxidačních procesech jako katalyzátory. (37)

Strategie pro minimalizaci oxidace ve funkčních potravinách nejsou jednoznačné. Zahrnují použití antioxidantů a práci v inertní atmosféře. V případě minerálů, které mohou katalyzovat oxidační procesy je velmi důležité minimalizovat jejich koncentraci v iontové formě. Toto lze ovlivnit změnou pH, přítomností dalších chelátorů (EDTA) a redukčních činidel, které ovlivňují jejich elektrochemický potenciál a schopnost podílet se na redoxních reakcích. V případě minerálních koloidních částic obsahujících železo nebo měď, se mohou oxidační procesy vyskytovat na rozhraní částic. Ke kontrole tohoto procesu může být použito filmové potahování.

Hlavní výhodou koloidních disperzí ve vztahu k oxidaci je to, že lze k jejich přípravě použít nerozpustné formy cílových stopových prvků a nutraceutik, které jsou typicky více chemicky stabilní. Pokud jsou zapouzdřené v inertních maticích, které jsou pomalu stravitelné, kompenzují to koloidní disperze zvýšením celkového povrchu, aby se zajistilo, že dané stopové prvky a nutraceutika budou stále biodostupné. Například enkapsulace askorbil palmitátu, v oleji rozpustného chemického derivátu kyseliny askorbové, do pevných jader lipidových nanočástic, vede k jeho větší stabilitě v důsledku snížené difúze kyslíku do pevné matrice. (38)

Strategie pro minimalizování oxidace lipidů, stopových prvků a nutraceutik jsou založeny na zvýšení jejich fyzikálně chemické stability v produktu, ovšem mohou se lišit v závislosti na chemické povaze jednotlivých sloučenin.

3.6. Struktura

Nanodisperze nacházejí uplatnění při doladování struktury produktu a umožňují tvorbu nových produktů. Nutraceutika a stopové prvky jsou používány v relativně nízkých koncentracích (typicky méně než 1%), tudíž jejich vliv na strukturu je omezen. Nicméně, možnost zavést funkční složky do produktu při zachování požadovaných strukturních vlastností je velmi důležitá.

3.7. Viskozita

Anizotropní tvary částic, jako jsou jehlice nebo destičky, mohou být použity jako alternativa k biopolymerům ke zvýšení viskozity nebo k tvorbě gelu při dostatečně nízkých objemových frakcích. Díky anizotropii jsou tyto částice silnějšími vizkozifianty než sférické částice stejné objemové frakce. K tvorbě gelu pomocí jehlicovitých částic dostačuje také mnohem nižší objemová frakce, než by odpovídalo sférickým částicím. Ačkoli je kontrola tvaru částic obtížná, jsou anizotropní částice vnímány jako slibné stavební kameny budoucích materiálů. Některé minerály (oxidy železa, uhličitan vápenatý) mohou tvořit anizotropní částice. Z nutraceutik jsou to například steroly, vyskytující se jako velké anizotropní krystaly v olejové fázi. (35)

3.8. Vůně a chuť

Vůně a chuť jsou rozhodující pro úspěch všech potravních produktů. Změny chuti jsou často spojeny s původní chutí složek nebo nechtěnými chemickými reakcemi (oxidace). Koloidní disperze umožňují kontrolu rozpustnosti a tudíž kontrolu chuti. Toto si lze jednoduše představit na příkladě minerálů. Často volné kovové ionty způsobují hořkou nebo kovovou chuť. Pečlivým výběrem minerálních zdrojů nebo komplexotvorného činidla může být koncentrace volných kovových iontů v systému minimalizována, což vede k zajištění co nejmenšího vlivu na chuť produktu. Je známo, že obklopení vápníku ve vodě rozpustným chloridem vápenatým, způsobuje hořkou chuť, avšak nerozpustný minerál jako uhličitan vápenatý nebo fosfát vápenatý není hořký díky jeho velmi nízké rozpustnosti. (39)

3.9. Vzhled

Vzhled je velmi důležitý faktor ovlivňující kvalitu produktů jako jsou potraviny, kosmetika, inkousty a barvy. Vzhled produktu závisí na jeho mikrostruktuře a složení. Celkový vzhled produktu závisí na způsobu, jakým interaguje z viditelným světlem. Rozptyl světla do značné míry určuje zákal a světlost nebo tmavost produktu, zatímco absorpcí světla je ovlivněna jeho barevnost. Míra rozptylu světla závisí na koncentraci dispergované fáze, velikosti a indexu lomu přítomných částic, zatímco stupeň absorpce závisí na koncentraci a typu barviva a přítomného absorbujícího materiálu. (35)

3.10. Průhlednost

Průhlednost je vyžadována tehdy, pokud je do produktu přidán nerozpustný materiál a produkt byl původně průhledný nebo jasný. Průhlednost je většinou definována jako množství světla, které projde produktem o určité tloušťce. Existuje několik přístupů jak ovlivnit průhlednost produktu. Prvním z nich je chemická modifikace, která vede k přeměně dané sloučeniny z nerozpustné na rozpustnou. Příkladem jsou estery mastných kyselin askorbové kyseliny, které přeměňují ve vodě rozpustný vitamin C na vitamín rozpustný v oleji. Tento přístup má však mnoho omezení, neboť může dojít ke změně funkčnosti molekuly, především ke změně její biodostupnosti a farmakokinetiky.

Existují také různé fyzikální přístupy, které umožňují dosáhnout průhlednosti u produktu. Příprava mikroemulzí je známý přístup, ale většinou podléhá vysoké spotřebě povrchově aktivních látek. Nicméně, tento způsob se využívá k předpřípravě daných složek. Další možností je snížení velikosti částic, čehož se často využívá v případě nízkoobjemových frakcí. V tomto případě mohou být použity různé koloidní systémy. Koloidní částice a nanoemulze tak nabízejí zajímavou alternativu a umožňují použití malého množství povrchově aktivních látek. Například, v oleji rozpustný vitamín E, může být přidán do nápojů ve formě emulze, ovšem velké kapky budou měnit výsledný vzhled tohoto produktu. Vitamín E byl proto připraven ve formě nanoemulze, ve které byla velikost kapiček dostatečně malá na to, aby umožnila přípravu průhledného nápoje o požadované koncentraci. (35)

3.11. Bělost

V mnoha případech hledáme opačné řešení, tedy zvýšení bělosti produktu. Bělost produktu může být ovlivněna vytvořením dostatečně velkého rozptylu světla na částicích a zvětšením objemové frakce dispergované fáze. V některých případech se používá přidání silně rozptylujících inertních částic (oxidu titaničitého) do produktu. Některé minerály se také používají ke zvýšení bělosti, ale jejich objemová frakce může být příliš nízká na to, aby vytvořila silně bělící účinky.

3.12. Barva

Absorpční vlastnosti nosičových systémů mohou často ovlivňovat nebo být záměrně použity k ovlivnění barevnosti produktu. Některé stopové prvky mohou být dodávány v různých formách, které mají odlišné optické vlastnosti. Je důležité vybrat takový materiál, který má nejmenší vliv na vzhled produktu. Na druhou stranu, pokud je barevnost u produktu vyžadována, lze ji ovlivnit výběrem materiálu i velikostí částic.

Koloidní nosičové systémy umožňují dodání nerozpustných pigmentů jak ve vodné tak v olejové fázi. Vzhledem k jejich optickým vlastnostem, nabízejí nanočástice a nanoemulze skvělou příležitost pro jemné doladění vzhledu produktu a umožňují obměnu produktu. S využitím koloidních disperzí můžeme vyrobit produkty, které jsou buď kompletně průhledné, nebo mají požadovanou barvu. Konečně, koloidní disperze s ovlivnitelnou velikostí částic, mohou být přidány do produktu s různým stupněm průhlednosti, aniž by došlo ke změně jeho vzhledu. Toto je zvláště důležité u barevných produktů, kde za účelem uchování barevnosti produktu musí být velikost částic dostatečně malá. (35)

3.13. Biodostupnost

Biodostupnost je rychle rozvíjející se otázkou v oblasti funkčních potravin. Rozpustnost a membránová propustnost mnoha léků a bioaktivních molekul jsou dva hlavní faktory, které ovlivňují jejich biodostupnost po perorálním podání. Většinou jsou tyto sloučeniny pevné krystalické látky za pokojové teploty, primárně ve formě špatně máčitelných prášků s velikostí částic v mikro- a milimetrech. Nízká rychlost absorpce ve vodě špatně rozpustných a především lipofilních látek z gastrointestinálního traktu je obecně připisována jejich špatné rozpustnosti v gastrointestinálních tekutinách. Pro porozumění a kontrolu biodostupnosti je nutné pochopit složité fyzikální a chemické reakce, které probíhají během trávicího procesu. Toto je však rozvíjející se oblast a její složitost není zcela pochopena. Trávení zahrnuje různé fyzikálně chemické procesy jako je rozkládání, emulgace, rozpouštění, enzymatické reakce, srážení a absorpce, které mohou být ovlivněny složením a strukturou produktu.

Existují různé přístupy ke zlepšení biodostupnosti. Špatná rozpustnost bioaktivních molekul může být v zásadě zvýšená následujícími technologiemi:

chemickou modifikací, redukcí velikosti, hydrofilizací povrchu částic ke zlepšení jejich smáčivosti ve vodném prostředí, redukcí krystalinity látky nebo změnou polymorfní formy. Chemická modifikace není vždy možná, ale je úspěšně využitelná u fytosterolů. Esterifikace sterolů mastnými kyselinami se v současné době používá ke zvýšení jejich rozpustnosti v olejích. (40)

Amorfizace a změna polymorfní formy jsou další způsoby, jak zvýšit rozpustnost a optimalizovat dodávání špatně rozpustných potravních složek a léků. Je známo, že amorfní formy materiálu se rozpouští rychleji než krystalické. Zdá se tedy, že jsou velké rozdíly v biodostupnosti mezi amorfní a krystalickou formou sloučenin. Například amorfní fosforečnan železitý se používá jako zdroj železa, ale pokud je použita krystalická forma, je výsledek stejný jako v případě, když se železo nedodává.

Tyto pokročilé přístupy však vyžadují velmi dobré znalosti fyzikálně chemických vlastností daných sloučenin a jejich metabolismu. Koloidní disperse jako nosičové systémy řeší všechny otázky související s rozpustností stopových prvků a nutraceutik. Jejich aplikace je stále ve vývoji, očekává se ovšem jeho rychlý rozvoj v důsledku rostoucího zájmu o funkční potraviny. (35)

3.14. Příklady aplikací

Dodávání železa do potravních produktů nebo doplňků je jedním z nejvýznamnějších problémů. Obohacování potravin železem je velmi důležité, neboť tím pomáháme při jeho nedostatku a při anémii. Železo také podporuje duševní vývoj dětí a seniorů. Použití rozpustné soli, jako je síran železnatý, způsobuje kovovou chuť, výraznou oxidaci lipidů a dochází také ke komplexaci s dalšími součástmi - například s polyfenoly, což vede k nechtěným barevným změnám. Použitím stabilního, ale stále ve vodě rozpustného komplexu (NaFeEDTA) se zvyšuje stabilita produktu, ale nezabrání se tím dlouhodobé oxidaci nebo odbarvovacím procesům. Ovšem při použití nerozpustné soli fosforečnanu železnatého ve formě velkých částic, dochází zase k jeho sedimentaci v kapalných produktech a ke snížení biodostupnosti díky pomalému rozpouštění velkých částic. K vyřešení těchto problémů byl vyvinut obecný přístup založený na koloidních nosičových systémech, které umožňují nalézt správnou rovnováhu mezi rozpustností a disperzibilitou sloučenin. Takové koloidní částice nejsou rozpustné ve vodě, ale ve zředěných kyselinách, jako v žaludku, kde pH klesá k 1-2.

Některé fosforečnany železa mají také přijatelnou bílou barvu, která umožňuje jejich široké uplatnění v potravinách. Byl vyvinut jednoduchý proces syntézy fosforečnanů železa, které jsou stabilizované pomocí biopolymerů, což zvyšuje kompatibilitu výsledného produktu.

Dalším hlavním problémem souvisejícím s nutraceutiky, je jejich nízká rozpustnost ve vodě a omezená rozpustnost v olejích. Nízká rozpustnost ve vodě je překážkou při přípravě produktu s nízkým obsahem tuku, zatímco omezená rozpustnost v oleji limituje použití olejových systémů, ve kterých částečně rozpustné sloučeniny inklinují k rekrystalizaci do velmi velkých krystalů. Tímto se v mnoha případech mění struktura výrobku nepřijatelným způsobem. Například rostlinné steroly mají velmi nízkou rozpustnost ve vodě a omezenou rozpustnost v oleji, což způsobuje obtížnou výrobu produktů s jejich obsahem. Pokud jsou steroly dispergovány v olejové fázi, je největším problémem Ostwaldovo zrání, které vede ke krystalizaci. Původně malé krystaly rozpouštějí a velké krystaly rostou a stávají se nepřijatelně velkými, což mění strukturu produktu. K vyřešení tohoto problému byly vyvinuty estery sterolů s mastnými kyselinami. Estery sterolů jsou rozpustné v oleji, ale jejich využití v produktech s nízkým obsahem tuku je složité. Například v důsledku jejich velmi vysoké hydrofobicity se adsorbují na hydrofobním povrchu. Tento jev můžeme pozorovat tehdy, pokud je makroemulze uložena v plastovém obalu.

Dalším výrazným problémem při tvorbě emulzí je gravitací způsobená nestabilita (krémovatění). Pokud je velikost částic velká, rychlost krémovatění je vysoká a je proto nutné použít zahušťovadla nebo-li viskozifikanty. Koalescence je také možnou příčinou nestability, se kterou se setkáváme u mnoha makroemulzí. Tyto problémy mohou být vyřešeny nebo výrazně omezeny snížením velikosti částic disperze přípravou koloidních disperzí. Výsledkem je, že koloidní disperze umožňují přípravu produktu s prodlouženou trvanlivostí. Dle očekávání, jsou koloidní suspenze tvořené estery sterolů extrémně stabilní. Velikost částic a rozložení velikosti se nemění po dobu více než 3 měsíců. (35)

4. ROSTLINNÉ OLEJE

4.1. Hroznový olej

Hroznový olej je rostlinný olej, který se získává lisováním semen různých odrůd hroznů *Vitis vinifera*. Používá se jako salátový dressing, na fritování, pečení, jako masážní olej, je součástí krémů na opalování, vlasových produktů, tělových krémů, balzámů na rty a krémů na ruce. Většina hroznového oleje je vyrobena v Itálii, dalšími významnými producenty oleje je Francie, Španělsko a Argentina.

Hroznový olej obsahuje především tyto mastné kyseliny: 72% linolové kyseliny, 16% olejové kyseliny, 7% palmitové kyseliny a dále kyselinu stearovou, alfa-linolenovou a palmitoolejovou.(41) Hroznový olej obsahuje mnohem více linolové kyseliny, než řada dalších olejů. Hroznový olej také obsahuje 0,8-1,5 % nezmýdelnitelných fenolů (tokoferolů) a steroidů (kampesterol, beta-sitosterol a stigmasterol). Obsahuje také malé množství vitamínu E, ale ne tolik jako slunečnicový olej, olej z bavlny nebo rýžový olej.

Hroznový olej obsahuje různé antioxidanty, jako jsou polyfenoly a anthokyany, které mají léčebné účinky. Za studena lisovaný olej z hroznových jader neobsahuje dostatečné množství antioxidantů. Antioxidanty z hroznové slupky a jader jsou více koncentrovány v produktech, jako je hroznový džus a červené víno. Hroznový olej může způsobovat také alergické reakce.

Hroznový olej má relativně vysoký bod varu, přibližně 216°C, a proto se používá v gastronomii při vysokých teplotách, například ke smažení. Je součástí kosmetických výrobků určených na poškozené tkáně, podporuje regenerační a restrukturalizační vlastnosti pleti a také zajišťuje dobrou kontrolu hydratace pleti. Podporou buněčných membrán epitelálních buněk napomáhá k tomu, aby si pleť zachovala normální strukturu. Je také zvláště efektivní pro podporu pokožky kolem očí. Pokud je používán jako tělový krém, snižuje výskyt strií. Studie potvrzují, že hroznový olej zvyšuje hladinu HDL-cholesterolu a snižuje hladinu LDL-cholesterolu.

4.2. Lněný olej

Lněný olej je bezbarvý až nažloutlý olej získávaný ze sušených zralých semen lnu setého (*Linum usitatissimum*). Tento olej se získává lisováním za studena, někdy následuje extrakce rozpouštědlem. Lněný olej může oxidovat a polymerizovat do pevné formy. Díky této vlastnosti se používá ve směsi s jinými oleji, pryskyřicemi a rozpouštědly k impregnaci dřeva. Je to jedlý olej, ale díky své výrazné chuti a vůni má omezené použití ve výživě.

V porovnání s ostatními rostlinnými oleji obsahuje nejvyšší množství omega-3 mastných kyselin, především kyselinu alfa-linolenovou, která může snižovat zánět vedoucí k ateroskleróze a působí preventivně proti srdečním chorobám a arytmiím. Je také důležitá pro normální vývoj dětí. Mezi další mastné kyseliny vyskytující se v lněném oleji patří především nasycené kyseliny - palmitová a stearová, mononenasyčená kyselina olejová a kyselina linolová. (42)

Semena lnu obsahují lignany, které mají antioxidační a protirakovinové účinky. Ovšem extrahovaný lněný olej neobsahuje lignany vyskytující se v semenech a proto nemá stejné antioxidační vlastnosti. I v chladu podléhá lněný olej snadno oxidaci a žluknutí, což způsobuje nepříjemný zápach. Dokonce, i když je stále v chladu, má trvanlivost jen několik týdnů.

4.3. Olivový olej

Olivový olej je získáván z oliv (*Olea europea*), tradiční plodiny z oblasti Středozevního moře. Je používán v gastronomii, v kosmetice, léčivech, mýdlech a jako palivo do olejových lamp. Nejznámější oleje pocházejí ze Severní Ameriky, Španělska a Itálie, největší kvalitu má extra panenský olej z Itálie.

Olivový olej můžeme klasifikovat následovně.

- Panenský olej: tento olej byl získán pomocí fyzikálních prostředků, nikoli chemickým ošetřením.

- Čištěný olej: je chemicky ošetřený a to k neutralizaci silné chuti a k neutralizaci obsažených kyselin (mastných kyselin). Čištěný olej je považován za olej s nižší kvalitou než olej panenský. Oleje s nápisem *extra panenský a panenský olej* nemohou obsahovat žádné stopy čištěného oleje.
- Lisovaný olej: je olej získaný lisováním za tepla za přítomnosti rozpouštědel, jako je hexan.

Kvantitativní analýzou můžeme určit kyselost oleje, což je definováno jako množství kyseliny olejové v oleji. Toto je mírou chemické degradace oleje, tedy toho, jak se olej kazí. Mastné kyseliny se uvolňují z triglyceridů, čímž se zvyšuje číslo kyselosti a dochází ke žluknutí. Další příčinou chemického znehodnocování oleje je obsah organického peroxidu, který způsobuje oxidaci a žluknutí.

Olivový olej se skládá především ze směsi triglyceridů esterů kyseliny olejové a palmitové a dalších mastných kyselin, společně se stopami skvalenu, sterolů a fytosterolů. Složení se liší podle odrůdy, oblasti, nadmořské výšky, času sklizně a podle extrakčního procesu. Olivový olej obsahuje přírodní látky se silnými antioxidačními vlastnostmi, které dávají extra-panenskému oleji typickou hořkou a štiplavou chuť. Jsou to estery tyrosolu a hydroxytyrosolu, především oleocanthal a oleuropein. (43)

Důkazy z epidemiologických studií potvrzují, že zvýšený podíl mononenasycených tuků ve stravě souvisí se sníženým rizikem srdečních onemocnění. Toto je významné zejména proto, že olivový olej obsahuje vysoké množství těchto nenasycených kyselin, především kyseliny olejové. Klinická data ukazují, že konzumace olivového oleje má pozitivní vliv na zdraví srdce, přispívá ke snížení hladiny cholesterolu a snižuje oxidaci LDL cholesterolu. Olivový olej má také protizánětlivé, antitrombotické, antihypertenzní a vazodilatační účinky jak u lidí, tak u zvířat.

Extra panenský nebo panenský olivový olej obsahuje více mononenasycených mastných kyselin než jiné olivové oleje. Tyto druhy také obsahují více polyfenolů, které mají pozitivní vliv na srdce. Je také prokázáno, že snižuje hladinu krevního cukru a krevní tlak. Olivový olej obsahuje také antioxidanty, jako je vitamín E, karotenoidy

a oleuropein, což je sloučenina, která snižuje oxidaci LDL částic. Předběžné výzkumy naznačují, že olivový olej může mít podpůrné cytoprotektivní účinky při vředové chorobě a při rakovině žaludku. Toto ovšem vyžaduje další potvrzení studiemi in vivo. Bylo rovněž zjištěno, že olivový olej snižuje oxidační poškození DNA a RNA, což může být významným faktorem v prevenci rakoviny. Olivový olej také reguluje střevní peristaltiku a tím přispívá ke snížení plynatosti. Díky tomu, že změkčuje stolicí působí jako mírné laxativum. Olivový olej většinou nezpůsobuje alergické reakce a jako takový se používá v přípravcích, které obsahují lipofilní léčivé látky.

Nenasycené oleje, jako je olivový olej, mají krátkou dobu trvanlivosti a jsou náchylnější k oxidaci a ke žluknutí, což vede k tvorbě toxických vedlejších produktů a hořké chuti. Proto by měly být tyto oleje chráněny před teplem a světlem, a oleje, které vykazují známky kažení, by se neměly konzumovat.

4.4. Perillový olej

Perillový olej se získává ze semen a listů vytrvalých bylin rodu *Perilla frutescens*. Semena obsahují 35-45 % oleje, který se získává lisováním. Olej z listů se získává procesem destilace s vodní parou a je bohatý na řadu chemických látek, které se mohou lišit v závislosti na druhu rostliny. Hlavní sloučeninou, která je zde přítomna ve vysoké koncentraci a je zodpovědná za vůni a chuť, je perillaldehyd. Mezi další terpeny obsažené v tomto oleji patří limonen, farnesen a karyofylen.

Perillový olej se používá k různým účelům a má řadu příznivých účinků na zdraví. V některých oblastech Asie, je perillový olej používán jako jedlý olej, který je oceňován především pro jeho léčebné účinky, než pro jeho chuť. Perillový olej je významným zdrojem omega-3 mastné kyseliny alfa-linolenové (ALA). Asi 50-60 % oleje se skládá z ALA. Omega-3 mastné kyseliny jsou důležité pro naše zdraví z následujících důvodů:

- snižují riziko rakoviny prsu, rakoviny tlustého střeva, infarktu a dalších kardiovaskulárních chorob
- snižují závažnost alergií
- pomáhají v boji proti obezitě
- zlepšují paměť a koncentraci

- snižují symptomy a zánět spojený s revmatoidní artritidou, aterosklerózou a dalšími autoimunitními chorobami

Perillový olej se používá také v boji proti akné. Zklidňuje, podporuje regeneraci kůže a má významné antioxidační účinky na zralou pleť. Při pravidelném používání tohoto oleje se pleť stává jasnější a klidnější. Perillový olej ovlivňuje srážení krve a není proto vhodný pro lidi užívající antikoagulanty, jako je warfarin a aspirin. U některých lidí může také způsobovat kožní alergické reakce. Těhotné a kojící ženy by se měly vyhnout užívání tohoto oleje.

4.5. Podzemnicový olej

Tento olej se získává z Podzemnice olejné. V Čínské a asijské kuchyni je používán tak často, jako olivový olej v kuchyni Středomořské. Podzemnicový olej je oceňován především pro svůj vysoký bod varu v porovnání s ostatními jedlými oleji a proto se používá především na smažení.

Obsahuje především kyselinu olejovou a linolovou. Dále kyselinu palmitovou, arachidonovou, lignocerovou a další mastné kyseliny. U rafinovaných olejů jsou odstraněny alergeny a tudíž mohou být bezpečně používány u lidí, kteří trpí alergiemi. Ovšem, u za studena lisovaného oleje nejsou alergeny odstraněny a proto může být pro alergiky velmi nebezpečný. (44)

4.6. Sojový olej

Sojový olej je rostlinný olej extrahovaný ze semen sóji (*Glycine max*). Patří mezi nejvíce používané jedlé oleje. Je vhodný především na smažení a pečení.

Sojový olej obsahuje nenasycené mastné kyseliny, především kyselinu alfa-linolenovou, kyselinu linolovou a kyselinu olejovou. Obsahuje také nasycené mastné kyseliny, především kyselinu palmitovou a stearovou.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5. NANOEMULZE ROSTLINNÝCH OLEJŮ

5.1. Použité přístroje

Předvážky KERN KB, Čína

Homogenizátor Diap 900, Heildolph, Německo

Homogenizátor Ultra – Turrax, IKA, Německo

Homogenizátor IKA Magic LAB® - Module DISPAX - REACTOR® (DR)

Malvern Zetasizer – nanoseries, model Nano ZS, Size and Zeta potential particle sizer,

Malvern Instruments, Malvern, Velká Británie

Kyvety pro měření velikosti částic – Macro – Cuvette Plastbrand, PS

rozměry : 12,5 x 12,5 x 45 mm, Plastbrand, Wertheim, Německo

5.2. Chemikálie

Sojový lecitin hydrogenovaný, Vřídlo v. d., Karlovy Vary

Polysorbát 20, Biesterfeld Silcom, Praha

Triacetin, Sigma-Aldrich, Praha

Premix, Chemopharma Vídeň, pobočka Vrchlabí

Sojový olej, M&H, Blansko

Olivový olej, M&H, Blansko

Podzemnicový olej, M&H, Blansko

Lněný olej, M&H, Blansko

Perillový olej, M&H, Blansko

Hroznový olej, Makro, Hradec Králové

Koenzym Q10, Chemopharma Vídeň, pobočka Vrchlabí

Vitamín E, Chemopharma Vídeň, pobočka Vrchlabí

5.3. Složení nanoemulze

Emulgátor: jako emulgátor se ve většině případů používala směs hydrogenovaného sojového lecitinu a polysorbátu 20 v poměru 1:1.

- do kádinky se navážilo stejné množství lecitinu a polysorbátu 20 (25 g + 25g), poté se tyto látky zahřály v mikrovlnné troubě přibližně na 50 °C a míchaly se až do vzniku homogenní směsi

Konzervans: Premix - směs solí kyseliny benzoové a sorbové

Vnější fáze: je polární. Skládá se z čištěné vody, emulgátoru a konzervační látky. Koncentrace emulgátoru ve vnější fázi se měnila (0,5%, 0,75 %, 1%, 1,5 %). Koncentrace konzervační látky byla 0,4%.

- na předvážkách se do kádinky o objemu 1000 ml navážilo potřebné množství emulgátoru a konzervační látky a toto se rozpustilo v předepsaném množství zahřáté čištěné vody. Roztok byl uchováván v litrových skleněných lahvích.

Tabulka 1: Složení vnější fáze

Navazovaná látka	Navazované množství [g]
Emulgátor	5 - 15
Konzervační látka	4
Čištěná voda	981 - 991

Jelikož byla spotřeba vnější fáze vysoká, nadále jsem si připravovala 3% roztok emulgátoru ve vodě, který jsem si poté ředila podle aktuálně potřebné koncentrace emulgátoru.

Tabulka 2: Složení zásobního roztoku vnější fáze

Navazovaná látka	Navazované množství [g]
Emulgátor	90
Konzervační látka	12
Čištěná voda	2898

Vnitřní fáze: je nepolární – olejová. Postupně se měnily jednotlivé používané oleje (sojový, olivový, hroznový, podzemnicový a lněný olej). Zkoušela se také kombinace olejů s triacetinem, polysorbátem 20 a lecitinem v různých poměrech. Koncentrace vnitřní fáze se také měnila. Pohybovala se v rozmezí 5 – 25 %.

5.4. Postup přípravy nanoemulze

- do kádinky se navážilo předepsané množství vnější fáze s emulgátorem
- aktuální acidita vnější fáze se u většiny emulzí upravila přidáním 10% NaOH na pH 9
- v mikrovlnné troubě se zahřála na požadovanou teplotu (40°C, 50°C, 60 °C)
- kádinka se umístila pod homogenizátor Diax 900, Heildolph, kdy hrot turbíny o průměru 10 mm byl asi 1 cm ode dna kádinky
- po zapnutí homogenizátoru se postupně zvyšovaly otáčky až na maximum
- poté se najednou přidala vnitřní olejová fáze předepsaného složení, také předem zahřátá na předepsanou teplotu
- míchání trvalo po předepsanou dobu (nejčastěji 60 sekund)
- poté následovalo měření velikosti částic

5.5. Měření velikosti částic

Velikost částic byla měřena přístrojem Malvern Zetasizer – nanoseries (obr. 2) v kyvetách vyrobených z polystyrenu (obr. 3). Komora přístroje byla temperována na 25°C. Pro každou koncentraci byla provedena tři měření.



Obr. 2 Malvern Zetasizer – nanoseries



Obr. 3 Kyveta pro měření velikosti částic

5.6. Emulze připravené za použití homogenizátoru Diax 900, Heildolph

5.6.1. Emulze se sojovým olejem

Emulze obsahovaly jako vnitřní fázi pouze sojový olej. Vnitřní i vnější fáze se předem v mikrovlnné troubě zahřály na 40 – 60°C. Homogenizace trvala 60 sekund.

Složení emulzí odpovídá tabulce 3.

Tabulka 3: Složení emulzí se sojovým olejem.

č. vzorku	hm. emulze [g]	konc. em. [%]	konc. emulg. [%]	teplota [°C]
1	100	5	0,5	50
2	100	10	0,5	50
3	100	15	0,5	50
4	200	5	0,5	40
5	200	5	0,5	50
6	200	5	0,5	60
7	200	5	0,75	40
8	200	5	0,75	50
9	200	5	0,75	60

Stejným způsobem, jako vzorky č. 4-9, byly připraveny vzorky číslo 10-15. Byly homogenizovány turbínou o průměru 19 mm. Při homogenizaci docházelo k tvorbě velkého množství pěny a k jejímu vytékání z kádinky.

5.6.2. Emulze se sojovým olejem s přidavkem triacetinu, polysorbátu 20 nebo lecitinu

Vnitřní olejová fáze obsahovala triacetin, polysorbát 20 nebo lecitin v níže uvedené koncentraci. Jak vnější, tak vnitřní fáze byly před emulgací zahřáty na teplotu v rozmezí 50 – 55 °C. Složení emulzí odpovídá tabulce 4.

Tabulka 4: Složení emulzí se sojovým olejem a triacetinem, polysorbátem 20 nebo lecitinem. Hmotnost emulze 100g, koncentrace emulze 5%, koncentrace emulgátoru 0,75%. Různá koncentrace triacetinu, polysorbátu 20 a lecitinu.

č. vzorku	konc. triacetinu [%]	konc. polysorbátu 20 [%]	konc. lecitinu [%]
16	10	0	0
17	25	0	0
18	50	0	0
19	0	2	0
20	0	5	0
21	0	10	0
22	0	0	5
23	0	0	10
24	0	0	20

Vzorky číslo 25 – 27 měly stejné složení jako vzorky číslo 16 – 18, pouze aktuální acidita vnější fáze byla upravena na pH 11.

5.6.3. Emulze se sojovým olejem s přidavkem triacetinu

Byly připraveny následující emulze s menšími rozdíly v koncentraci triacetinu. Jejich složení odpovídá tabulce 5.

Tabulka 5: Složení emulzí se sojovým olejem a triacetinem. Hmotnost emulze 100g, koncentrace emulze 5%, koncentrace emulgátoru 0,75%. Různá koncentrace triacetinu.

č. vzorku	koncentrace triacetinu [%]
28	5
29	10
30	17,5
31	25

5.6.4. Emulze se sojovým olejem s přídavkem triacetinu a polysorbátu 20

Byly připraveny emulze, kde se vnitřní fáze skládala ze sojového oleje, triacetinu a polysorbátu 20 v předepsané koncentraci. Složení emulzí odpovídá tabulce 6.

Tabulka 6: Složení emulzí se sojovým olejem, triacetinem a polysorbátem 20. Hmotnost emulze 100g, koncentrace emulze 5%, koncentrace emulgátoru 0,75%. Různá koncentrace triacetinu a polysorbátu 20.

č. vzorku	koncentrace triacetinu [%]	koncentrace polysorbátu 20 [%]
32	10	5
33	10	10
34	5	5
35	10	2
36	5	2

5.6.5. Emulze se sojovým olejem s přídavkem triacetinu a polysorbátu 20 – vliv režimu míchání

Byly připraveny emulze s různým složením vnitřní olejové fáze s cílem zjistit, jaký vliv má režim míchání na výslednou velikost částic. Složení emulzí odpovídá tabulce 7, rozdíl je pouze v tom, že vzorky 37-39 byly homogenizovány standardně po dobu 60 s a vzorky 40 – 42 byly homogenizovány 60 s, poté se nechaly 90 s stát a opětovně se homogenizovaly 60 s.

Tabulka 7: Složení emulzí se sojovým olejem, triacetinem a polysorbátem 20 - vliv režimu míchání. Koncentrace emulze 5%, koncentrace emulgátoru 0,75%. Různá koncentrace triacetinu a polysorbátu 20.

č. vzorku	hm. emulze [g]	koncentrace triacetinu [%]	koncentrace polysorbátu 20 [%]
37	200	0	0
38	100	0	10
39	100	5	2
40	200	0	0
41	100	0	10
42	100	5	2

5.7. Emulze připravené za použití zařízení IKA Magic LAB®

5.7.1. Postup přípravy emulze

- připravovalo se celkem 500 g emulze
- do kádinky se navázilo předepsané množství vnější fáze s emulgátorem
- aktuální acidita vnější fáze se upravila přidáním 10% NaOH na pH 9
- v mikrovlnné troubě se zahřála přibližně na teplotu 50 °C
- kádinka se umístila pod homogenizátor Ultra – Turrax, IKA, kdy hrot turbíny byl asi 1 cm ode dna kádinky
- po zapnutí homogenizátoru se postupně zvyšovaly otáčky až na stupeň 4
- poté se najednou přidala vnitřní olejová fáze předepsaného složení, také předem zahřátá na teplotu přibližně 50 °C
- míchání trvalo po předepsanou dobu
- poté se vzniklá emulze přelila do homogenizátoru IKA Magic LAB® - Module DISPAX - REACTOR® (DR) a míchala se při určitých otáčkách (nejčastěji 26 000 otáček) po předepsanou dobu (nejčastěji 3,5 minuty)
- poté následovalo měření velikosti částic
- mezi homogenizací jednotlivých emulzí bylo zařízení IKA Magic LAB® pokaždé dvakrát promyto 0,5 l čištěné vody

5.7.2. Emulze lišící se druhem oleje

Byly připraveny dva typy emulzí lišící se složením vnitřní fáze. Ta byla tvořena různými oleji (sojový olej, hroznový olej, podzemnicový olej, lněný olej a olivový olej). Byl použit buď samotný olej, nebo směs oleje s polysorbátem 20 v 10 % koncentraci. Složení emulzí odpovídá tabulce 8.

Tabulka 8: Složení emulzí lišící se druhem oleje. Hmotnost emulze 500 g, koncentrace emulze 5%, koncentrace emulgátoru 0,75%. Různá koncentrace polysorbátu 20 v oleji.

č. vzorku	druh oleje	koncentrace polysorbátu 20 [%]
43	sojový o.	0
44	sojový o.	10
45	hroznový o.	0
46	hroznový o.	10
47	podzemnicový o.	0
48	podzemnicový o.	10
49	lněný o.	0
50	lněný o.	10
51	olivový o.	0
52	olivový o.	10

5.7.3. Emulze s hroznovým olejem

Byly připraveny emulze, které se lišily celkovou koncentrací, tedy množstvím vnitřní fáze - hroznového oleje. Složení emulzí odpovídá tabulce 9.

Tabulka 9: Složení emulzí s hroznovým olejem. Hmotnost emulze 500 g, koncentrace emulgátoru 0,75%. Různá koncentrace emulze.

č. vzorku	koncentrace emulze [%]
53	10
54	15
55	20
56	25

5.7.4. Emulze s hroznovým olejem lišící se koncentrací emulgátoru

Při míchání již hotové emulze v zařízení IKA Magic LAB® docházelo k rychlému nárůstu teploty až k hodnotám přesahujícím 75°C. Proto se při přípravě emulze vnitřní ani vnější fáze nezahřívaly v mikrovlnné troubě a homogenizace emulze se prodloužila na 75 sekund. Teploty emulzí po jejich homogenizaci v zařízení IKA Magic LAB® neměly přesáhnout 65 °C.

Emulze byly připraveny s cílem nalézt takovou koncentraci emulgátoru, která bude poskytovat nejlepší výsledky. Jejich složení odpovídá tabulce 10.

Tabulka 10: Složení emulzí s hroznovým olejem lišící se koncentrací emulgátoru. Hmotnost emulze 500 g, koncentrace emulze 15 %.

č. vzorku	koncentrace emulgátoru [%]
57	0,5
58	0,75
59	1
60	1,25
61	1,5

5.7.5. Emulze s hroznovým a olivovým olejem – vliv doby homogenizace

U emulzí se sledovalo, jaký vliv má doba homogenizace v zařízení IKA Magic LAB® na výslednou velikost částic emulze. U jednotlivých emulzí se lišilo složení vnitřní fáze (hroznový olej nebo olivový olej), koncentrace emulgátoru a doba míchání. Složení emulzí odpovídá tabulce 11.

Tabulka 11: Složení emulzí s hroznovým a olivovým olejem. Hmotnost emulze 500 g, koncentrace emulze 15%. Různá koncentrace emulgátoru a různá doba homogenizace.

č. vzorku	druh oleje	koncentrace emulgátoru [%]	doba míchání [min]
62	hroznový o.	0,75	2
63	olivový o.	0,75	2
64	hroznový o.	0,75	3,5
65	olivový o.	0,75	3,5
66	hroznový o.	0,75	5
67	olivový o.	0,75	5
68	hroznový o.	1,25	2
69	olivový o.	1,25	2
70	hroznový o.	1,25	3,5
71	olivový o.	1,25	3,5
72	hroznový o.	1,25	5
73	olivový o.	1,25	5
74	hroznový o.	1,5	3,5
75	hroznový o.	1,5	5

Pozn.: U vzorků číslo 74 a 75 byla koncentrace emulze 25%.

Následující emulze měly obdobné složení jako výše uvedené emulze. Aktuální acidita vnější fáze se neupravovala. Doba míchání v homogenizátoru IKA Magic LAB® byla 5 minut. Bylo změřeno až pH výsledné emulze, které bylo 5,5. Složení emulzí odpovídá tabulce 12.

Tabulka 12: Složení emulzí s hroznovým a olivovým olejem. Hmotnost emulze 500 g, koncentrace emulze 15%. Různá koncentrace emulgátoru.

č. vzorku	druh oleje	koncentrace emulgátoru [%]
76	hroznový o.	0,75
77	olivový o.	0,75
78	hroznový o.	1,25
79	olivový o.	1,25

5.7.6. Emulze s hroznovým a olivovým olejem – vliv intenzity homogenizace

U emulzí se sledovalo, jaký vliv má frekvence otáček turbíny při míchání v homogenizátoru IKA Magic LAB® na výslednou velikost částic emulze. U jednotlivých emulzí se lišilo složení vnitřní fáze (hroznový olej nebo olivový olej), koncentrace emulgátoru, počet otáček a doba míchání. Při počtu otáček 23000 probíhalo míchání emulze 6 minut a při 20 000 otáčkách 7 minut, a to vždycky tak, aby teplota emulze nepřekročila 65 °C. Složení emulzí odpovídá tabulce 13.

Tabulka 13: Složení emulzí s hroznovým a olivovým olejem. Hmotnost emulze 500 g, koncentrace emulze 15%. Různá koncentrace emulgátoru a různý počet otáček.

č. vzorku	druh oleje	koncentrace emulgátoru [%]	počet otáček
80	hroznový o.	0,75	23 000
81	olivový o.	0,75	23 000
82	hroznový o.	1,25	23 000
83	olivový o.	1,25	23 000
84	hroznový o.	0,75	20 000
85	olivový o.	0,75	20 000
86	hroznový o.	1,25	20 000
87	olivový o.	1,25	20 000

5.7.7. Emulze s koenzymem Q10 a vitamínem E

Emulze obsahovaly jako vnitřní fázi hroznový olej s předepsanou koncentrací koenzymu Q10 nebo vitamínu E. Lišila se celková koncentrace emulze. Emulze byly míchány v homogenizátoru IKA Magic LAB® po dobu 5 minut na 26 000 otáček. Složení emulzí odpovídá tabulce 14.

Tabulka 14: Složení emulzí s koenzymem Q10 a vitamínem E. Hmotnost emulze 500g, koncentrace emulgátoru 0,75%. Různá koncentrace emulze.

č. vzorku	koenzym Q10 [%]	vitamín E [%]	koncentrace emulze [%]
88	10	0	15
89	10	0	5
90	0	3	15
91	0	3	5

5.7.8. Emulze s perillovým olejem

Emulze obsahovaly jako vnitřní fázi hroznový olej s předepsanou koncentrací perillového oleje. Lišila se celková koncentrace emulze. Emulze byly míchány v homogenizátoru IKA Magic LAB® po dobu 5 minut na 26 000 otáček. Složení emulzí odpovídá tabulce 15.

Tabulka 15: Složení emulzí s perillovým olejem. Hmotnost emulze 500 g, koncentrace emulgátoru 0,75%. Různá koncentrace emulze.

č. vzorku	perillový olej [%]	koncentrace emulze [%]
92	33	15
93	33	5

5.7.9. Emulze s olivovým olejem

Emulze obsahovaly jako vnitřní fázi olivový olej. Emulze byly po homogenizaci buďto ochlazeny na 18 °C nebo zahřáty na 50 °C a poté byly míchány v homogenizátoru IKA Magic LAB® po dobu 5 minut na 26 000 otáček. Teploty po ukončení míchání byly ihned zaznamenávány. Složení emulzí odpovídá tabulce 16.

Tabulka 16: Složení emulzí s olivovým olejem. Hmotnost emulze 500 g. Různá koncentrace emulze i emulgátoru. Zaznamenané teploty emulzí.

č. vzorku	konc. em. [%]	konc. emulg. [%]	počáteční teplota [°C]	konečná teplota [°C]
94	5	0,75	18	59
95	15	0,75	18	59
96	5	1,25	18	57
97	15	1,25	18	58
98	5	0,75	50	68
99	15	0,75	50	74
100	5	1,25	50	71
101	15	1,25	50	75

5.7.10 Emulze s různým složením emulgátoru

Vnitřní fáze emulzí byla tvořena olivovým olejem. Emulze se lišily typem emulgátoru. Jako emulgátor byl použit samotný lecitin, samotný polysorbát 20, směs lecitinu a polysorbátu 20 v poměru 1:2 a v poměru 2:1. Tyto emulgátory byly vždy přidány v předepsané koncentraci. Všechny emulze byly míchány v homogenizátoru IKA Magic LAB® po dobu 5 minut na 26 000 otáček. Složení emulzí odpovídá tabulce 17.

Tabulka 17: Složení emulzí s různým složením emulgátoru. Hmotnost emulze 500 g, koncentrace emulze 15 %. Různé složení směsi polysorbátu 20 a lecitinu jako emulgátoru.

č. vzorku	lecitin [%]	polysorbát 20 [%]	L : P20 = 2:1[%]	L : P20 = 1:2[%]
102	0,75	0	0	0
103	1,25	0	0	0
104	0	0,75	0	0
105	0	1,25	0	0
106	0	0	0,75	0
107	0	0	1,25	0
108	5	0	0	0,75
109	0	0	0	1,25
110	0	0	0,5	0
111	0	0	1	0
112	0	0	1,5	0
113	1,5	0	0	0

6. TABULKA VÝSLEDKŮ A OBRÁZKY

Tabulka 18: Granulometrie částic nanoemulze oleje. Intenzitní průměr, polydisperzita a jednotlivé píky.

č. vzorku	Z-Ave (nm)	Pdl	P1 (nm)	P2 (nm)	P3 (nm)	P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)
1-1	226,1	0,421	328,4	8,928	0	92,2	7,8	0
1-2	197,1	0,830	395,6	10,51	0	90,8	9,2	0
1-3	209,0	0,584	382,7	11,2	0	90,3	9,7	0
2-1	262,20	0,376	278,60	5463,00	0,00	98,4	1,6	0,0
2-2	266,70	0,412	304,40	8,17	5264,00	91,6	5,1	3,4
2-3	272,40	0,454	333,60	10,20	5388,00	91,3	6,5	2,2
3-1	274,70	0,240	343,30	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
3-2	288,50	0,241	358,00	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
3-3	288,60	0,444	363,50	4983,00	0,00	96,3	3,7	0,0
4-1	504,10	0,109	543,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
4-2	575,90	0,077	602,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
4-3	583,30	0,224	698,40	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
5-1	483,10	0,179	509,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
5-2	566,30	0,233	573,60	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
5-3	536,50	0,204	651,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
6-1	521,90	0,229	513,10	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
6-2	533,90	0,026	542,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
6-3	484,40	0,124	530,30	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
7-1	441,00	0,034	456,00	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
7-2	509,00	0,329	511,80	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
7-3	603,30	0,080	678,10	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
8-1	480,50	0,394	417,10	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
8-2	435,50	0,283	467,60	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
8-3	417,80	0,453	481,30	13,05	5372,00	91,6	5,5	2,9
9-1	480,10	0,051	501,80	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
9-2	573,90	0,024	642,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
9-3	575,30	0,252	740,90	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
10-1	31,03	0,771	192,90	20,31	0,00	50,6	49,4	0,0
10-2	31,40	0,739	31,96	410,30	2,69	63,1	36,2	0,7
10-3	34,02	0,820	80,03	14,73	814,50	42,6	31,2	26,2
11-1	30,82	0,812	31,38	290,30	7,27	51,6	39,5	8,9

11-2	30,28	0,715	104,50	16,49	3308,00	53,8	38,2	8,0
11-3	33,42	0,560	117,20	15,19	4788,00	60,1	37,5	2,3
12-1	37,11	0,874	232,90	19,26	3662,00	63,9	34,3	1,8
12-2	38,84	0,540	48,55	431,40	8,96	54,9	31,0	14,1
12-3	35,68	0,582	180,50	20,44	0,00	56,8	43,2	0,0
13-1	38,68	0,920	427,70	24,60	3695,00	50,0	45,1	5,0
13-2	33,26	0,862	283,50	22,03	7,03	51,7	40,2	8,1
13-3	25,91	0,801	34,23	396,40	8,25	54,2	30,1	15,7
14-1	37,66	0,876	374,40	17,94	0,00	62,4	37,6	0,0
14-2	34,39	0,996	268,20	20,15	2,95	56,7	42,5	0,8
14-3	34,33	0,893	18,51	548,80	79,08	36,8	36,4	26,8
15-1	31,20	0,894	326,70	19,94	0,00	55,2	44,8	0,0
15-2	30,65	0,780	27,69	461,10	0,00	31,0	39,0	0,0
15-3	30,54	0,789	26,16	203,60	3760,00	53,6	41,1	5,3
16-1	404,30	0,206	459,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
16-2	526,60	0,006	586,70	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
16-3	452,70	0,281	587,80	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
17-1	446,00	0,16	533,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
17-2	473,40	0,342	646,800	9,34	0,00	94,6	5,4	0,0
17-3	163,00	1,000	659,000	17,36	0,00	90,4	9,6	0,0
18-1	484,30	0,275	507,300	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
18-2	426,00	0,424	634,100	9,41	0,00	93,0	7,0	0,0
18-3	355,60	0,746	738,700	9,56	25,62	88,8	5,7	5,4
19-1	405,50	0,290	450,000	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
19-2	423,50	0,480	569,700	9,86	0,00	91,8	8,2	0,0
19-3	354,10	0,956	773,000	16,21	7,37	89,5	7,4	3,1
20-1	355,70	0,554	281,400	5383,00	0,00	92,5	7,5	0,0
20-2	298,00	0,616	528,000	10,27	0,00	89,4	10,6	0,0
20-3	140,30	1,000	448,200	15,11	6,27	83,0	12,1	4,9
21-1	354,00	0,397	315,400	0,00	0,00	10,0	0,0	0,0
21-2	427,60	0,468	427,200	6,58	0,00	93,9	6,1	0,0
21-3	317,40	0,493	495,100	7,63	0,00	92,4	7,6	0,0
22-1	133,70	1,000	586,20	20,25	0,00	88,3	11,7	0,0
22-2	123,70	1,000	537,20	22,98	7,14	84,7	10,6	4,4
22-3	125,40	1,000	553,80	24,18	0,00	89,0	11,0	0,0
23-1	66,78	1,000	332,50	17,55	4796,00	73,8	21,9	4,2
23-2	58,25	1,000	330,60	19,59	4755,00	70,4	24,5	5,1
23-3	72,82	1,000	388,00	32,58	10,83	67,5	14,2	13,8

24-1	44,82	1,000	354,40	16,92	57,29	63,6	25,9	6,1
24-2	40,86	1,000	375,80	22,45	3,72	61,9	35,2	2,9
24-3	37,63	1,000	278,80	16,56	4627,00	68,7	30,2	1,0
25-1	471,10	0,047	518,800	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
25-2	493,40	0,234	619,900	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
25-3	392,10	0,488	623,500	10,54	0,00	92,1	7,9	0,0
26-1	437,10	0,194	511,000	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
26-2	445,20	0,273	581,500	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
26-3	410,20	0,582	697,600	12,26	0,00	92,8	7,2	0,0
27-1	482,50	0,429	645,60	9,71	0,00	94,2	5,8	0,0
27-2	441,10	0,527	651,00	12,21	0,00	92,0	8,0	0,0
27-3	419,10	0,534	544,30	11,53	0,00	90,8	9,2	0,0
28-1	469,20	0,254	521,10	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
28-2	463,30	0,283	567,80	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
28-3	443,20	0,491	594,70	12,23	0,00	94,1	5,9	0,0
29-1	541,20	0,171	596,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
29-2	552,70	0,123	607,40	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
29-3	631,50	0,046	689,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
30-1	501,50	0,187	551,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
30-2	577,00	0,194	647,30	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
30-3	622,10	0,102	664,00	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
31-1	567,70	0,144	586,40	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
31-2	636,00	0,479	622,70	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
31-3	655,30	0,107	694,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
32-1	553,80	0,087	602,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
32-2	561,30	0,218	656,90	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
32-3	638,90	0,194	738,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
33-1	972,20	1,000	694,90	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
33-2	649,00	0,164	721,60	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
33-3	950,40	1,000	751,00	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
34-1	624,50	0,030	653,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
34-2	568,20	0,228	644,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
34-3	696,20	0,612	683,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
35-1	609,30	0,119	615,40	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
35-2	597,80	0,088	659,80	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
35-3	593,40	0,020	654,30	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
36-1	598,90	0,312	604,60	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
36-2	563,50	0,241	577,70	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0

36-3	560,50	0,044	611,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
37-1	522,10	0,046	511,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
37-2	527,90	0,009	590,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
37-3	585,30	0,328	727,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
38-1	458,20	0,330	413,40	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
38-2	441,60	0,283	473,00	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
38-3	502,00	0,299	658,60	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
39-1	589,20	0,117	606,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
39-2	698,80	0,552	677,30	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
39-3	571,70	0,189	669,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
40-1	401,20	0,298	527,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
40-2	377,10	0,409	548,90	11,80	0,00	93,7	6,3	0,0
40-3	323,50	0,537	521,40	12,03	0,00	92,2	7,8	0,0
41-1	566,70	0,115	582,00	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
41-2	544,90	0,095	601,40	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
41-3	560,40	0,272	697,00	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
42-1	539,10	0,116	621,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
42-2	550,30	0,156	645,50	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
42-3	518,90	0,214	643,30	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
43-1	61,33	0,663	186,40	22,03	4654,00	68,7	27,5	3,8
43-2	59,78	0,634	327,50	40,30	6,98	55,5	40,1	3,9
43-3	57,58	0,705	186,80	25,58	4822,00	67,5	29,9	1,6
44-1	37,76	0,774	121,90	21,91	4132,00	61,7	34,0	4,3
44-2	42,96	0,550	149,20	26,78	5,62	54,2	38,4	3,9
44-3	41,92	0,552	82,46	3127,00	0,00	94,1	5,9	0,0
45-1	39,09	0,562	124,60	20,53	4,93	65,7	31,0	3,2
45-2	38,87	0,541	96,54	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
45-3	40,84	0,508	102,90	22,13	4625,00	62,1	33,8	4,1
46-1	33,00	0,527	32,47	156,70	4,99	56,2	39,7	4,1
46-2	35,86	0,460	34,39	317,90	5,32	63,8	30,7	5,5
46-3	35,07	0,497	95,45	22,74	4390,00	54,3	38,8	4,0
47-1	57,27	0,626	256,00	40,88	9,62	59,1	30,6	10,4
47-2	44,62	1,000	187,60	24,53	4739,00	62,4	34,4	3,2
47-3	48,57	0,638	88,28	397,50	14,14	50,6	30,4	19,0
48-1	47,12	0,519	116,40	17,21	4262,00	69,2	26,3	4,5
48-2	49,28	0,541	101,00	16,63	4029,00	65,5	24,5	10,1
48-3	45,66	0,751	129,70	19,55	4197,00	59,7	31,8	8,5
49-1	50,82	0,520	98,64	12,14	2633,00	76,9	14,2	8,9

49-2	46,52	0,734	101,50	4216,00	0,00	94,2	5,8	0,0
49-3	50,73	0,544	195,50	24,11	3956,00	65,5	33,1	1,4
50-1	43,39	0,537	72,48	801,80	9,41	70,8	17,1	12,2
50-2	45,78	0,577	156,90	24,17	5,97	62,9	33,3	3,9
50-3	45,51	0,558	154,20	25,88	5,30	61,0	34,9	3,1
51-1	58,86	0,635	115,00	695,70	16,17	55,3	25,5	19,2
51-2	61,54	0,646	415,50	66,05	12,08	44,5	43,6	11,9
51-3	60,67	0,625	293,30	55,75	10,63	51,7	37,9	10,4
52-1	49,02	0,900	161,40	22,93	3653,00	64,3	28,5	7,3
52-2	58,57	0,618	78,66	387,50	12,56	47,7	38,4	13,9
52-3	51,80	0,950	72,48	294,30	12,90	47,7	36,0	13,0
53-1	63,24	0,744	139,90	22,82	4681,00	72,2	22,4	5,4
53-2	70,30	0,570	183,70	23,31	4097,00	73,6	22,7	3,7
53-3	64,55	0,567	218,00	42,28	7,86	60,2	35,8	4,0
54-1	76,77	0,553	169,10	26348,00	4517,00	77,6	19,2	3,3
54-2	74,85	0,512	152,20	15,53	3792,00	87,5	8,5	4,0
54-3	70,33	0,499	126,90	21,23	4627,00	80,4	13,9	4,0
55-1	110,50	0,481	179,70	20,45	4388,00	78,2	13,9	7,9
55-2	98,28	0,577	154,10	1031,00	15,04	69,7	21,5	8,8
55-3	93,21	0,584	237,20	28,60	4679,00	77,1	21,4	1,5
56-1	111,70	0,594	290,80	13,04	0,00	94,1	5,9	0,0
56-2	116,60	0,537	380,20	16,56	0,00	92,3	7,7	0,0
56-3	102,90	0,742	175,90	19,84	4181,00	80,7	10,6	8,7
57-1	88,88	0,572	185,80	25,75	7,53	83,1	15,3	1,7
57-2	89,77	0,501	167,40	18,04	4059,00	85,9	10,5	3,7
57-3	88,40	0,575	243,90	50,72	0,00	72,4	27,6	0,0
58-1	86,37	0,527	197,30	40,30	4705,00	74,4	22,4	3,2
58-2	82,11	0,595	95,47	548,80	12,42	56,3	35,7	8,0
58-3	79,93	0,581	155,70	19,55	3924,00	76,6	16,3	7,1
59-1	117,50	0,605	319,40	35,06	0,00	78,9	21,1	0,0
59-2	95,67	0,932	323,30	57,91	11,93	61,3	28,2	5,4
59-3	106,50	0,639	461,20	25,57	0,00	85,8	14,2	0,0
60-1	62,54	0,563	137,60	22,43	3903,00	73,4	21,1	5,5
60-2	64,98	0,514	162,10	25,41	4567,00	73,6	24,4	2,0
60-3	62,20	0,581	165,20	15,17	3967,00	84,4	14,2	1,4
61-1	57,04	0,840	110,10	14,71	2144,00	68,7	16,0	15,3
61-2	61,91	0,502	71,98	568,10	9,91	62,2	29,6	8,2
61-3	63,31	0,531	60,27	536,50	11,55	53,6	37,1	9,3

62-1	101,00	0,533	191,90	27,89	4370,00	74,7	17,6	7,7
62-2	99,28	0,607	250,60	34,27	4022,00	75,9	17,8	3,4
62-3	99,80	0,540	241,50	30,70	4220,00	75,4	20,5	4,2
63-1	100,90	0,658	272,80	30,35	4722,00	75,0	20,4	3,0
63-2	96,62	0,724	368,10	49,19	0,00	70,5	29,5	0,0
63-3	91,86	0,811	251,10	35,73	4671,00	70,2	24,5	5,3
64-1	77,95	0,565	177,70	26,79	2,91	77,4	16,7	3,2
64-2	77,45	0,564	235,30	17,91	0,00	87,4	12,6	0,0
64-3	74,06	0,615	175,40	11,27	0,00	92,4	7,6	0,0
65-1	72,48	0,621	155,60	13,04	3327,00	83,8	11,6	4,6
65-2	75,77	0,561	153,10	18,16	4427,00	79,8	16,5	.,7
65-3	76,08	0,555	148,00	16,10	3173,00	79,3	13,7	7,0
66-1	76,19	0,556	206,50	29,18	0,00	77,2	22,8	0,0
66-2	78,08	0,557	199,80	29,92	0,00	79,1	20,9	0,0
66-3	78,28	0,559	159,80	10,88	4642,00	92,5	6,2	1,3
67-1	68,95	0,606	140,40	29,92	4936,00	71,3	23,8	4,9
67-2	71,46	0,545	176,70	23,04	4256,00	78,0	18,4	2,2
67-3	70,45	0,534	159,10	32,28	4792,00	71,7	24,7	3,6
68-1	61,71	1,000	296,00	30,25	4448,00	69,8	29,2	1,0
68-2	74,68	0,588	146,10	16,97	3903,00	71,2	18,0	10,2
68-3	59,67	0,983	217,80	24,88	4062,00	72,5	22,5	2,8
69-1	86,57	0,690	315,60	53,46	18,02	70,1	15,5	14,3
69-2	79,26	0,726	254,90	26,06	0,00	76,4	23,6	0,0
69-3	85,75	0,682	296,70	35,21	3761,00	67,2	23,3	5,3
70-1	55,60	0,626	231,90	31,56	0,00	61,4	38,6	0,0
70-2	51,82	0,842	157,00	23,88	4704,00	63,7	31,5	4,8
70-3	57,98	0,549	93,68	596,60	11,02	63,7	24,3	12,0
71-1	53,81	0,571	109,40	13,43	2398,00	75,5	14,2	10,4
71-2	50,92	0,549	139,00	4,40	4323,00	97,3	1,5	1,2
71-3	50,86	0,566	146,00	18,85	0,00	74,2	25,8	0,0
72-1	49,31	0,570	121,80	18,07	4,24	80,4	18,2	1,4
72-2	52,58	0,485	82,36	1664,00	11,15	72,6	14,0	13,4
72-3	50,15	0,698	112,80	17,74	4939,00	73,1	22,0	3,2
73-1	46,16	0,561	128,10	21,21	0,00	72,4	27,6	0,0
73-2	45,10	0,562	155,50	27,06	0,00	62,0	38,0	0,0
73-3	45,74	0,555	140,20	24,06	0,00	66,1	33,9	0,0
74-1	63,49	0,555	147,40	3977	2,842	97,6	1,8	0,6
74-2	61,94	0,626	164,00	25,88	0	75,9	24,1	0

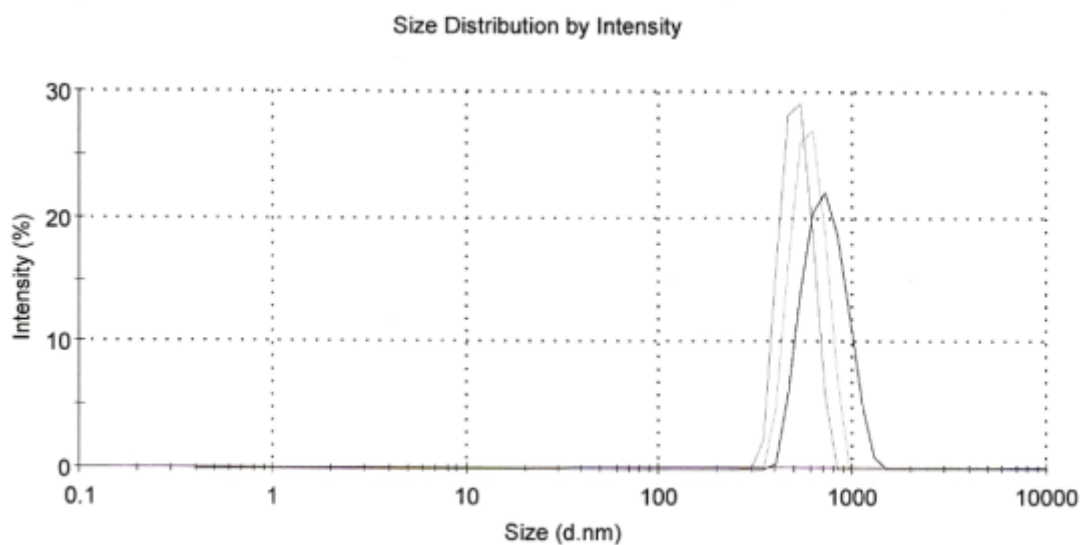
74-3	62,91	0,553	123,80	18,03	4438	78,4	16,8	4,7
75-1	93,39	0,985	92,77	906,9	11,95	46,8	45,0	8,2
75-2	89,27	0,647	359,80	95,81	11,96	45,6	44,2	8,6
75-3	102,90	0,670	444,10	79,19	12,79	60,4	30,3	9,3
76-1	61,00	0,513	63,63	360,30	8,11	58,5	36,0	5,5
76-2	60,31	0,602	166,50	17,64	0,00	84,2	15,8	0,0
76-3	61,54	0,527	174,00	33,78	4769,00	67,3	31,7	1,1
77-1	68,80	0,591	180,10	26,62	7,03	74,3	20,2	3,0
77-2	64,76	0,615	153,30	10,76	0,00	93,3	6,7	0,0
77-3	70,96	0,523	144,90	16,64	4349,00	79,9	16,4	3,7
78-1	51,31	0,486	103,90	17,48	4308,00	72,6	22,1	5,3
78-2	48,81	0,528	91,24	11,30	3834,00	79,6	14,2	6,2
78-3	49,10	0,521	84,60	10,88	4057,00	78,2	14,9	6,9
79-1	52,24	0,505	126,70	22,20	4391,00	67,2	27,8	4,9
79-2	49,85	0,627	158,40	24,46	0,00	68,6	31,4	0,0
79-3	52,96	0,506	117,40	16,46	4449,00	74,0	22,5	3,5
80-1	63,65	0,499	195,70	33,67	0,00	68,0	32,0	0,0
80-2	59,75	0,512	104,90	11,16	1742,00	78,1	11,4	10,5
80-3	53,77	0,561	157,60	23,92	0,00	71,4	28,6	0,0
81-1	57,87	0,596	156,70	25,91	0,02	72,3	24,4	3,3
81-2	55,11	0,569	158,20	23,93	0,00	72,5	27,5	0,0
81-3	55,44	0,578	152,60	21,22	0,00	73,4	26,6	0,0
82-1	46,03	0,515	108,10	20,37	4792,00	69,4	25,4	3,0
82-2	44,11	0,523	36,63	171,80	0,00	50,5	49,5	0,0
82-3	43,10	0,544	123,70	18,32	0,00	72,2	27,8	0,0
83-1	49,48	0,543	59,81	449,30	8,76	63,1	30,0	6,7
83-2	47,85	0,513	95,60	4233,00	0,00	98,0	2,0	0,0
83-3	46,19	0,580	115,70	22,07	4645,00	66,7	27,8	3,1
84-1	84,52	0,578	130,90	962,30	13,26	69,6	21,5	8,8
84-2	81,14	0,578	151,00	17,51	2363,00	73,0	14,3	12,7
84-3	74,88	0,549	211,80	31,89	0,00	73,7	26,3	0,0
85-1	69,62	0,603	202,90	34,25	8,97	68,9	25,0	5,0
85-2	64,83	0,652	177,80	21,62	4,78	78,1	21,3	0,6
85-3	66,67	0,554	173,20	26,07	6,58	77,2	20,2	2,6
86-1	53,64	0,880	124,50	4282,00	0,00	94,9	5,1	0,0
86-2	57,50	0,663	154,10	18,88	3957,00	74,7	22,0	3,4
86-3	54,34	0,598	236,50	43,69	9,76	54,4	37,7	7,9
87-1	76,36	0,985	493,60	55,64	11,87	59,7	33,9	6,4

87-2	74,85	1,000	598,30	109,40	15,17	43,8	43,7	12,5
87-3	72,33	1,000	227,00	35,32	9,25	70,7	20,4	6,1
88-1	62,28	0,547	192,80	13,11	0,00	87,5	12,5	0,0
88-2	61,54	0,540	188,10	32,91	0,00	68,2	31,8	0,0
88-3	61,12	0,609	191,40	33,37	0,00	74,0	26,0	0,0
89-1	40,67	0,540	41,43	230,30	8,03	49,7	41,9	8,4
89-2	41,60	0,522	71,00	439,70	10,91	60,7	22,7	16,6
89-3	40,98	0,589	216,60	28,31	0,00	50,5	49,5	0,0
90-1	50,38	0,477	56,82	233,50	0,00	66,6	33,4	0,0
90-2	53,67	0,512	106,80	15,84	4629,00	82,2	16,3	1,5
90-3	52,63	0,508	72,02	371,10	7,85	70,7	23,3	6,0
91-1	31,93	0,535	117,80	17,86	0,00	62,2	37,8	0,0
91-2	33,35	0,560	80,87	10,46	4442,00	78,3	18,3	3,4
91-3	33,39	0,493	37,44	304,50	6,43	62,3	30,2	7,5
92-1	58,97	0,555	107,20	5,69	4782,00	94,0	3,0	2,9
92-2	61,02	0,596	149,20	19,10	4,55	81,9	16,9	1,2
92-3	60,23	0,449	206,70	43,86	4707,00	52,1	46,8	1,0
93-1	42,47	0,537	123,20	15,16	4373,00	72,1	24,2	3,7
93-2	39,41	0,567	40,67	250,80	8,43	49,1	40,2	10,7
93-3	37,66	0,699	111,40	17,96	4240,00	59,5	34,0	6,4
94-1	46,15	0,918	273,20	27,69	6,28	54,5	36,2	5,4
94-2	45,66	1,000	418,50	57,29	11,12	49,7	35,3	15,0
94-3	49,03	1,000	88,37	630,10	13,06	43,3	37,5	19,1
95-1	66,69	0,483	104,30	3449,00	7,44	86,9	8,8	4,3
95-2	62,50	0,611	170,50	28,63	0,00	78,0	22,0	0,0
95-3	64,28	0,535	96,93	665,60	9,29	71,9	20,8	7,3
96-1	31,35	0,492	22,77	130,20	4421,00	50,8	42,4	3,9
96-2	28,23	0,795	20,26	107,20	1015,00	43,7	41,9	14,3
96-3	28,08	0,780	110,60	16,23	4482,00	54,8	41,9	3,3
97-1	405,80	0,086	441,00	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
97-2	439,70	0,074	485,30	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
97-3	472,50	0,044	526,70	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
98-1	31,26	0,533	27,02	153,50	0,00	55,2	44,8	0,0
98-2	30,74	0,506	30,52	157,00	4464,00	62,7	35,0	2,3
98-3	31,21	0,543	141,70	22,90	4,21	53,1	43,4	3,5
99-1	69,62	0,501	141,70	17,61	0,00	82,5	17,5	0,0
99-2	68,68	0,542	117,80	11,39	4178,00	84,4	10,0	5,3
99-3	65,08	0,548	169,80	23,69	0,00	77,6	22,4	0,0

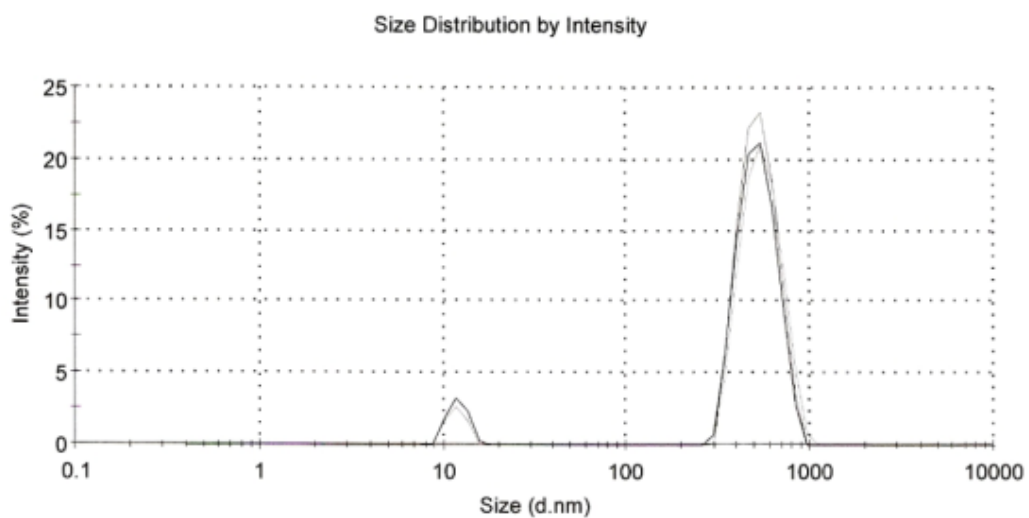
100-1	23,11	0,611	17,77	70,97	4016,00	49,4	45,2	5,3
100-2	25,14	0,528	93,22	15,59	4557,00	51,5	46,1	2,4
100-3	25,80	0,480	18,49	95,79	3332,00	50,8	43,3	5,9
101-1	44,96	0,567	121,80	8,61	0,00	92,6	7,4	0,0
101-2	46,25	0,591	127,10	20,12	0,00	74,7	25,3	0,0
101-3	45,90	0,528	101,10	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
102-1	85,43	0,608	224,20	24,42	0,00	79,1	20,9	0,0
102-2	83,35	0,619	246,10	37,26	12,24	69,9	23,9	6,2
102-3	69,53	0,925	196,10	25,27	4337,00	71,7	23,5	4,8
103-1	78,41	0,626	197,60	20,54	4669,00	72,8	22,9	4,3
103-2	75,67	0,587	181,60	21,48	4292,00	70,9	23,5	5,5
103-3	76,76	0,686	202,40	22,96	4748,00	73,9	22,9	3,3
104-1	80,58	0,592	210,30	38,89	4728,00	68,1	29,6	2,3
104-2	81,12	0,523	91,93	494,50	9,82	62,3	32,6	5,1
104-3	80,71	0,445	142,00	3948,00	0,00	94,7	5,3	0,0
105-1	62,70	0,444	96,23	13,94	4149,00	80,9	11,9	7,2
105-2	58,72	0,546	69,76	438,50	0,00	70,5	29,5	0,0
105-3	59,26	0,556	136,50	26,09	0,00	75,8	24,2	0,0
106-1	62,10	0,573	116,50	14,61	4222,00	78,7	14,9	5,5
106-2	62,49	0,495	137,40	20,95	4514,00	74,0	22,4	3,6
106-3	61,25	0,565	141,90	19,22	4519,00	73,0	23,0	4,0
107-1	44,18	0,577	172,10	10,54	0,00	88,0	12,0	0,0
107-2	44,08	0,521	150,10	22,45	0,00	64,4	35,6	0,0
107-3	42,79	0,574	121,40	21,72	4437,00	63,2	30,9	3,2
108-1	60,75	0,548	69,39	406,70	8,66	63,7	30,3	6,0
108-2	61,30	0,549	170,70	45,00	4524,00	61,0	37,3	1,8
108-3	62,18	0,578	62,76	252,00	7,73	55,6	36,2	5,3
109-1	59,27	0,477	113,00	18,20	4201,00	75,5	17,7	6,9
109-2	56,88	0,582	67,91	396,20	8,12	60,4	32,8	6,8
109-3	54,17	0,565	163,20	0,00	0,00	100,0	0,0	0,0
110-1	80,00	0,550	182,70	35,40	9,79	77,4	14,8	6,2
110-2	68,69	0,595	155,30	25,31	0,00	81,9	18,1	0,0
110-3	71,86	0,548	148,30	12,43	0,00	90,4	9,6	0,0
111-1	60,98	0,881	199,80	30,50	4871,00	63,3	32,8	3,8
111-2	64,46	0,588	131,40	20,23	3143,00	70,7	18,6	10,7
111-3	57,16	0,828	159,20	23,47	4527,00	67,8	26,5	5,7
112-1	46,25	0,838	145,20	20,86	2811,00	61,2	28,2	10,6
112-2	46,64	0,860	88,20	144,00	15,13	56,1	23,5	20,4

112-3	47,87	0,604	222,90	23,94	0,00	63,1	36,9	0,0
113-1	65,06	0,953	322,90	48,27	8,41	56,7	34,3	6,1
113-2	69,25	0,675	302,80	31,71	8,91	64,6	30,9	4,5
113-3	67,29	1,000	516,70	73,52	17,25	54,7	29,4	15,9

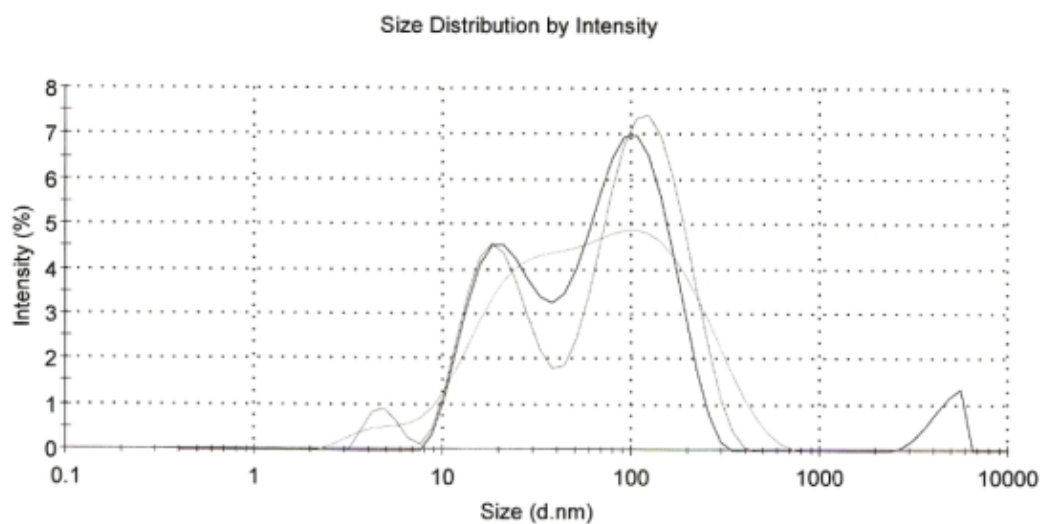
Obrázek 4: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 37; intenzitní průměr velikosti nanočástic



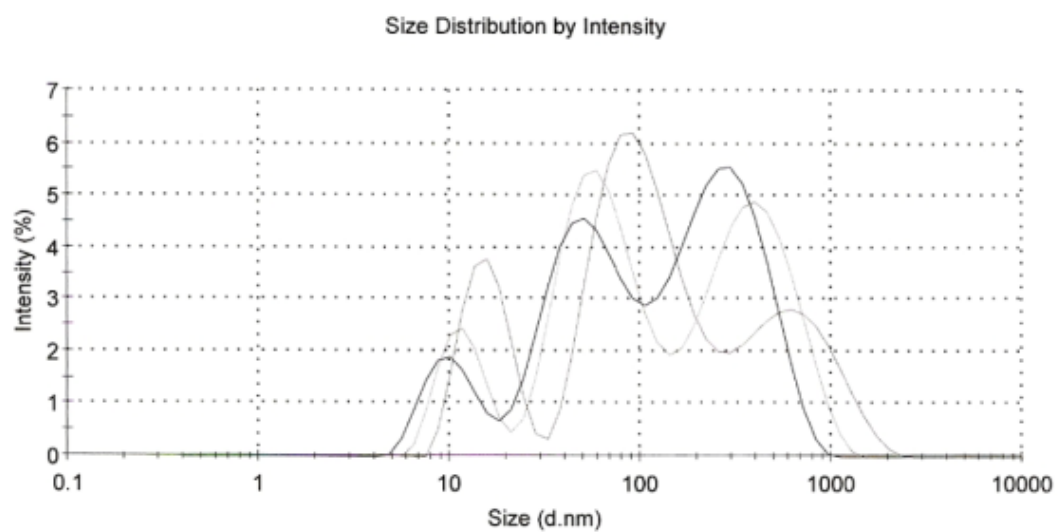
Obrázek 5: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 40; intenzitní průměr velikosti nanočástic



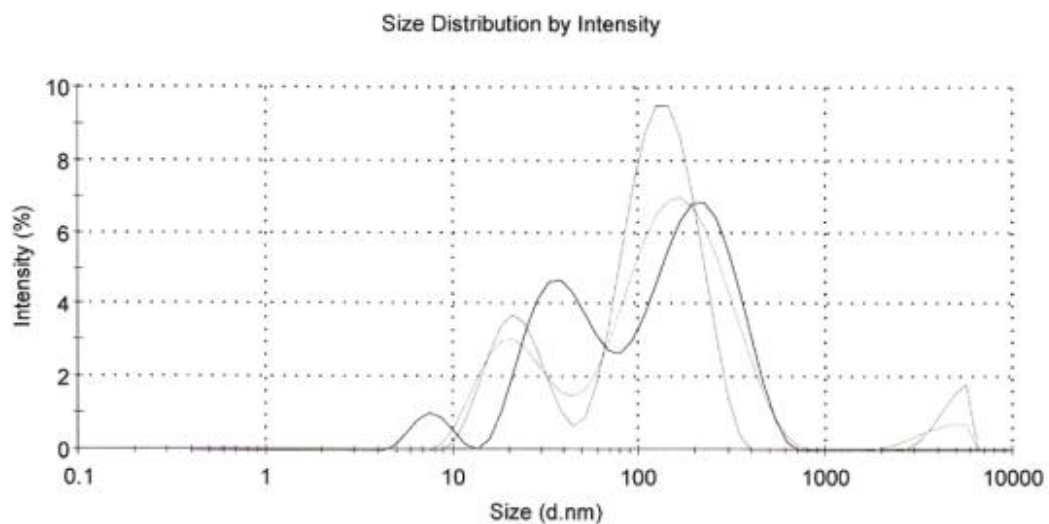
Obrázek 6: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 45; intenzitní průměr velikosti nanočástic



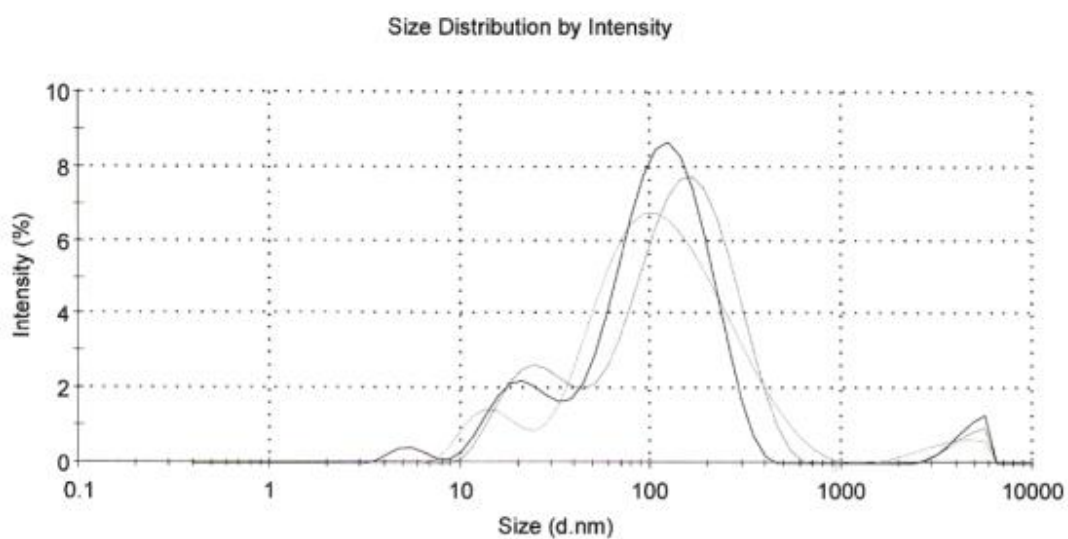
Obrázek 7: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 51; intenzitní průměr velikosti nanočástic



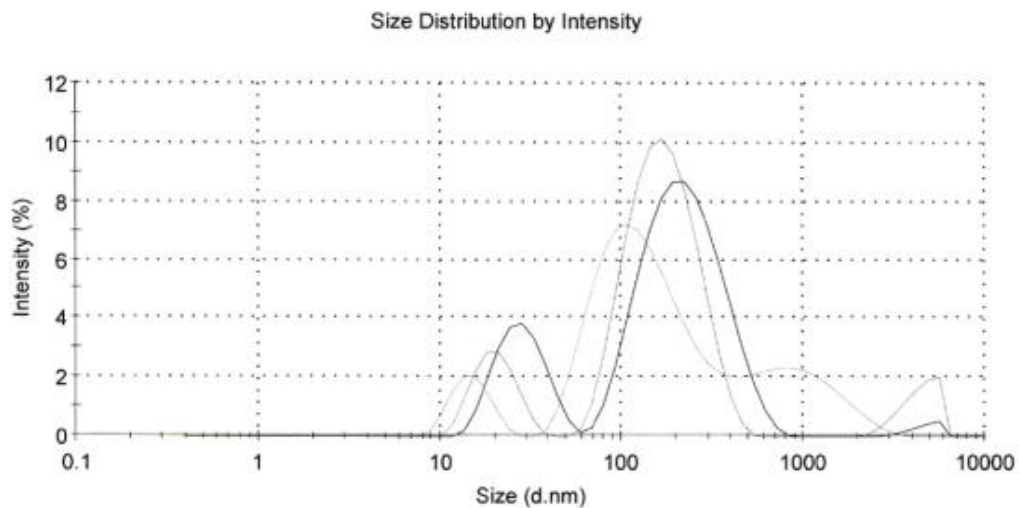
Obrázek 8: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 53; intenzitní průměr velikosti nanočástic



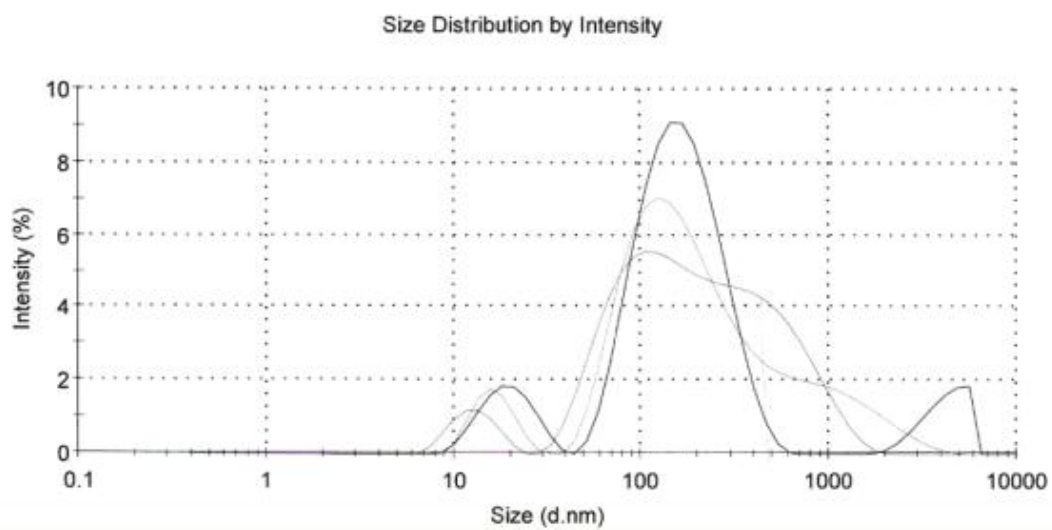
Obrázek 9: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 54; intenzitní průměr velikosti nanočástic



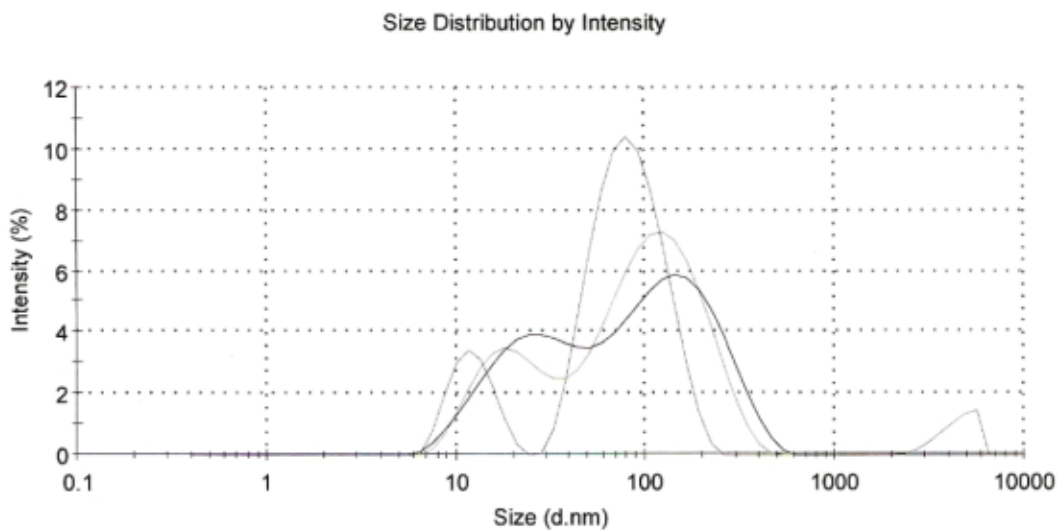
Obrázek 10: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 55; intenzitní průměr velikosti nanočástic



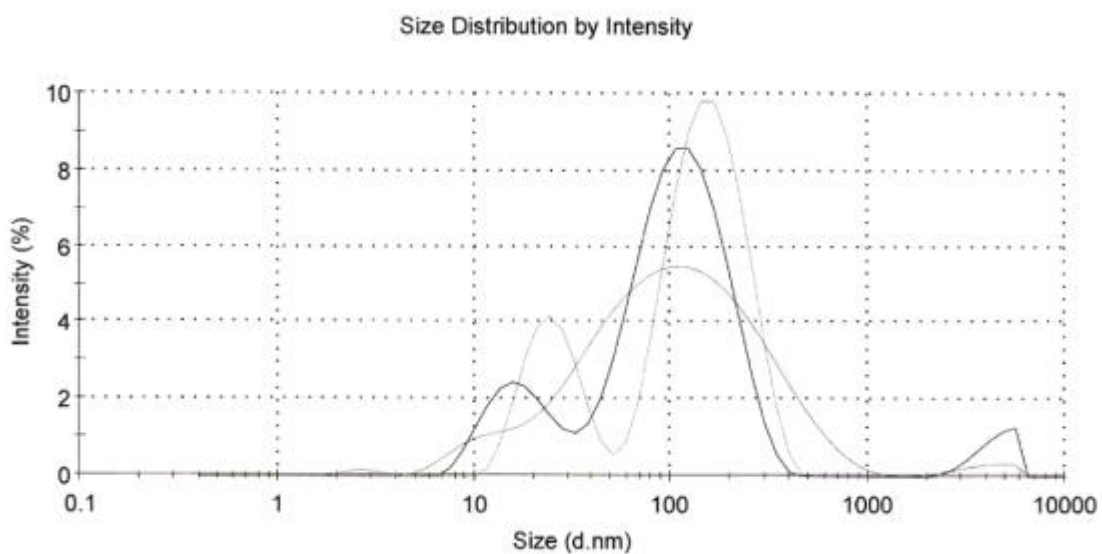
Obrázek 11: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 56; intenzitní průměr velikosti nanočástic



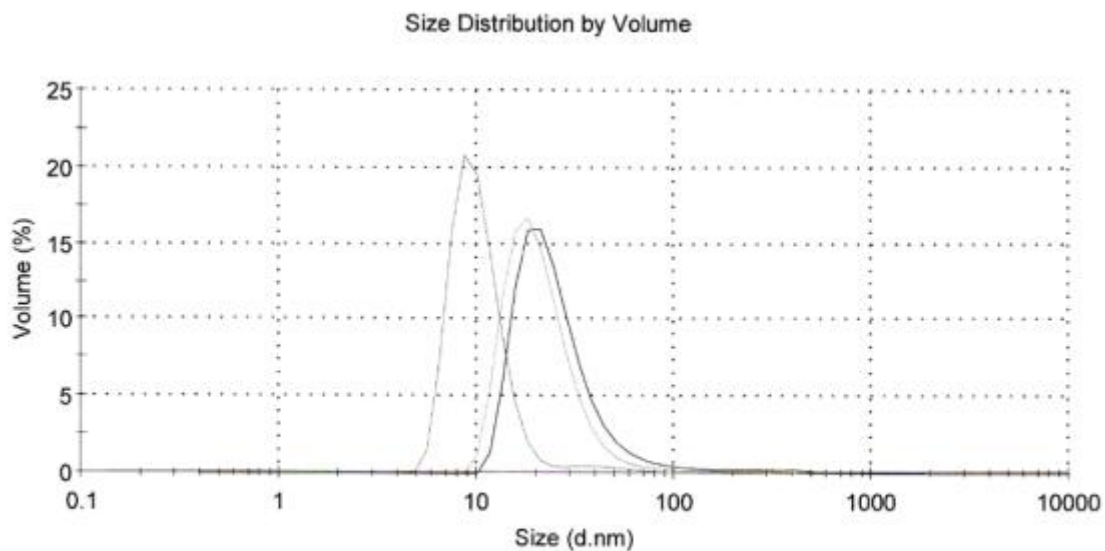
Obrázek 12: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 73; intenzitní průměr velikosti nanočástic



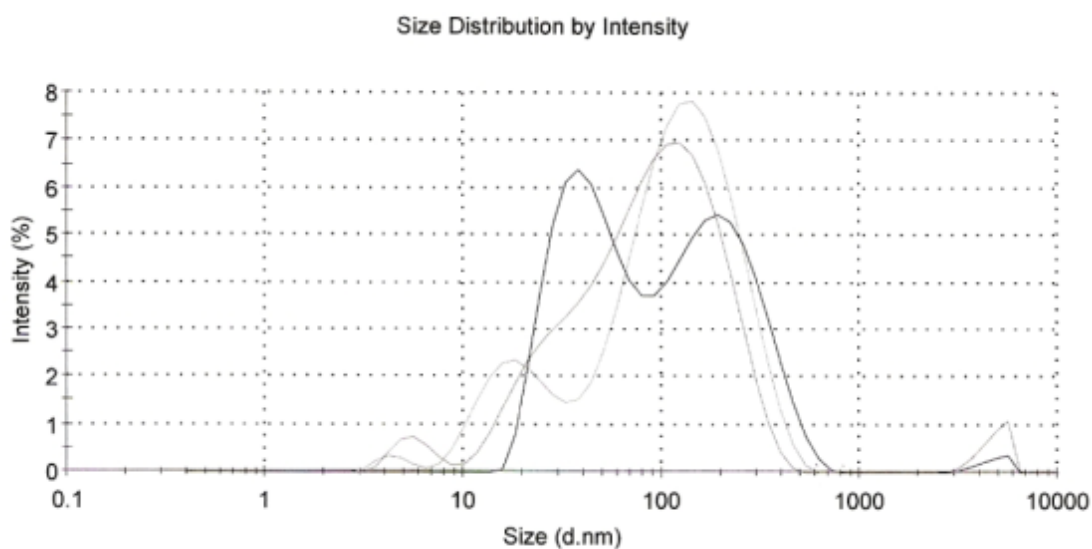
Obrázek 13: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 74; intenzitní průměr velikosti nanočástic



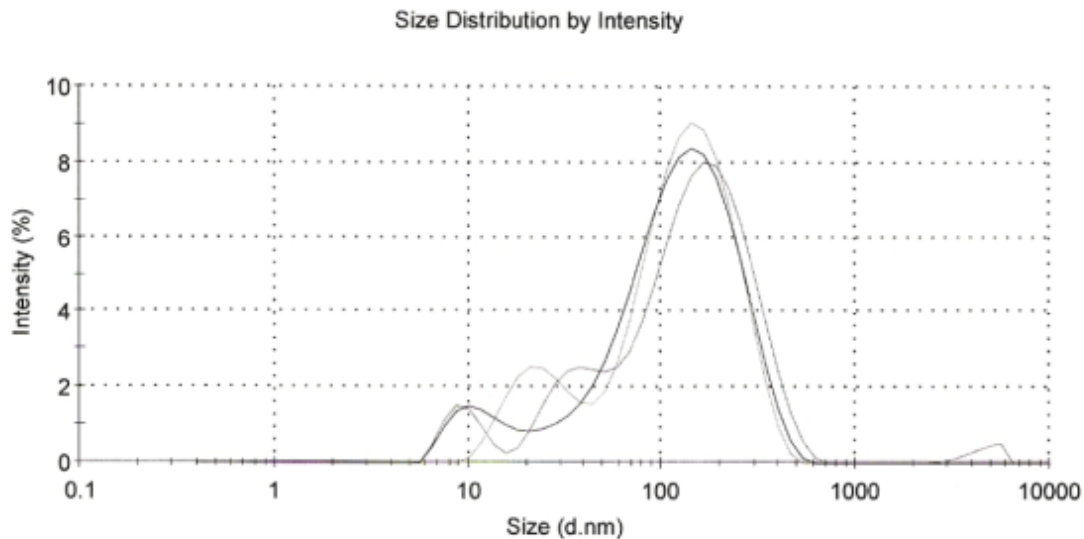
Obrázek 14: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 88; intenzitní průměr velikosti nanočástic



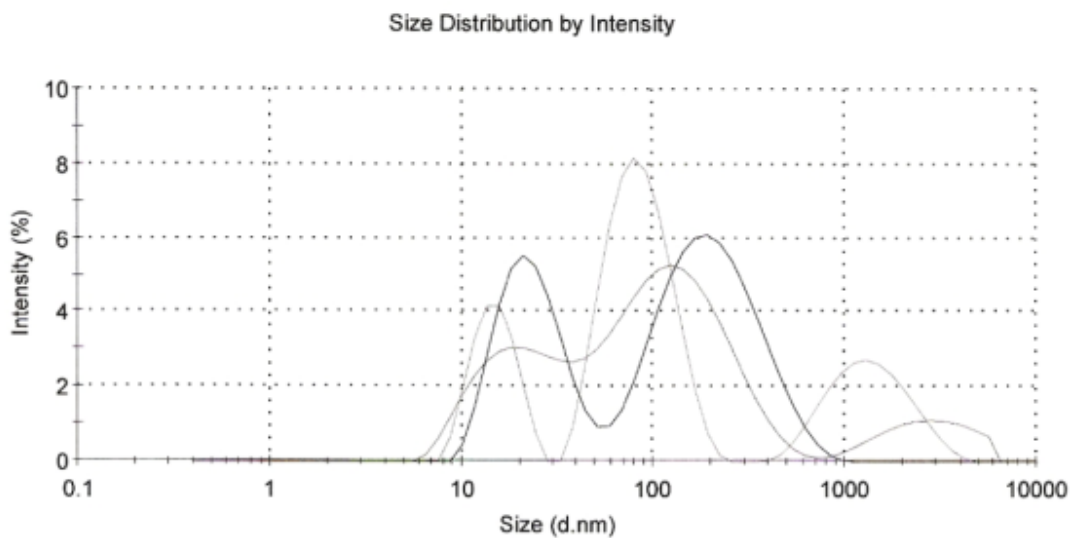
Obrázek 15: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 92; intenzitní průměr velikosti nanočástic



Obrázek 16: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 110; intenzitní průměr velikosti nanočástic



Obrázek 17: Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer, vzorek č. 112 – intenzitní průměr velikosti nanočástic



7. DISKUZE

7.1. K tématu práce

V současné době jsme svědky velmi intenzivního pronikání nových poznatků z různých odvětví nanotechnologie do různých tradičních oborů. Jedním z nich je průmysl potravin. Doplnky stravy, které jsou v kapalném skupenství, jsou výhodné z hlediska možností variabilního dávkování, snadnosti aplikace v nepříznivých podmínkách a z hlediska jejich vysoké biodostupnosti. Hydrofilní kapaliny založené na vodě jako hlavní složce jsou upřednostňovány, protože jsou snadno korigovatelné z hlediska chuti a vůně. Aplikaci hydrofobních látek v kapalných přípravcích je možno řešit formulací emulzí typu o/v za použití přídatných látek povolených pro výrobu potravin.

Hlavním problémem je volba vhodného emulgátoru ve vhodné koncentraci, dalším je formulace jednotlivých fází a posledním je vypracování postupu přípravy nenáročného na speciální zařízení, energii a čas. Hlavním kvalitativním znakem je granulometrická charakteristika, která souvisí s fyzikální stabilitou emulze.

Jako emulgátor byl vybrán hydrogenovaný sojový lecitin a polysorbát 20 buď využité v různých koncentracích jednotlivě, nebo ve směsích. Vnitřní fáze byly různé rostlinné oleje vhodné pro daný účel, modifikované případně přidáním triacetinu snižujícího viskozitu nebo polysorbátu 20 či lecitinu, které snižují mezipovrchové napětí. Ve vnější fázi byl rozpuštěn nebo dispergován lecitin, polysorbát 20 nebo oba emulgátory současně. Jako opatření k modifikaci lecitinu byla alternativně zvýšena hodnota pH.

Koncentrace vnitřní fáze je důležitý parametr emulze, který souvisí s její kvalitou. Teplota soustavy při dispergaci souvisí s její viskozitou, polaritou a s parametry emulgátoru. Doba míchání a intenzita míchání jsou parametry procesu, které mají význam především z hlediska dalšího posuzování možností postupného převodu laboratorního postupu do výrobního v rámci validace a škálování.

7.2. K objemu a koncentraci emulze se sojovým olejem, koncentraci emulgátoru a teplotě

Vzorky č. 1 až 3 byly připraveny v různých poměrech fází. Z výsledků je zřejmé, že se zvyšující se koncentrací od 5% přes 10% k 15% se získaly větší částice vnitřní olejové fáze. Podíl velkých mikročástic přesahujících rozsah měření se s koncentrací snižoval, což je možno pokládat za překvapivé.

Se zvyšováním teploty (vzorky č. 4 až 6) v rozmezí od 40 °C do 60 °C byly získány postupně menší nanočástice. Pozoruhodná je unimodalita rozdělení hodnot intenzitního průměru a nízký index polydisperzity. Uvedené vztahy platí pro 0,50% koncentraci emulgátoru. Při 0,75% koncentraci emulgátoru nebyl jednoznačný vztah mezi teplotou a velikostí částic prokázán (vzorky č. 7 až 9).

Při použití dispergační turbíny většího rozměru nebyl jednoznačně prokázán vliv stoupající počáteční teploty od 40 °C do 60 °C na střední intenzitní průměr nanočástic (vzorky č. 10 až 15). V celkovém hodnocení je možno zvětšení rozměru (průměru statoru z 10 mm na 19 mm) nástavce hodnotit jako vliv velmi výrazný.

7.3. Vliv změny viskozity a mezipovrchového napětí olejové fáze

Snížení viskozity vnitřní fáze by mohlo být příčinou získání menších částic. Jako přísada do sojového oleje byl za tímto účelem vybrán triacetin. Jak je z porovnání velikosti částic vzorků č. 16 až 18 patrné, tato látka přidaná v 10%, 25% a v 50% koncentraci neměla očekávaný účinek. Vliv stoupající koncentrace triacetinu v řadě 5%, 10%, 17,5% a 25% byl poměrně slabý, avšak opačný, než se předpokládalo (vzorky č. 28 až 31). S přibývajícím koncentrací tohoto triesteru byly získány větší částice. Pozoruhodná je unimodální distribuce velikosti.

Úprava aktuální acidity vnější fáze spolu s použitím triacetinu v koncentracích od 10 % do 50 % neměla na velikost částic vliv (vzorky 25 až 27).

Také polysorbát 20 jako aditivum neměl významný vliv na velikost nanočástic (vzorky. č. 19 až 21). V tomto případě se mohlo jednat o kompenzaci sníženého

mezipovrchového napětí zvýšenou viskozitou. Také se projevila velmi omezená mísitelnost tohoto tenzidu s olejem. Dokladem je jednak neprokázání vlivu zvyšující se koncentrace z 2% na 10% a také variabilita v hodnotách indexu polydisperzity v rámci opakovaných měření provedených na stejných vzorcích.

Jako opatření vedoucí ke zmenšení částic dispergovaného oleje je možno hodnotit přidání hydrogenovaného lecitinu do vnitřní fáze. Se zvyšováním koncentrace lecitinu z 5% na 20% bylo zaznamenáno zmenšování částic. Všechna měření se vyznačují vysokou hodnotou indexu polydisperzity (vzorky č. 22 až 24).

Přísada triacetinu a polysorbátu 20 do olejové fáze měla zlepšit mísitelnost polysorbátu 20 a spojit tak účinky obou typů aditiv. Z dat naměřených u vzorků č. 32 až 36 je patrné, že směs obou aditiv se neosvědčila. Se stoupající koncentrací obou složek byly získány větší částice oleje. Jako pozitivum je možno hodnotit unimodalitu distribuce velikostního parametru.

7.4. Vliv doby a režimu míchání při různé viskozitě a mezipovrchovém napětí vnitřní olejové fáze

Vnitřní fáze emulze byla tvořena sojovým olejem, nebo byla formulována jako binární či ternární směs sojového oleje s příměsí 2% nebo 10% polysorbátu 20 a případně 5% triacetinu. Tato vnitřní fáze byla dispergována buď po dobu 60 sekund, nebo dvakrát po 60 sekundách s 90 sekundovou přestávkou. Vzorky č. 37 až 42 měly relativně nízkou polydisperzitu velikosti. Delší doba míchání s přestávkou se osvědčila pouze u vzorku se samotným olejem ve vnitřní fázi. Záznam měření je na obrázku 4 a 5. U vzorků s oběma aditivami měla spíše opačný efekt.

7.5. Vliv kvalitativního složení oleje a jeho směsi s polysorbátem 20

Emulze byla připravena ve dvou fázích pomocí dvou zařízení. Nejdříve byla připravena jemná emulze v zařízení typu Ultra-Turrax a potom byla tato emulze homogenizována v zařízení IKA Magic LAB® s dvojitou turbínou za průtoku emulze. Vzorky č. 43 až 52 se liší druhem rostlinného oleje. Do olejů pěti druhů byl alternativně přidán polysorbát 20 v koncentraci 10 %.

Pro všechny testované oleje platí, že přidání 10% polysorbátu 20 má vliv na dosažení částic vnitřní fáze menších rozměrů. Efekt je však malý. Jeho příčinou může být rozdělování polysorbátu 20 do vnější fáze na základě jeho lepší rozpustnosti v ní. Rozdíly ve velikosti nanočástic byly malé, patrně jsou v korelaci s viskozitou. Nejmenší částice byly zjištěny u oleje ze semen vinné révy, větší byly v případě sojového oleje. Přibližně stejné byly při použití oleje z podzemnice olejné a ze semen lnu. Největší částice byly v případě olivového oleje. Záznam měření je na obrázku 6 a 7.

Ve všech vzorcích byly prokázány mikročástice s intenzitním průměrem přesahujícím hranici měřitelnosti s výjimkou vzorku s olivovým olejem. V souvislosti s největší hodnotou průměrné velikosti je možno tento fakt hodnotit jako překvapivý. Výsledek je nutno potvrdit, případně vyvrátit prokázáním procesu krémovatění.

7.6. Vliv koncentrace oleje ze semen vinné révy

Byly připraveny emulze ve čtyřech koncentracích - 10%, 15%, 20% a 25%. Jsou označeny jako vzorky č. 53 až 56. Bylo jednoznačně prokázáno, že se stoupající koncentrací emulzí prudce rostou průměrné hodnoty intenzitního průměru. Záznam měření je na obrázcích 8 až 11. Ve všech vzorcích byla prokázána malá frakce mikročástic s velikostí přesahující limit měřitelnosti. Pozoruhodná je fluktuace hodnot velikosti a procentuálního zastoupení těchto nadmikronových částic. Vysvětlení je možno hledat v jejich pohybu v gravitačním poli převažujícím nad Brownovým pohybem.

7.7. Vliv koncentrace emulgátoru na homogenizaci oleje ze semen vinné révy

Směs hydrogenovaného lecitinu a polysorbátu 20 byla vyzkoušena při emulgaci oleje v pěti koncentracích - 0,50%, 0,75 %, 1,00%, 1,25% a 1,50% (vzorky č. 57 až 61). Koncentrace emulgátoru v rozmezí od 1,00% a 1,50% se využívají při formulaci infusních roztoků k parenterální výživě.

Z dat prezentovaných v tabulce 18 je možno vyčíst, že nejmenší nanočástice byly prokázány při použití nejvyšší koncentrace emulgátoru. V tomto vzorku byly nalezeny nadmikronové částice ve vysoké koncentraci. Ve vzorku připraveném

s využitím nižší koncentrace emulgátoru (1,25 %) byla velmi malá frakce těchto velkých částic prokázána ve všech třech opakovaných měřeních. Při 1,00% koncentraci emulgátoru byla průměrná hodnota rozměrového parametru nejvyšší, jako velmi výhodné je možno konstatovat, že v tomto vzorku nebyly žádné nadmikronové částice olejové fáze.

7.8. Vliv typu oleje, koncentrace emulgátoru a doby homogenizace

Pro zkoušení vlivu doby míchání v zařízení IKA Magic LAB® byly připraveny 15% emulze s olivovým olejem a olejem z vinné révy za použití emulgátoru o třech různých koncentracích (0,75%, 1,25% a 1,5%). Bylo tak připraveno 14 vzorků s označením č. 62 až č. 75.

Při 0,75% koncentraci emulgátoru byla doba dispergace 2 minuty nedostačující. Po jejím prodloužení na 3,5 minuty se průměrná hodnota intenzitního průměru snížila. Při použití oleje z hroznového vína nebyly ve vzorku žádné částice v nadmikronové velikosti. Prodloužení doby dispergace na 5 minut se u tohoto oleje neprojevovalo, u olivového oleje byly částice menší s malým podílem částic přesahujících mez měřitelnosti.

Po zvýšení koncentrace emulgátoru na 1,25 % byly získány menší částice než při 0,75% koncentraci. Přesto byla téměř u všech vzorků prokázána frakce částic v nadmikronové velikostní třídě (vzorky č. 68 až 73). Opakovala se situace soustavy s 0,75% emulgátorem a s olejem ze semen vinné révy. I v případě vzorku s 1,25% emulgátorem po 5 minutovém míchání byly částice menší než jeden mikrometr. Totéž platí o vzorcích 25% emulze se stejným olejem při použití 1,5% emulgátoru a míchaných po dobu 3,5 minuty. (Obrázek 12 a 13). Zajímavé je, že tato emulze o vysoké koncentraci vnitřní fáze po prodloužené době míchání 5 minut má horší parametry než emulze míchaná 3,5 minuty, což nasvědčuje tomu, že existuje buď optimální doba míchání, nebo maximální teplota míchání.

Výše uvedené souvislosti mezi druhem oleje (olivový a vinné révy), koncentrací emulgátoru (0,75% a 1,25%) a velikostí částic oleje v 15% emulzích míchaných po dobu 5 minut jsou reprodukovány v podobě vzorků č. 76 až 79. Průměrná velikost

nanočástic byla velmi příznivá. Zajímavé je, že při nižší koncentraci emulgátoru byly prokázány velmi nízké podíly nadmikronových částic, i když průměrné hodnoty byly vyšší.

7.9. Vliv typu oleje, koncentrace emulgátoru, intenzity a doby homogenizace

Byly připraveny 15% emulze s olivovým olejem a olejem z vinné révy za použití emulgátoru o dvou koncentracích (0,75%, a 1,25%). Byla vyzkoušena různá intenzita homogenizace v provedení frekvence otáček 23 000 za minutu (vzorky č. 80 až 83) a 20 000 za minutu (vzorky č. 84 až 87).

Z výsledků měření vyplývá, že významně účinnější je homogenizace při vyšší frekvenci otáček. V příslušných vzorcích jsou jen malé podíly velkých částic. Po snížení frekvence otáček o 15 % byly připraveny nanoemulze s částicemi, které byly jen o málo větší. Zvýšení koncentrace lecitinu z 0,75% na 1,25% mělo za následek získání menších částic oleje při obou intenzitách homogenizace.

7.10. Vliv příměsi lipofilních látek do oleje z hroznového vína při různých koncentracích emulze

Byly vybrány tři modelové aktivní látky – koenzym Q10 (10%), vitamín E (3%) a perillový olej (33%) v koncentracích reálných pro případné využití v 5% a 15% emulzi oleje z hroznového vína. Emulze byly připraveny 5minutovou homogenizací při maximálních otáčkách rotoru dvojité turbíny (26 000 RPM).

Emulze s koenzymem Q10 (vzorky č. 88 a 89) měla velmi příznivé parametry. Vzorky neobsahovaly nadmikronové částice. Podstatně menší hodnotu měl celkový průměr hodnoty měřeného parametru (41 nm). (Obrázek 14). Po přidání vitamínu E v 3% koncentraci (vzorky č. 90 a 91) byla hodnota celkového průměru ještě nižší (33 nm). Vzorky však obsahovaly velmi malé, až stopové množství částic větších než jeden mikrometr i u vzorku s 5% koncentrací vnitřní fáze (vzorek č. 91). Perillový olej obsahuje vysoký podíl kyseliny linoleové, která zvyšuje jeho viskozitu. Změna tohoto parametru neměla významný vliv na hodnotu celkového průměru velikostního parametru a na mírně zvýšený podíl nadmikronových částic. (Obrázek 15)

7.11. Vliv teploty a koncentrace emulgátoru při homogenizaci různě koncentrovaných emulzí z olivového oleje

Teplota emulze při homogenizaci je důležitým parametrem, který souvisí jednak s viskozitou obou fází, jednak s hodnotou HLB emulgátoru. Vzorky č. 94 až 101 byly připraveny při dvou velmi odlišných počátečních teplotách (18 °C a 50 °C), odlišných koncentracích emulze (5% a 15%) a emulgátoru (0,75% a 1,25%).

Vliv počáteční teploty byl u většiny vzorků v mezích variability hodnot. Výjimkou je 15% emulze s 1,25% emulgátorem. Při nízké teplotě měla patrně primární emulze vysokou viskozitu. Průměrná hodnota intenzitního průměru byla vysoká, jako velmi pozitivní je možno hodnotit velmi malou variabilitu unimodálního rozdělení hodnot intenzitního průměru částic v podobě hodnoty koeficientu polydisperzity 0,07 (vzorek č. 97). Výrazná tendence k unimodální distribuci bez nadmikronových částic byla prokázána také u analogicky připraveného vzorku lišícího se pouze teplotou na začátku homogenizace (vzorek č. 101).

Zajímavé je srovnání 5% emulze s 15% při vyšší koncentraci emulgátoru (vzorky č. 96 a 97). 5% emulze byla velmi polydisperzní, obsahovala vysoký podíl nanočástic s rozměrem kolem 20 nm (téměř 50 %) a nezanedbatelný podíl nadmikronových mikročástic (kolem 7 %).

Obecně je možno konstatovat, že méně koncentrované emulze obsahují částice s menší průměrovou hodnotou velikosti částic. Vliv koncentrace emulgátoru není jednoznačný, ve většině případů měla vyšší koncentrac pozitivní vliv na proces homogenizace.

7.12. Vliv složení a koncentrace emulgátoru při homogenizaci emulze

Byly vyzkoušeny čtyři druhy emulgátoru vzniklých kombinací lecitinu a polysorbátu 20. Každý z nich byl použit ve dvou různých koncentracích - 0,75% a 1,25%, u dvou vzorků byla ještě použita 1,5% koncentrace, u jednoho (kombinace lecitin/polysorbát 2:1) ještě 0,5% a 1,0%. Vnitřní fázi představoval olivový olej v 15% koncentraci. Celkem soubor obsahoval 12 vzorů označených č. 102 až 113.

Samotný polysorbát 20 byl účinnější jako emulgátor než samotný lecitin. U obou těchto emulgátorů byla dosažena účinnější dispergace oleje při vyšší koncentraci. Výhodnější byla směs lecitinu s polysorbátem 20 v poměru 2:1 (vzorky č. 106 a 107). Při 1,25% koncentraci byly nanočástice menší než při 0,75%. Obsahovaly jen malou koncentraci nadmikronových částic.

Pozoruhodné jsou výsledky měření velikosti nanočástic připravených ze směsi obou emulgátorů v poměru 2:1 ve velmi nízké 0,5% koncentraci. Ve vzorku nebyly zjištěny nadmikronové částice (vzorek č. 110). Záznam měření je na obrázku 16. Při 0,75% koncentraci tohoto emulgátoru (č. 106) byly prokázány stopy nadmikronových částic a při jeho koncentraci 1,0 % byl podíl plochy pod křivkou distribuce hodnot intenzitního průměru kolem 7 %. Vzhledem k tomu, že se jednalo o část křivky, je tato skutečnost významná z hlediska stability. Vzorky připravené v emulzích s 1,25% a 1,5% koncentrací směsného emulgátoru (č. 109 a 112) měly lepší parametry, zvláště hodnoty celkového průměru velikosti. (Obrázek 17) Vysoké hodnoty stupně polydisperzity jsou dány frakcí velmi malých nanočástic, patrně micel.

8. ZÁVĚRY

- Na základě výsledků experimentů bylo prokázáno, že je možno připravit nanoemulze s rostlinnými oleji pomocí vsádkového nebo kontinuálního laboratorního homogenizátoru typu stator-rotor bez přítomnosti nebo s malým podílem částic nadmikronové velikosti.
- Intenzita dispergace je dána obvodovou rychlostí rotoru a je regulovatelná průměrem rotoru a frekvencí jeho otáček. Se zvyšováním intenzity dispergace a s prodlužováním její doby se snižuje velikost nanočástic do meze dané maximální teplotou soustavy.
- Při posuzování kvality emulze byl hodnocen podíl nadmikronových částic, celkový průměr intenzitního rozměru a index polydisperzity.
- Teplota emulze při dispergaci je málo významný faktor, který nemá jednoznačný vliv na proces dispergace, ovlivňuje nejen viskozitou a polaritu fází, ale také hodnotu HLB emulgátoru.
- Testováním velikosti nanočástic byla prokázána možnost využití oleje ze semen vinné révy, oleje ze sojových bobů, oleje ze semen podzemnice olejné, oleje ze semen lnu setého a oleje z plodů olivovníku evropského.
- Se zvyšováním koncentrace emulze v rozmezí od 5 % do 25 % se snižuje účinnost procesu dispergace oleje.
- Pro formulaci doplňků stravy typu nanoemulzí se jako vhodné emulgátory osvědčily směsi lecitinu s polysorbátem 20. Určení optimální koncentrace emulgátoru je komplikováno interakcemi s dalšími vlivy, jako je teplota a viskozita emulze, koncentrace emulze a parametry její vnitřní fáze.
- Modifikace složení vnitřní fáze přídatnými látkami snižujícími viskozitu (triacetin) nebo mezipovrchové napětí (polysorbát 20, lecitin) neměla dostatečně pozitivní efekt.
- Přítomnost koenzymu Q10, tokoferol acetátu a perillového oleje jako modelových aktivních látek ve vnitřní fázi neovlivnila negativně granulometrické parametry nanoemulzí.
- Stabilitě nanoemulzí jako jejich nejdůležitějšímu parametru bude nutno věnovat pozornost.

9. LITERATURA

1 BECHER, P. *Emulsions: Theory and Practice*. 3rd ed. Washington: American Chemical Society, 2001, 513 p. ISBN 0841234965.

2 SHAH, P., BHALODIA, D., SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 2010, vol. 1, no. 1, p. 24-32. ISSN 0975-8453.

3 SOLANS, C., IZQUIERDO, P., NOLLA, J., *et al.* Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2005, vol. 10, p. 102-110. ISSN 1359-0294.

4 MASON, T., WILKING, J., MELESON, K., *et al.* Nanoemulsions: formations, structure and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2006, vol. 18, no. 41, R 635- R 666. ISSN 0953-8984.

5 SOLANS, C., ESQUENA, J., FORGIARINI, A. M., *et al.* Nano-emulsions: formation, properties, and applications. *Adsorption and Aggregation of Surfactants in Solution*, 2003, vol. 109, p. 524-554. ISBN 0824708431.

6 SHINODA, K., & SAITO, H. Effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1968, vol. 26, p. 70-74. ISSN 0021-9797.

7 SALAGER, J. L., LOAIZA-MALDONADO, I., MINANA-PÉREZ, M., *et al.* Surfactant-oil-water systems near the affinity inversion. Part I: Relationship between equilibrium phase behavior and emulsion type and stability. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 1982, vol. 3, p. 279-292. ISSN 0193-2691.

8 FRIBERG, S., & SOLANS, C. Emulsification and the HLB-temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1978, vol. 66, p. 367-368. ISSN 0021-9797.

9 FORSTER, T., & VON RYBINSKI, W. *Modern aspects of emulsion science*. Cambridge: The Royal Society and Chemistry, 1998, 450 p. ISBN 0854044396.

- 10 LACHMAN, L., LIEBERMAN, H. A., KANIG, J. L. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. 3rd ed. CBS Publishers & Distributors, 2009, p. 510-511. ISBN 8123916795.
- 11 JAFARI, S. M., HE, Y., & BHANDARI, B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. *International Journal of Food Properties*, 2006, vol. 9, p. 475-485. ISSN 1094-2912.
- 12 WALSTRA, P., & SMULDERS, P. *Modern Aspects of Emulsion Science*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1998, p. 56-99. ISBN 978-1-84755-147-4.
- 13 KENTISH, S., WOOSTER, T. J., ASHOKKUMAR, M., *et al.* The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, vol. 9, no. 2, p. 170-175. ISSN 1466-8564.
- 14 GUPTA, P. K., & CANNON, J. B. *Water-insoluble drug formulation*. Denver: Interpharm Press, 2000, 688 p. ISBN 0849396441.
- 15 TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2004, p. 108-109, 303-318. ISSN 0001-8686.
- 16 HIGUCHI, W. I., & MISRA, J. Physical degradation of emulsions Via the molecular diffusion route and the possible prevention thereof. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1962, vol. 51, p. 459-466. ISSN 0022-3549.
- 17 BUSZELLO, K., & MÜLLER, B. W. *Pharmaceutical emulsions and suspensions*. New York: Marcel Dekker, 2000, 660 p. ISBN 0824703049.
- 18 TIWARI, S. B., SHENOY, D. B., AMIJI, M. M. *Nanoemulsion Formulations for Improved Oral Delivery of Poorly Soluble Drugs*. Northeastern Univesity, US, 2006, vol. 1, 871 p. ISBN 0-9767985-6-5.
- 19 BENITA, S. *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*. Amsterdam: Harwod Academic Publishers, 1998, 352 p. ISBN 9789057023491.

- 20 BENITA, S., & LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1993, vol. 82, p. 1069-1079. ISSN 0022-3549.
- 21 WU, H., RAMACHANDRAN, CH., WEINER, N. D., *et al.* Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, vol. 220, p. 63-75. ISSN 0378-5173.
- 22 MEDINA, J., SALVADÓ, A., & DEL POZO, A. Use of ultrasound to prepare lipid emulsions of lorazepam for intravenous injection. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, vol. 216, p. 1-8. ISSN 0378-5173.
- 23 AKKAR, A., & MULLER, R. H. Formulation of intravenous Carbamazepine emulsions by SolEmuls Technology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003, vol. 55, p. 305-312. ISSN 0939-6411.
- 24 WANG, J. J., SUNG, K. C., HU, O. Y. P., *et al.* Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs. *Journal of Controlled Release*, 2006, vol. 115, p. 140-149. ISSN 0168-3659.
- 25 SANTINI, J.r., RICHARDS, A.C., SCHEIDT, R., *et al.* Microships as Controlled Drug-Delivery Devices. *Angewandte Chemie International Edition*, 2000, vol. 39, p. 2396-2407. ISSN 1433-7851.
- 26 DIAS, M. L. N., CARVALHO, J. P., RODRIGUES, D. G., *et al.* Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients in gynecologic cancers. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2007, vol. 59, no. 1, p. 105-111. ISSN 0344-5704.
- 27 SEKI, J., SONOKE, S., SAHEKI, A., *et al.* A nanometer lipid emulsion, lipid nano-sphere (LNS), as a parenteral drug carrier for passive drug targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, vol. 273, p. 75-83. ISSN 0378-5173.
- 28 OZPOLAT, B., LOPEZ-BERESTEIN, G., ADAMSON, P., *et al.* Pharmacokinetics of intravenously administered liposomal all-trans-retinoic acid (ATRA) and orally

administered ATRA in healthy volunteers. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2003, vol. 6, p. 292-301. ISSN 1482-1826.

29 CHARMAN, W.N., CHAN, H.K., FINNIN, B.C., *et al.* Drug Delivery: A Key Factor in Realising the Full Therapeutic Potential of Drugs. *Drug Development Research*, 1999, vol. 46, p. 316-327. ISSN 0272-4391.

30 KOPECEK, J. Smart and genetically engineered biomaterials and drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, vol. 20, p. 1-16. ISSN 0928-0987.

31 PACKHAEUSER, C.B., SCHNIEDERS, J., OSTER, C.G., *et al.* In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004, vol. 58, p. 445-55. ISSN 0939-6411.

32 AGNIHOTRI, S. A., MALLIKARJUNA, N.N., AMINABHAVI, T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2004, vol. 100, p. 5-28. ISSN 0168-3659.

33 SOOD, A., and PANCHAGNULA, R. Peroral Route: An Opportunity for Protein and Peptide Drug Delivery. *Chemical Reviews*, 2000, vol. 101, p. 3275-3303. ISSN 0009-2665.

34 WILDMAN, R. E. C. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. 2nd ed. CRC Press, 2006, 560 p. ISBN 9780849364099.

35 VELIKOV, K. P., and PELAN, E. Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter*, 2008, vol. 4, no. 10, p. 1964-1980. ISSN 1744-683X.

36 KABALNOV, A. Ostwald Ripening and Related Phenomena. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2001, vol. 22, no. 1, p. 1-12. ISSN 0193-2691.

37 SERGENT, O., MOREL, I., and CILLARD, J. Involvement of metal ions in lipid peroxidation: Biological implications. *Metal Ions in Biological Systems*, 1999, vol. 36, p. 251-287. ISSN 0949-8257.

38 KRISTL, J., VOLK, B., GASPERLIN, M., *et al.* Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, vol. 19, p. 181-189. ISSN 0928-0987.

39 LAWLESS, H. T., RAPACKI, F., HORNE, J., *et al.* The taste of calcium chloride in mixtures with NaCl, sucrose and citric acid. *Food Quality and Preference*, 2004, vol. 15, no. 1, p. 83-89. ISSN 0950-3293.

40 HORTER, D. and DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, vol. 46, p. 75-87. ISSN 0169-409X.

41 KAMEL, B. S., DAWSON, H., KAKUDA, Y. Characteristics and composition of melon and grape seed oils and cakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1985. vol. 62, no. 5, p. 881-883. ISSN 0003-021X.

42 VERESHCHAGIN, A. G. and NOVITSKAYA, G. V. The triglyceride composition of linseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1965, vol. 42, no. 11, p. 970-974. ISSN 0003-021X.

43 TRIPOLI, E., GIAMMANCO, M., TABACCHI, G., *et al.* The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 2005, vol. 18, p. 98-112. ISSN 0954-4224.

44 CREVEL, R. W., KERKHOFF, M. A., KONING, M. M. Allergenicity of refined vegetable oils. *Food and Chemical Toxicology*, 2000, vol. 38, p. 385-393. ISSN 0278-6915.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

GRAS	Generally Recognized As Safe
PIT	Phase-inversion temperature
FDA	Food and Drug Administration
PC	Phosphatidylcholin
HLB	Hydrophile-lipophile balance (hydrofilně-lipofilní rovnováha)
DMP	Dexamethason palmitát
ATRA	ALL-trans retinová kyselina
DDS	Drug delivery system (systém dodávání léků)
SLN	Solid lipid nanoparticle (pevné lipidové nanočástice)
ALA	Kyselina alfa-linolenová
L	Lecitin
P20	Polysorbát 20
Z-Ave	Intenzitní průměr
PdI	Index polydisperzity
P1-3	Pík 1-3

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Vysokotlaká homogenizace

(zdroj: <http://www.pharmainfo.net/pharma-studenmagazine/nanoemulsions-0>)

Obrázek 2 Malvern Zetasizer – nanoseries

(zdroj: <http://www.malvern.com/LabEng/products/zetasizer/zetasizer.htm>)

Obrázek 3 Kyveta pro měření velikosti částic

(zdroj: <http://www.helago-cz.cz/set/kyveta-macro-a-semi-micro-ps-a-pmma/>)

Obrázek 4 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 37; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 5 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 40; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 6 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 45; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 7 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 51; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 8 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 53; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 9 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 54; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 10 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 55; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 11 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 56; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 12 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 73; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 13 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 74; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 14 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 88; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 15 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 92; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 16 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer; vzorek č. 110; intenzitní průměr velikosti nanočástic

Obrázek 17 Záznam měření na přístroji Malvern Zetasizer, vzorek č. 112; intenzitní průměr velikosti nanočástic