

Myrhové mýdlo v kosmetických formulacích

Bc. Ivona Roubalová

Diplomová práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivona Roubalová**
Osobní číslo: **T19462**
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**
Studijní obor: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Myrhové mýdlo v kosmetických formulacích**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši na zadané téma.
2. Věnujte se problematice původu, složení a vlastností myrhové pryskyřice a myrhového oleje.
3. Dále studujte problematiku povrchově aktivních látek a jejich schopnosti stabilizovat emulzní systémy.

II. Praktická část

1. Stanovte základní charakteristiky připraveného myrhového mýdla v kontextu schopnosti snižovat povrchové a mezipovrchové napětí.
2. Určete jeho emulgační schopnosti a využijte je pro přípravu emulzí s obsahem různých typů bioaktivních olejů.
3. Vhodnými technikami stanovte fyzikálně-chemické charakteristiky připravených emulzí.
4. Sledujte rovněž jejich biologické charakteristiky. Získané výsledky zpracujte a formulujte závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] SARKER, D. K. (Ed). Pharmaceutical Emulsions: A Drug Developer's Toolbag. Wiley-Blackwell, 2013, ISBN: 978-0-470-97683-8.
- [2] TADROS T. F. (Ed). Emulsion Science and Technology. Wiley‐VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009, ISBN: 9783527325252.
- [3] SHEN, T.; LI, G. H.; WANG, X.N.; et al. The genus Commiphora: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, 142, 2, 2012, 319-330.
- [4] SHEN, T.; LOU, H. X. Bioactive constituents of myrrh and frankincense, two simultaneously prescribed gum resins in Chinese traditional medicine. CHEMISTRY & BIODIVERSITY, 5, 4, 2008,‏ 540-553.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 20. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta: Ivona Roubalová

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá studiem myrhového mýdla, připraveného procesem zmýdelnění myrhové pryskyřice. Teoretická část je zaměřena na popis základních vlastností a aplikačních možností myrhové pryskyřice a myrhového esenciálního oleje. Vzhledem k možnosti použití myrhového mýdla jako emulgátoru jsou dále představeny emulze a jejich charakterizace.

Praktická část se zabývá charakterizací myrhového mýdla a jeho využitím pro přípravu emulzí. Dále obsahuje studii emulzních systémů s různými typy olejů, charakterizaci těchto systémů, sledování jejich stability v průběhu skladování a mikrobiologickou analýzu.

Klíčová slova: povrchově aktivní látky, myrhová pryskyřice, esenciální oleje, emulze

ABSTRACT

The thesis deals with the study of myrrh soap, prepared by the saponification of myrrh resin. The theoretical part is focused on the description of properties and application of myrrh resin and myrrh essential oil. Due to the possibility of using myrrh soap as an emulsifier, emulsions are also described. The experimental part deals with the characterization of myrrh soap and its use for preparation of emulsions. It also includes the study of emulsions systems with different types of oils, characterization of these systems, monitoring of their stability during storage and microbiological analysis.

Keywords: surface active agents, myrrh resin, myrrh essential oil, emulsions

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za odborné vedení, velkou trpělivost a za pomoc a ochotu při zpracování této práce. Další poděkování patří také panu Ing. Ondřeji Rudolfovi Ph.D., za pomoc při dílčích měřeních pro praktickou část a panu Ing. Pavlovi Plevovi Ph.D., za cenné rady během mikrobiologické analýzy. Poděkování patří také mému příteli, kamarádům a rodině za podporu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 MYRHA	12
1.1 MYRHOVNÍK	12
1.2 MYRHOVÁ PRYSKYŘICE	13
1.2.1 Složení pryskyřice	13
1.2.2 Použití myrhyové pryskyřice	15
1.3 MYRHOVÝ OLEJ.....	15
1.3.1 Složení oleje	15
1.3.2 Formulace s obsahem myrhyového oleje	17
2 EMULZE	19
2.1 KLASIFIKACE EMULZÍ.....	19
2.1.1 Dle polarity disperzního prostředí.....	19
2.1.2 Dle koncentrace disperzního podílu.....	20
2.1.3 Dle velikosti dispergovaných kapek	20
2.2 PŘÍPRAVA EMULZÍ	21
2.2.1 Příprava klasických emulzí	22
2.2.2 Příprava nanoemulzí.....	22
2.2.3 Příprava mikroemulzí.....	24
2.3 MECHANISMUS ROZPADU EMULZÍ	25
2.3.1 Krémování a sedimentace	26
2.3.2 Flokulace	27
2.3.3 Ostwaldovo zrání	28
2.3.4 Koalescence.....	28
2.3.5 Fázová inverze	28
2.4 POUŽITÍ EMULZÍ	29
2.4.1 Kosmetický průmysl	29
2.4.2 Farmaceutický průmysl	30
2.5 MYRHOVÝ OLEJ A MYRHA VE FARMACII A KOSMETICE.....	31
2.5.1 Pevné lipidové nanočástice obsahující esenciální oleje z kadidla a myrhy	31
2.5.2 Myrhyový olej a myrha v přípravcích pro vnitřní i topickou aplikaci.....	31
3 CHARAKTERIZACE DISPERZNÍCH SYSTÉMŮ	33
3.1.1 Stanovení velikosti emulzních kapek metodou DLS	33
3.1.2 Stanovení zeta potenciálu.....	34
3.1.3 Stanovení reologických vlastností.....	35
3.1.4 Mikroskopické metody.....	36
3.1.5 Fázové studie – enkapsulační účinnost a index krémování	37
3.1.6 Vizualní popis	39

4	CÍLE PRÁCE	40
II	PRAKTICKÁ ČÁST	41
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
5.1	MATERIÁLY	42
5.2	PŘÍSTROJE	43
5.3	METODIKA	44
5.3.1	Spektrofotometrické stanovení.....	44
5.3.2	Měření povrchového napětí metodou Wilhelmyho destičky	44
5.3.3	Měření mezifázového napětí	45
5.3.4	Charakterizace disperzních systémů s myrhovým mýdlem	46
5.3.5	Infračervená spektroskopie myrhového mýdla	47
5.3.6	Příprava emulzí	48
5.3.7	Charakterizace emulzí	48
5.3.8	Mikrobiologická analýza.....	49
5.3.9	Plynová chromatografie myrhového éterického oleje.....	50
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	51
6.1	PŘÍPRAVA MYRHOVÉHO MÝDLA	51
6.1.1	Postup přípravy	51
6.1.2	Složení myrhového mýdla.....	51
6.2	CHARAKTERIZACE MYRHOVÉHO MÝDLA	52
6.2.1	Povrchové napětí.....	52
6.2.2	Mezifázové napětí	53
6.2.3	Velikost disperzních částic MM a ζ potenciálu.....	54
6.2.4	Velikost disperzních částic MM a ζ potenciálu v závislosti na pH.....	55
6.2.5	Velikost disperzních částic MM a ζ potenciálu v závislosti na koncentraci elektrolytu.....	56
6.2.6	Infračervená spektroskopie	59
6.3	CHARAKTERIZACE EMULZNÍCH SYSTÉMŮ.....	62
6.3.1	Emulze s oleji na bázi triacylglycerolů a vosku.....	62
	<i>Velikost emulzních kapek.....</i>	<i>62</i>
	<i>Fázové studie emulzí obsahujících oleje na bázi TAG nebo jojobový vosk</i>	<i>66</i>
6.3.2	Emulze s esenciálními oleji.....	70
	<i>Velikost emulzních kapek.....</i>	<i>70</i>
6.3.3	Emulze se složkami esenciálních olejů.....	74
	<i>Velikost emulzních kapek.....</i>	<i>74</i>
	<i>Fázové studie emulzí obsahující esenciální oleje a jejich složky</i>	<i>77</i>
6.4	MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA.....	83
6.5	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE MYRHOVÉHO ESENCIÁLNÍHO OLEJE	86
	ZÁVĚR	88
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	91
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	98
	SEZNAM OBRÁZKŮ	101

SEZNAM TABULEK.....	104
SEZNAM PŘÍLOH.....	105

ÚVOD

Díky protizánětlivým, antimikrobiálním a antikarcinogenním účinkům je myrhová pryskyřice již od starověku používána k vnitřním i topickým aplikacím. V nativní formě se jedná o červenohnědý, ztvrdlý rostlinný exsudát získávaný ze stromů a keřů určitých druhů myrhovníků, latinsky *Commiphora*. Mezi základní složky myrhy patří ve vodě rozpustná guma, v ethanolu částečně rozpustné pryskyřice a těkavé éterické oleje. Chemicky se jedná o velmi složitou směs aromatickým a cyklických uhlovodíků, polysacharidů a bílkovin. V dnešní době se myrha často používá k výrobě esenciálních olejů, které v kosmetickém průmyslu nacházejí uplatnění např. při výrobě parfémů, ústních vod a zubních past.

Myrhové mýdlo je novým typem povrchově aktivní látky připravené v laboratořích společnosti Nobilis Tilia. Jedná se hnědě zbarvenou kapalinu s charakteristickou myrhovou vůní, která vykazuje chování anionického surfaktantu. Mýdlo bylo připraveno rozpuštěním myrhové pryskyřice ve vodno-ethanolicím roztoku s hydroxidem sodným, kdy po procesu zmýdelnění došlo k oddělení dvou vrstev, horní a spodní vrstvy s odlišným složením. Horní vrstva obsahující rozpuštěnou myrhu s pryskyřičnými kyselinami byla dále neutralizována kyselinou mléčnou za vzniku myrhového mýdla (MM).

Diplomová práce se zabývá studiem takto připraveného MM, především jeho charakterizací měření povrchového a mezifázového napětí, měření velikosti částic (micel) a zeta potenciálu vodné disperze MM. Dále se věnuje použití MM jako emulgátoru pro přípravu emulzí typu O/V s vybranými kosmetickými oleji.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MYRHA

Jako myrha je nejčastěji označována červenohnědá ztvrdlá pryskyřice, jež se získává ze stromů nebo keřů některých druhů myrhovníků. Její název je odvozen z arabského slova „murr“, které v překladu znamená „hořký“. Od starověku byla myrha používána jako základní složka kadidla při náboženských obřadech a sloužila také pro výrobu parfémů. Znamé jsou také její léčivé účinky, kdy v čínské medicíně je díky svým protizánětlivým účinkům dodnes používána k ošetření ran, dále ke zmírnění bolesti otoků, k utlumení menstruačních bolestí a k léčbě rakoviny. V současnosti se z myrhy často vyrábí esenciální oleje, které mají také řadu terapeutických účinků [1].

1.1 Myrhovník



Obrázek 1 *Commiphora myrrha* [2]

Myrhovník latinsky zvaný *Commiphora* (z čeledi *Burseraceae*) je malý strom nebo keř s tlustým kmenem a krátkými, trnitými větvemi, rostoucí v Arábii, Africe, Indii a na Madagaskaru. Existuje více než 200 druhů myrhovníků, avšak pravou myrhu produkuje zejména druh *Commiphora myrrha* (myrhovník pravý), jež se nachází v jižní Arábii a severovýchodní Africe až na jih severovýchodní Keni. Dalšími zdroji pravé

pryskyřice jsou druhy *Commiphora abyssinica* (arabská myrha) a *Commiphora schimperi*. Největším světovým dodavatelem myrhy a mimo jiné i opopanaxu (podobná, ale méně kvalitní pryskyřice) je Somálsko. Charakteristickými znaky myrhovníku pravého jsou odlupující se bělavá nebo modrošedá kůra, pod kterou je zelenější kůra, drobné, lesklé, trojčetné listy, ostré trny a malé bílé květy[1], [3].

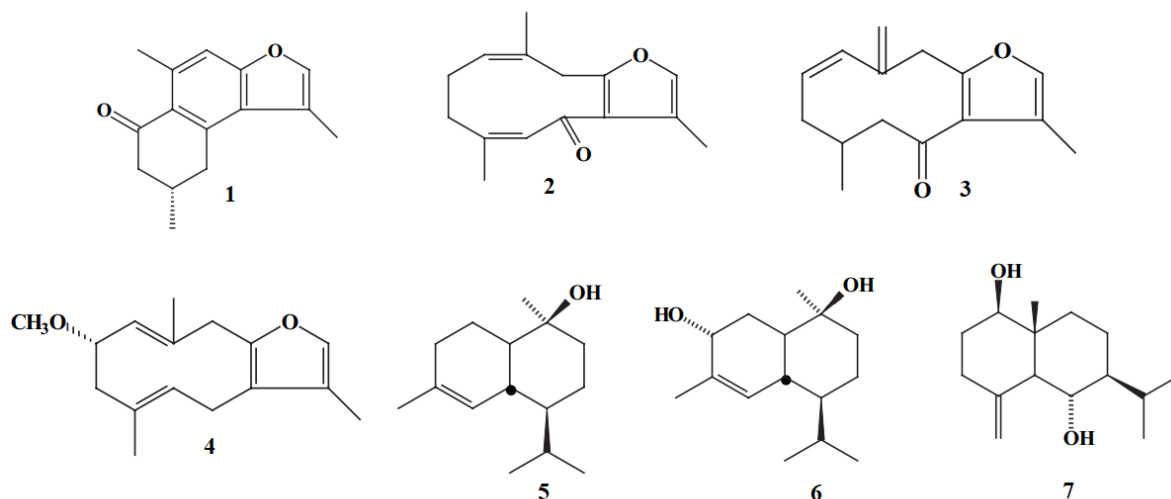
1.2 Myrhová pryskyřice

Pryskyřice se uvolňuje samovolně z trhlin v kůře myrhovníku anebo narušením kůry pomocí řezu, čímž dochází k exsudaci žlutozeleného rostlinného exsudátu tzv. klejopryskyřice. Na vzduchu dochází k jejímu postupnému vysychání a nakonec ke ztvrdnutí a zčervenání, za vzniku charakteristické aromatické myrhy [1]. Nejvyšší kvalita myrhy se získává z druhu *Commiphora myrrha* (Nees) Engler, kterou je možné najít pod synonymy *C. rivae* Engl., *C. coriacea* Engl. a *C. molmol* Engl. [1]. Myrha je částečně rozpustná v ethanolu (více než 30 % alkoholu), ve vodě a v etheru. Relativní zastoupení sloučenin v myrhové pryskyřici a její zbarvení závisí především na klimatických a environmentálních podmínkách. Myrhová pryskyřice vykazuje rozmanitou škálu barev, kdy existuje myrha červená, hnědá, oranžová, žlutá a také černá. Pomocí Ramanovy spektrometrie s Fourierovou transformací je možné snadno odlišit myrhu od kadidla a jiných pryskyřic a také lze identifikovat různě zbarvené vzorky. Protože myrha obsahuje vysoký podíl gummy, jsou její spektra dostatečně odlišná od spekter jakýkoli jiných pryskyřic, taktéž obsahujících diterpenoidy a triterpenoidy [1], [4].

1.2.1 Složení pryskyřice

K základním složkám myrhové pryskyřice patří ve vodě rozpustná guma (30–60 %), v ethanolu částečně rozpustné pryskyřice (25–40 %) a těkavé éterické oleje (3–8 %). Éterické oleje zahrnují monoterpeny, seskviterpeny a nízkomolekulární aromatické sloučeniny[5]. Charakteristický pryskyřičný zápach je odvozen od furanoseskviterpenů [1]. Mezi hlavní složky pryskyřic patří diterpenoidy, triterpenoidy, steroidy a lignany. Myrhová guma obsahuje polysacharidy, proteiny a popel [5]. Extrakcí 90% vodným roztokem alkoholu se z myrhy odstraní z velké části pryskyřice a získají se surové polysacharidy jako složky myrhové gummy. Po jejich hydrolyze bylo ve frakcích identifikováno nejméně patnáct aminokyselin a sacharidy zejména D-galaktóza, L-arabinóza a 4-methyl-D-glukuronová kyselina (v poměru 4 : 1 : 3) [1].

Pro izolaci sloučenin myrhové pryskyřice se používají různá extrakční činidla, kdy často používaný je ethanol, dále chloroform, hexan, ethylacetát, petroleum ether aj. [1]. Podle Evropské lékové agentury (European Medicines Agency – EMA) jsou hlavními složkami pryskyřice α -, β - a γ -commiphorové kyseliny, α -heerabomyrrhol a β -heerabomyrrhol, heeraborenese, commiferin, burseracin a různé terpeny. Dále obsahuje steroidy campesterol, cholesterol a β -sitosterol. Směs furanodien-6-onu a methoxyfuranoguai-9-ene-8-onu, jež byla izolována z pryskyřice *C. molmol*, vykazovala silné antimikrobiální a antifungální účinky proti patogenním mikroorganismům *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans* s nízkými hodnotami minimální inhibiční koncentrace (MIC) v rozmezí od 0,18–2,8 $\mu\text{g/ml}$ [6], [7], [8]. Z ethylacetátového extraktu pryskyřice *C. myrrha*, který byl separován na kolonové chromatografii (stacionární fáze – silikagel, mobilní reverzní fáze – oktadecyl), bylo ze získaných frakcí izolováno a identifikováno 7 aromatických seskviterpenů: myrrhone (1), epicurzerenone (2), furanogermacra-1E,10(15)-dien-6-one (3), 2-methoxyfuranogermacra-1(10),4-diene (4), T-cadinol (5), 3 α -hydroxy-T-cadinol (6), eudesm-4(15)-ene-1 β ,6 α -diol (7) [1]. V závislosti na zdroji pryskyřice a typu extrakčního činidla se složení extraktů z pryskyřic a zastoupení sloučenin v nich obsažených může lišit, přičemž škála izolovaných a identifikovaných sloučenin je velmi rozmanitá.



Obrázek 2 Aromatické seskviterpeny izolované z myrhové pryskyřice [1] (upraveno)

1.2.2 Použití myrhové pryskyřice

Rostlinné pryskyřičné exsudáty jako např. kadidlo (kadidlovník, *Boswellia*), benzoe (benzoin), dračí krev (dračinec dračí, *Dracaena draco*) a mimo jiné i myrha jsou důležitými surovinami pro přípravu tradičních léků. Jejich léčivé účinky a využití byly zaznamenány již v literatuře pocházející ze starověkého Egypta, Říma, Řecka a Číny. Z pryskyřic získaných z rodu *Commiphora* bylo identifikováno více než 300 sekundárních metabolitů včetně terpenoidů zejména seskvi- a triterpenoidů, steroidů, flavonoidů, lignanů a sacharidů. Tyto biologicky aktivní sloučeniny jsou zodpovědné za příznivé účinky na organismus, kdy v různých studiích byly zkoumány antiproliferativní, protizánětlivé, antimikrobiální, antitrombotické, hepatoprotektivní vlastnosti rafinovaných metabolitů i surových extraktů. Dále jsou myrhové výtažky součástí přípravků pro léčbu artritidy, parazitárních infekcí, orálních a gastrointestinálních onemocnění. V dermatologii se lokální aplikace myrhové tinktury používá k léčbě kožních vředů, akné, drobných ran a oděrek [8], [9].

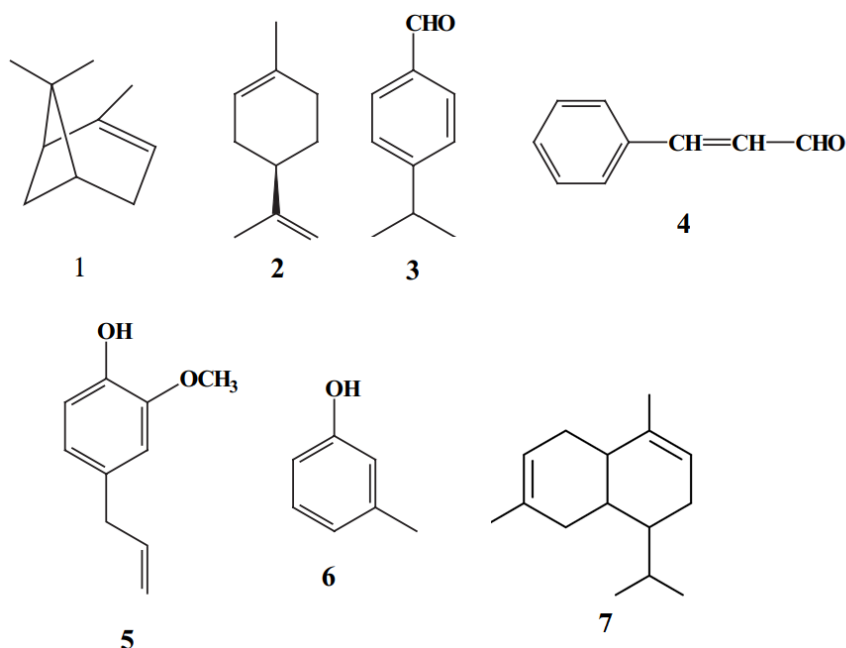
1.3 Myrhový olej

Olej z myrhy, pro který je typická těžká balzámová vůně, je cennou složkou parfémů. Jedná se o tekavou, žlutohnědou kapalinu obsahující ve svém složení organické, především cyklické sloučeniny, jako jsou steroidy, steroly a terpeny [1]. Esenciální myrhový olej není toxický a má, dle některých výzkumů, protizánětlivé a antischistosomální účinky (působí na schistosomy také zvané jako krevničky – rod motolice). V kosmetickém průmyslu nachází uplatnění při výrobě parfémů, zubních past a ústních vod. Z myrhy se olej nejčastěji získává hydrodestilací, destilací vodní parou a extrakcí rozpouštědlem. Dalším možným způsobem je získávání oleje extrakcí oxidem uhličitým v superkritickém stavu. Tato metoda extrakce se provádí při určitém tlaku a teplotě, kdy se CO₂ chová jako rozpouštědlo a podmínky extrakce minimalizují ztrátu tekavých vonných sloučenin [10].

1.3.1 Složení oleje

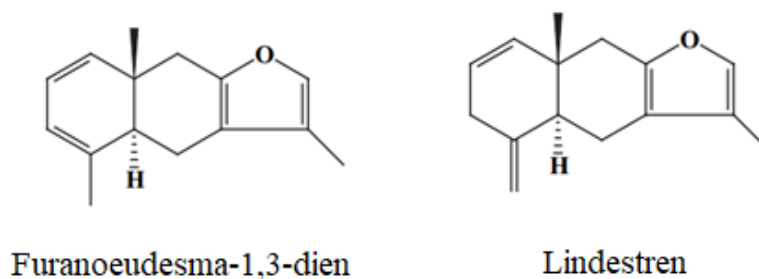
Chemické složení myrhového oleje bylo zkoumáno již na počátku 20. století, kdy bylo z doložených studií zjištěno, že olej obsahuje následující sloučeniny: α -pinen (1), limonen (2), kuminaldehyd (3), cinnamaldehyd (4), eugenol (5), m-kresol (6), kadinen (7),

bicyklické seskviterpeny, tricyklické seskviterpeny (heerabolen), kyselinu mravenčí, kyselinu octovou, kyselinu myrholovou (myrrholic acid) a kyselinu palmitovou [1].



Obrázek 3 Sloučeniny obsažené v myrhovém oleji [1] (upraveno)

Pro analýzu sloučenin myrhového oleje je vhodnou metodou plynová chromatografie, kdy lze jako detektory použít hmotnostní spektrometr (GC/MS) a infračervený spektrometr (GC/FTIR). Pozdější analytický rozbor myrhového oleje prokázal přítomnost dalších chemických sloučenin, které jsou uvedeny v tabulce v Příloze 1. Podle této analýzy je za typické aroma myrhového oleje zodpovědná směs furanoedesma-1,3-dienu a lindestrenu [1], [11].



Obrázek 4 Sloučeniny typické pro myrhové aroma [1]

Další analýzou bylo v myrhovém oleji získaném z pryskyřice *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. hydrodestilací, destilací vodní parou a extrakcí superkritickým CO₂, identifikováno

pomocí GC/MS 26 sloučenin. Nejvíce zastoupenými složkami byly furanoeudesma-1,3-dien (~35 %) a lindestren (~13 %), dalšími detekovanými sloučeninami se zastoupením nad 1,5 % byly curzeren, germacron, 8-hydroxy-isobornyl isobutyrát, 6-hydroxy-isobornyl isobutyrát, β -elemen a atractylon, přičemž procentuální zastoupení jednotlivých sloučenin ve třech různých frakcích získaných různými postupy izolace se výrazně nelišilo s výjimkou curzerenu a germacronu, viz *Tabulka 1* [10].

Tabulka 1 Složky obsažené v myrhovém oleji [10] (upraveno)

Sloučenina	SFE [%]	HD [%]	SD [%]
furanoeudesma-1,3-dien	34,9	38,6	33,5
lindestren	12,9	14,4	13,1
curzeren	8,5	17,5	14,7
germacron	5,8	2,8	3,4
8-hydroxy-isobornyl isobutyrát	3,6	2,0	1,8
6-hydroxy-isobornyl isobutyrát	3,5	3,8	3,0
β -elemen	3,0	4,3	3,6
atractylon	2,8	2,5	1,7

*SFE – extrakce superkritickým CO₂, HD – hydrodestilace, SD – destilace vodní parou

Jednotné chemické složení myrhového oleje nelze určit, protože v závislosti na typu myrhové pryskyřice a způsobu získávání oleje se přítomnost a zastoupení jednotlivých sloučenin může lišit. Lze však s jistotou konstatovat, že hlavními složkami oleje jsou seskviterpeny a monoterpeny, především furanoeudesma-1,3-dien a lindestren. Na základě přítomnosti těchto sloučenin je možné rozlišit falšování komerčních myrhových olejů nejčastěji oleji získanými z opopanaxu [1].

1.3.2 Formulace s obsahem myrhového oleje

Myrhový esenciální olej poskytuje díky výše uvedeným biologicky aktivním látkám celou řadu benefitů, mezi které patří především antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální (působí proti bakteriím i plísním), antiseptické, antikarcinogenní, analgetické a stimulační účinky. Lze jej aplikovat lokálně v ředěné formě, anebo jako součást krémů, může se inhalovat nebo použít jako doplněk stravy. Podporuje imunitní, nervový, dýchací, zažívací a vylučovací systém. Používá se pro zvýšení obranyschopnosti těla a je vhodný na suchou, popraskanou a citlivou pokožku, kterou chrání před volnými

kyslíkovými radikály, zmírňuje projevy photoagingu a tím působí proti vráskám. Je možné jej aplikovat na ekzematickou a aknézní pleť pro zmírnění bolesti a zánětu. V zubních pastách a gelech posiluje dásně a podporuje zdraví a hygienu ústní dutiny. Může být obsažen v šamponech a kondicionérech, kdy posiluje vlasy a zvyšuje jejich lesk. Je vhodný také na léčbu urogenitálních infekcí [12].

Nobilis Tilia nabízí několik produktů obsahujících myrhový éterický olej anebo extrakt z myrhové pryskyřice. Mezi tyto produkty patří Krém na ruce s myrhou, Intimní gel Fema a Šampon pro objem vlasů. Dále je k dostání samotný éterický olej Myrha, který je zakomponovaný i do směsi éterických olejů s názvem Kouzlo adventu [13].



Obrázek 5 Produkty značky Nobilis Tilia [13]

2 EMULZE

Emulze patří mezi heterogenní disperzní systémy, které se skládají ze dvou vzájemně nemísitelných nebo omezeně mísitelných kapalin. Obsahují dvě fáze – vnější kontinuální fázi (disperzní prostředí) a vnitřní fázi, která je tvořena dispergovanou látkou. Dispergovaná látka je ve formě drobných kapiček kapaliny rozptýlena (dispergována) v druhé kapalině [14].

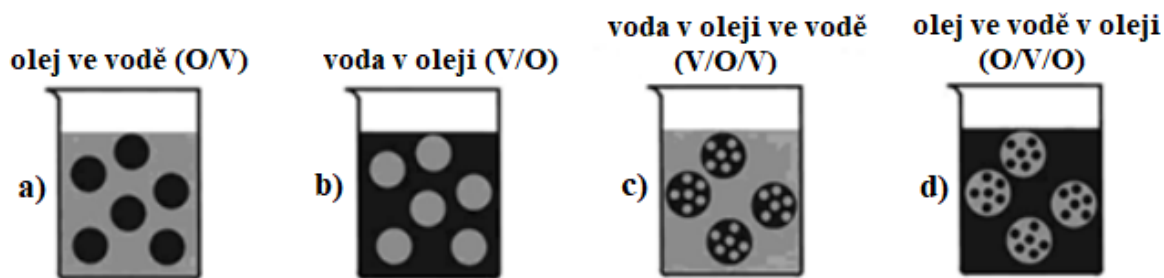
Zpravidla jsou tvořeny kapalinami s rozdílnou hustotou a polaritou (nejčastěji olej a voda), proto je pro vznik emulze nutná přítomnost třetí složky, emulgátoru, který umožňuje dispergaci dvou vzájemně nemísitelných kapalin tím, že snižuje mezifázové napětí. Emulgátor zjednodušuje přípravu emulzí a zároveň emulze stabilizuje a zabraňuje jejich rozpadu [15].

2.1 Klasifikace emulzí

Emulze lze rozdělit podle různých kritérií, z nichž zásadní je polarita disperzního prostředí, koncentrace disperzního podílu a velikost dispergovaných kapek [15].

2.1.1 Dle polarity disperzního prostředí

Podle polarity disperzního prostředí a dispergované fáze se emulze dělí na přímé a obrácené. Přímé emulze (emulze prvního druhu) jsou emulze typu O/V (olej ve vodě), ve kterých je disperzní prostředí tvořeno polárnější kapalinou a dispergovaná látka je nepolární nebo málo polární kapalina. Obrácené emulze, označovány jako emulze druhého druhu, jsou emulze typu V/O (voda v oleji), jejichž disperzní prostředí je tvořeno nepolární kapalinou, ve které jsou rozptýleny kapičky polárnější kapaliny. O jaký typ emulze se jedná lze určit např. měřením elektrické vodivosti disperzního prostředí, kdy vodivost emulzí O/V je mnohem vyšší než u emulzí V/O, dále určením schopnosti rozpouštět polární nebo nepolární barviva, nebo určením smáčivosti či pozorováním emulze pod ultrafialovým zářením (olejová fáze opaleskuje). Existují také vícenásobné emulze a to „voda v oleji ve vodě“ (V/O/V) a „olej ve vodě v oleji“ (O/V/O), viz *Obrázek 6* [15].



Obrázek 6 Typy emulzí dle polaridy disperzního prostředí [17] (upraveno)

2.1.2 Dle koncentrace disperzního podílu

Podle tohoto kritéria se emulze dělí na zředěné, koncentrované a vysoce koncentrované emulze. U zředěných emulzí zaujímá dispergovaná fáze maximálně 2 % celkového objemu, průměr emulzních kapiček je řádově 10^{-7} m, což je rozměr blízký velikosti koloidních částic. Koncentrované emulze mohou v monodisperzních systémech, jež jsou tvořeny nedeformovanými sférickými kapkami, dosáhnout koncentrace disperzní podílu až 74 obj. %. Koncentrovanější emulze lze připravit u polydisperzních systémů, ve kterých menší kapičky vyplňují prostory mezi velkými. Vysoce koncentrované (gelovité) emulze obsahují kapky disperzního podílu uloženy tak těsně vedle sebe, že u nich dochází k vzájemné deformaci, kapky mají tvar mnohostěnů a jsou od sebe odděleny tenkým filmem kontinuální fáze [15].

2.1.3 Dle velikosti dispergovaných kapek

Podle rozmezí velikosti dispergovaných kapek se emulze klasifikují do tří základních skupin, a to makroemulze (klasické, konvenční emulze), nanoemulze a mikroemulze (miniemulze) [16], [18].

Makroemulze jsou termodynamicky nestabilní systémy s velikostí kapek od 0,1 do 100 μm . Jedná se o zakalené, mléčně zbarvené emulze, které se vyskytují v nerovnovážném stavu a jejich vlastnosti závisí na složení, teplotě a způsobu přípravy. Jejich příprava je založena na mechanickém míchání emulze za použití různých mechanických zařízení např. míchadel, homogenizátorů nebo ultrazvuků. Pokud makroemulze není dostatečně stabilizována vhodným emulgátorem, dochází u ní s postupem času k samovolnému rozpadu na dvě původní vzájemně nemísitelné kapaliny. Jako emulgátory se nejčastěji používají surfaktanty, mezi další účinné emulgátory patří polysacharidy, proteiny nebo syntetické polymery [16], [18], [19].

Nanoemulze a mikroemulze jsou koloidní systémy, které jsou transparentní nebo slabě opalescentní, s nízkou viskozitou a velkou plochou povrchu na jednotku objemu. Liší se však velikostí kapek a stabilitou [20].

Nanoemulze jsou, stejně jako makroemulze, termodynamicky nestabilní, avšak vzhledem k malé velikosti jejich kapek mohou vykazovat po dlouho dobu kinetickou stabilitu. Velikost kapek se u nanoemulzí pohybuje v rozmezí 20–500 nm. Pro jejich přípravu je nutné dodat energii a jejich vlastnosti závisí na způsobu přípravy. Malá velikost nanoemulzních kapek umožňuje úpravu reologických vlastností a zajišťuje stabilitu emulzí [18], [20].

Pro mikroemulze je charakteristická velikost kapek od 5 do 100 nm, jsou makroskopicky homogenní, ale na mikroskopické úrovni heterogenní. Jedná se o izotropní, termodynamicky stabilní systémy, které vznikají spontánně kombinací vhodného množství lipofilní a hydrofilní látky, surfaktantu a kosurfaktantu, nejčastěji alkoholu se středním řetězcem. Mezi jejich charakteristické vlastnosti patří velmi nízké mezifázové napětí a velká solubilizační kapacita pro sloučeniny rozpustné ve vodě i v oleji [20].

Tabulka 2 Souhrn typických vlastností pro jednotlivé typy emulzí [18], [20]

	Makroemulze	Nanoemulze	Mikroemulze
Velikost	1–100 μm	20–500 nm	5–100 nm
Tvar kapek	sférický	sférický	sférický, lamelární
Stabilita	termodynamicky nestabilní, slabě kineticky stabilní	termodynamicky nestabilní, kineticky stabilní	termodynamicky stabilní
Metody přípravy	vysoko a nízkoenergetické metody	vysoko a nízkoenergetické metody	nízkoenergetické metody
Polydisperzita	vysoká (>40 %)	nízká (<10–20 %)	nízká (<10 %)

2.2 Příprava emulzí

Příprava emulzí, neboli emulgace, je zpravidla založena na mechanické dispergaci disperzního podílu v disperzním prostředí ze přítomnosti emulgátoru. Při emulgaci dochází k intenzivnímu promíchávání a protřepávání dispergovaných kapalin, které se podrobují vibracím pomocí míchadel, koloidních mlýnů nebo ultrazvuku. U takto připravených

polydisperzních emulzí se pro zvýšení jejich stability provádí dodatečná homogenizace ve speciálních homogenizátorech [15].

2.2.1 Příprava klasických emulzí

Jedná se o poměrně snadnou přípravu, při které se nejprve emulgátor rozpustí ve fázi, ve které má větší rozpustnost a poté se přidává druhá fáze. Podle Bancroftova pravidla se fáze, ve které je emulgátor rozpustnější, stane kontinuální fází. Po smíchání všech složek následuje intenzivní homogenizace směsi. Turbulentní míchání je rozhodujícím faktorem pro vytvoření dostatečně malých kapiček u emulzí O/V. Po počátečním míchání je často zařazeno druhé míchání s použitím vysoké mechanické smykové síly. Využit lze celou řadu homogenizátorů jako např. ultrazvukové generátory, koloidní, kolíkové nebo ozubené kotoučové mlýny. Mezi další zařízení pro výrobu emulzí patří atomizéry a nebulizéry, které umožňují přípravu emulzí s relativně úzkou distribucí kapiček. Při výrobě emulzí V/O, u kterých je olejová fáze viskózní, je nutné přidávat vodnou fázi do oleje pomalu, aby nedošlo k zachycení vzduchových bublinek. U systémů s vysokou viskozitou se pro homogenizaci používají votátory, které seškrabují emulzi ze stěn nádoby [17], [21].

2.2.2 Příprava nanoemulzí

Při výrobě nanoemulzí je nutné dodání energie, a to buď vnější (disperzní nebo vysokoenergetické metody) nebo vnitřní (kondenzační nebo nízkoenergetické metody). U vysokoenergetických metod platí, že čím vyšší je dodaná energie, tím menší je velikost kapiček. Pro generování kapiček v nanometrovém měřítku se používají ultrazvukové sonikátory anebo vysokotlaké homogenizátory, ve kterých hrubá emulze prochází homogenizačním ventilem nebo štěrbinou při tlaku od 7 do 24 MPa. Emulgace je však neefektivní proces, protože se přibližně 99 % dodané energie přeměňuje na teplo. Z tohoto důvodu jsou nízkoenergetické metody vhodnou alternativou, protože pro emulgaci se využívá vnitřní energie emulzních komponent, která se uvolňuje během procesu emulgace. Navíc lze dosáhnout menších velikostí kapiček a jejich užší distribuce než u vysokoenergetických metod. Nízkoenergetické metody jsou založeny na fázové inverzi (změna emulze O/V na V/O a naopak), ke které dochází při teplotě fázové inverze (PIT – phase inversion temperature), nebo změnou složení emulze při konstantní teplotě tzv. metoda fázového inverzního složení (PIC – phase inversion composition) [17], [20].

Metoda PIT je založena na schopnosti povrchově aktivních látek (PAL) měnit spontánní zakřivení filmu v závislosti na teplotě. V průmyslových aplikacích se používají neionické surfaktanty polyoxyethylenového typu, u kterých se hydrofilně-lipofilní vlastnosti mění v závislosti na teplotě. Při nízkých teplotách mají tyto PAL hydrofilní charakter a jsou vhodné jako emulgátory pro emulze O/V. Se zvyšující se teplotou dochází k dehydrataci polyoxyethylenových řetězců, surfaktant se stává lipofilním a dochází ke změně na emulzi V/O. Při teplotě PIT je afinita PAL k vodní a olejové fázi rovnovážná a v závislosti na koncentraci surfaktantu a emulze, může docházet ke vzniku struktur s nulovým středním zakřivením, jako jsou bikontinuální mikroemulze nebo lamelární kapalně krystaly. Díky extrémně nízkému mezifázovému napětí (10^{-2} až 10^{-4} mN·m⁻¹) dochází při PIT k tvorbě velmi malých emulzních kapiček. Vznikají však nestabilní emulze, protože filmy oddělující jednotlivé kapičky nejsou pevné a rychlost koalescence je extrémně vysoká. Pro výrobu kineticky stabilních emulzí je zapotřebí rychlého chlazení nebo zahřívání. Jakmile je dosaženo PIT teploty následuje rychlé ochlazení systému, což způsobí změnu spontánního zakřivení vrstev PAL a vznikne nanoemulze O/V. Výroba nanoemulzí V/O je analogická, ale k jejich vzniku dochází při teplotách vyšších než PIT. Pokud chlazení a ohřev nejsou dostatečně rychlé, převládá koalescence a vznikají hrubé polydisperzní emulze [17], [20].

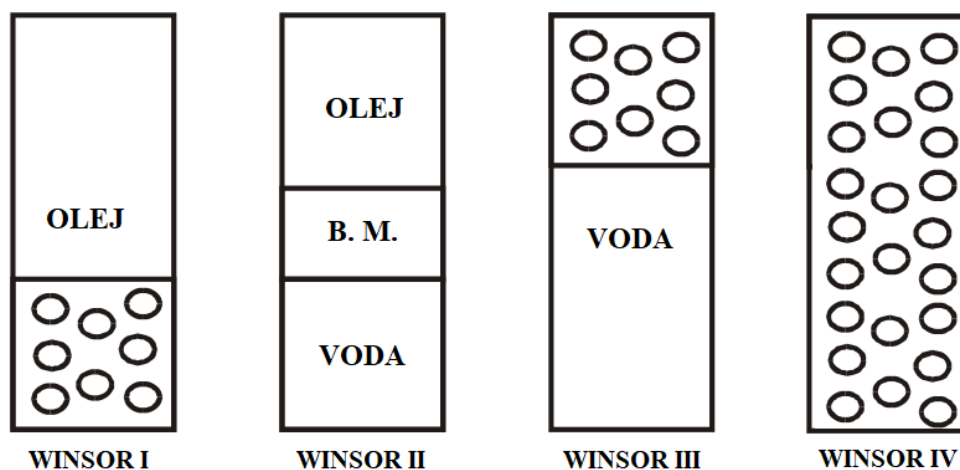
Další možností, jak dosáhnout změny spontánního zakřivení je metodou PIC, která je založena na změně objemové frakce vodné fáze při konstantní teplotě. Jak roste objemový podíl vody u emulze V/O, roste i stupeň hydratace PAL a postupně se zvyšuje a mění spontánní zakřivení z inverzního (negativního) na rovinné (nulové) zakřivení. Kolem přechodového složení je afinita PAL k vodné a olejové fázi rovnovážná a vznikají dvouřadé nebo lamelární struktury. S dalším přidáváním vody se struktury s nulovým zakřivením transformují do malých metastabilních kapiček O/V (struktury s velmi pozitivním zakřivením vrstvy PAL). Aby bylo možné připravit malé kapičky s nízkou polydisperzitou, musí být v inverzním bodě veškerý olej začleněn do bikontinuálních nebo lamelárních struktur. Pokud část oleje zůstane mimo tyto struktury, z volného oleje vzniknou velké polydisperzní kapičky. Čím více je přítomno volné olejové frakce, tím vyšší je střední velikost a polydisperzita [20].

2.2.3 Příprava mikroemulzí

Mikroemulze se připravují spontánní emulgací metodou fázové titrace. Poprvé byly mikroemulze popsány Schulmanem v roce 1943, který sledoval spontánní vznik transparentního roztoku při titraci hrubé emulze složené z vody, oleje a mýdla, která byla titrována alkoholem se středním řetězcem. Jedná se o složité systémy, které mohou být popsány pomocí fázových diagramů, jejichž konstrukce je užitečná pro studii fázového chování při míchání jednotlivých komponent [20].

Hlavní způsoby fázového chování popsal Winsor v 50. letech 20. století v systémech složených z vody, oleje, surfaktantu, kosurfaktantu a anorganického elektrolytu (Obrázek 7). Ve směsích s neměnným množstvím vody, oleje a vhodnou koncentrací surfaktantu byly při zvýšení koncentrace elektrolytu nebo kosurfaktantu pozorovány tyto fázové rovnováhy:

- Winsor I – mikroemulze O/V koexistující s přebytečnou olejovou fází
- Winsor II – mikroemulze V/O koexistující s přebytečnou vodnou fází
- Winsor III – bikontinuální mikroemulze koexistující s přebytečnou vodnou a olejovou fází
- Winsor IV – jednofázový homogenní systém obsahující olej, vodu a surfaktant, bez fázového přebytku

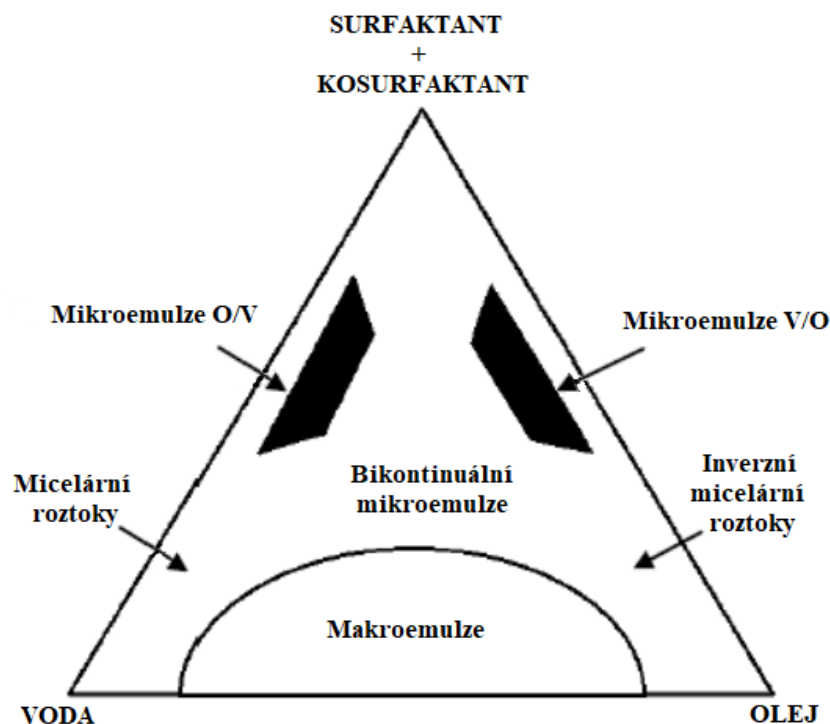


Obrázek 7 Fázové rovnováhy dle Winsora [22] (upraveno)

Výše uvedené fázové rovnováhy jsou založeny na změně zakřivení vrstvy PAL. Bikontinuální struktura je složená z neuspořádaných surfaktantových filmů oddělujících

vodnou a olejovou fází a vzniká při extrémně nízkých hodnotách mezifázového napětí na fázovém rozhraní O/V [20], [22].

Pro popis komplexní série interakcí mezi jednotlivými složkami se v praxi nejčastěji využívají pseudoternární fázové diagramy, pomocí kterých je možné složité systémy složené z různých typů PAL, olejů a aditiv zjednodušit klasifikací složek do kategorií polární, nepochární a amfifilní. Tyto typy diagramů využívají neměnného složení jedné složky emulze, přičemž se mění složení zbylých tří složek anebo zůstává neměnný poměr dvou složek, nejčastěji se jedná o surfaktant a kosurfaktant. Při konstantní teplotě a tlaku je pseudoternární diagram tříložkových mikroemulzí rozdělen do dvou nebo čtyř oblastí, znázorňujících oblast složení, ve které daný systém tvoří mikroemulze, viz *Obrázek 8* [20], [22].



Obrázek 8 Pseudoternární fázový diagram [23] (upraveno)

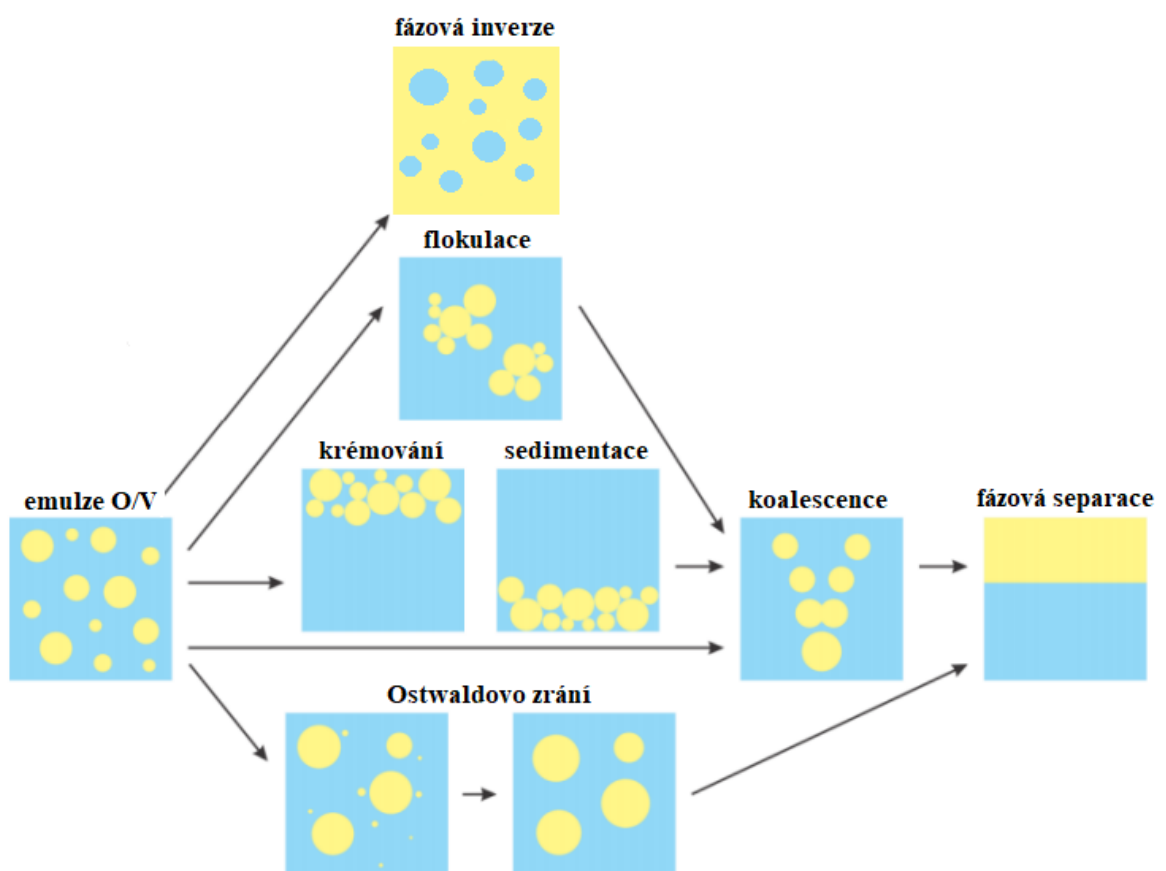
2.3 Mechanismy rozpadu emulzí

Během skladování může u emulzí docházet k několika procesům, které souvisejí s jejich rozpadem (*Obrázek 9*) a závisí na:

- distribuci velikosti částic a rozdílu hustoty mezi dispergovanou fází a disperzním prostředím – krémování a sedimentace

- velikosti přitažlivých a odpudivých sil – flokulace
- rozpustnosti dispergovaných částic – Ostwaldovo zrání
- stabilitě kapalného filmu mezi kapičkami emulze – koalescence
- fázové inverzi

Fyzikálních jevy probíhající při procesech rozpadu emulzí jsou komplikované a pro jejich popis je důležitá analýza povrchových sil. Výše uvedené procesy navíc mohou probíhat současně, což zvyšuje náročnost analýzy [14].



Obrázek 9 Mechanismy rozpadu emulze [24] (upraveno)

2.3.1 Krémování a sedimentace

Krémování a sedimentace vznikají v důsledku působení vnějších sil, nejčastěji gravitační nebo odstředivé síly. Když tyto síly překonají intenzitu tepelného pohybu částic (Brownův pohyb), dochází v systému ke vzniku koncentračního gradientu a kapičky emulze se pohybují směrem k povrchu, pokud je jejich hustota menší než hustota prostředí anebo se pohybují ke dnu, jestliže je jejich hustota větší než hustota disperzního prostředí.

Výjimečně mohou kapičky vytvářet na povrchu nebo na dně hustou kompaktní vrstvu (náhodnou nebo uspořádanou), přičemž zbývající objem zaujímá kontinuální fáze. Krémování je typický jev pro emulze O/V, protože hustota většiny olejů je nižší než hustota vodní fáze, a proto se olejová fáze snadno hromadí na hladině emulze. Naopak emulze typu V/O mají tendenci sedimentovat. Pro prevenci proti rozpadu emulzí vlivem působení vnějších sil existuje několik metod. Protože rozdílná hustota obou fází je příčinou krémování a sedimentace, je minimalizace rozdílu hustot mezi kapkami a okolní kapalinou jednou z možností jak zabránit těmto procesům. Další metodou je redukce velikosti kapek. Do určité velikosti kapek může Brownův pohyb převyšovat gravitační sílu a tak je zabráněno krémování a sedimentaci. Tento princip platí u nanoemulzí a mikroemulzí, které obsahují malé kapičky s rozměry řádově v nm a vykazují velmi malé nebo žádné krémování a sedimentaci. Dalším účinným způsobem je použití látek, které upravují viskozitu kontinuální fáze. Zvýšením viskozity kapaliny se snižuje rychlost, se kterou se kapky pohybují. K tomuto účelu mohou sloužit vysokomolekulární přírodní nebo syntetické polymery jako např. xanthanová guma, hydroxyethylcelulóza nebo algináty [14], [25].

2.3.2 Flokulace

Flokulace je proces spojený s agregací dvou a více kapek do větších celků, přičemž nedochází ke změně primárních rozměrů kapek a zachovává se jejich individuální identita. Tento proces je výsledkem působení van der Waalsových sil. K flokulaci dochází, když v disperzním systému není dostatečný odpor k udržení kapek ve vzdálenosti v místech, kde jsou van der Waalsovy síly slabé. Jedná se o reverzibilní proces, který lze překonat dodáním energie do systému např. protřepáním (nižší energie než pro emulgaci). Jedním ze způsobů jak zamezit flokulaci je elektrostatická stabilizace pomocí ionických PAL. Přítomnost ionického surfaktantu vede k tvorbě elektrických dvojrstev, jejichž odpudivé síly jsou vyšší než přitažlivé van der Waalsovy síly. Stabilita potom závisí na elektrických vlastnostech kapek, pH a iontové síle vodné fáze. Druhou a velmi účinnou metodou proti flokulaci je stérická stabilizace pomocí neionických surfaktantů nebo polymerů, nejčastěji polysacharidů. Pro tuto stabilizaci je důležité celkové pokrytí kapek emulgátorem a jeho pevné zakotvení, dále tloušťka absorbované vrstvy a zachování emulgátoru v dobrých rozpouštěcích podmínkách [14], [25], [26].

2.3.3 Ostwaldovo zrání

Ostwaldovo zrání, označované taktéž jako disproporcionace, je výsledkem rozdílné rozpustnosti mezi malými a velkými emulzními kapkami. K disproporcionaci dochází především v systémech, ve kterých jsou kapaliny omezeně vzájemně mísitelné a distribuce kapek je polydisperzní. V takových typech emulzí mají menší kapičky větší rozpustnost než velké kapky. S postupem času malé kapičky zanikají, jejich molekuly difundují do větších kapek, což způsobuje posun distribuce velikosti částic k vyšším hodnotám. Teoreticky může Ostwaldovo zrání vést až ke kondenzaci všech kapiček do jedné kapky, ale v praxi k tomuto jevu nedochází, protože rychlost růstu klesá s rostoucí velikostí kapek. Zpomalení Ostwaldova zrání je možné dosáhnout přidáním látky rozpustné v dispergované fázi, ale nerozpustné v kontinuální fázi (u emulzí O/V se používá např. skvalen), což zamezuje shlukování kapek do větších celků. Rychlost Ostwaldova zrání lze dále významně snížit použitím surfaktantů, které se silně absorbují na mezifázové rozhraní O/V. Jedná se o nejčastější proces rozpadu nanoemulzí, avšak vhodným složením a způsobem přípravy, je možné vyrobit nanoemulze s vysokou kinetickou stabilitou [14], [20], [25].

2.3.4 Koalescence

Při koalescenci dochází ke ztenčování a rozrušování kapalného filmu mezi kapkami, přičemž může dojít k prasknutí filmu a ke spojení dvou a více kapiček za vzniku jedné kapky s větším objemem, ale menší mezifázovým povrchem. Důvodem koalescence je kolísání (fluktuace) tloušťky filmů u kapek, které jsou v těsné blízkosti, kdy dochází ke vzniku povrchových vln a tenký film vzájemně oddělující kapky se ztenčuje a praská. Mezním případem koalescence je úplný rozpad emulze na dvě separované fáze. Obecně platí, že menší kapičky jsou méně náchylné k povrchovým výkyvům, což vysvětluje vysokou stabilitu mikroemulzí a nanoemulzí. Pro zamezení koalescence se používá směs anionických a neionických surfaktantů, které způsobují vznik lamelárních kapalných krystalických struktur na mezifázovém rozhraní O/V [14], [25], [26].

2.3.5 Fázová inverze

Jedná se o proces spojený s výměnou dispergované fáze a disperzního prostředí. Pokud dojde ke změně podmínek podílejících se na stabilizaci určitého typu emulze, může dojít k inverzi fází, při které se např. emulze O/V přemění na emulzi V/O a naopak. Ve většině případů při inverzi vzniká přechodný stav, který obsahuje násobné emulze.

Faktory ovlivňující inverzi jsou teplota, koncentrace elektrolytu anebo použití emulgátoru, vhodného pro opačný typ emulze [14], [25].

2.4 Použití emulzí

Emulze mají širokou škálu využití v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Vzhledem k jejich specifickým vlastnostem nacházejí uplatnění v celé řadě kosmetických přípravků a léčiv. Při výběru složek potřebných pro přípravu emulzí, jako jsou surfaktanty, kosurfaktanty, oleje a další aditiva, je v první řadě nutné posoudit, zda tyto látky nejsou toxické, nezpůsobí iritaci či senzibilizaci pokožky a dále jaký budou mít vliv na vlastnosti a stabilitu výsledné formulace [17], [20].

2.4.1 Kosmetický průmysl

V kosmetických přípravcích mohou být emulze přítomné ve formě jako krémů, sprejů nebo pěn. Mají schopnost solubilizovat složky rozpustné ve vodě i v oleji, zajišťují lepší propustnost účinných látek do pokožky a napomáhají zvyšovat její hydrataci [20].

Emulze typu O/V jsou snadno roztíratelné a vstřebávají se rychleji než emulze V/O, které zanechávají na pokožce mastný film. Vodná fáze (60–80 obj. %) obsahuje látky, mezi které patří: humektanty (látky přímo zvyšující obsah vody ve *Stratum corneum* – glycerol, sorbitol), chelatační činidla (vážou polyvalentní ionty, stabilizují emulzi – EDTA, ethylendiamintetraoctová kyselina), konzervanty (imidazolidinyl urea, bronopol), zahušňovadla (polymery) a aktivní látky (bílkoviny, ve vodě rozpustné vitamíny a minerály). Olejová fáze (20–40 obj. %) obsahuje oleje, tuky a vosky přírodního i syntetického původu, barviva a vonné látky. Mezi látky syntetického původu, získávané jako ropné frakce, patří minerální olej, petrolatum a isoparafiny, dále se používá silikonový olej a vazelína. Látkami přírodního původu jsou lipidy obsahující triacylglyceroly nebo estery vyšších mastných alkoholů jako např. olivový olej, ricinový olej, lanolin a včelí vosk [17].

Mikroemulze jsou používány díky vynikající rozpustnosti a solubilizační kapacitě, kdy nejen že zlepšují účinnost přípravku, ale také zvyšují stabilitu obsažených aktivních složek. Používají se pro přípravu skin care přípravků, odličovačů, opalovacích krémů, vlasové kosmetiky, přípravků po holení, deodorantů a antiperspirantů. Nanoemulze se díky své hydratační schopnosti používají pro přípravu pleťových krémů, tělových mlék

a lotionů. Mohou také enkapsulovat ceramidy, které jsou nezbytné pro bariérovou funkci pokožky [20].

2.4.2 Farmaceutický průmysl

Emulze mají širokou škálu uplatnění v léčivých přípravcích pro vnitřní i vnější použití. Při přípravě emulzních přípravků se musí brát v úvahu následující faktory: množství léčiva, které má být solubilizováno, známé chemické vlastnosti léčiva a jeho předpokládaná dávka. Před farmaceutickými aplikacemi se emulzní systémy důkladně charakterizují a provádějí se např. testy na cytotoxicitu, pH, velikost a morfologii částic, teplotu tání, teplotu skelného přechodu či reologii. Dále musí být brány v potaz faktory, jako jsou kompatibilita s pomocnými látkami, požadavky na antioxidanty a na možnou racemizaci a polymeraci přítomného léčiva. Pro určení vhodnosti přípravku je nezbytnou součástí napodobování prostředí, ve kterém má být léčivo aplikováno. U topických přípravků se např. používají Franzovy difúzní komůrky, které napodobují transdermální absorpci testovaných látek [27].

Emulze V/O lze použít pro intramuskulární vakcíny, kdy je léčivo rozpuštěno ve vodné fázi, což pomáhá zpomalit difúzi z místa vpichu do okolí. Naproti tomu emulzi O/V je možné aplikovat intravenózně pro dodání živin, lipofilních léků a vitaminů. Pro transport hydrofilních léků, vitaminů, enzymů a hormonů se mohou použít také vícenásobné emulze V/O/V, které zajišťují pomalé uvolňování enkapsulovaného léčiva. Dalšími užitečnými prostředky pro dodávání terapeutik jsou liposomy, které nedráždí pokožku a vytvářejí lamelární struktury, které jsou určeny k penetraci látek (např. retinoidů, kortikosteroidů, anestetik) ve vhodných koncentracích. Liposomy jsou také vhodné pro řízené uvolňování léčiv. Nanoemulze stejně jako liposomy umožňují enkapsulovat léčivé látky ve vyšších koncentracích, zajišťují jejich lepší uvolňování, snižují toxicitu a zvyšují chemickou stabilitu léčiva [17], [27].

Mikroemulze se obvykle používají k orálním a topickým aplikacím, ve kterých slouží ke zvýšení rozpustnosti nerozpustných nebo málo rozpustných léčiv a mohou také zlepšit transdermální penetraci terapeutika. Přípravky obsahující aktivní látky (vitaminy, enzymy, peptidy), které působí proti vráskám nebo ošetřují pokožku spálenou sluncem, jsou označovány jako kosmeceutika. Krémy, především na bázi O/V, se používají k léčbě kožních onemocnění (ekzémy, lupénka, akné), a jsou vhodné také pro vaginální podání.

Emulze V/O se také běžně aplikují ve formě mastí jako emolienty, které na povrchu tvoří okluzivní film, čímž dochází ke snižování transepidermální ztráty vody [17], [27].

2.5 Myrhový olej a myrha ve farmacii a kosmetice

V současnosti bylo provedeno několik studií, ve kterých byla snaha zakomponovat myrhový esenciální olej a extrakty z myrhy do různých léčiv a kosmetických přípravků. Příklady aplikačních možností myrhy a myrhového esenciálního oleje jsou uvedeny v této kapitole.

2.5.1 Pevné lipidové nanočástice obsahující esenciální oleje z kadidla a myrhy

Esenciální oleje z kadidla a myrhy (FMO – frankincense and myrrh oil) byly enkapsulovány do pevných lipidových nanočástic (SLN) pro perorální podávání za účelem zvýšení stability a protinádorové účinnosti FMO. Kombinace oleje z kadidla a myrhy (obvykle v poměru 1:1) vykazuje synergický efekt, ale jako většina esenciálních olejů jsou i tyto nestabilní (degradaci podporuje vzduch, světlo a vysoká teplota) a špatně rozpustné ve vodě. SLN je nový efektivní systém pro dodávání léčiv, který má řadu výhod, mezi které patří ochrana účinných látek, snížení toxicity, zvýšení účinnosti a biokompatibility. Vysokotlakou homogenizací byly připraveny sférické SLN s průměrem částic 220 nm, do kterých byly enkapsulovány esenciální oleje z kadidla a myrhy. Testy prokázaly, že SLN značně snižují odpařování složek FMO, čímž zvyšují jejich stabilitu. Ve srovnání s počátečním množstvím FMO byly po 6 dnech skladování zjištěny u FMO-SLN ztráty odpařováním nižší než 50 %. *In vivo* testy na myších s nádorovým onemocněním prokázaly, že antikarcinogenní účinnost byla při stejné dávce významně vyšší u FMO-SLN než u suspenze FMO. SLN jsou proto vhodným řešením pro zvýšení stability a protinádorové účinnosti esenciálních olejů [28].

2.5.2 Myrhový olej a myrha v přípravcích pro vnitřní i topickou aplikaci

Jak již bylo zmíněno výše, esenciální myrhový olej vykazuje antischistosomální účinky, ale nevýhodou je jeho hořká chuť. K zamaskování hořké chuti myrhového oleje byly připraveny emulze O/V s různými dochucovadly. Pro přípravu byly použity klasické komponenty: emulgátor (neionický surfaktant PEG-40 hydrogenovaný ricinový olej), xanthanová guma, konzervanty (methyl- a propylparabeny), antioxidant (BHA – butylhydroxyanisol), chelatační činidlo (EDTA) vodná fáze s kyselinou citronovou, rozpouštědla (ethanol, propylen glykol) a sladidla (sacharóza, aspartam). Dále byl přidán

glycerol, anýzový a mátový esenciální olej. Sensorickým hodnocením bylo zjištěno, že sacharóza a aspartam nestačily k zamaskování hořké chuti. Emulze s přídavkem anýzového a mátového oleje byla pro spotřebitele přijatelnější. Jako nejméně hořká byla hodnocena emulze obsahující anýzový i mátový olej a glycerol, která však vykazovala nižší stabilitu [29].

Vhodnou alternativou k perorálnímu podání jsou rektální čípky, protože mohou snížit vedlejší gastrointestinální účinky, lze se vyhnout účinkům jídla na absorpci léčiva a zvláště u dětí zajišťují jednodušší aplikaci [29].

Extrakt z myrhy *Commiphora mukul* a kvercetin (rostlinný antioxidant s protizánětlivými účinky) byly použity na přípravu gelu pro podpůrnou léčbu psoriázy. Tato antipsoriatická bylinná léčiva byla enkapsulována do liposfér. Liposféry jsou systémy pro dodávání léčiv, které se skládají z pevných hydrofobních triacylglycerolů směřujících dovnitř liposféry a fosfolipidů tvořících na vnější straně liposféry monovrstvu. Díky amfipatické struktuře jsou vhodné pro enkapsulaci lipofilních látek, přičemž zajišťují vysokou enkapsulační účinnost, zabraňují úniku léčiva z nosiče, zvyšují jeho stabilitu a jsou biokompatibilní [30].

Dále bylo prokázáno, že extrakt z pravé myrhy *Commiphora molmol* lze použít jako ústní vodu, která podporuje hojení ran v časných stádiích po extrakci zubu [31].

Myrhový olej získaný z *Commiphora myrrha* může být použit jako přírodní UV filtr do opalovacích krémů obsahujících syntetické UV filtry. Kombinace krému s myrhovým olejem vykazovala významně účinnější ochranu před UV zářením než samotný opalovací krém. Přídavek myrhového oleje v opalovacích krémech může způsobit snížení obsahu syntetických UV filtrů [32].

Z výše uvedeného přehledu aplikací myrhového oleje je zřejmé, že se jedná o zajímavý přírodní produkt s širokou možností využití v kosmetice a farmacii.

3 CHARAKTERIZACE DISPERZNÍCH SYSTÉMŮ

K charakterizaci disperzních systémů existuje široká škála technik, které umožňují podrobnou analýzu různých soustav a poskytují informace o jejich charakteristických vlastnostech. Charakterizace emulzí je primárně založena na stanovení velikosti emulzních kapek, zeta potenciálu a reologických vlastností, což jsou parametry, které mají zásadní vliv na stabilitu emulzí. Pro přesnější popis emulzí slouží mikroskopické metody a fázové studie, zahrnující stanovení enkapsulační účinnosti a indexu krémování [33].

3.1 Metody pro charakterizaci emulzí

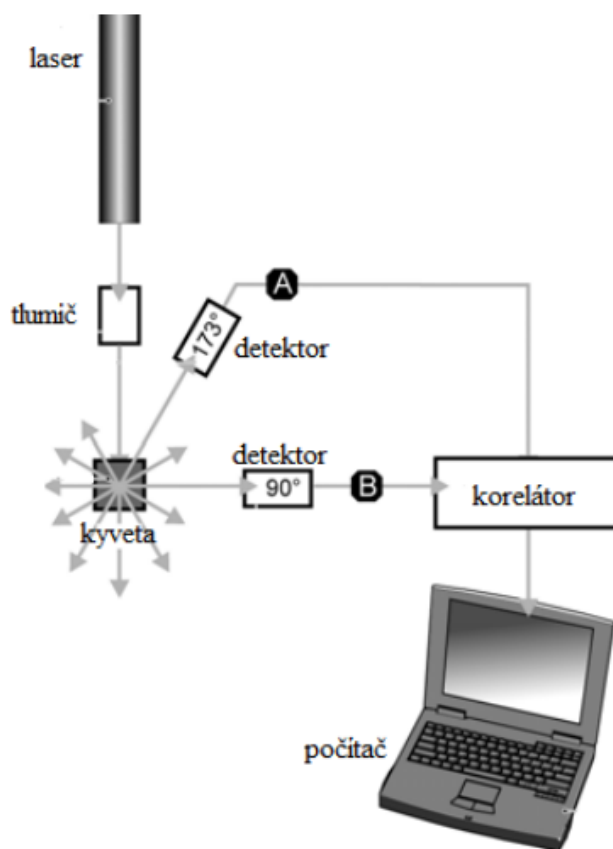
Znalost analytických metod je důležitá pro popis kvalitativních parametrů emulzí. Tato kapitola je zaměřena na popis metod, které se používají k jejich charakterizaci.

3.1.1 Stanovení velikosti emulzních kapek metodou DLS

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS) je založena na měření kolísání intenzity rozptýleného světla na pohyblivých částicích disperzní fáze v určitém čase. Měří se tedy Brownův pohyb částic, který je uveden do vztahu s velikostí částic. Pro DLS je důležitým předpokladem, že malé částice se pohybují rychleji než ty větší, protože čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se mění intenzita rozptýleného světla [33], [34].

Přístroj používá jako zdroj monochromatického záření laser, který osvětluje vzorek v kyvetě. Intenzitu rozptýleného světla měří obvykle pod úhlem 90° detektor (zařízení řady Zetasizer Nano umožňují měření i pod úhlem 173°). Aby mohla být detektorem změřena intenzita rozptýleného světla, musí jeho hodnota ležet v určitém rozsahu. Pokud je detekováno příliš mnoho světla, dojde k přehlcení detektoru. Ke snížení intenzity světla se používá tzv. tlumič, který umožňuje i zvýšení intenzity pronikajícího laserového světla do vzorku. Signál intenzity rozptylu světla je z detektoru přenesen do korelátoru, který v po sobě jdoucích časových intervalech vzájemně porovnává intenzitu rozptýleného světla. Korelátor předává informace počítači, ve kterém software provede analýzu dat a získá údaje o velikosti částic. Pro správné měření je nutné použít vhodně naředěný vzorek. Při dávkování vzorku do kyvety je nutné dbát na absenci bublinek vzduchu, prachových částic či jiných nečistot, které by mohly překrýt signál měřeného analytu [33], [34]. Výsledkem měření je pak velikost emulzních kapek vyjádřená jako z-průměr

jejich velikosti v nm, která představuje intenzitně vážený průměr velikostí všech kapek v měřeném vzorku.



Obrázek 10 Schéma přístroje pro měření DLS [34] (upraveno)

3.1.2 Stanovení zeta potenciálu

Zeta potenciál je elektrický náboj na povrchu částic, jehož velikost je důležitým faktorem poskytujícím údaj o potenciální stabilitě disperzních systémů. Pokud mají částice v suspenzích anebo kapičky v emulzích dostatečně velký negativní nebo pozitivní zeta potenciál, budou mít tendenci se vzájemně odpuzovat a nebude docházet k jejich shlukování. Mezní hodnoty zeta potenciálu rozdělující disperzní systémy na stabilní a nestabilní jsou obvykle udávány jako +30 mV nebo -30 mV. Nad těmito hodnotami jsou disperze považovány za stabilní. Pokud je zeta potenciál nižší, nebude docházet k dostatečnému odpuzování a částice budou mít tendenci agregovat do větších celků. Pro měření zeta potenciálu mohou být použity mikroeletroforetické metody anebo elektroakustická spektroskopie [33], [35], [36].

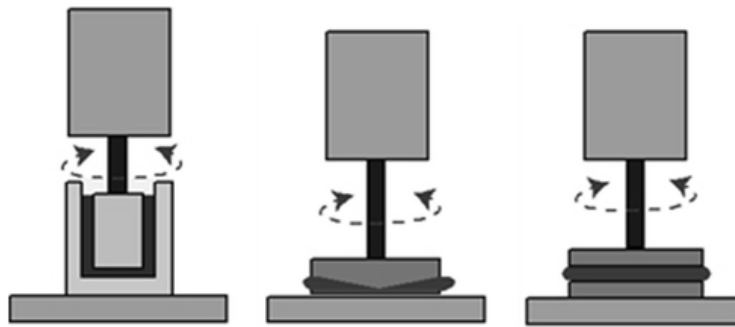
Mikroelektroforetické měření pracuje na principu elektroforézy, při které dochází k pohybu nabitých částic mezi dvěma elektrodami. Pro měření zeta potenciálu se používá speciální kyveta (DTS1070) se zabudovanými elektrodami, na které je veden elektrický potenciál. Přístroj měří rychlost částic pohybujících se v elektrickém poli, která je vyjádřena v jednotkové intenzitě pole jako jejich pohyblivost [33], [35], [36].

Principem elektroakustické spektroskopie je kombinace působení ultrazvuku a elektrického pole na disperzní částice. Na rozdíl od elektroforetických technik, které vyžadují dostatečné ředění vzorku, lze tuto metodu použít pro analýzu koncentrovaných vzorků obsahujících až 50 obj. % částic. Hodnota zeta potenciálu se získá převodem naměřených dat pomocí vhodného matematického modelu [33].

3.1.3 Stanovení reologických vlastností

Reologické vlastnosti a s nimi související viskozita jsou významnou fyzikální charakteristikou ovlivňující stabilitu disperzních soustav. Mezi faktory, které mají vliv na reologické vlastnosti emulzí, patří teplota, chemické složení kontinuální fáze (pH, koncentrace elektrolytů), objemový podíl dispergované fáze, vlastnosti emulzních kapiček (distribuce velikosti, koncentrace, vnitřní viskozita, interakce a deformace) a pružnost filmu emulgátoru [33], [36].

Nejčastěji používanými přístroji ke stanovení reologických charakteristik jsou viskozimetry a reometry. Používají se např. kuličkové viskozimetry, u kterých se sleduje rychlost pádu kulovitého tělesa zkoumaným vzorkem anebo kapilární viskozimetry, u kterých se pozoruje doba průtoku definovaného objemu mezi dvěma rýskami. Reometry pracují na principu působení smykové nebo kompresní deformační síly na měřený vzorek, a mohou být konstruovány pro kapaliny, pevné látky nebo jiné viskoelastické materiály. Pro tekuté vzorky jsou vhodné rotační reometry s různými typy geometrií (válec-válec, kužel-deska, deska-deska, viz *Obrázek 11*), kdy jeden z měřících elementů se otáčí (rotor), druhý je statický (stator) a vzorek vyplňuje štěrbinu mezi rotorem a státorem. Pro pevné, plastické či viskoelastické vzorky jsou vhodnější kompresní zařízení [33].



Obrázek 11 Typy rotační reometrů [37]

3.1.4 Mikroskopické metody

Morfologické vlastnosti disperzních systémů nelze obvykle sledovat pouhým okem. K získání informací o tvaru, distribuci a velikosti dispergované fáze se proto využívají různé typy mikroskopů. Mezi nevýhody mikroskopických metod patří především příprava mikroskopického preparátu s vhodným ředěním vzorku, dále časová náročnost pozorování a subjektivní hodnocení získaných výsledků. U emulzních systémů však mohou poskytnout informace o relativním množství oleje, vody a pevných látek, lze pozorovat jejich interakce a asociace, popř. určit rychlost koalescence rozptýlených kapiček [33], [38].

3.1.4.1 Optická mikroskopie

Jedná se o poměrně levnou, jednoduchou a snadno dostupnou mikroskopickou metodu používanou pro charakterizaci emulzních mikrostruktur. Optický mikroskop může být prvním nástrojem pro získání informací o tvaru a velikosti emulzních kapek. Ve většině případů je vybaven digitální kamerou umožňující snímání mikrostruktur, kdy získané snímky lze následně použít pro počítačovou analýzu. K pozorování mikrostruktur musí být připraven dostatečně tenký a plochý vzorek, ve kterém jsou většinou zobrazeny pouze sférické kapky. Další nevýhodou může být obtížné rozlišení složek emulzí, z důvodu podobných indexů lomu. Pro zvýšení kontrastu mezi fázemi lze použít různé typy hydrofilních nebo lipofilních barviv, které zvýrazní ty složky emulze, které chceme pomocí mikroskopu pozorovat. Při výběru se musí dávat pozor na to, aby barvivo neinteragovalo s některou ze složek, čímž by došlo ke změně mikrostruktury. Alternativními metodami zlepšujícími kontrast mezi fázemi jsou metoda fázového kontrastu a diferenciální kontrastní fázová mikroskopie. Tyto techniky jsou vybaveny speciálním objektivem, který převádí i malé rozdíly v indexech lomu na významné rozdíly

v intenzitě světla a tím dochází ke zlepšení kontrastu a rozlišení. Dalším užitečným nástrojem pro zkoumání morfologických vlastností je polarizační světelná mikroskopie [33], [38].

3.1.4.2 Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Je další technikou pro charakterizaci emulzních mikrostruktur, jejíž výhodou je lepší optické rozlišení a kontrast v porovnání se širokoúhlým fluorescenčním mikroskopem. Tato metoda je vhodná pro konstruování trojrozměrných snímků a profilu povrchu částic pomocí speciální funkce trojrozměrného skenování. K získání dostatečně silné intenzity signálu je vyžadována delší doba expozice, a proto metoda není vhodná pro vzorky, jež jsou citlivé na světlo anebo se v průběhu času mění. U látek, které přirozeně nefluoreskují je pro pozorování nutné do vzorku předem zabudovat fluorescenční činidlo, aby bylo možné pomocí konfokálního mikroskopu sledovat zkoumané struktury. Nevýhodou je však toxicita používaných fluorescenčních barviv [33], [39].

3.1.4.3 Elektronová mikroskopie

Jedná se o velmi efektivní techniku používanou pro analýzu morfologie a mikrostruktury emulzí. Existují dva typy elektronových mikroskopů, a to skenovací elektronový mikroskop (SEM) a transmisní elektronový mikroskop (TEM). Metoda SEM je založena na skenování vzorku fokusovaným paprskem elektronů, které reagují s atomy ve vzorku. Výsledné snímky poskytují informace o topografii povrchu disperzních soustav a složení vzorku. Pomocí TEM je možné získat snímky s vysokým rozlišením, kdy elektrony prochází vzorkem a interagují s obsaženými molekulami. Pro účinnější propustnost elektronů je doporučována ultratenká tloušťka vzorku (obvykle < 200 nm). Elektronová mikroskopie poskytuje trojrozměrnou povrchovou strukturu a podrobnou mikrostrukturu emulzí, ale příprava vzorku je časově náročná a nedodržením správného postupu přípravy může dojít ke změně struktury [33], [40].

3.1.5 Fázové studie – enkapsulační účinnost a index krémování

Pro kosmetický a farmaceutický průmysl je žádoucí vyvíjet bioaktivní látky s vysokou účinností. Řada těchto látek je však citlivá na změny prostředí, kdy efektivní ochranou může být jejich enkapsulace. Bylo zjištěno, že enkapsulované aromatické látky, jako např. citral, jsou stabilnější a vykazují dlouhodobější zadržování vůně. Pro vyhodnocení účinnosti emulzních soustav, které obsahují enkapsulované bioaktivní látky,

slouží enkapsulační účinnost, sledování stability v průběhu skladování a obsahu uvolněných látek. K vyhodnocení těchto parametrů je potřeba kvantitativně určit množství látek zbývajících v emulzi okamžitě po zpracování a následně v určitých časových intervalech během skladování a užívání [33].

Účinnost enkapsulace (EE) lze stanovit pomocí vztahu (Rovnice 1) zahrnujícího objemový podíl enkapsulované látky (V_{enkaps}) vztaženého k celkovému objemu použité látky (V_{total}) [41], [42].

$$EE = \frac{V_{enkaps}}{V_{total}} \cdot 100\% \quad (1)$$

Pro stanovení enkapsulační účinnosti analytů s chromofory lze využít UV-VIS spektrofotometrii. Tato kvalitativní analýza je založena na extrakci enkapsulovaných sloučenin obsahujících chromofory a auxochromy, následuje jejich spektrofotometrická analýza a vyhodnocení pomocí Lambert-Beerova zákona [33].

Další účinnou metodou umožňující separaci čistých složek ze směsi je chromatografie. K separaci složek ze směsi dochází na základě dělení vzorku mezi mobilní a stacionární fázi. Vhodnou technikou pro kvalitativní a kvantitativní analýzu enkapsulovaných sloučenin je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Plynovou chromatografií (GC) lze použít pro těkavé nepolární sloučeniny s nízkým bodem varu. Pro získání kvalitních výsledků se obvykle kombinuje chromatografie a hmotnostní spektrometrie [33].

Stabilitu emulzí z hlediska krémování nebo sedimentace lze hodnotit vizuálně, pozorováním emulzí uložených v uzavřených skleněných tubách za konstantních podmínek skladování. V pravidelných časových intervalech se měří výška krémové popř. sérové vrstvy a index krémování (CI) lze vypočítat pomocí Rovnice 2 [43]:

$$CI = \frac{H_S}{H_E} \cdot 100\% \quad (2)$$

Kde:

H_S výška séra (průhledné vrstvy)

H_E celková výška emulze v tubě

3.1.6 Vizuální popis

Vzhled a senzorické vlastnosti emulzí jsou důležitými aspekty nejen v potravinářství, ale také v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Vzhled emulzí lze hodnotit pomocí světelné propustnosti, zbarvení emulze, její konzistence anebo na základě přítomnosti či absence fázové separace, krémování nebo sedimentace [33].

Vzhled emulzí závisí na různých interakcích, jako je např. rozptyl, absorpce a přenos světelného vlnění ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra. Transparentnost emulze je charakterizována množstvím rozptýleného světla, kdy emulze může být vnímána jako čirá, zakalená nebo neprůhledná. Zbarvení emulze určují vlnové délky světla, které jsou emulzí absorbovány [33].

Schopnost absorbovat a rozptylovat světlo jsou dva základní faktory určující turbiditu/zakal emulzí. K získání informací o turbiditě a absorbanci se nejčastěji používá UV-VIS spektrofotometrie, kdy měřený vzorek je dávkován do křemenné kyvety a měření probíhá při vlnových délkách, které odpovídají viditelné oblasti elektromagnetického záření (obvykle 380 až 780 nm) [33].

Kolorimetry slouží k určení zbarvení emulze na základě měření systému barevného prostoru pomocí parametrů L , a , b , kdy L reprezentuje intenzitu odraženého světla (jas), zatímco a a b charakterizují barvu souřadnice. Zpravidla se hodnota L pohybuje v rozmezí od 0 do 100, přičemž barva emulze je nejsvětlejší, když je hodnota L blízká 100. Mezi faktory ovlivňující barvu emulze patří velikost kapiček, koncentrace a index lomu dispergované a kontinuální fáze, typ použitého barviva a jeho koncentrace [33], [44].

4 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této diplomové práce bylo popsat základní charakteristiky a aplikační možnosti myrhové pryskyřice a myrhového esenciálního oleje. Vzhledem k možnosti použití myrhového mýdla jako emulgátoru jsou dále blíže představeny emulze a jejich charakterizace.

Úkolem praktické části bylo stanovit základní charakteristiky zmýdelněné myrhové pryskyřice, především měření povrchového napětí a mezifázového napětí, určením kritické micelární koncentrace, měření velikosti disperzních částic a zeta potenciálu a sledováním případných změn v závislosti na pH a iontové síle. Dalším dílčím cílem bylo použít myrhové mýdlo pro přípravu a stabilizaci emulzí typu O/V a v této souvislosti zjistit jeho emulgační schopnosti pro vybrané kosmetické oleje na bázi triacylglycerolů a esenciální olejů (silic). U připravených emulzních systémů, myrhového mýdla a myrhového éterického oleje byla dále zkoumána jejich potenciální antimikrobiální aktivita.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiály

Hlavním studovaným materiálem byla horní vrstva myrhového mýdla, ze které byly pro experimenty připravovány disperze o potřebné koncentraci. Pro další měření a přípravu emulzí byly použity níže uvedené látky:

- Horní vrstva myrhového mýdla (7 % myrhové pryskyřice);
- Spodní vrstva myrhového mýdla (převážně obsah sodných solí pryskyřičných kyselin);
- Demineralizovaná voda;
- Ethanol;
- Olivový olej (Nobilis Tilia);
- Slunečnicový olej (komerční značka);
- Konopný olej (Nobilis Tilia);
- Jojobový olej (Nobilis Tilia);
- Olej trikaprin/trikaprylin (Saboderm TCC, SABO S.p.A);
- Esenciální olej lemongras (Nobilis Tilia);
- Esenciální olej limetka (Nobilis Tilia);
- Esenciální olej hřebíček plody (Nobilis Tilia);
- Esenciální olej skořice kůra (Nobilis Tilia);
- Esenciální olej myrha (Nobilis Tilia);
- Esenciální olej máta peprná (Nobilis Tilia);
- Eugenol (99%, $M = 164,20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 97-53-0, Sigma Aldrich);
- *trans*-cinnamaldehyd (99%, $M = 132,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 14371-10-9, Sigma Aldrich);
- R-(+)-Limonene (97%, $M = 136,26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 5589-27-5, Sigma Aldrich);
- Kyselina chlorovodíková (HCl, $c = 0,2 \text{ M}$);

- Roztok hydroxidu sodného (NaOH, $c = 0,5 \text{ M}$);
- Chlorid sodný (NaCl, $M = 58,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$);
- Bromid draselný (KBr, $M = 119,00 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$);
- Xanthanová guma (KELTROL[®] CG-SFT, CP Kelco U. S., Inc.);
- Agar (Agar Agar, Type I, CAS 9002-18-0, ES 232-658-1, HiMedia);
- Mueller Hinton Agar (M173-500G, HiMedia);
- Bakterie *Staphylococcus aureus* (CCM 3953);
- Bakterie *Micrococcus luteus* (CCM 732);
- Bakterie *Escherichia coli* (CCM 3954);
- Bakterie *Pseudomonas fluorescens* (CCM 2798).

5.2 Přístroje

Kromě běžného laboratorního vybavení a pomůcek, byly dále použity tyto přístroje:

- Automatické pipety (Discovery Comfort, Eppendorf);
- Analytické laboratorní váhy;
- Spektrofotometr (PhotoLab 6600 UV-VIS);
- Tenziometr (K20, A.Krüss Optronic, Německo);
- Optický tenziometr (Attension Theta, Finsko);
- Zetasizer (Nano ZS90, Malvern, UK);
- pH metr (WTW InoLab 7110, elektrody Sen Tix HW);
- Ultrazvukový sonikátor (Heilscher UP400S, Německo);
- Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací (spektrometr Nicolet Summit, nástavec Everest ATR, nástavec iD1);
- Vortex (Labnet);
- Denzimetr (Erbalachema);
- Sterilní disky (HiMedia);

- Plynový chromatograf (DANI Master GC Fast Gas Chromatograph).

5.3 Metodika

5.3.1 Spektrofotometrické stanovení

Touto metodou byl sledován vznik zákalu, který detekoval tvorbu micel a přibližnou kritickou micelární koncentraci (CMC). Do kyvety byly nadávkovány 2 ml demineralizované vody a automatickou pipetou byly postupně pipetovány 5 μ l přídatky myrhového mýdla. Jako blank byl připraven roztok ethanolu ve vodě (3,8 ml ethanolu v 10 ml vody). Byl použit spektrofotometr PhotoLab 6600 UV-VIS a měření probíhalo v rozmezí vlnových délek od 190–780 nm. Zákal byl patrný při 10 μ l myrhového mýdla ve 2 ml vody (5 μ l/ml), kdy naměřená absorbance byla $A = 0,782$ při vlnové délce $\lambda = 291$ nm. Spektrofotometrické stanovení bylo provedeno také u spodní vrstvy MM. S postupnými přídatky této frakce docházelo ke zvyšování absorbance, avšak zákal se nevytvořil. S vodou zde vznikaly čiré roztoky.

5.3.2 Měření povrchového napětí metodou Wilhelmyho destičky

Dalším krokem bylo stanovení CMC měřením povrchového napětí γ [$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$]. Tato metoda je založena na snižování povrchového napětí v závislosti na zvyšující se koncentraci PAL. Po překročení CMC dochází ke shlukování molekul PAL do micel a povrchové napětí systému se již dále nesnižuje, ale zůstává konstantní. Pro měření byl použit tenziometr typu K20 (Krüss) s platinovou Wilhelmyho destičkou. Jedná se o odtrhávací metodu, při které se měří síla potřebná k odtržení destičky od hladiny měřeného roztoku, přičemž maximální síly je dosaženo těsně před jejím odtržením. K měření síly se využívají velmi citlivé váhy.

Před samotným stanovením vzorků bylo jako kontrola třikrát změřeno γ demineralizované vody, aby se mohly vyloučit systematické chyby měření. Do 5ml odměrných baněk bylo následně připraveno osm vodných roztoků myrhového mýdla (MM) se zvyšující se koncentrací tak, aby vznikla koncentrační řada MM: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7 a 1,0 vol.% (Tabulka 3). Měření probíhalo postupně od nejnižší koncentrace po nejvyšší, přičemž každá disperze o určité koncentraci byla změřena třikrát. Do kádinky opláchnuté demineralizovanou vodou a ethanolem byly nality cca 2 ml vzorku a na háček, který je součástí vah, byla zavěšena Wilhelmyho destička, která byla před každým použitím důkladně opláchnuta vodou a acetonem a následně byla vyžhána, aby se zamezilo

přítomnosti nečistot, jež by mohly negativně ovlivnit měření. Poté byl pomocí šroubu posunut stolek se vzorkem tak, aby se dolní část destičky dotýkala hladiny měřeného vzorku. Po ustálení destičky a nastavení všech potřebných parametrů bylo tenziometrem při teplotě 27 °C změřeno povrchové napětí.

Tabulka 3 Koncentrace vzorků a objem myrhového mýdla (MM) vztažený na 5ml

c [%]	V _{MM} [μl]
0,05	2,5
0,1	5
0,2	10
0,3	15
0,4	20
0,5	25
0,7	35
1,0	50

5.3.3 Měření mezifázového napětí

Mezifázové napětí bylo stanoveno metodou přisedlé kapky na optickém tenziometru Attension Theta. Tenziometr za pomoci černobílé digitální kamery, která zaznamenává obraz kapičky v disperzním prostředí testovaného vzorku. Kapičku je nutné dostatečně přiblížit a zaostřit. Pro měření mezifázového napětí na rozhraní olej/voda je potřeba znát hustotu a viskozitu oleje při 20 °C. Po nastavení všech potřebných parametrů je počítačovým softwarem vyhodnoceno mezipovrchové napětí z geometrických parametrů tvaru kapičky pomocí Young-Laplaceovy rovnice.

Pro měření byly použity 0,1; 0,3; 0,5 a 1,0% vodné disperze MM, rostlinné oleje konkrétně olivový, slunečnicový, konopný olej a jojobový vosk, dále esenciální oleje – lemongras, limetka, hřebíček plody, skořice kůra, myrha a máta peprná. Do kyvety byl nadávkován cca 1 ml vzorku MM o příslušné koncentraci, kyveta byla očištěna a umístěna na posuvný stolek tenziometru. Oleje byly dávkovány do mikrostříkačky Hamilton, jejíž součástí je zahnutá jehla z nerezové oceli o průměru 0,718 mm. Mezi jednotlivými oleji byla pipeta i jehla důkladně propláchnuta vodou a hexanem. Pipeta byla umístěna do držáku a jehla byla pomalým spouštěním vpravena do kyvety s disperzí mýdla. Následně byla pomocí jehly vytvořena kapka oleje (optimální objem kapky cca 7 μl) a po ustálení a kalibraci bylo příslušným počítačovým programem vyhodnoceno mezipovrchové napětí na rozhraní disperze MM a oleje. Měření probíhalo při teplotě 25 °C.

5.3.4 Charakterizace disperzních systémů s myrhovým mýdlem

K měření velikosti disperzních částic MM a zeta potenciálu byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS90 (Malvern), který pracuje na principu dynamického rozptylu světla. Zetasizer umožňuje měření vzorků s vysokou vodivostí a nízkou pohyblivostí částic a to ve vodných i bezvodých disperzích

5.3.4.1 Měření velikosti disperzních částic myrhového mýdla a ζ potenciálu

Do polystyrenové kyvety byl opatrně po stěně napipetován 1 ml přefiltrované demineralizované vody (byl použit stříkačkový filtr Millipore o velikosti pórů 0,22 μm), do které bylo následně nadávkováno 5 μl neředěného MM. Kyveta byla očištěna a vložena do přístroje. Měření bylo prováděno při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$ a byly použity následující vstupní údaje potřebné pro výpočet velikosti částic: viskozita disperzního média 0.887 cP, index lomu disperzního média 1.33 a index lomu dispergovaného podílu surfaktantu 1,46. Po nastavení parametrů a spuštění měření, přístroj Zetasizer a příslušný počítačový program zpracoval a vyhodnotil naměřená data. Velikost částic byla vyjádřena jako „z-průměr“, který představuje intenzitně vážený průměr velikostí všech částic ve vzorku.

Pro měření ζ potenciálu byl připraven vzorek tak, že do kádinky byly pipetou nadávkovány 4 ml přefiltrované demineralizované vody a 15 μl neředěného MM. Takto připravená disperze byla pomocí stříkačky nadávkována do speciální kyvety s elektrodami (DTS1070) a následně bylo spuštěno měření. Měření bylo provedeno při 25 $^{\circ}\text{C}$ a výsledky vyhodnoceny pomocí Smoluchowskeho aproximace.

5.3.4.2 Měření velikosti disperzních částic myrhového mýdla a ζ potenciálu v závislosti na pH

Bylo připraveno 9 vodných roztoků s pH v rozmezí 2 až 10. Roztoky byly připraveny do 250 ml baněk postupným přikapáváním HCl a NaOH do demineralizované vody, kdy změna pH byla měřena pH elektrodou, jež byla kalibrována na fosfátový pufr (pH 7) a borátový pufr (pH 9). Před měřením byly roztoky přefiltrovány (pro každý roztok o určitém pH byl použit čistý filtr Millipore o velikosti pórů 0,22 μm). Pro měření velikosti částic byl do kyvety pipetován 1 ml přefiltrovaného roztoku o určitém pH a 5 μl neředěného MM. Pro měření ζ potenciálu byly do kádinky pipetovány 4 ml přefiltrovaného roztoku o určitém pH a 15 μl neředěného MM. Poté byl vzorek

stříkačkou převeden do kyvety DTS1070. Pro měření i vyjádření výsledků byly použity parametry uvedené v části 5.3.4.1.

5.3.4.3 Měření velikosti disperzních částic myrhového mýdla a ζ potenciálu v závislosti na koncentraci elektrolytu

Na analytických vahách bylo s přesností na 4 desetinná místa naváženo 0,5844 g NaCl. Pro přípravu roztoku o koncentraci 100 mM NaCl bylo do 100 ml odměrné baňky kvantitativně převedeno navážené množství NaCl a roztok byl doplněn po rysku. Tento roztok byl postupně ředěn tak, aby vznikla koncentrační řada: 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 a 75 mM NaCl. Roztoky byly přefiltrovány (pro každou koncentraci NaCl byl použit čistý filtr Millipore o velikosti pórů 0,22 μm) a pro měření velikost částic byl do kyvety pipetován 1 ml přefiltrovaného roztoku o určité koncentraci NaCl a 5 μl neředěného MM. Pro měření ζ potenciálu byly do kádinky pipetovány 4 ml přefiltrovaného roztoku o určité c NaCl a 15 μl neředěného MM. Poté byl roztok stříkačkou nadávkován do kyvety DTS1070. Pro měření i vyjádření výsledků byly použity parametry uvedené v části 5.3.4.1.

5.3.5 Infračervená spektroskopie myrhového mýdla

Pro analýzu byl použit infračervený spektrometr Nicolet Summit s nástavcem Everest ATR a analyzována byla horní i spodní vrstva MM. Pár kapek myrhového mýdla bylo Pasteurovou pipetou přeneseno na nástavec, vzorek byl přiklopen selen-zinkovým krystalem a následně probíhalo samotné měření. Obě vrstvy myrhového mýdla byly měřeny na pozadí vzduch a etanol.

Pro získání kvalitnějších spekter byla následně provedena FTIR analýza bromido-draselné tablety obsahující vysušenou horní vrstvu myrhového mýdla. Na Petriho misku bylo nadávkováno 10 ml MM a následně proběhlo sušení při 50 °C přes noc. Poté byla Petriho miska s vysušeným MM ponechána týden v exikátoru. Následovala příprava KBr tablety. Na lodičku byl navážen cca 1 mg vysušeného MM, poté bylo naváženo cca 0,175 g KBr. Směs byla převedena do třecí misky, ve které byla důkladně zhomogenizována. Zhomogenizovaná směs byla přenesena do nástavce, který byl vložen do lisu a při tlaku ca 200 kPa byla zhotovena KBr tableta, která byla opatrně vyjmuta z nástavce. Analogicky byla připravena i druhá tableta se vzorkem a tableta s čistým KBr, která sloužila jako pozadí pro měření. Pro analýzu byl použit infračervený spektrometr Nicolet Summit s nástavcem iD1.

5.3.6 Příprava emulzí

V práci byly připraveny emulze O/V, kdy jako vodná fáze byla použita 1 % disperze MM a jako olejová fáze rostlinné oleje na bázi triacylglycerolů (TAG, olivový, slunečnicový, konopný), jojobový vosk a esenciální oleje (EO, lemongras, limetka, hřebíček plody, skořice kůra, myrha, máta peprná). Dále byl použit trikaprin/trikaprylin a čisté látky – složky esenciálních olejů eugenol, R-(+)-Limonen a *trans*-cinnamaldehyd. Celkový objem emulze byl 10 ml, kdy do vialky byla dávkována olejová a vodná fáze v poměru 10/90 a 5/95. Poté byla vialka uzavřena a směs byla po dobu jedné minuty míchána na vortexu. Následovala homogenizace složek emulze sonikací s použitím ultrazvukového sonikátoru Heilscher UP400S. Sonikace probíhala po dobu 2 minut při amplitudě 60 %. Během sonikace byla vialka umístěna v ledové lázni, aby se předešlo přehřátí směsi možné degradaci olejů. Mezi jednotlivými vzorky byla sonikační sonda vždy promyta v demineralizované vodě a ethanolu.

5.3.6.1 Stabilizace emulzí xanthanovou gumou

Byly připraveny roztoky xanthanové gumy (XG) s koncentrací 0,1; 0,5 a 1 %. Tyto roztoky XG byly dále použity pro přípravu 1% roztoku MM, které následně sloužily k přípravě emulzí, ve kterých byl jako olejová fáze použit myrhový esenciální olej. V tomto testu byla stanovena koncentrace XG, schopná zabránit krémování/sedimentaci emulzních kapek. Tato koncentrace XG (1 %) byla dále použita pro přípravu emulzí obsahujících oleje na bázi TAG, a to olivový olej a trikaprin/trikaprylin, dále esenciální oleje (viz výše 5.3.6) a složky EO (viz výše 5.3.6). Vodná fáze (1% MM+1% XG) a olejová fáze byly míchány v poměru 95/5. Postup přípravy dále probíhal obdobně jako v části 5.3.6.

5.3.7 Charakterizace emulzí

5.3.7.1 Měření velikosti emulzních kapek a ζ potenciálu

Ihned po přípravě emulzí byla na přístroji Zetasizer ZS90 měřena velikost dispergovaných kapek a ζ potenciál. Pro měření velikosti kapek byl do polystyrenové kyvety pipetován 1 ml přefiltrované vody a 5 μ l emulze. Pro měření ζ potenciálu bylo do kádinky pipetováno 4 ml přefiltrované vody a 15 μ l emulze, poté byl vzorek stříkačkou nadávkován do kyvety DTS1070 a následovalo měření. Pro měření i vyjádření výsledků byly použity parametry uvedené v části 5.3.4.1.

5.3.7.2 Fázové studie – vizuální popis emulzí

Stabilita emulzí byla sledována v níže uvedených časových intervalech. První popis emulzí byl proveden po jedné hodině od jejich přípravy, poté byly emulze sledovány po 3 hodinách, následně po 1, 3 a 7 dnech, a nakonec po měsíci od přípravy. Emulze byly skladovány v chladničce při teplotě 4 °C. Během odečítání byla určována výška v mm 1) vrstvy oddělené olejové fáze, 2) vrstvy krémování nebo sedimentace, v závislosti na procesu, který v dané emulzi probíhal.

5.3.8 Mikrobiologická analýza

Před samotnou analýzou bylo připraveno 500 ml Mueller Hinton agaru, kdy 7,5 g agaru a 10,5 g Mueller Hinton agaru bylo naváženo do 500ml reagenční lahve a odměrným válcem bylo přidáno 500 ml demineralizované vody. Směs byla krouživými pohyby promíchána a následně vložena do autoklávu. Po vychladnutí byl agar přelit do Petriho misek a nechal se zatuhnout.

Jednodenní bakteriální kultury *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens* byly z bujónu naředěny do 7 ml fyziologického roztoku na zákal s hodnotou 0,5 McFarlandovy stupnice. Tyto naředěné bakteriální kultury byly pomocí automatické pipety zaočkovány na Petriho misky s Mueller Hinton agarem a byly ponechány v laminární boxu.

Mezitím byly připraveny emulze. Jako vodná fáze bylo použito 1% MM a jako olejová fáze esenciální oleje myrha, hřebíček, skořice a složky EO eugenol a *trans*-cinnamaldehyd, které byly emulgovány v poměru O/V 10/90. Příprava probíhala postupem popsáním v části 5.3.6. Z důvodu omezené stability těchto emulzí, a pro zajištění dostatečné homogenity systému, bylo ihned po přípravě 25 µl každé emulze nadávkováno automatickou pipetou na sterilní disky o průměru 9 mm, které se takto nechaly emulzí nasytit. Dále bylo na sterilní disky přeneseno 25 µl samotného myrhového mýdla a myrhového esenciálního oleje. Celkem bylo použito 7 připravených, neředěných vzorků. Nasycené disky byly poté opatrně přeneseny pomocí sterilní pinzety na misky se zaočkovanými bakteriálními kulturami. Inkubace probíhala při 30 °C po dobu 24 h a následně byly odečítány velikosti inhibičních zón.

5.3.9 Plynová chromatografie myrhového éterického oleje

K analýze myrhového éterického oleje byla použita metoda plynové chromatografie. Byl použit plynový chromatograf DANI Master s nepolární kapilární kolonou GC ZebronTM ZB-5ms (dimethylsiloxan s 5 % arylenu) o rozměrech 30 m × 0,25 mm × 0,5 μm a s plameno-ionizačním detektorem (FID). Jako mobilní fáze byl použit dusík. Do injektoru byl nastříkovan mikrostříkačkou roztok o objemu 1 μl. Nástřikový roztok byl připraven ředěním 1 μl myrhového oleje v 1000 μl methanolu. Teplota injektoru byla 220 °C a průtok mobilní fáze 1 ml·min⁻¹. Dělič toku byl nastaven na poměr 1 : 20. Teplota FID detektoru byla 260 °C. Kolona byla vyhřívána gradientově. Počáteční teplota kolony 60 °C byla lineárně zvyšována rychlostí 3 °C/min až do teploty 250 °C. Celkový čas analýzy činil 63 min. Data byla vyhodnocena pomocí programu Clarity, DataApex.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Příprava myrhového mýdla

Vzorek myrhového mýdla byl připraven procesem saponifikace myrhové pryskyřice. Při přípravě byly izolovány dvě frakce, horní a spodní vrstva, které se lišily procentuálním zastoupením rozpuštěné myrhové pryskyřice. Postup přípravy, který byl vypracován ve vývojovém oddělení firmy Nobilis Tilia, je popsán v této kapitole.

6.1.1 Postup přípravy

Myrhová pryskyřice byla po dobu jednoho týdne louhována ve směsi vodného roztoku hydroxidu sodného a ethanolu. Během této doby došlo k oddělení dvou vrstev, spodní vrstvy s převážným obsahem sodných solí pryskyřičných kyselin a horní vrstvy, která obsahovala rozpuštěnou myrhu s pryskyřičnými kyselinami. Následně byla horní vrstva oddělena a neutralizována kyselinou mléčnou. U spodní vrstvy nebyla provedena neutralizace a dále se již nepoužívala.

6.1.2 Složení myrhového mýdla

Složení horní a spodní vrstvy myrhového mýdla je uvedeno v následujících tabulkách.

Tabulka 4 Složení horní vrstvy myrhového mýdla

Látka	Obsah [%]
Kyselina mléčná	1,0
NaOH	4,5
Myrhová pryskyřice	7,0
Mléčnan sodný	14,0
Voda	35,5
Ethanol	38,0

Tabulka 5 Složení spodní vrstvy myrhového mýdla

Látka	Obsah [%]
Ethanol	5,0
NaOH	11,5
Myrhová pryskyřice	20,0
Voda	63,5

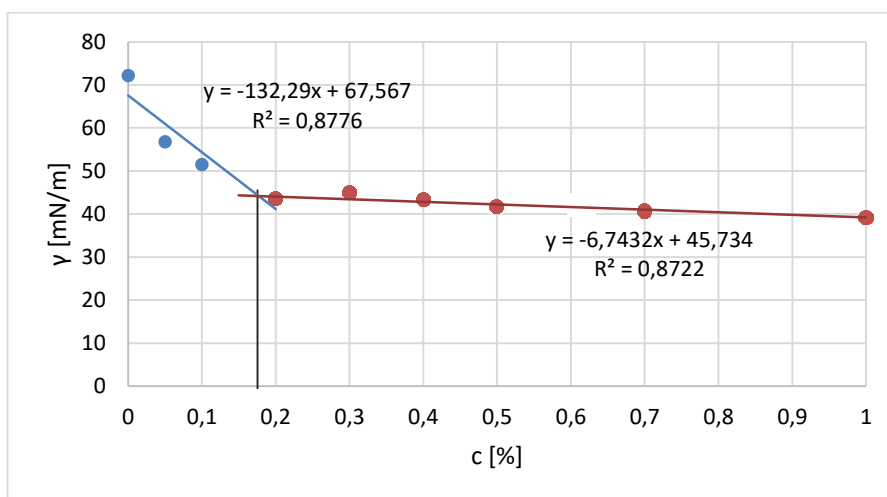
Horní vrstva myrhového mýdla byla použita pro experimentální část diplomové práce. U spodní vrstvy bylo provedeno pouze spektrofotometrické měření absorbance (část 5.3.1) a FTIR analýza (část 6.2.6).

6.2 Charakterizace myrrového mýdla

V této kapitole jsou shrnuty výsledky měření povrchového napětí, mezifázového napětí, měření velikosti disperzních částic a ζ potenciálu (v závislosti na pH a koncentraci elektrolytu). V závěru této části jsou uvedeny spektra MM z FTIR analýzy.

6.2.1 Povrchové napětí

Úkolem měření povrchového napětí bylo zjistit koncentraci MM, při které dochází k tvorbě micel. K měření byl použit tenziometr typu K20 (Krüss) s platinovou Wilhelmyho destičkou. Jedná se o odtrhávací metodu, kdy se zvyšující se koncentrací MM docházelo ke snižování povrchového napětí, což je patrné na *Obrázku 12*. Z grafu závislosti γ na koncentraci lze vyčíst, že CMC MM je 0,18 % roztok MM, což odpovídá 180 μ l MM ve 100 ml demineralizované vody.



Obrázek 12 Grafická závislost povrchového napětí na koncentraci MM

Tabulka 6 Naměřené hodnoty povrchového napětí v závislosti na koncentraci

c _{MM} [%]	γ [mN·m ⁻¹]			σγ [mN·m ⁻¹]
0	71,5	72,2	72,8	72,2±0,7
0,05	56,2	56,9	57,1	56,7±0,5
0,1	51	51,9	51,5	51,5±0,5
0,2	43,1	43,7	43,9	43,6±0,4
0,3	45,4	44,7	44,8	45,0±0,4
0,4	43,2	43,3	43,5	43,3±0,2
0,5	41,6	41,8	41,9	41,8±0,2
0,7	40,5	40,9	40,6	40,7±0,2
1,0	39,2	39,2	39,2	39,2±0,0

6.2.2 Mezifázové napětí

Mezifázové napětí na rozhraní vodné a olejové fáze bylo stanoveno metodou přisedlé kapky pomocí optického tenziometru Attension Theta. Jako vodná fáze byly použity vodné disperze MM s rostoucí koncentrací, a to 0,1; 0,3; 0,5 a 1 %. Dále byly použity rostlinné oleje, vosk a esenciální oleje. Postup experimentu je uveden v části 5.3.3. Měření bylo možné provést pouze u rostlinných olejů, konkrétně u olivového a slunečnicového oleje, kde byly hodnoty mezifázového napětí stanoveny pro všechny koncentrace MM, viz *Tabulka 7*. U konopného oleje byla na jehle vytvořena stabilní olejová kapka pouze v přítomnosti vodné fáze s obsahem nejnižší 0,1% koncentrace MM, kdy byla odečtena hodnota $\gamma = 5,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Naproti tomu pro jojobový vosk bylo možné γ měřit pouze u nejvyšší 1% koncentrace MM. U dalších koncentrací MM ve vodné fázi se na jehle kapka nevytvořila, protože docházelo k jejímu rozplývání. K tomuto jevu docházelo i u esenciálních olejů, kdy nebylo možné mezifázové napětí γ stanovit ani pro jeden ze studovaných vzorků. Důvodem nestability kapky může být v případě konopného oleje jeho výrazně odlišné složení mastných kyselin oproti olivovému a slunečnicovému oleji, jelikož obsahuje převážné nenasycené dienové a trienové mastné kyseliny. Obdobný důvod, tedy chemické složení, lze najít i u jojobového vosku, který je esterem jednosytných alkoholů a mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem. Tento vosk má rovněž oproti ostatním olejům nižší hustotu. V případě esenciálních olejů je pak nestabilita kapky na jehle způsobena přítomností ethanolu v samotném MM, který je pro esenciální oleje rozpouštědlem. Výsledky γ rostlinných olejů jsou shrnuty v *Tabulce 7*, kdy z naměřených hodnot je patrné, že se zvyšující se koncentrací MM dochází ke snižování mezifázového napětí.

Tabulka 7 Hodnoty mezifázového napětí v závislosti na koncentraci MM

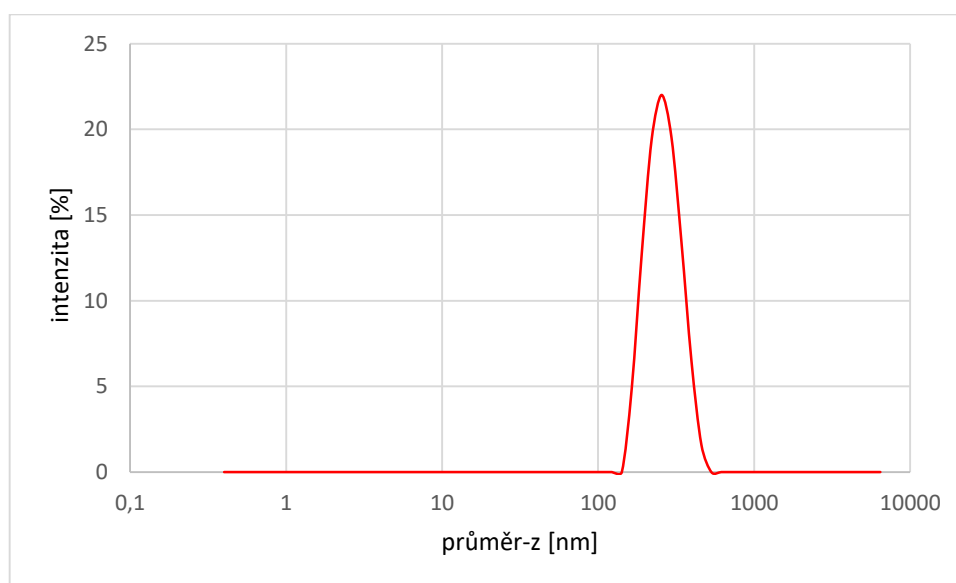
c [% v/v]	Olivový olej $\gamma \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	Slunečnicový olej $\gamma \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	Konopný olej $\gamma \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	Jojobový vosk $\gamma \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$
0,1	11,5	11,4	5,8	n
0,3	8,0	7,7	n	n
0,5	7,1	6,0	n	n
1,0	6,6	5,7	n	1,6

6.2.3 Velikost disperzních částic MM a ζ potenciálu

K charakterizaci disperze MM sloužil přístroj Zetasizer Nano ZS90 (Malvern), který pracuje na principu dynamického rozptylu monochromatického záření. Velikost částic, resp. micel MM, je vyjádřena jako „z-průměr“, což je hodnota vyjadřující intenzitně vážený průměr velikostí všech částic ve vzorku. Hodnota PDI vyjadřuje stupeň polydisperzity systému a ζ potenciál udává informace o potenciální koloidní stabilitě disperze. Naměřené hodnoty pro vodnou disperzi MM jsou uvedeny v *Tabulce 8*, kdy průměrná velikost disperzních částic MM je $399,8 \pm 5,6$ nm a průměrná hodnota ζ potenciálu se rovná $-30,3 \pm 0,5$ mV. Distribuční křivka MM (*Obrázek 13*) je monomodální, což dokumentuje přítomnost jedné populace micel s relativně malými rozdíly ve velikosti. Relativně úzkou distribuci potvrzuje i hodnota indexu polydisperzity $PDI = 0,28 \pm 0,01$.

Tabulka 8 Naměřené hodnoty velikosti disperzních částic (micel) MM a ζ potenciálu

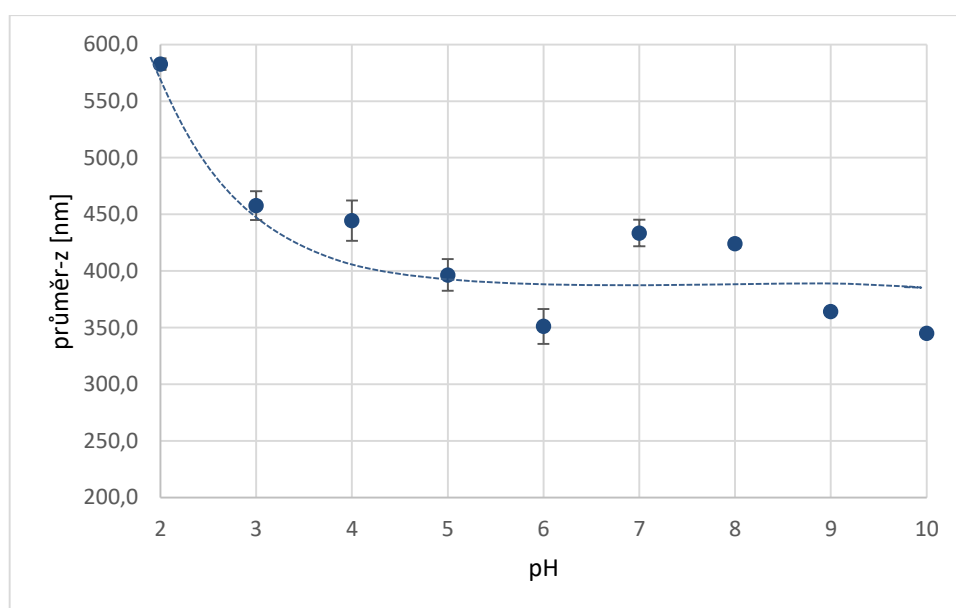
z-průměr [nm]	Průměr velikosti [nm]	PDI	Průměr PDI	ζ potenciál [mV]	Průměr ζ potenciálu
397,4	399,8±5,6	0,282	0,28±0,01	-29,9	-30,3±0,5
406,2		0,275		-30,1	
395,7		0,271		-30,9	



Obrázek 13 Distribuční křivka disperzních částic (micel) MM

6.2.4 Velikost disperzních částic MM a ζ potenciálu v závislosti na pH

Grafická závislost průměrné velikosti disperzních částic MM na pH je uvedena na *Obrázku 14*. Největší průměrná velikost částic MM a to $582,7 \pm 5,0$ nm (*Tabulka 9*) byla naměřena při pH 2, které je v tomto případě blízké izoelektrickému bodu, při kterém částice ztrácí náboj a dochází k jejich agregaci, protože se vzájemně neodpužují. Při pH 2 byla také naměřena nejnižší průměrná hodnota ζ potenciálu $-5,2 \pm 0,1$ mV (*Tabulka 9*), která je charakteristická pro vysoce nestabilní systémy. Při pH 3 a 4 je zřejmý menší nárůst velikosti částic způsobený vlivem agregace. Nejblíže průměrné velikosti částic ve vodné disperzi s neadjustovaným pH ($399,8 \pm 5,6$ nm, *Tabulka 8*) je velikost částic MM při pH 5. U neutrálního pH a pH 8 opět došlo k mírnému zvětšení a při vyšším pH se velikost opět blížila průměrné velikosti částic $399,8 \pm 5,6$ nm. Průměrné hodnoty ζ potenciálu se pro pH v intervalu 3 až 10 pohybovaly v rozmezí $30 \pm 1,5$ mV, viz *Tabulka 9*. Ze získaných dat je možné konstatovat, že myrhové mýdlo je poměrně odolné širokému rozmezí hodnot pH a že ke značné agregaci disperzních částic dochází při velmi nízké hodnotě pH 2.



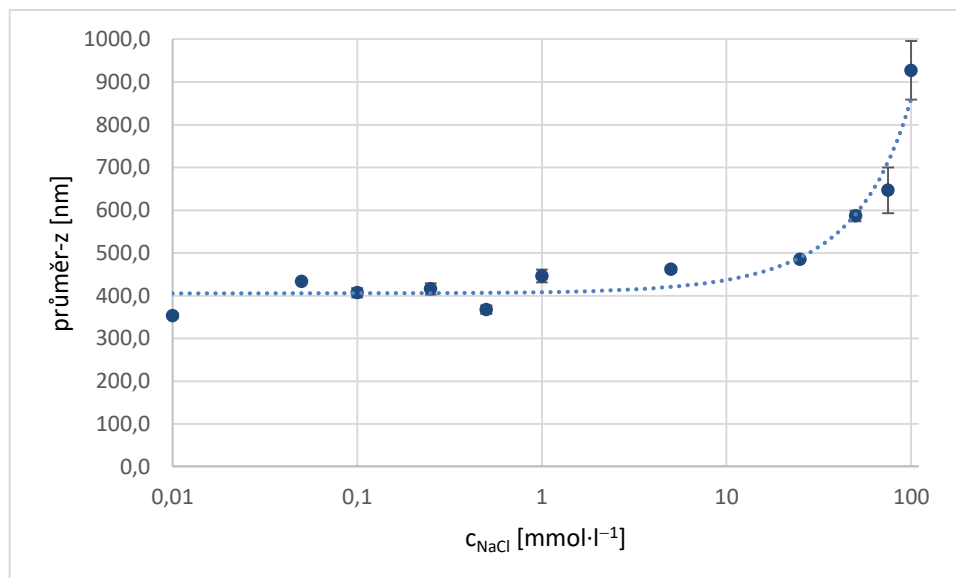
Obrázek 14 Grafická závislost velikosti disperzních částic MM na pH

Tabulka 9 Hodnoty velikosti disperzních částic MM a ζ potenciálu v závislosti na pH

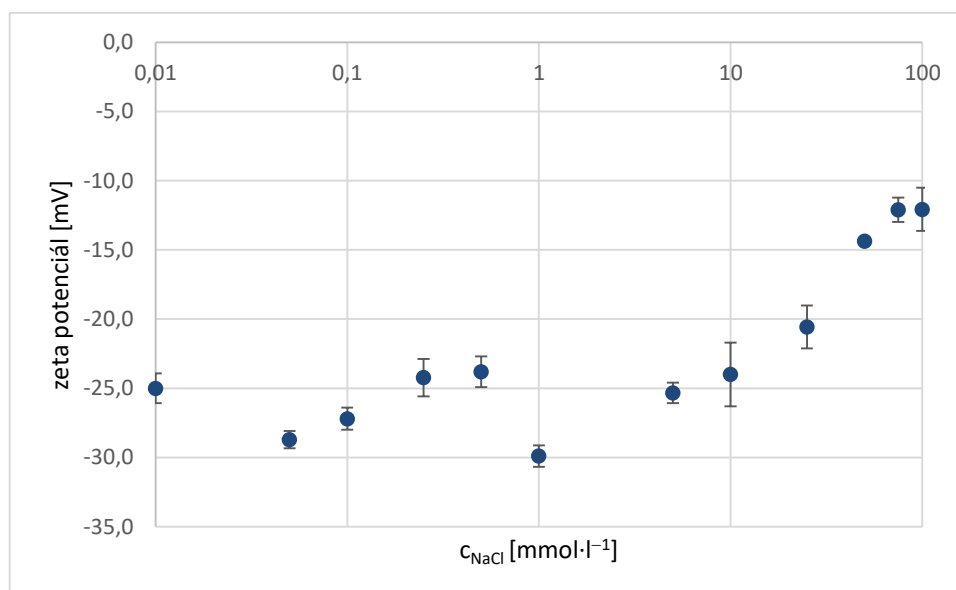
pH	Průměr velikosti [nm]	Průměr PDI	Průměr ζ potenciálu [mV]
2	583±5	0,29±0,03	-5,2±0,1
3	458±13	0,37±0,01	-30,7±0,6
4	444±18	0,37±0,01	-29,5±1,0
5	397±14	0,28±0,10	-30,5±1,2
6	351±15	0,33±0,05	-29,2±0,7
7	434±12	0,27±0,04	-31,5±0,9
8	424±4	0,25±0,02	-30,9±1,5
9	364±3	0,36±0,03	-32,0±0,9
10	345±1	0,22±0,02	-31,7±0,9

6.2.5 Velikost disperzních částic MM a ζ potenciálu v závislosti na koncentraci elektrolytu

Grafická závislost průměrné velikosti disperzních částic MM na koncentraci elektrolytu je uvedena na *Obrázku 15*. Nízké koncentrace elektrolytu neměly zásadní vliv na agregaci částic MM, kdy do koncentrace NaCl $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ se hodnoty pohybují v okolí průměrné velikosti částic $399,8\pm 5,6 \text{ nm}$ odpovídající nulové koncentraci NaCl. Mírné zvýšení je sledováno při koncentraci $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, avšak znatelný nárůst je patrný až při vyšších koncentracích NaCl, a to 50; 75 a $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (*Tabulka 10*). Zvětšení částic MM odpovídá poklesu průměrných hodnot ζ potenciálu s rostoucí koncentrací NaCl (*Obrázek 16*). Do koncentrace NaCl $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, se hodnoty ζ potenciálu pohybují v rozmezí $-25,0\pm 5,0 \text{ mV}$ a při vyšších koncentracích dochází k poklesu až na $-12,1\pm 1,6 \text{ mV}$, viz *Tabulka 10*. Z naměřených dat lze konstatovat, že disperzní systém MM je odolný vůči agregaci částic, ke které dochází až při vyšších koncentracích NaCl (pro srovnání, koncentrace NaCl ve fyziologickém roztoku je $154 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Srovnání distribučních křivek částic (micel) MM v přítomnosti NaCl je pro nejvyšší studované koncentrace elektrolytu uvedeno na *Obrázku 17*. Jedná se o bimodální distribuční křivky, kde je patrné, že se zvyšující se koncentrací dochází k postupnému přibývání aglomerátů v oblasti větší než $4 \mu\text{m}$, což je velikost, kterou již přístroj Zetasizer není schopen detekovat. V přítomnosti elektrolytů s divalentními kationty lze však předpokládat, že k agregaci dojde při nižších koncentracích.



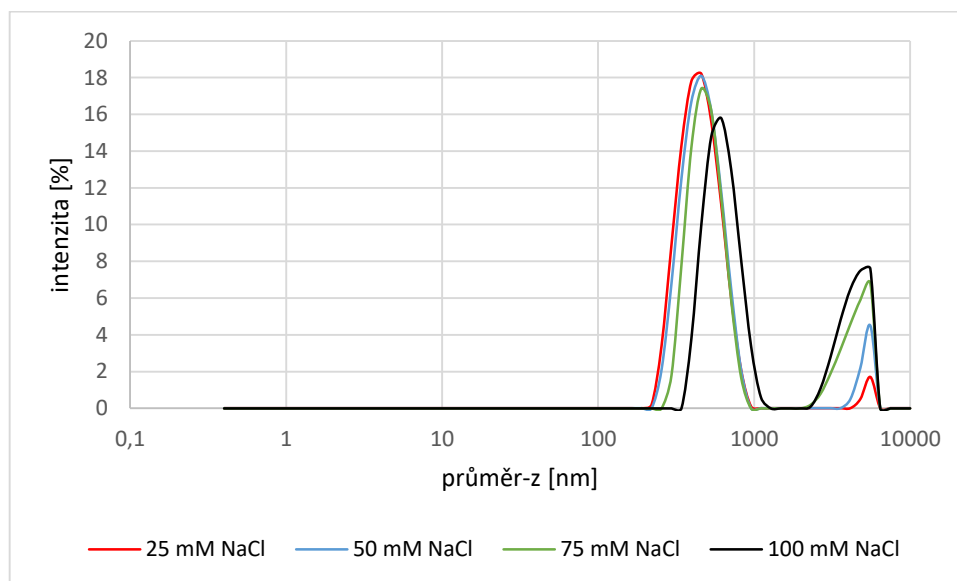
Obrázek 15 Grafická závislost velikosti disperzních částic MM na koncentraci NaCl



Obrázek 16 Grafická závislost ζ potenciálu MM na koncentraci NaCl

Tabulka 10 Naměřené hodnoty velikosti disperzních částic MM a ζ potenciálu v závislosti na koncentraci NaCl

c_{NaCl} [$\text{mmo} \cdot \text{l}^{-1}$]	Průměr velikosti [nm]	Průměr PDI	Průměr ζ potenciálu [mV]
0,01	354±6	0,27±0,03	-25,0±1,1
0,05	433±1	0,19±0,05	-28,7±0,6
0,1	407±10	0,20±0,03	-27,2±0,8
0,25	416±13	0,37±0,04	-24,2±1,4
0,5	368±10	0,41±0,01	-23,8±1,1
1,0	446±15	0,40±0,02	-29,9±0,8
5,0	462±6	0,28±0,04	-25,3±0,8
25	485±4	0,33±0,05	-20,6±1,6
50	587±12	0,37±0,03	-14,4±0,1
75	647±54	0,48±0,03	-12,1±0,9
100	927±68	0,47±0,09	-12,1±1,6



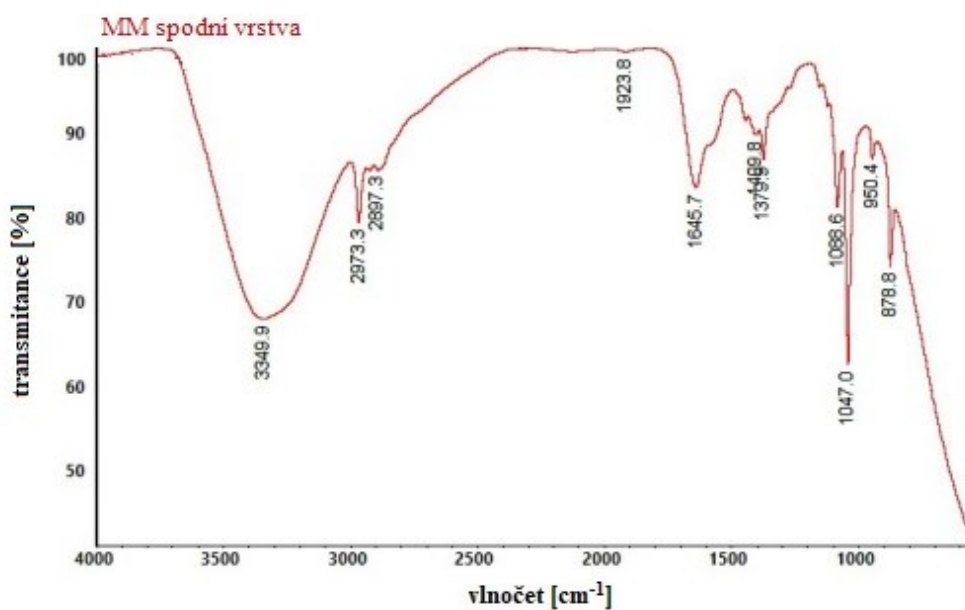
Obrázek 17 Distribuční křivky disperzních částic (micel) MM pro nejvyšší koncentrace NaCl

6.2.6 Infračervená spektroskopie

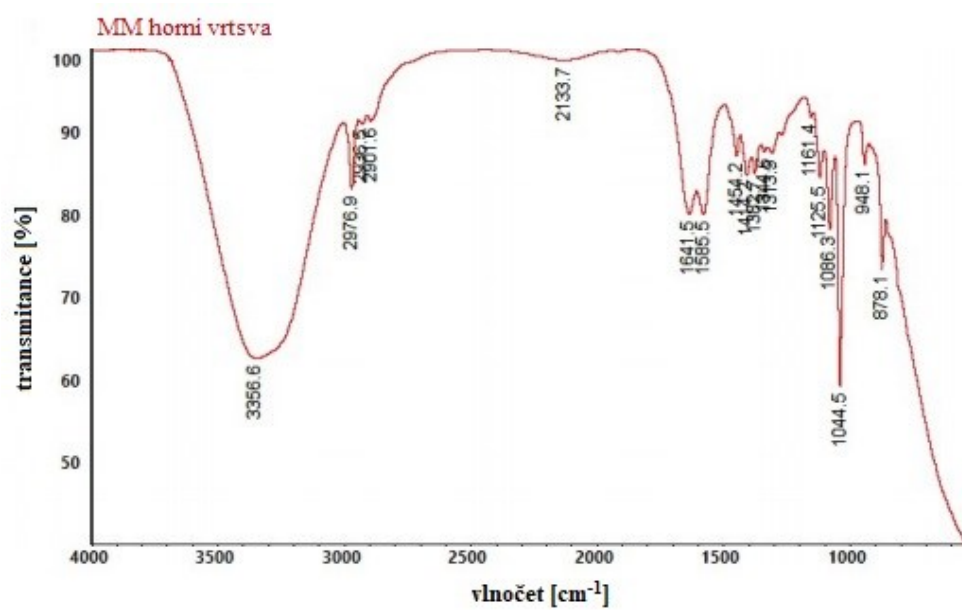
Infračervenou spektroskopií byla analyzována horní i spodní vrstva MM. Měření probíhalo na pozadí vzduch a ethanol, ale spektra na pozadí ethanol byla nekvalitní a nebylo možné je vyhodnotit. Spektra pro horní i spodní vrstvu na pozadí vzduch jsou zobrazena na *Obrázku 18* a *Obrázku 19*. Spektra obou vrstev jsou velmi podobná, ale spektrum horní vrstvy je složitější, především v oblasti $1650\text{--}870\text{ cm}^{-1}$, viz *Obrázek 19*. Nejvýraznější signál v oblasti $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ je patrný u obou spekter a ukazuje na přítomnost --OH skupin, kdy v případě MM se jedná jak o ethanol, který je jeho součástí, tak i další sloučeniny s --OH skupinou. Oblast $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ odpovídá --CH „stretching“ methylových skupin. Oblast vlnočtu 1645 cm^{-1} je pak možné přiřadit C=C vazbám. Ty představují exocyklické methylenové skupiny, které jsou charakteristické pro pryskyřice [45]. Signály v oblasti $1340\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ je možno přiřadit alifatickým uhlovodíkům (CH_2 a CH_3). Lze předpokládat, že píky v oblasti $1440\text{--}1395\text{ cm}^{-1}$ odpovídají --COOH skupinám pryskyřičných kyselin.

Infračervené spektrum pro KBr tabletu s MM je zobrazeno na *Obrázku 20*. Opět je patrný široký signál v oblasti $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ charakteristický pro --OH skupinu, Dalším výrazným signálem je pík 1602 cm^{-1} zřejmě odpovídající C=C vazbám. Silný úzký signál 1448 cm^{-1} ukazuje buď na přítomnost --COOH skupin, anebo na přítomnost methylové skupiny s dalšími navázanými substituenty. Výpis signálů z FTIR spekter je pro jednotlivé vzorky uveden v *Tabulce 11*.

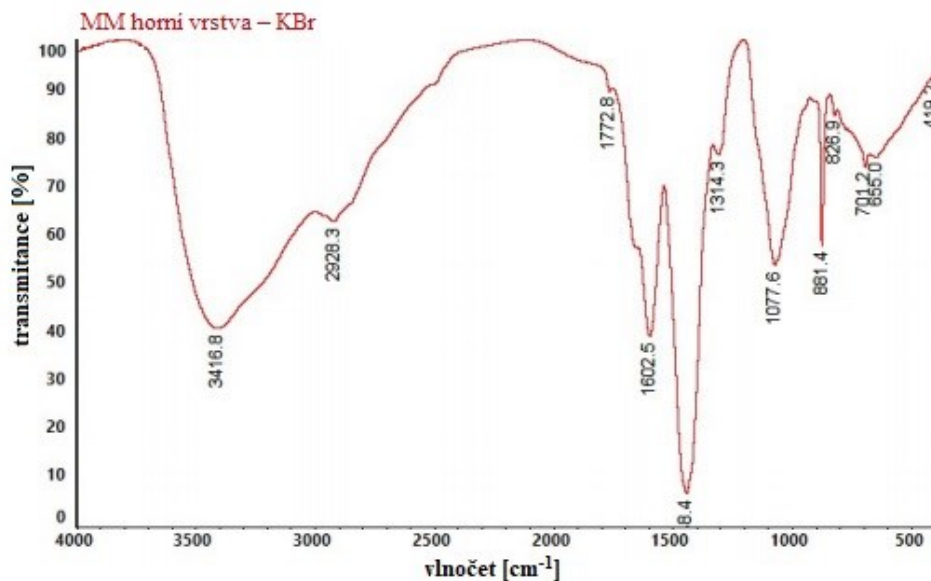
Při diskusi spekter byly využity publikace [45], [46]. V této souvislosti je možno konstatovat, že prací, které se zabývají FTIR spektroskopií myrhových pryskyřic, je velmi málo. Situace je dále komplikována velkou variabilitou myrhových pryskyřic. Autoři se zde zabývali klasifikací několika typů pryskyřic podle jejich charakteristických funkčních skupin. Myrha byla zařazena mezi pryskyřice obsahující esterové skupiny, vzhledem k přítomnosti signálů s vlnočty v oblasti $1731\text{--}1738\text{ cm}^{-1}$. Ve spektrech představených v této diplomové práci však signály z uvedené oblasti chyběly. Další typické signály pro myrhovou pryskyřici zaznamenané v publikaci Martin-Ramos a kol. [45] byly píky při 1658 cm^{-1} (C=C) a 1242 cm^{-1} (C-H a C-O-H). Podrobnější popis a rozbor FTIR spekter však přesahuje rámec této diplomové práce.



Obrázek 18 Infračervené spektrum pro spodní vrstvu MM (pozadí vzduch)



Obrázek 19 Infračervené spektrum pro horní vrstvu MM (pozadí vzduch)



Obrázek 20 Infračervené spektrum pro horní vrstvu MM (pozadí čistá KBr tableta)

Tabulka 11 Souhrn signálů FTIR pro jednotlivé vzorky [47]

Vlnocet [cm ⁻¹]	Funkční skupina	MM – spodní	MM – horní	MM – KBr
3000-3500	-OH	3350	3357	3417
2500-3000	-CH	2897; 2973	2977; 2937; 2902	2928
1600-1650	C=C	1646	1642	1603
1390-1450	CH ₃ -(C=O)-C- CH ₃ -(C=O)-O-	1410	1454; 1414	1448
1395-1440	-COOH	1410; 1380	1454	1448
1000-1500	C-C, C-O C-H a C-O-H	1047; 1087; 1410	1045; 1086; 1126; 1161; 1314; 1345; 1383; 1414; 1452	1078; 1314; 1448
1075-1225	Ar-CO	1047; 1089	1086; 1126; 1161	1078
500-1000	-CH Ar	879; 950	878; 948	655; 701; 257; 881

6.3 Charakterizace emulzních systémů

Tato kapitola je zaměřena na charakterizaci emulzních systémů měřením velikosti emulzních kapek a ζ potenciálu. Průměrné velikosti jsou uvedeny ve sloupcových grafech, ve kterých jsou porovnány emulze připravené z 1% MM a dané olejové fáze s emulzemi, jež byly stabilizovány xanthanovou gumou. U emulzí, které si zachovaly stabilitu, jsou uvedeny průměrné velikosti kapek v průběhu skladování v chladničce po dobu 1 měsíce. Průměrné hodnoty ζ potenciálu pro dané emulzní systémy jsou taktéž zaznamenány pomocí sloupcových grafů.

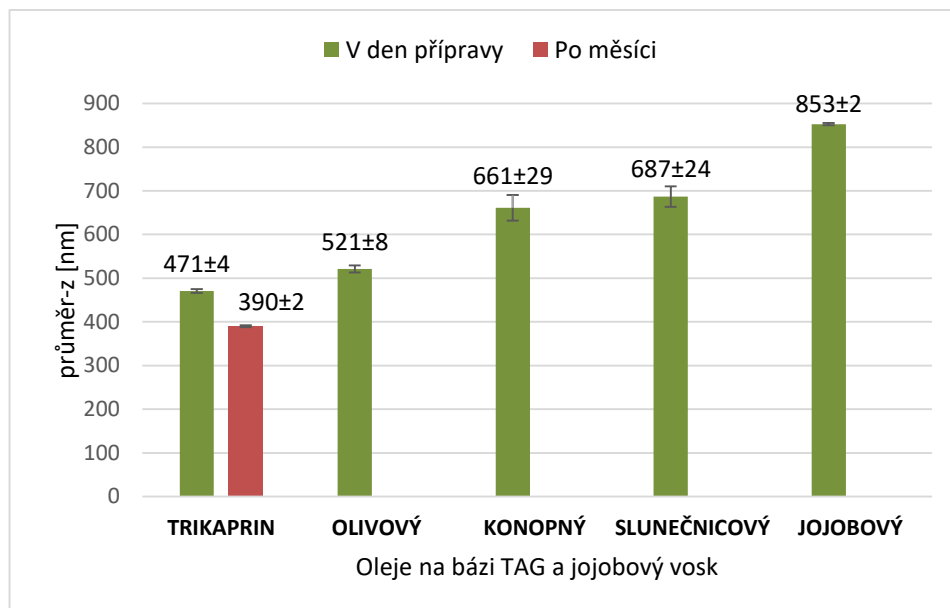
Tato část práce se dále zabývá fázovou studií emulzních systémů, kdy jsou sledované parametry (vrstva oddělené olejové fáze, vrstva krémování a vrstva sedimentace) v daných časových intervalech uvedeny v tabulkách. Pro stanovení byly použity emulze O/V v poměru 5/95.

Dále byly připraveny emulze O/V v poměru 5/95, kdy jako vodná fáze byla použita vyšší, 2% koncentrace MM a jako olejová fáze olivový olej a myrhový EO. Vyšší koncentrace MM neměla zásadní vliv na velikost emulzních kapek ani na ζ potenciál, ale měla negativní vliv na stabilitu emulzí, kdy bylo sledováno větší množství volné olejové fáze a k oddělení došlo dříve než po hodině od přípravy. Tímto testem byla potvrzena vhodnost zvolené 1% koncentrace MM pro přípravu studovaných emulzí.

6.3.1 Emulze s oleji na bázi triacylglycerolů a vosku

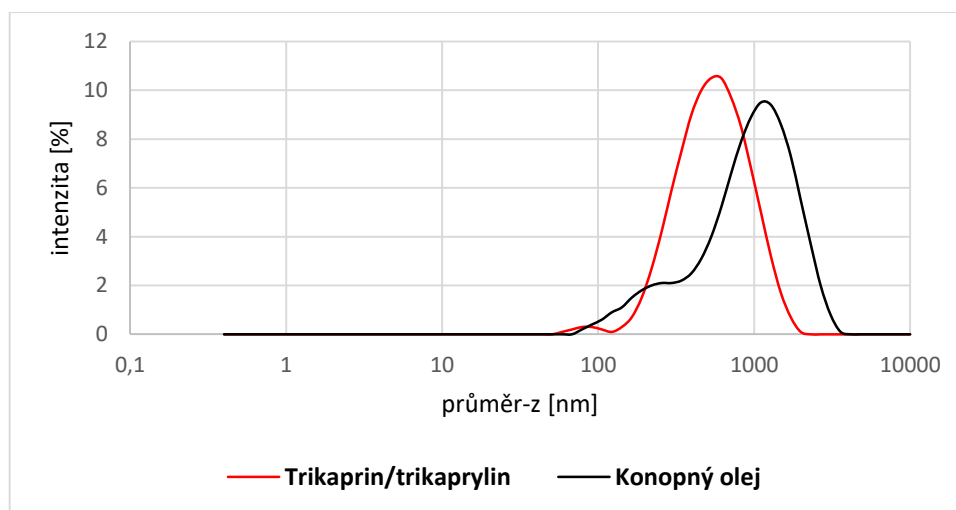
Velikost emulzních kapek

U emulzí připravených z 1% roztoku MM s olejovou fází složenou z olejů na bázi TAG nebo vosku v poměru O/V 5/95 nepřesáhla průměrná velikost emulzních kapek 1 μm s nejmenšími kapkami stanovenými pro emulzi s trikaprylinem (471 ± 4 nm), viz *Obrázek 21*. Po měsíci skladování byla opětovně změřena velikost emulzních kapek a ζ potenciálu pouze pro emulzi s trikaprylinem/trikaprylinem, která vykazovala nejmenší známky rozpadu. Na *Obrázku 21* je patrné, že v průběhu skladování nedošlo u této emulze k významné změně velikosti emulzních kapek. Z tohoto důvodu byl trikaprylin dále vybrán pro přípravu emulze stabilizované xanthanovou gumou, spolu s olivovým olejem, který vykazoval po měsíci skladování pouze tenkou vrstvu oddělené olejové fáze.



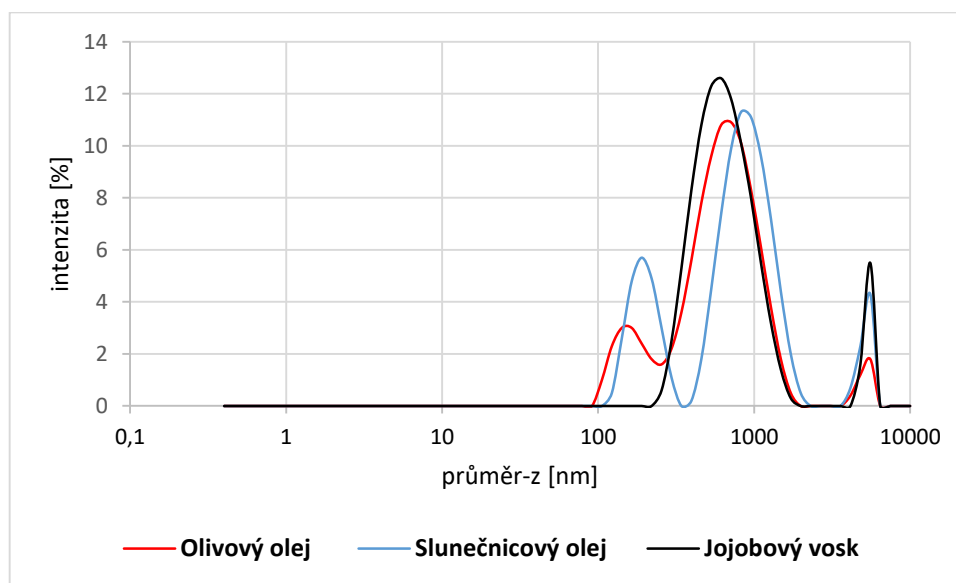
Obrázek 21 Průměrná velikost kapek emulzí s obsahem olejů na bázi TAG a jojobového vosku. S výjimkou emulze s trikaprylinem se ostatní vzorky rozpadly

Distribuční křivky emulzí s trikaprylinem a konopným olejem, viz *Obrázek 22*, byly monomodální, což potvrzuje přítomnost jedné populace emulzních kapek s relativně malými rozdíly ve velikosti. Poměrně úzká distribuce je sledována u emulze s trikaprylinem s hodnotou indexu polydisperzity $PDI = 0,24 \pm 0,01$. Konopný olej má širší distribuční křivku, která může ukazovat na přítomnost menší emulzních kapek, které jsou však součástí populace větších kapek.



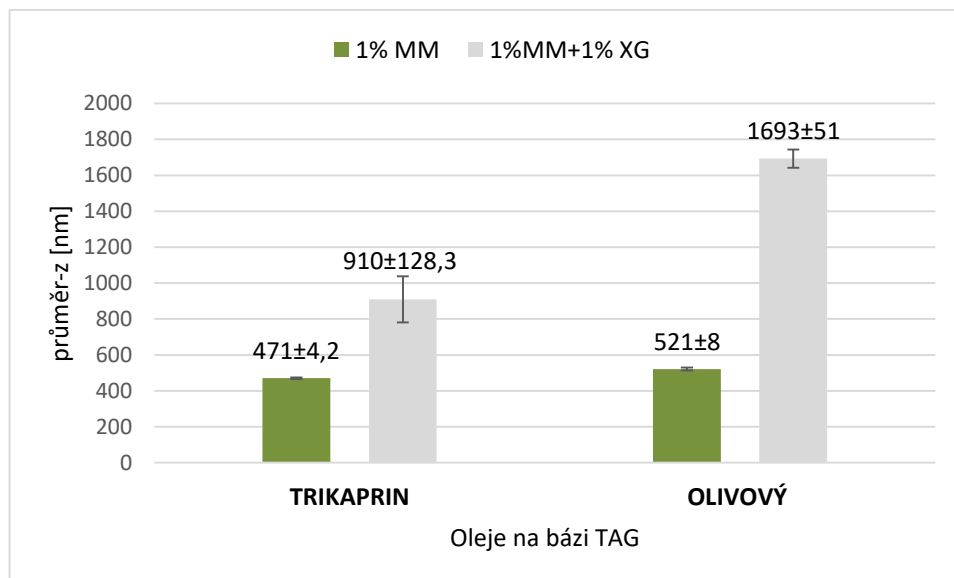
Obrázek 22 Distribuční křivky kapek emulzí s obsahem olejů na bázi TAG (monomodální distribuce)

Distribuční křivky emulzí s olivovým a slunečnicovým olejem spolu s jojobovým voskem na *Obrázku 23* vykazují bimodální charakter. U emulze s olivovým a slunečnicovým olejem je patrná populace kapek s velikostí blížící se 1 μm a druhá, samostatná menší populace s menšími kapkami. U všech vzorků lze sledovat poměrně významnou populaci emulzních kapek větších než 5 μm , jejichž velikost již nelze pomocí DLS přesně stanovit, protože při této velikosti ustává Brownův pohyb dispergovaných kapek, na kterém je měření založeno.



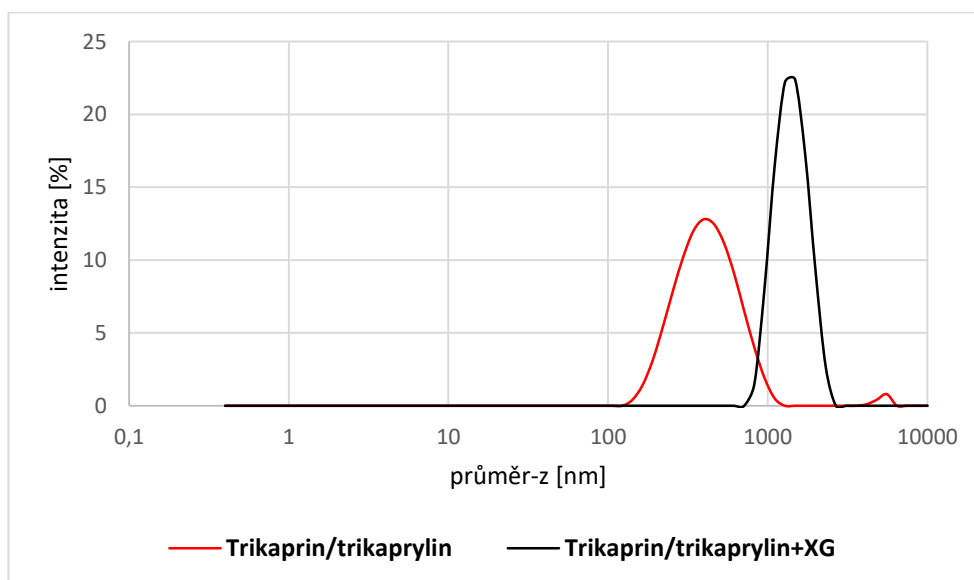
Obrázek 23 Distribuční křivky kapek emulzí s obsahem olejů na bázi TAG a jojobového vosku (bimodální distribuce)

Pro zlepšení stability byly studované emulzní systémy, připravené s MM jako surfaktantem, dále stabilizovány 1% XG. Na *Obrázku 24* je zobrazeno zvětšení průměrné velikosti kapek takto stabilizovaných emulzí s trikaprylinem a olivovým olejem. V případě emulzí obsahujících XG je však potřeba připomenout, že uvedené hodnoty představují průměrnou velikost všech částic v celém systému, tedy nejen emulzních kapek, ale také velkých makromolekul polysacharidových řetězců XG. U emulze s olivovým olejem došlo v přítomnosti XG k výraznému nárůstu velikosti kapek, které jsou větší až o 1 μm . U emulzí s trikaprylinem bylo zvětšení emulzních kapek menší z 471 \pm 4 nm u nestabilizované emulze na 910 \pm 128 nm u emulze s XG.



Obrázek 24 Průměrná velikost kapek emulzí myrhového mýdla s obsahem olejů na bázi TAG stabilizovaných XG. Srovnání s emulzemi bez XG.

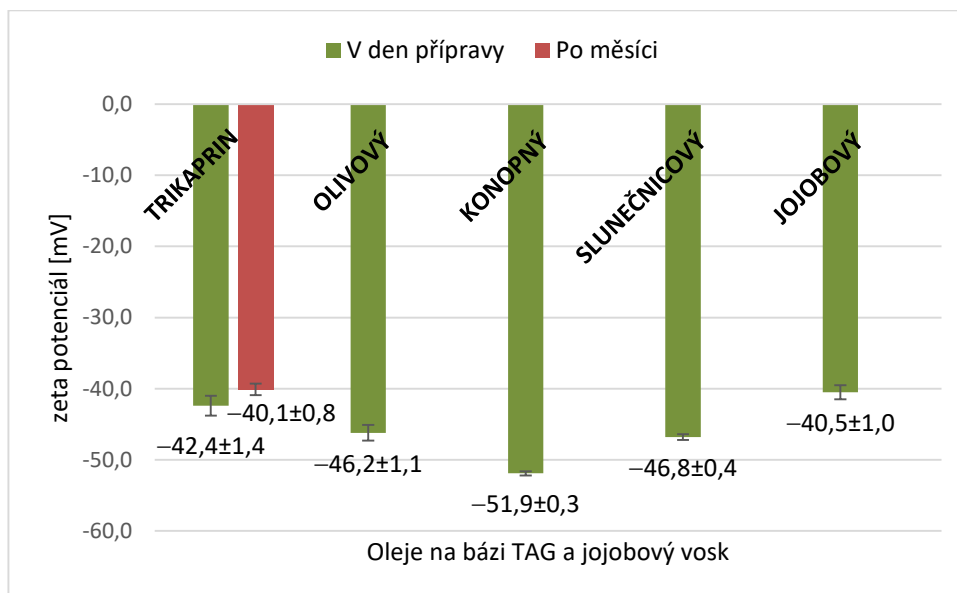
Na Obrázku 25 jsou zobrazeny distribuční křivky pro trikaprylinovou emulzi připravenou v přítomnosti a nepřítomnosti XG. Distribuční křivka stabilizované emulze je monodální s úzkou distribucí a velikostí emulzních kapek větších než 1 μm . Emulze nestabilizovaná XG pak vykazuje širší distribuci s menšími emulzními kapkami.



Obrázek 25 Distribuční křivky emulzí myrhového mýdla s trikaprylinem/trikaprylinem. Srovnání emulzí stabilizovaných a nestabilizovaných XG

Zeta potenciál

Průměrné hodnoty ζ potenciálu jsou u emulzí s myrhovým mýdlem výrazně nižší než -30 mV, což je hodnota uváděná v odborné literatuře jako mezní, nad kterou jsou disperzní systémy nestabilní a dochází k jejich rozpadu (Obrázek 26). Hodnoty ζ potenciálu jsou rovněž výrazně nižší než pro samotnou disperzi MM, jejíž potenciál byl $-30,3 \pm 0,5$ mV.



Obrázek 26 Průměrné hodnoty ζ potenciálu pro emulze s obsahem olejí na bázi TAG a jojobového vosku. S výjimkou emulze s trikaprilinem se ostatní vzorky rozpadly

Fázové studie emulzí obsahujících oleje na bázi TAG nebo jojobový vosk

U emulzí O/V obsahujících oleje na bázi TAG nebo jojobový vosk byly v průběhu skladování v chladničce sledovány různé mechanismy rozpadu. Emulze, jež vykazovaly nízkou stabilitu, obsahovaly konopný olej, slunečnicový olej a jojobový vosk. S výjimkou slunečnicového oleje, docházelo již po hodině od přípravy k uvolnění malých kapek oleje, viz Tabulka 12. Po třech hodinách byly patrné kapky volného oleje i na hladině emulze se slunečnicovým olejem. Po dnu skladování byla u vzorků s konopným olejem a jojobovým voskem sledována tenká vrstva volného oleje a u emulze se slunečnicovým olejem i tenká vrstva krémování. V dalších dnech od přípravy docházelo k postupnému uvolňování olejové fáze, které bylo doprovázeno krémováním. Sedmý den od přípravy byl značný rozpad sledován u emulze s jojobovým voskem, kdy na hladině byla volná

olejová fáze, pod kterou byla vrstva krémování a oproti dalším emulzím je patrný i méně intenzivní zákal, viz *Obrázek 27*. Po měsíci skladování byl největší rozpad fází pozorován u emulze se slunečnicovým olejem a jojobovým voskem (*Obrázek 28*). K rozpadu fází došlo i u emulze s obsahem konopného oleje (*Obrázek 28*).

Tabulka 12 Sledování stability emulzí s obsahem olejů na bázi TAG a jojobového vosku (nestabilní emulze (E))

čas	KONOPNÝ OLEJ	SLUNEČNICOVÝ OLEJ	JOJOBOVÝ VOSK
1 h	malé kapky volného oleje na hladině E	stabilní E	malé kapky volného oleje na hladině E
3 h	malé kapky oleje na hladině E	malé kapky oleje na hladině E	malé kapky oleje na hladině E
1 den	tenká vrstva volného oleje	větší kapky volného oleje, tenká vrstva krémování	tenká vrstva volného oleje
3 dny	ca 1 mm volného oleje	větší kapky volného oleje, ca 1 mm krémování	ca 1 mm volného oleje, cca 1 mm krémování
7 dnů	ca 3 mm volného oleje, dochází k oddělení fází	ca 1 mm volného oleje, ca 1 mm krémování	ca 1 mm volného oleje, ca 1 mm krémování
1 měsíc	MO*) růst, rozpad fází	MO růst, největší rozpad fází	MO růst, Největší rozpad fází

*) MO – mikroorganismy

Oproti výše uvedeným byly emulze s obsahem olivového oleje a trikaprin/trikaprylinu stabilnější (*Tabulka 13*). Vzorek s olivovým olejem vykazoval o něco lepší stabilitu jako emulze diskutované v předchozím odstavci, avšak v průběhu skladování bylo i zde pozorováno postupné uvolňování volné olejové fáze a docházelo ke krémování (*Obrázek 27*). Po měsíci skladování byl u této emulze znatelný nejmenší rozpad fází, kdy emulze byla v celém objemu vialky s krémovou vrstvou a kapkami volného oleje (*Obrázek 28*). Nejvyšší stabilitu vykazovala emulze obsahující trikaprin/trikaprylin, triester glycerolu s navázanými mastnými kyselinami – kyselinou kaprinovou (C10:0) a kyselinou kaprylovou (C8:0). V průběhu tří dnů tato emulze nevykazovala známky rozpadu a po týdnu skladování byla sledována pouze tenká vrstva volné olejové fáze (*Obrázek 27*). Měsíc od přípravy byla patrná volná olejová fáze a krémová vrstva, viz *Obrázek 28*.

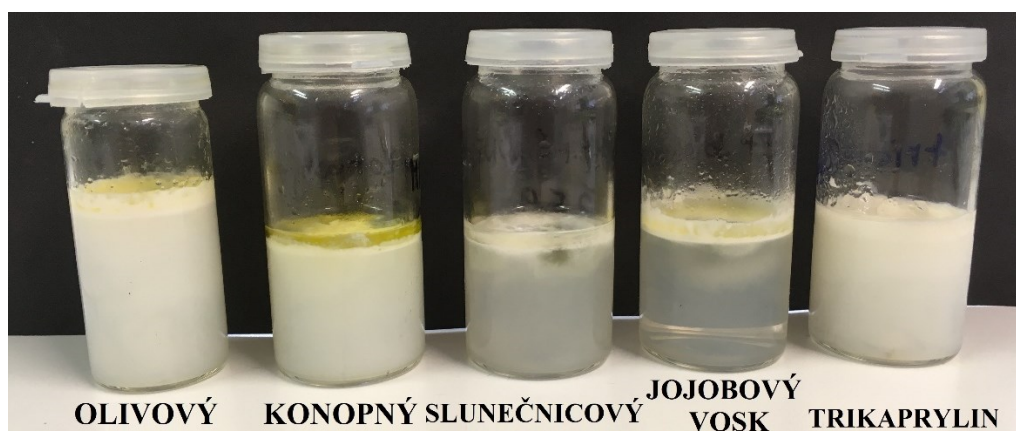
Tabulka 13 Sledování stability emulzí s obsahem olejů na bázi TAG (stabilní emulze, (E))

čas	OLIVOVÝ OLEJ	TRIKAPRIN/ TRIKAPRYLIN
1 h	stabilní E	stabilní E
3 h	tenká vrstva oleje na hladině E	stabilní E
1 den	tenká vrstva volného oleje, tenká vrstva krémování	stabilní E
3 dny	ca 1 mm volného oleje, tenká vrstva krémování	stabilní E
7 dnů	ca 2 mm volného oleje, tenká vrstva krémování	tenká vrstva volného oleje na hladině
1 měsíc	MO*) růst, nejmenší rozpad fází – E v celém objemu vialky s vrstvou olejových kapek na povrchu + vrstva krémování	ca 1,5 mm volného oleje, ca 2 mm krémování

*) MO – mikroorganismy



Obrázek 27 Stabilita emulzí – 7. den od přípravy

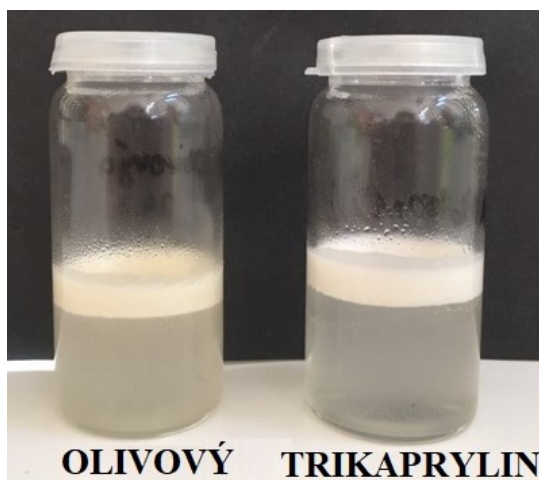


Obrázek 28 Stabilita emulzí – po měsíci od přípravy

U emulzí dodatečně stabilizovaných XG byla opět nejstabilnější emulze s trikaprylinem (*Tabulka 14*). Oproti nestabilizované emulzi byla sledována krémová vrstva již po jednom dni od přípravy, ale nedošlo k uvolnění olejové fáze. U emulze s olivovým olejem stabilizované XG došlo k uvolnění kapek volného oleje a krémování, stejně jako u emulze bez XG, u které však bylo větší množství volného oleje. Na *Obrázku 29* jsou zobrazeny emulze s XG po týdnu skladování, u kterých je patrná krémová vrstva.

Tabulka 14 Sledování stability emulzí s obsahem olejů na bázi TAG stabilizovaných myrhovým mýdlem a XG (1 %)

čas	OLIVOVÝ OLEJ	TRIKAPRIN/ TRIKAPRYLIN
1 h	stabilní E	stabilní E
3 h	malé kapky volného oleje na hladině E	stabilní E
1 d	ca 5 mm krémování, malé kapky volného oleje na hladině E	tenká vrstva krémování
7 dnů	ca 5 mm krémování, kapky volného oleje	cca 7 mm krémování

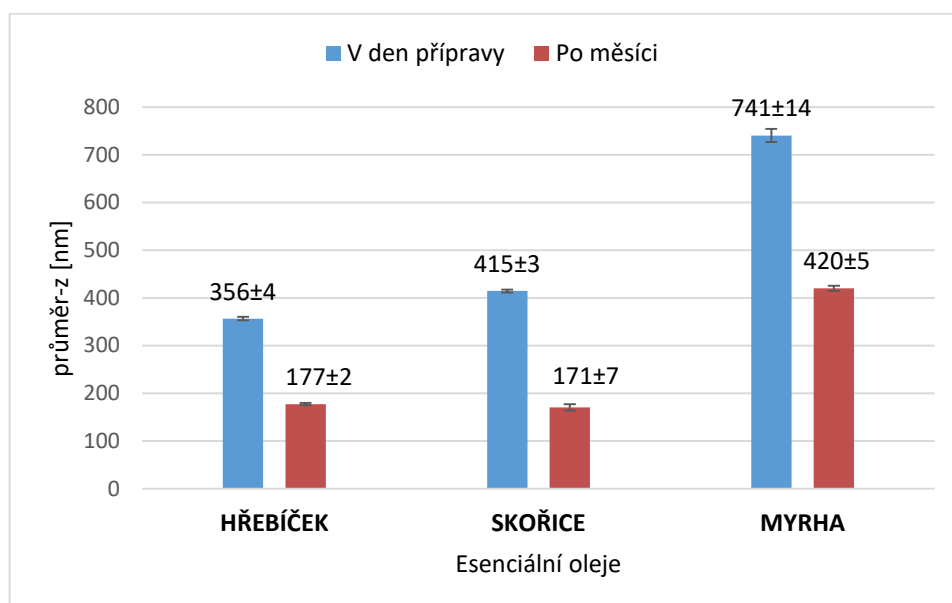


Obrázek 29 Emulze stabilizované kromě myrhového mýdla i 1% roztokem XG – 7. den od přípravy

6.3.2 Emulze s esenciálními oleji

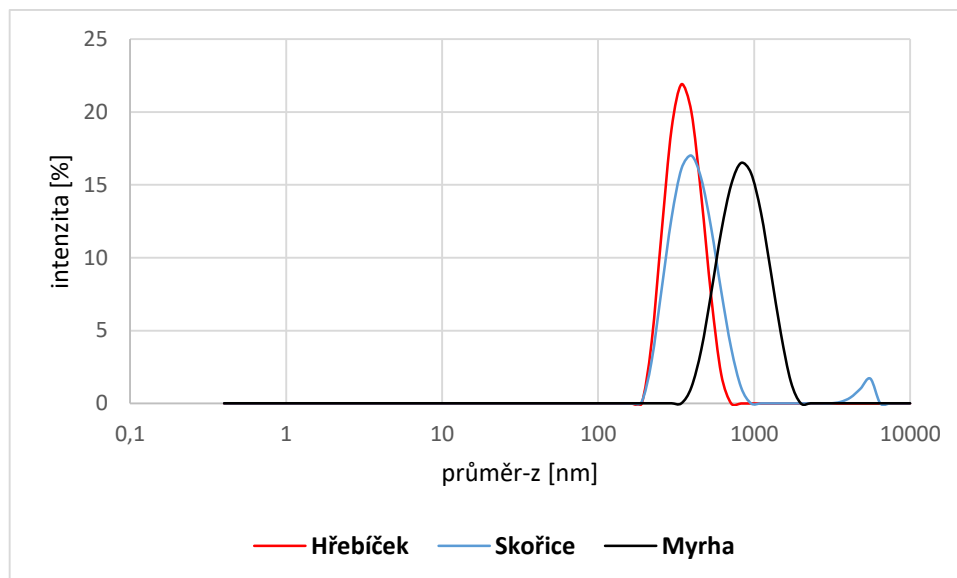
Velikost emulzních kapek

Emulze obsahující esenciální oleje jsou rozděleny na dvě skupiny, a to na emulze, které podléhají sedimentaci a na emulze podléhající krémování v průběhu skladování. Na tyto mechanismy rozpadu má vliv hustota použité olejové fáze. Mezi emulze podléhající sedimentaci patří ty, které obsahují esenciální oleje myrhy, hřebíčku (plody) a skořicové kůry. Na *Obrázku 30* je znázorněna průměrná velikost emulzních kapek v den přípravy a po měsíci skladování v chladničce. Nejmenší změny emulzních kapek jsou patrné u emulze s hřebíčkovým olejem, kdy došlo k jejich zmenšení velikosti přibližně na polovinu. Podobné je i chování skořicové emulze, kde je však pokles velikosti kapek o něco větší. Největší rozdíl velikostí emulzních kapek v den přípravy a po měsíci je sledován u emulze s myrhou.



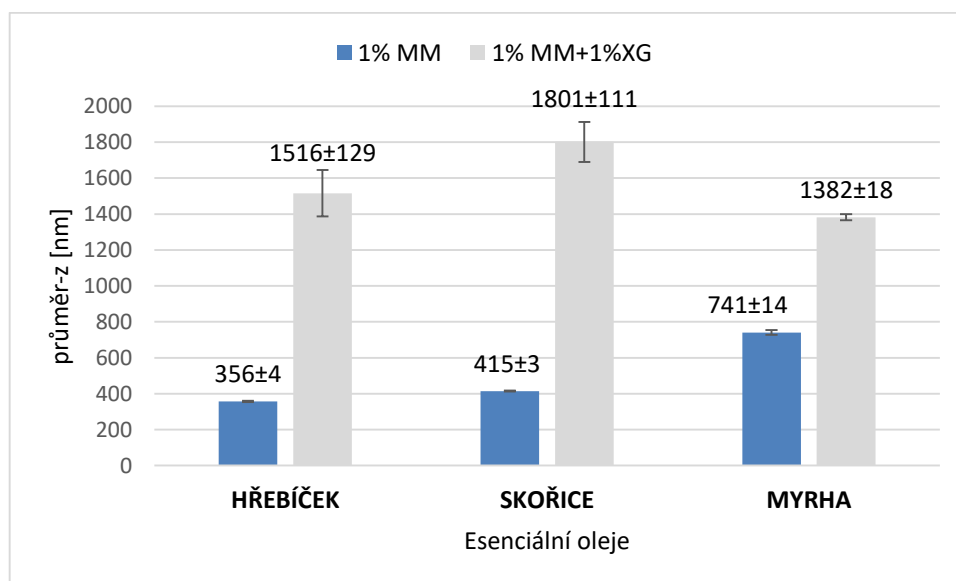
Obrázek 30 Průměrná velikost kapek emulzí s esenciálními oleji podléhajícími sedimentaci

Úzká momodální distribuční křivka je patrná u emulze s obsahem hřebíčkové silice, které odpovídá i hodnota indexu polydisperzity $PDI = 0,16 \pm 0,02$. Skořicová emulze vykazuje širší distribuci velikosti emulzních kapek, stejně jako emulze s myrhovým EO (*Obrázek 31*).



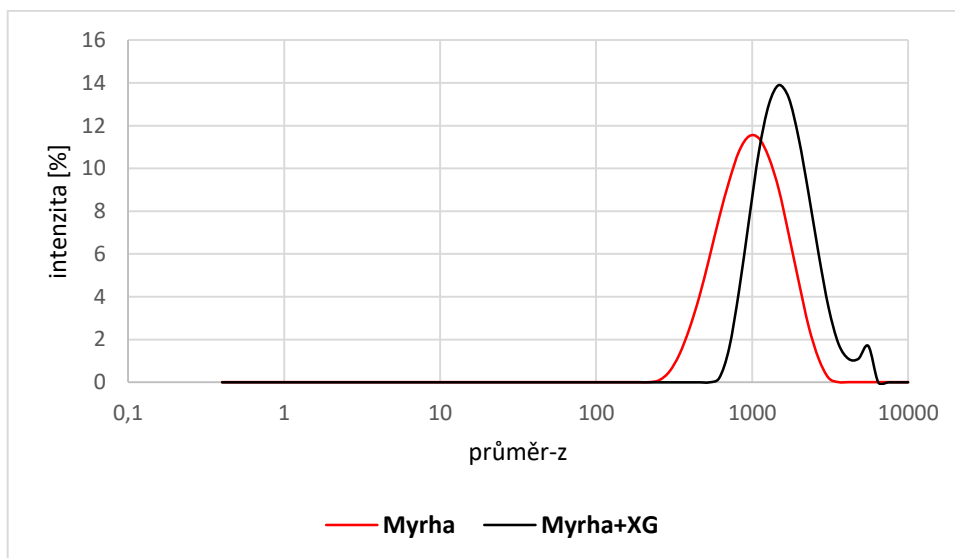
Obrázek 31 Distribuční křivky kapek emulzí s esenciálními oleji podléhajícími sedimentaci (ihned po přípravě)

Dalším krokem byla dodatečná stabilizace emulzí 1% roztokem XG, viz Obrázek 32. Rovněž zde, jako v případě emulzí s oleji na bázi TAG došlo ke zvětšení průměrné velikosti kapek oproti emulzím, kde nebyla XG přítomná. Nejmenší nárůst byl zaznamenán u emulze s myrhou, naopak u vzorků s hřebíčkovým a skořicovým olejem je patrný masivní nárůst průměrné velikosti emulzních kapek vlivem působení stabilizačních řetězců XG.



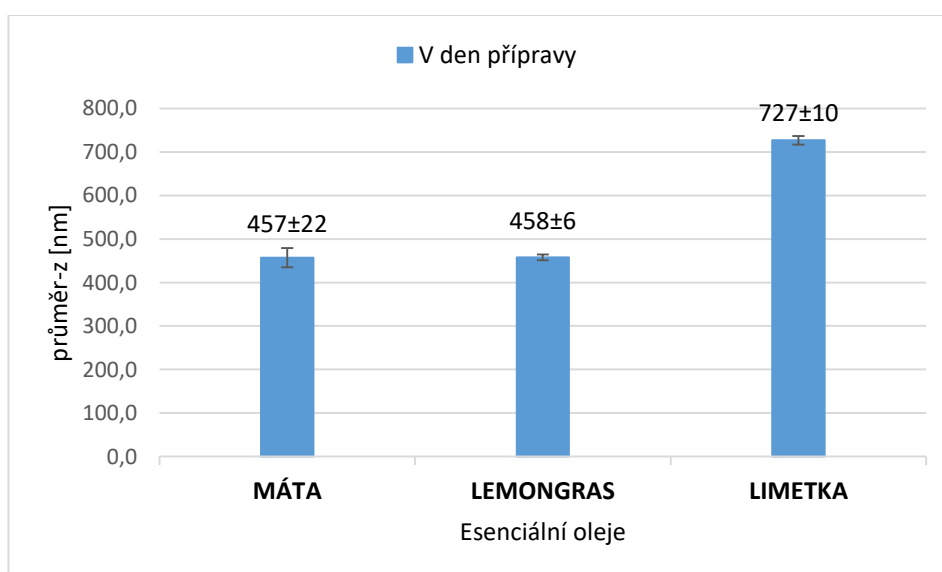
Obrázek 32 Průměrná velikost kapek emulzí s esenciálními oleji stabilizovaných xanthanovou gumou. Srovnání s emulzemi bez XG

U myrhové emulze připravené pouze MM lze sledovat širší monomodální distribuci než u emulze stabilizované MM a XG. U distribuční křivky emulze stabilizované MM a XG je patrné raménko v oblasti velikostí blížících se 10 μm , zřejmě odpovídající polysacharidovým řetězcům XG (Obrázek 33).



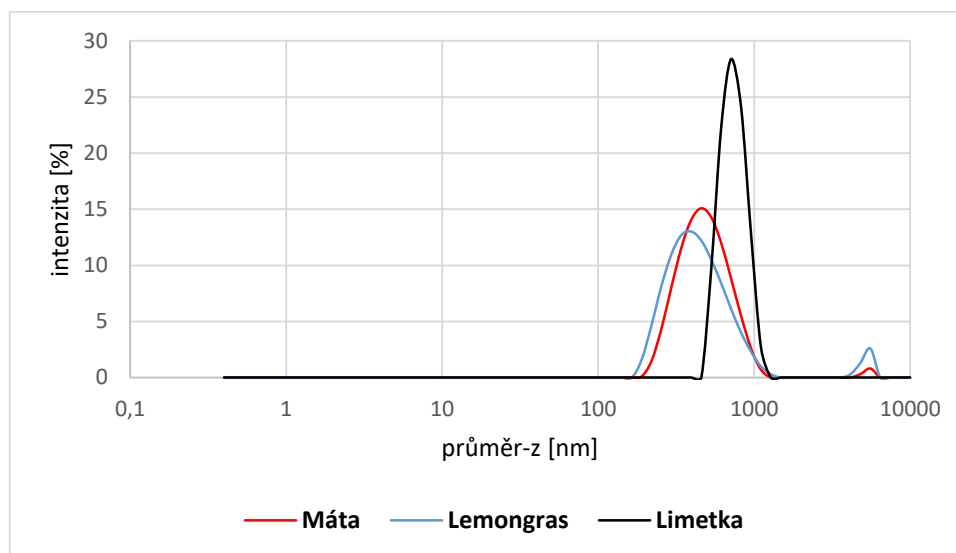
Obrázek 33 Distribuční křivky kapek emulzí pro myrhu a myrhu stabilizovanou XG

Emulze podléhající krémování, obsahovaly jako olejovou fázi esenciální oleje máty peprné, lemongras a limetky. Průměrná velikost emulzních kapek byla měřena pouze v den přípravy, protože po měsíci skladování v chladničce došlo u všech emulzních systémů k rozpadu fází. Průměrné velikosti kapek jsou zobrazeny na Obrázku 34.



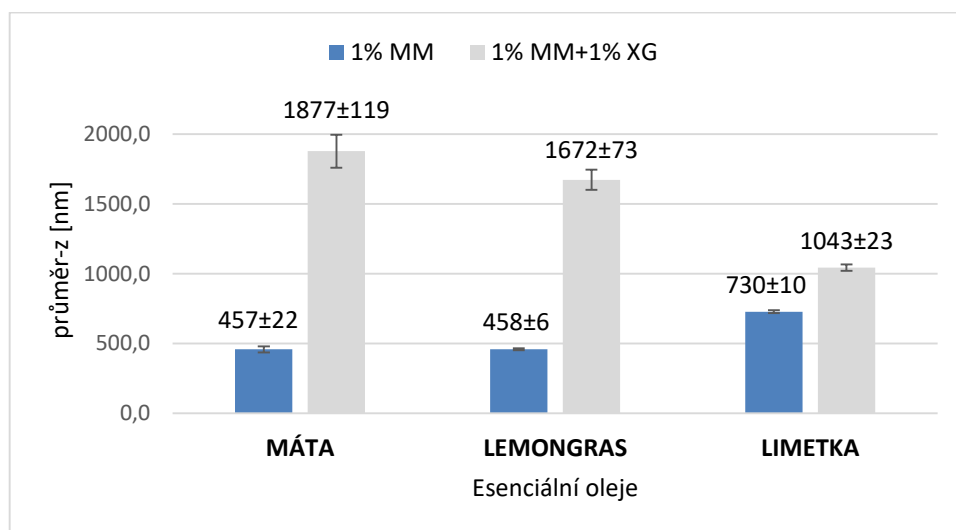
Obrázek 34 Průměrná velikost kapek emulzí s obsahem esenciálních olejů podléhajících krémování

Distribuční křivka emulze s limetkovým olejem je úzká a monomodální, což dokumentuje přítomnost jedné populace emulzních kapek s velmi malými rozdíly ve velikosti. Emulze obsahující esenciální oleje máty a lemongras vykazují širší monomodální distribuční křivky (Obrázek 35).



Obrázek 35 Distribuční křivky kapek emulzí s obsahem esenciálních olejů podléhajících krémování

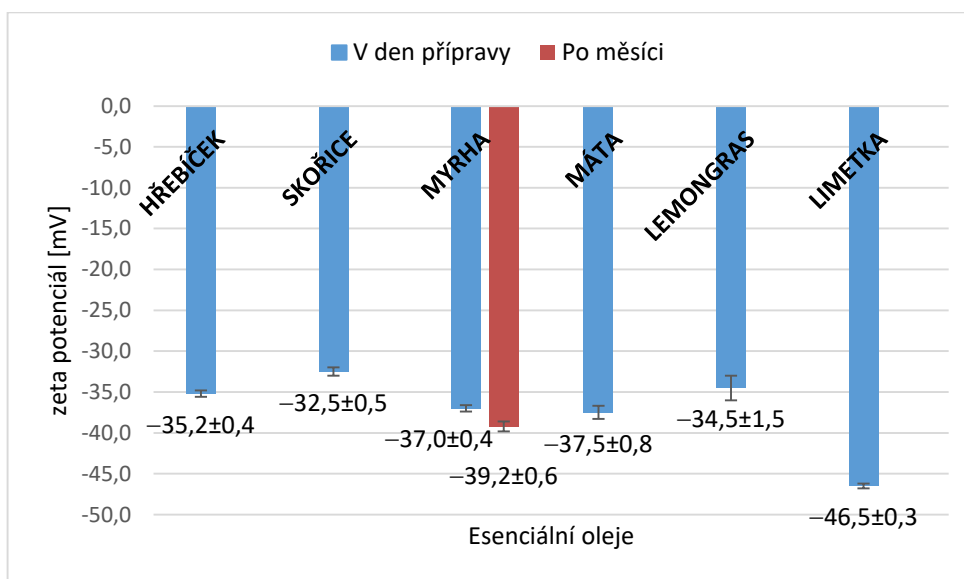
Tyto emulze byly taktéž stabilizovány pomocí 1% roztoku XG, kdy bylo nejmenší zvětšení průměrné velikosti kapek po přidavku XG patrné u emulze s limetkovým olejem. Naopak u emulze s mátou, která má nejmenší velikost kapek bez XG, je nárůst průměrné velikosti kapek po jejím přidavku největší (z 457 ± 22 na 1877 ± 119 nm), viz Obrázek 36.



Obrázek 36 Průměrná velikost kapek emulzí s esenciálními oleji stabilizovaných xanthanovou gumou. Srovnání s emulzemi bez XG

Zeta potenciál

Hodnoty ζ potenciálu všech emulzí s esenciálními oleji, které byly připraveny pouze s MM, jsou uvedeny na *Obrázku 37*. S výjimkou emulze s limetkovým olejem, pro kterou byl stanoven ζ potenciál $-46,5 \pm 0,3$ mV se jeho průměrné hodnoty u ostatních emulzí pohybovaly v rozmezí $-35,0 \pm 5$ mV, což jsou hodnoty blízké hodnotám ζ potenciálu stanoveným pro samotnou disperzi myrhového mýdla.

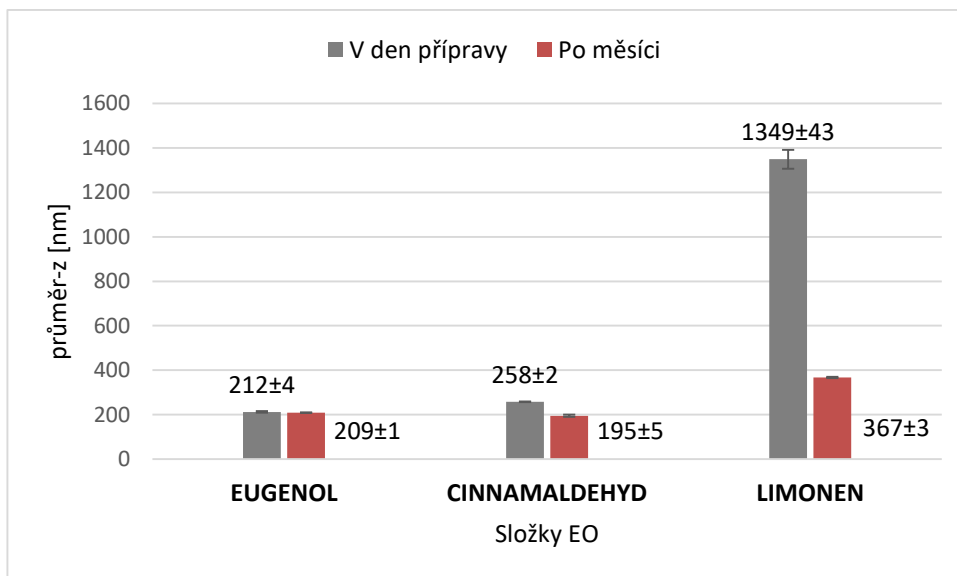


Obrázek 37 Průměrné hodnoty ζ potenciálu pro emulze s esenciálními oleji. Emulze připravené s 1 % MM

6.3.3 Emulze se složkami esenciálních olejů

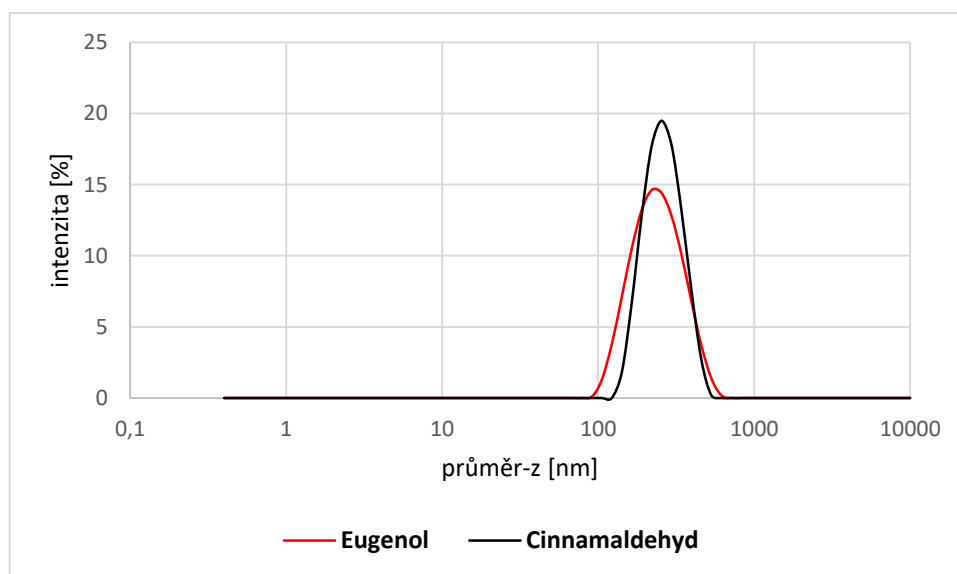
Velikost emulzních kapek

Dalšími látkami, které byly použity jako olejová fáze pro přípravu emulzí, byl eugenol, *trans*-cinnamaldehyd a R-(+)-Limonene. Eugenol je aromatická látka, jež je převážně obsažena v hřebíčkovém éterickém oleji. Cinnamaldehyd je běžnou součástí skořicové silice a limonen lze izolovat z citrusových plodů. Průměrná velikost emulzních kapek v den přípravy byla pro emulze s eugenolem a cinnamaldehydem velmi podobná, a to 212 ± 4 nm a 258 ± 2 nm (*Obrázek 38*). Po měsíci skladování v chladničce u těchto emulzí nedošlo k významné změně velikosti kapek. Emulze s limonenem vykazovaly v den přípravy průměrnou velikost kapek větší než $1 \mu\text{m}$, což je největší průměrná velikost kapek u emulze bez XG. Po měsíci skladování však došlo k výraznému zmenšení průměrné velikosti kapek.



Obrázek 38 Velikost kapek emulzí s obsahem složek esenciálních olejů připravených s 1 % MM

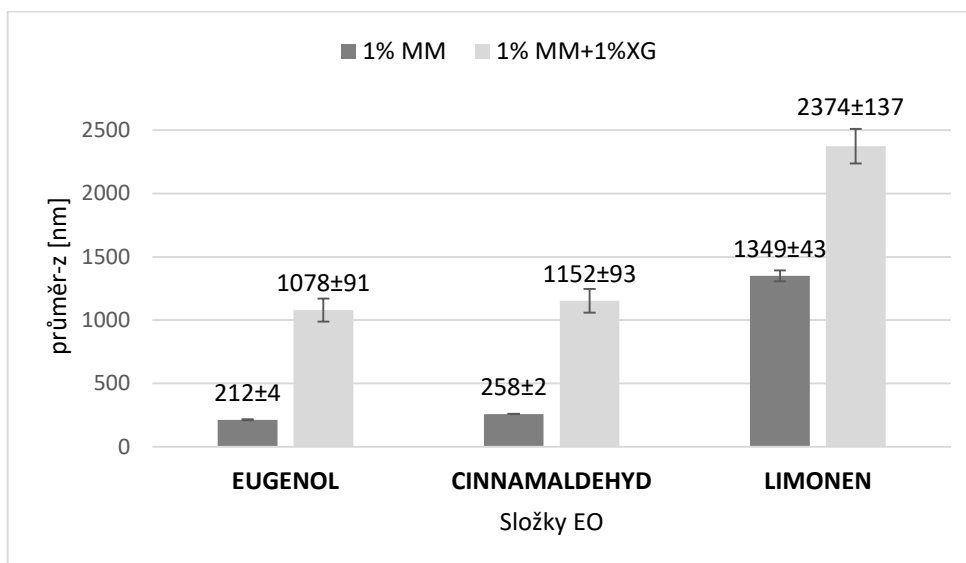
Distribuční křivky emulzí obsahujících studované složky EO jsou monomodální. Užší distribuce je patrná u emulze s cinnamaldehydem, přičemž velikosti emulzních kapek obou emulzí jsou přibližně stejné, viz Obrázek 39.



Obrázek 39 Distribuční křivky kapek emulzí s obsahem složek esenciálních olejů připravené s 1 % MM

Stejně jako u předchozích emulzí byla provedena stabilizace emulzí 1% roztokem XG, viz Obrázek 40. U emulzí eugenolu a cinnamaldehydu je zřejmé velmi podobné zvětšení průměrné velikosti emulzních kapek stabilizovaných XG. Průměrná velikost kapek

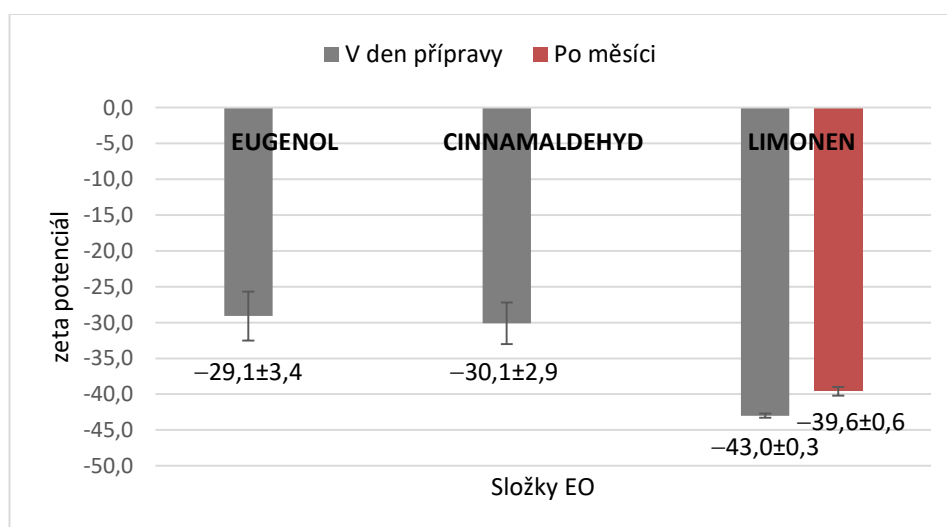
pro emulzi s limonenem se zvětšila o jeden mikron, kdy se jedná o největší průměrnou velikost emulzních kapek stabilizovaných řetězci XG.



Obrázek 40 Průměrná velikost kapek emulzí s obsahem složek esenciálních olejů stabilizovaných XG

Zeta potenciál

Průměrné hodnoty ζ potenciálu emulzí připravených s MM byly nejnižší u emulzí s limonenem (-43 ± 3 mV), kdy po měsíci skladování došlo pouze k jejich mírnému poklesu (Obrázek 41). Obdobně jako v předchozích případech vykazuje eugenol a cinnamaldehyd téměř totožné naměřené hodnoty, které jsou blízké potenciálu disperze MM ($-30,3\pm 0,5$ mV).



Obrázek 41 Průměrné hodnoty ζ potenciálu pro emulze s obsahem složek esenciálních olejů připravených s 1 % MM

Fázové studie emulzí obsahující esenciální oleje a jejich složky

Jak již bylo uvedeno výše, na krémování/sedimentaci má zásadní vliv rozdíl hustot mezi vodnou a olejovou fází. Hustoty a indexy lomu použitých esenciálních olejů byly získány z technických listů firmy Nobilis Tilia. Emulze podléhající sedimentaci obsahovaly jako olejovou fázi hřebíček, skořici a myrhu, EO jejichž hustoty jsou vyšší než je hustota vody, viz *Tabulka 15*. Krémující emulze obsahovaly EO s hustotou nižší než $1,0 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, a to mátu, lemongras a limetku (*Tabulka 15*).

Tabulka 15 Fyzikální vlastnosti EO [48], [49], [50], [51], [52], [53]

Esenciální olej	Hustota [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]	Index lomu
HŘEBÍČEK	1,030 – 1,065	1,528 – 1,538
SKOŘICE	1,000 – 1,050	1,550 – 1,595
MYRHA	0,970 – 1,030	1,510 – 1,530
MÁTA	0,900 – 0,916	1,457 – 0,467
LEMONGRAS	0,880 – 0,920	1,480 – 1,490
LIMETKA	0,850 – 0,880	1,475 – 1,485

Po hodině od přípravy byly u emulzí s EO myrha, hřebíček a skořice sledovány sedimentující kapky volného oleje na dně vialky, viz *Tabulka 16*. Během dalších dnů skladování docházelo k postupnému uvolňování a sedimentaci volného oleje. Po týdnu skladování byla u všech emulzí pozorována vrstva kapek volného oleje zcela pokrývající dno vialky. Mírné rozdíly hustot EO však způsobily, že u emulzí byly sledovány i další jevy. Emulze s obsahem hřebíčkového EO, u něhož je uvedena nejvyšší hodnota hustoty $1,065 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, měla na dně vialky sediment volných kapek oleje spolu s emulzní fází, viz *Obrázek 42*. U emulze obsahující skořicový EO, jehož rozmezí hustot je o něco nižší než u hřebíčkové silice (*Tabulka 15*), byla na dně vialky usazena souvislá vrstva drobných kapek volného oleje. U emulze s myrhovým EO, je uváděná hustota $0,970 - 1,030 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ blízká hustotě vody (*Tabulka 15*), byl pozorován souvislý sediment volných kapek oleje a tenká vrstva volné olejové fáze na hladině emulze (*Obrázek 42*). Po měsíci skladování vykazovala hřebíčková emulze nejpatrnější vrstvu sedimentujících kapek volného oleje spolu s usazenou emulzí, viz *Obrázek 43*. Skořicová emulze vykazovala podobné chování jako hřebíčková, ale s intenzivnějším zákalem emulze v objemu vialky (*Obrázek 43*). Nejmenší rozpad byl zaznamenán u emulze s obsahem myrhové silice, u které byla na dně patrná souvislá vrstva kapek volného oleje a tenká vrstva volné olejové fáze na hladině emulze, viz *Obrázek 43*.

Tabulka 16 Sledování stability sedimentujících emulzí s obsahem esenciálních olejů

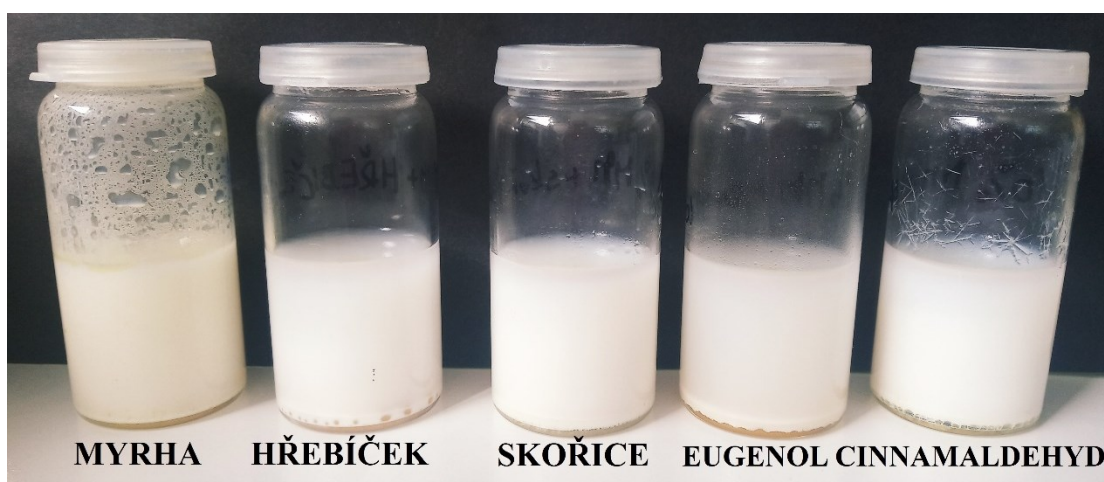
čas	MYRHA	HŘEBÍČEK	SKOŘICE
1 h	sedimentace kapek volného oleje	sedimentace kapek volného oleje	kapky volného oleje na dně vialky i hladině E*)
3 h	sedimentace kapek volného oleje	kapky volného oleje na dně vialky i hladině E	kapky volného oleje na dně vialky i hladině E
1 den	kapky volného oleje zcela pokrývají dno vialky, volný olej na hladině E i stěnách vialky	kapky volného oleje zcela pokrývají dno vialky	kapky volného oleje zcela pokrývají dno vialky
7 dnů	sedimentace kapek volného oleje, tenká vrstva volné olejové fáze na hladině E	kapky volného oleje s E zcela pokrývají dno vialky	kapky volného oleje zcela pokrývají dno vialky
1 měsíc	sedimentace kapek volného oleje, tenká vrstva volné olejové fáze na hladině E	kapky volného oleje s E zcela pokrývají dno vialky	kapky volného oleje s E zcela pokrývají dno vialky

*) E – emulze

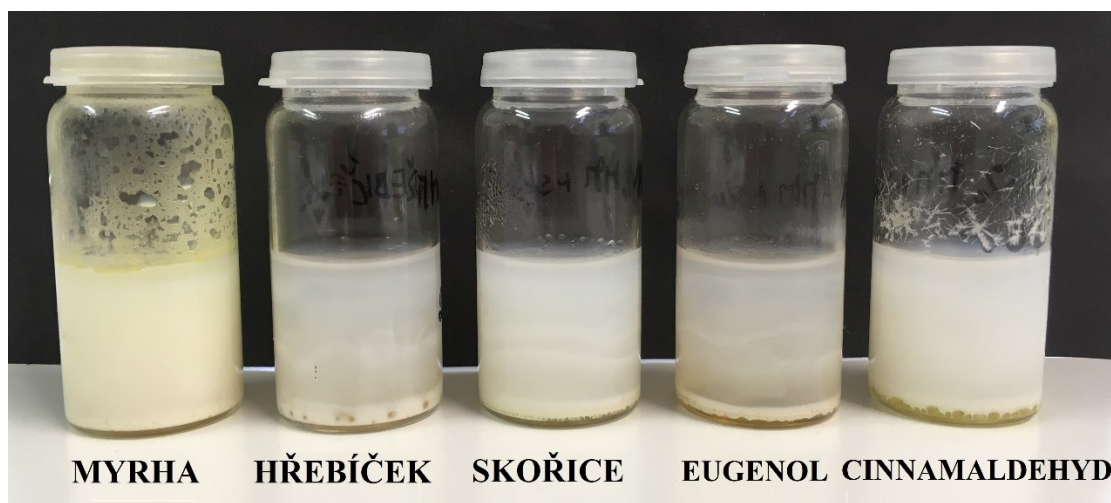
Emulze s eugenolem, který je až z 95 % obsažen v hřebíčkovém EO, vykazovala v průběhu skladování obdobné chování jako hřebíčková emulze (Tabulka 17). Taktéž zde docházelo k postupnému uvolňování kapek olejové fáze, které sedimentovaly spolu s emulzní fází (Obrázek 42). Po měsíci skladování byla u emulze s obsahem eugenolu také pozorována nejpatrnější sedimentace, viz Obrázek 43. U emulze obsahující *trans*-cinnamaldehyd, který je až ze 70 % součástí skořicového EO, podobně jako u emulze s tímto EO docházelo k postupné sedimentaci kapek volné olejové fáze, viz Obrázek 42. Dále byla v průběhu skladování pozorována koalescence, při které dochází ke spojování malých kapek olejové fáze za vzniku kapek větších. Po měsíci od přípravy byla u této emulze na dně vialky patrná souvislá vrstva kapek volné olejové fáze spolu s usazenou emulzí, viz Obrázek 43.

Tabulka 17 Sledování stability sedimentujících emulzí s obsahem složek EO

čas	EUGENOL	CINNAMALDEHYD
1 h	sedimentace malých kapek volné olejové fáze	sedimentace malých kapek volné olejové fáze
3 h	sedimentace malých kapek volné olejové fáze	sedimentace malých kapek volné olejové
1 den	malé kapky volné olejové fáze zcela pokrývají dno vialky	malé kapky volné olejové fáze zcela pokrývají dno vialky
7 dnů	malé kapky volné olejové fáze s emulzí zcela pokrývají dno vialky	větší kapky volné olejové fáze zcela pokrývají dno vialky
1 měsíc	malé kapky volné olejové fáze s emulzí zcela pokrývají dno vialky	zvětšení kapek volné olejové fáze (koalescence), sedimentace E



Obrázek 42 Stabilita sedimentujících emulzí – 7. den od přípravy



Obrázek 43 Stabilita sedimentujících emulzí – po měsíci od přípravy

Fázové chování emulzí s esenciálními oleji dále stabilizovaných 1 % XG je shrnuto v *Tabulce 18*. Po hodině od přípravy nedošlo u těchto emulzí k sedimentaci volného oleje. U stabilizované hřebíčkové emulze byla mírná sedimentace patrná po třech hodinách od přípravy (*Tabulka 18*). Následující den byla sedimentace sledována i u emulzí s myrhovým a skořicovým EO. Po týdnu byla nejstabilnější myrhová emulze s tenkou vrstvou sedimentu a bez volné olejové fáze, která nebyla sledována ani u hřebíčkové a skořicové emulze, které však zcela sedimentovaly, viz *Obrázek 44*.

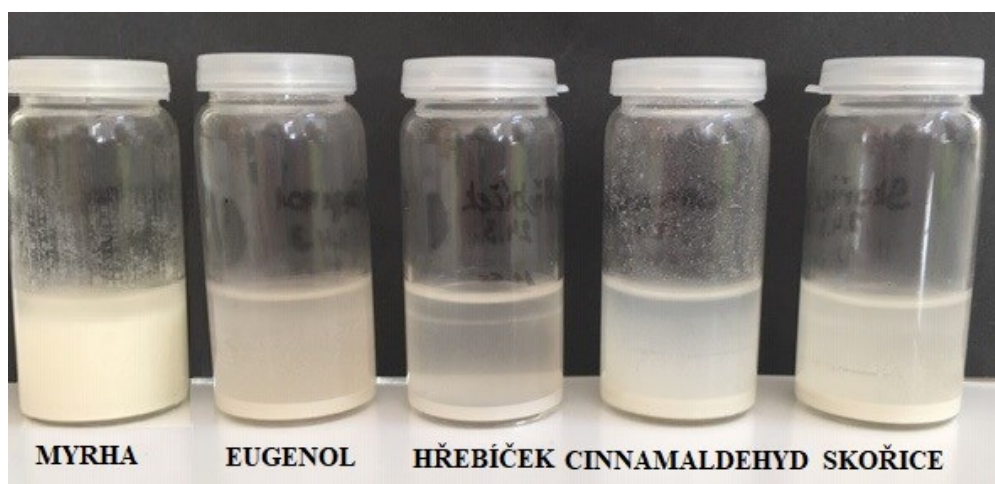
Tabulka 18 Sledování stability sedimentujících emulzí (E) s obsahem EO po – stabilizaci 1% XG

čas	MYRHA	HŘEBÍČEK	SKOŘICE
1 h	stabilní E	stabilní E	stabilní E
3 h	stabilní E	mírná sedimentace E	stabilní E
1 den	tenká vrstva sedimentující E	ca 3 mm sedimentace E	ca 4 mm sedimentace E
7 dnů	stabilní E s tenkou vrstvou sedimentující E	sedimentace E, bez volné olejové fáze	sedimentace E, bez volné olejové fáze

Stabilizované emulze obsahující eugenol a *trans*-cinnamaldehyd vykazovaly totožné chování jako stabilizované emulze s EO, ve kterých jsou tyto složky obsaženy (Tabulka 18 a Tabulka 19). Po týdnu došlo taktéž k úplné sedimentaci emulzí, viz Obrázek 44.

Tabulka 19 Sledování stability sedimentujících emulzí (E) s obsahem složek EO po stabilizaci 1% XG

čas	EUGENOL	CINNAMALDEHYD
1 h	stabilní E	stabilní E
3 h	mírná sedimentace E	stabilní E
1 den	ca 4 mm sedimentace E	ca 5 mm sedimentace E
7 dnů	sedimentace E bez volné olejové fáze	sedimentace E bez volné olejové fáze



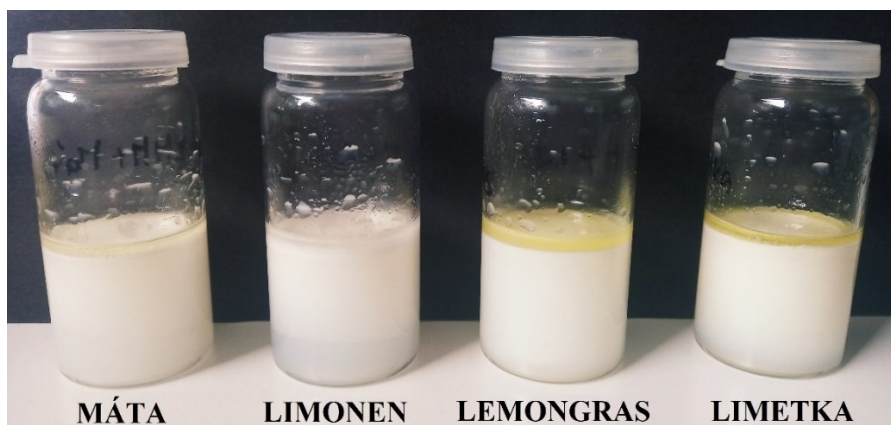
Obrázek 44 Stabilita sedimentujících emulzí stabilizovaných XG – 7. den od přípravy

Hodinu od přípravy došlo u emulzí s EO máta, lemongras a limetka, jejichž emulzní kapky krémovaly, k oddělení volného oleje, který byl patrný na hladině emulzí (Tabulka 20).

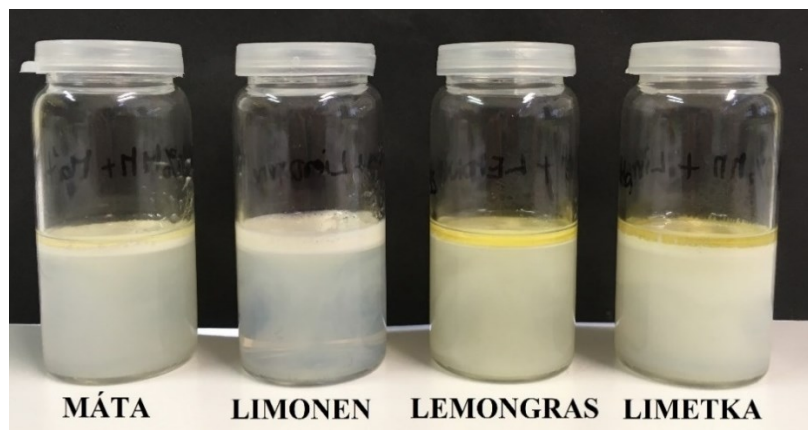
Následující den měly emulze pod volnou olejovou fází také vrstvu krémovou. Po týdnu skladování byla u těchto emulzí sledována ca 2 – 3 mm vrstva volného oleje s ca 1 mm vrstvou krémování, viz *Obrázek 45*. Po měsíci došlo k rozpadu fází s viditelnou vrstvou volného oleje a tenkou krémovou vrstvou, viz *Obrázek 46*. Emulze s limonenem, který je obsažen v limetkovém EO, byla stabilní i po třech hodinách od přípravy. Následující den byla u této emulze sledována tenká krémová vrstva a po týdnu došlo k oddělení volné olejové fáze, pod kterou byla ca 3 mm vrstva krémování (*Obrázek 45*). Po měsíci emulze vykazovala stejné chování, ale měla méně intenzivní zákal, viz *Obrázek 46*.

Tabulka 20 Sledování stability krémujících emulzí (E) s obsahem EO a limonenem

čas	MÁTA	LIMONEN	LEMONGRAS	LIMETKA
1 h	malé kapky volného oleje na hladině E	stabilní E	tenká vrstva volné olejové fáze na hladině E	tenká vrstva volné olejové fáze na hladině E
3 h	malé kapky volného oleje na hladině E	stabilní E	tenká vrstva volné olejové fáze na hladině E	tenká vrstva volné olejové fáze na hladině E
1 den	kapky volného oleje na hladině E, tenká vrstva krémování	tenká vrstva krémování	vrstva volné olejové fáze na hladině E, tenká vrstva krémování	vrstva volné olejové fáze na hladině E, tenká vrstva krémování
7 dnů	ca 2 mm volného oleje, ca 1 mm krémování	tenká vrstva volné olejové fáze, ca 3 mm vrstva krémování	ca 3 mm volného oleje, ca 1 mm krémování	ca 2 mm volného oleje, ca 1 mm krémování
1 měsíc	rozpad fází, vrstva krémování	tenká vrstva volné olejové fáze, krémování	rozpad fází, vrstva krémování	rozpad fází, vrstva krémování



Obrázek 45 Stabilita krémujících emulzí – 7. den od přípravy

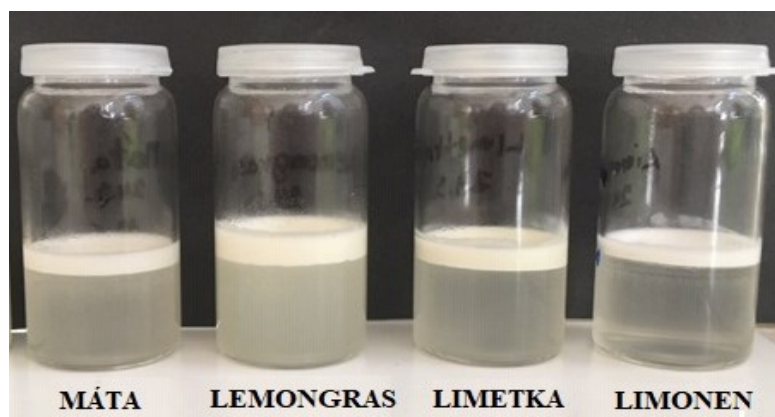


Obrázek 46 Stabilita krémujících emulzí – po měsíci od přípravy

Pokud byly posledně jmenované emulze stabilizovány 1% XG nedocházelo po hodině od přípravy ke krémování. Po třech hodinách bylo mírné krémování sledováno u mátové emulze (Tabulka 21). Následující den byla ca 4 – 6 mm krémová vrstva u všech stabilizovaných emulzí s obsahem EO máta, lemongras a limetka. Krémová vrstva byla patrná i po týdnu skladování, viz Obrázek 47. Stabilizovaná emulze obsahující limonen krémovala již hodinu po přípravě a po týdnu došlo k úplnému oddělení krémové vrstvy a vodné fáze emulze (Obrázek 47).

Tabulka 21 Sledování stability krémujících emulzí (E) s obsahem EO po stabilizaci 1% XG

čas	MÁTA	LEMONGRAS	LIMETKA	LIMONEN
1 h	stabilní E	stabilní E	stabilní E	ca 5 mm krémování E
3 h	mírné krémování E	stabilní E	stabilní E	ca 5 mm krémování E bez volné olejové fáze
1 den	ca 4 mm krémování	ca 6 mm krémování	ca 5 mm krémování	krémování
7 dnů	krémování	krémování	krémování	krémování



Obrázek 47 Stabilita krémujících emulzí se XG – 7. den od přípravy

6.4 Mikrobiologická analýza

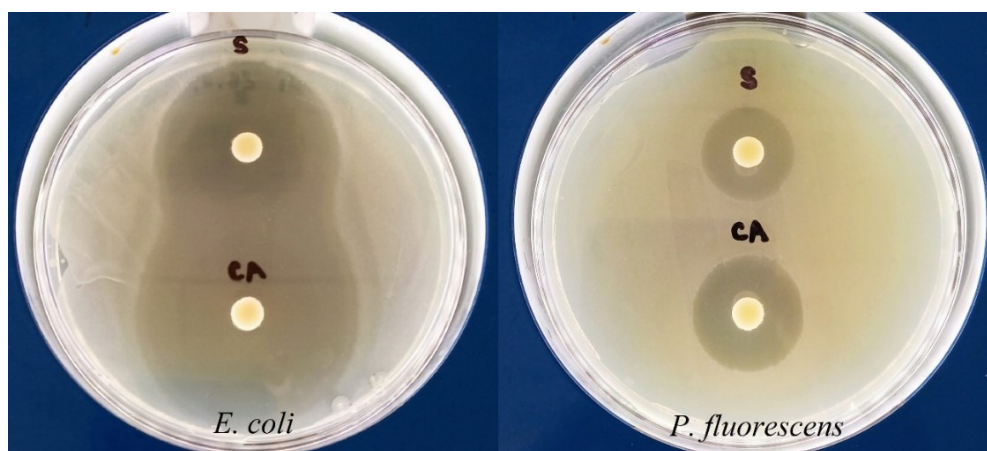
V této kapitole je shrnuto vyhodnocení mikrobiologického difúzního testu emulzí s vybranými esenciálními oleji, myrhovým mýdlem a myrhovým esenciálním olejem. Emulze pro mikrobiologické testování byly připraveny v poměru O/V 10/90. Jelikož nevykazovaly dobrou stabilitu, byly použity k nasycení sterilních disků pro difúzní metodu bezprostředně po přípravě.

K analýze antimikrobiální účinnosti pomocí diskové difúzní metody byly vybrány emulze O/V obsahující esenciální oleje hřebíčku (**H**), skořice (**S**), myrhy a složky esenciálních olejů eugenol (**EU**) a *trans*-cinnamaldehyd (**CA**). Dále bylo použito samotné myrhové mýdlo a myrhový olej. Zkoušenými mikroorganismy byly grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus* a gramnegativní bakterie *Pseudomonas fluorescens* a *Escherichia coli*. Výsledky vzorků emulzí obsahujících jako olejovou fázi hřebíček, skořici a složky EO jsou uvedeny v *Tabulce 22*. Naměřené hodnoty inhibičních zón nezahrnují průměr disku 9 mm.

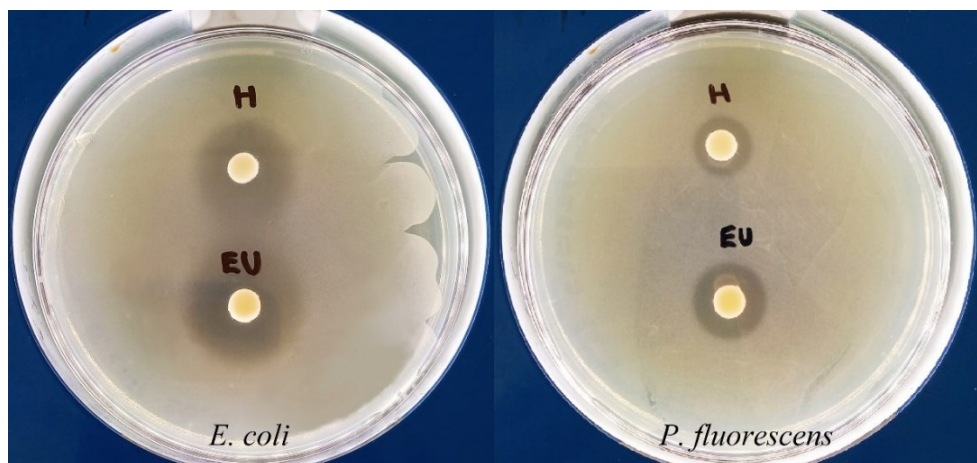
Emulze obsahujících skořici a cinnamaldehyd nejlépe inhibovaly růst *E. coli*, kde jsou patrné největší inhibiční zóny, a to u skořicové emulze 16 mm a emulze s cinnamaldehydem 20 mm (*Obrázek 48*). Rovněž na další gramnegativní bakterii *P. fluorescens* působily tyto emulze antimikrobiálně, ale inhibiční zóny jsou v tomto případě menší (*Obrázek 48*). Grampozitivní bakterie *S. aureus* a *M. luteus* také vykazovaly citlivost na emulze se skořicí a cinnamaldehydem, viz *Tabulka 22*. Emulze s obsahem hřebíčkové silice a eugenolu vykazují antimikrobiální působení u všech zkoušených mikroorganismů. Největší inhibiční zóny jsou opět sledovány u *E. coli* (*Obrázek 49*), dále u *M. luteus* (*Obrázek 50*) a *P. fluorescens* (*Obrázek 49*). Nejmenší antimikrobiální aktivita je patrná u *S. aureus*, viz *Obrázek 50*. Ve studii Zhang [54] bylo zjištěno, že skořicový EO vykazoval účinnou antimikrobiální aktivitu proti patogenním bakteriím *S. aureus* a *E. coli*, pro které byla zjištěna MIC a to 1,0 mg/ml. Další práce [55], [56] potvrzují antimikrobiální aktivitu hřebíčkového EO proti testovaným mikroorganismům *S. aureus* a *E. coli*.

Tabulka 22 Inhibiční zóny vzniklé po působení emulzí se studovanými esenciálními oleji, eugenolem a cinnamaldehydem

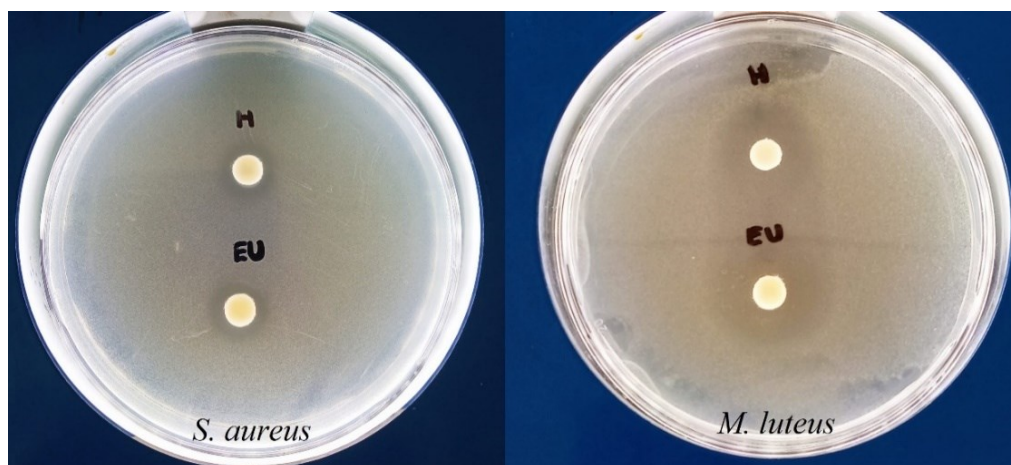
Emulze	Inhibiční zóna [mm]			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Escherichia coli</i>
HŘEBÍČEK	2	5	4	7
EUGENOL	3	7	5	9
SKOŘICE	8	6	6	16
CINNAMALDEHYD	10	8	9	20



Obrázek 48 Inhibiční zóny emulzí s obsahem skořicového EO a cinnamaldehydu pro gramnegativní bakterie



Obrázek 49 Inhibiční zóny emulzí s obsahem hřebíčkového EO a eugenolu pro gramnegativní bakterie

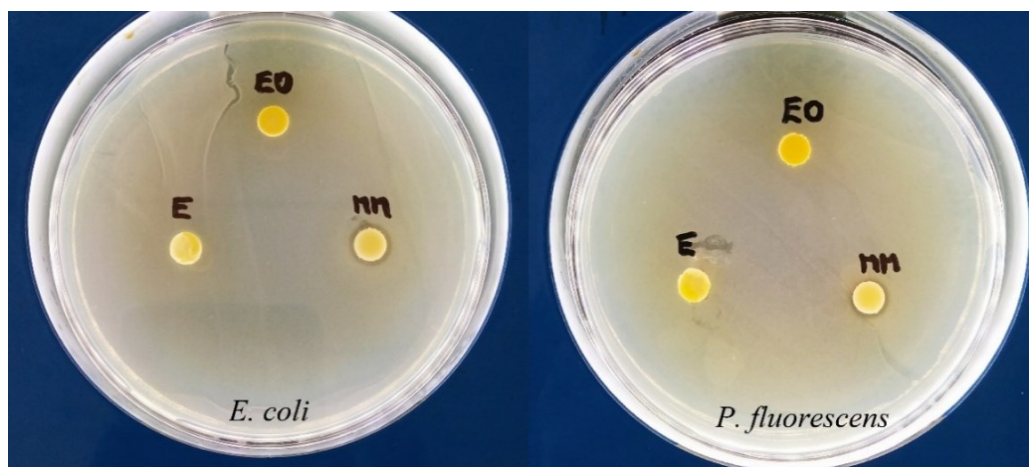


Obrázek 50 Inhibiční zóny emulzí s obsahem hřebíčkového EO a eugenolu pro grampozitivní bakterie

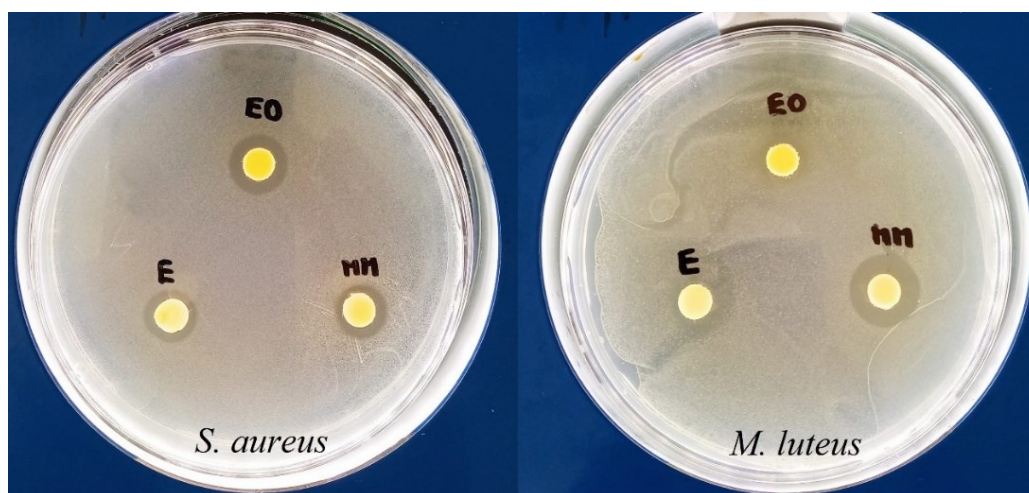
Dále byly analyzovány vzorky s obsahem myrhy, konkrétně myrhové mýdlo (**MM**), esenciální myrhový olej (**EO**) a emulze obsahující jako olejovou fázi myrhový EO (**E**). Inhibiční zóny pro tyto vzorky jsou uvedeny v *Tabulce 23*. Nejmenší antimikrobiální účinnost byla pozorována u gramnegativních bakterií *E. coli* a *P. fluorescens* (Obrázek 51), kde je inhibiční zóna zratelná pouze u myrhového mýdla. Myrhový esenciální olej žádnou antibakteriální aktivitu nevykazoval, což bylo vzhledem k poznatkům z literatury překvapivé. Největší citlivost vůči všem zkoušeným vzorkům s obsahem myrhy vykazoval *S. aureus* (Obrázek 52). U bakterie *M. luteus* byly sledovány malé inhibiční zóny pro myrhový EO a emulzi s tímto EO, u myrhového mýdla je patrná větší zóna (Obrázek 52).

Tabulka 23 Inhibiční zóny vzniklé po působení vzorků obsahujících myrhu

Myrha	Inhibiční zóna [mm]			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Escherichia coli</i>
MÝDLO	3	4	1	1
ESENCIÁLNÍ OLEJ	4	2	n	n
EMULZE	2	1	n	n



Obrázek 51 Inhibiční zóny vzorků s obsahem myrhy pro gramnegativní bakterie: MM myrhové mýdlo, EO esenciální myrhový olej, E emulze s myrhovým olejem



Obrázek 52 Inhibiční zóny vzorků s obsahem myrhy pro grampozitivní bakterie: MM myrhové mýdlo, EO esenciální myrhový olej, E emulze s myrhovým olejem

6.5 Plynová chromatografie myrhového esenciálního oleje

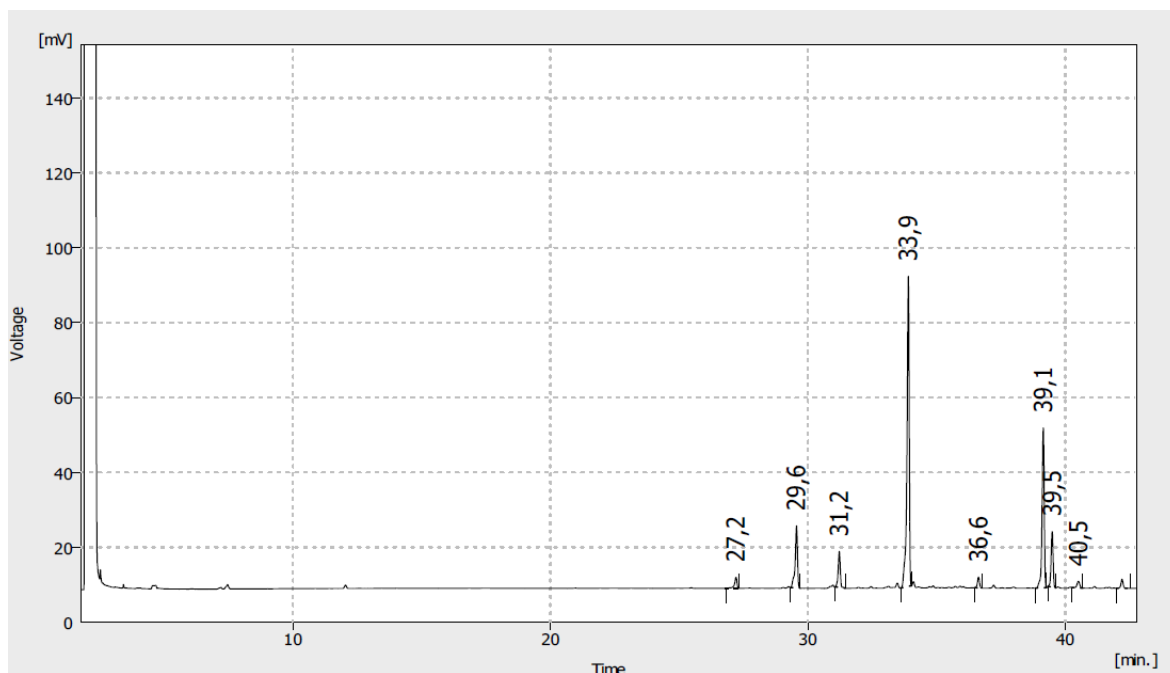
Jak již bylo uvedeno v první kapitole této práce, složení myrhového EO se může výrazně lišit v závislosti na lokalitě pěstování myrhovníku, zdroji pryskyřice a způsobu extrakce EO. Esenciální olej myrha značky Nobilis Tilia byl extrahován parní destilací z pryskyřice myrhovníku druhu *C. abyssinica* rostoucího v oblasti Maroka a Etiopie. Složení tohoto oleje uvedené v analytickém certifikátu [50] je shrnuto v *Tabulce 24*. Chromatogram GC analýzy je zobrazen na *Obrázku 53*. Z naměřených dat (*Tabulka 24*) je patrné, že procentuální obsah sloučenin, který je daný plochou příslušného píku vzhledem k celkové ploše všech píků v chromatogramu, pouze s malými odchylkami odpovídá obsahu složek, jež deklaruje certifikát analýzy firmy Nobilis Tilia. GC analýza

potvrdila nejvyšší množství furanoedesma-1,3-dienu a přítomnost lindestrenu, dvou základních složek zodpovídajících za typické myrhové aroma. V souvislosti s touto analýzou je třeba konstatovat, že se jednalo pouze o ověření složení oleje a doplnění informace pro diplomovou práci.

Tabulka 24 Složení éterického oleje myrha (*Nobilis Tilia*) uvedené v analytickém certifikátu a zjištěné chromatografickou analýzou

Složka	Deklarovaný obsah [%]	Zjištěný obsah [%]	Rt [min]
Furanoedesma-1,3-diene	32,0 – 40,0	43	33,9
Furanodiene	16,0 – 20,0	22	39,1
Lindestrene	10,0 – 13,0	9	29,6
β -Elemene	5,0 – 10,0	8	39,5
Germacrene B	3,0 – 5,0	5*)	31,2
Germacrene D	3,0 – 5,0		

*) nerozlišený izomer



Obrázek 53 Chromatografická analýza myrhového esenciálního oleje *Nobilis Tilia*

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá studiem vlastností a základní charakterizací myrhového mýdla vyrobeného procesem zmýdelnění myrhové pryskyřice. Záměrem vývojového oddělení firmy Nobilis Tilia bylo připravit látku vykazující kombinaci emulgačních a antimikrobiálních vlastností. Cílem práce bylo zjistit, zda tyto vlastnosti myrhové mýdlo splňuje a zda je vhodné pro přípravu emulzí s obsahem olejů a esenciálních olejů používaných v kosmetice.

Prvním krokem bylo stanovení kritické micelární koncentrace tohoto anionického tenzidu. Orientační hodnota CMC pro MM byla určena spektrofotometrickým měřením absorbance, kdy tvorba micel byla detekována vznikem zákalu. Toto stanovení však bylo pouze orientační. Z tohoto důvodu bylo provedeno stanovení CMC tenziometricky, měřením povrchového napětí (γ), kdy s rostoucí koncentrací MM docházelo ke snižování povrchového napětí až do koncentrace 0,18 % MM (180 μ l MM ve 100 ml vody), která byla určena jako hodnota CMC MM. S dalším zvyšováním koncentrace MM již k výraznému snižování povrchové napětí nedocházelo.

Následovalo měření mezifázového napětí (γ) na rozhraní olej/voda metodou přisedlé kapky pomocí optického tenziometru. K tomuto stanovení byly použity vodné disperze MM s rostoucí koncentrací (0,1; 0,3, 0,5 a 1%), rostlinné oleje na bázi TAG (olivový, slunečnicový, konopný), jojobový vosk a esenciální oleje (lemongras, limetka, hřebíček plody, skořice kůra, myrha a máta peprná). Pro olivový a slunečnicový olej byly hodnoty mezifázového napětí stanoveny u všech koncentrací MM, kdy se zvyšující se koncentrací docházelo k jeho snižování. U konopného oleje byla stanovena hodnota γ pouze pro nejnižší koncentraci MM a pro jojobový vosk bylo možné γ měřit pouze u nejvyšší koncentrace MM. U dalších koncentrací MM se nevytvořila stabilní kapka olejové fáze na jehle, protože docházelo k jejímu rozplývání. Tento jev byl pozorován i u EO, pro které nebylo možné stanovit γ ani u jednoho ze zkoumaných vzorků. Důvodem může být přítomnost ethanolu v samotném MM, který je pro esenciální oleje rozpouštědlem. U konopného oleje a jojobového vosku může být důvodem výrazně odlišné chemické složení oproti olivovému a slunečnicovému oleji.

Průměrná velikost disperzních částic (micel) MM a ζ potenciálu byla stanovena v demineralizované vodě a následně v závislosti na změnách pH a koncentrace elektrolytu v disperzním mediu použitým pro měření. Průměrná velikost disperzních částic ve vodné

disperzi MM byla $399,8 \pm 5,6$ nm a průměrná hodnota ζ potenciálu $-30,3 \pm 0,5$ mV. Distribuční křivka byla monomodální s hodnotou indexu polydisperzity $PDI = 0,28 \pm 0,01$, což potvrzuje relativně úzkou distribuci s malými rozdíly ve velikosti částic. V závislosti na pH byla největší průměrná velikost částic MM a to $582,7 \pm 5,0$ nm naměřena při pH 2, které je blízké izoelektrickému bodu, čemuž odpovídá i nízká hodnota ζ potenciálu $-5,2 \pm 0,1$ mV. Z dalších naměřených dat lze konstatovat, že myrhové mýdlo je odolné vůči změnám v širokém rozmezí hodnot pH. Bylo rovněž zjištěno, že nízké koncentrace elektrolytu (NaCl) neměly zásadní vliv na agregaci částic MM. Aglomerace částic byla pozorována až při vyšších koncentracích NaCl, a to 50; 75 a 100 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, kdy vznik aglomerátů odpovídal poklesu průměrných hodnot ζ potenciálu.

Pomocí myrhového mýdla byly připraveny emulze typu olej ve vodě, kdy nejvhodnější byla koncentrace 1% MM, která byla míchána s olejovou fází v poměru O/V 5/95. Mýdlo v tomto případě sloužilo jako emulgátor, kdy za emulgační účinnost jsou s největší pravděpodobností zodpovědné zmýdelněné pryskyřičné kyseliny spolu s polysacharidovými sloučeninami, které se mohly do horní vrstvy MM uvolnit během louhování ve vodno-ethanolickém roztoku s NaOH. Navíc MM obsahuje 38 % ethanolu, který se podílí na snižování γ , čímž zvyšuje stabilitu systému a tím plní funkci koemulgátoru. Pro přípravu emulzí bylo testováno široké spektrum běžných olejů, esenciálních olejů i složek EO, konkrétně eugenol, *trans*-cinnamaldehyd a limonen. Pro všechny vzorky emulzí byla měřena průměrná velikost emulzních kapek a průměrná hodnota ζ potenciálu v den přípravy. U olejů na bázi TAG vykazovala nejlepší stabilitu emulze s obsahem trikaprin/trikaprylinu, triesteru glycerolu s navázanými alifatickými mastnými kyselinami s délkou uhlíkatého řetězce C8 a C10, který se běžně používá v kosmetickém i farmaceutickém průmyslu jako emolient a nosič léčiv. Po měsíci skladování v chladničce došlo u této emulze pouze k oddělení tenké vrstvy volného oleje a mírnému krémování. Z emulzí s obsahem esenciálních olejů byla nejstabilnější emulze s myrhovým EO, která po měsíci skladování vykazovala nejmenší známky rozpadu. Aby se rozpad emulzí potlačil, byl pro jejich dodatečnou stabilizaci použit 1% roztok xantanové gumy v kombinaci s 1% roztokem MM. S výjimkou emulzí s myrhovým olejem, byla po týdnu od přípravy u všech emulzí sledována úplná sedimentace anebo krémování emulzní fáze, v závislosti na hustotě použité olejové fáze.

Antimikrobiální aktivita byla stanovena diskovou difúzní metodou, kdy byly použity emulze obsahující EO skořice a *trans*-cinnamaldehyd a emulze obsahující EO hřebíček

a eugenol, což jsou látky, u kterých byla již v dřívějších studiích prokázána antimikrobiální aktivita. V tomto případě byly použity emulze O/V 10/90, čímž bylo zvýšeno množství aktivních antimikrobních látek. Testovanými mikroorganismy byly *E. coli*, *P. fluorescens*, *S. aureus* a *M. lutes*. Největší inhibiční zóny, tedy nejlepší antibakteriální aktivita, byly patrné u gramnegativní bakterie *E. coli*, a to v přítomnosti všech testovaných emulzí (skořice, cinnamaldehyd, hřebíček a eugenol), viz *Obrázek 48* a *49*. Dále byly testovány vzorky s obsahem myrhy, a to samotné MM, myrhový EO a emulze s obsahem myrhového EO. Největší inhibiční zóny těchto vzorků byly patrné u grampozitivní bakterie *S. aureus* (*Obrázek 52*). I když se antimikrobiální aktivita myrhových sloučenin potvrdila, nebyla rozhodně tak velká, jak by se mohlo očekávat na základě informací z literatury shrnutých v teoretické části této práce.

Z naměřených dat a získaných výsledků lze konstatovat, že myrhové mýdlo je zajímavou povrchově aktivní látkou, kterou lze již při nízkých koncentracích (1%) použít pro emulgaci vodné a olejové fáze, za vzniku relativně stabilních emulzí. Další výhodou je odolnost MM vůči širokému rozmezí hodnot pH a jeho odolnost vůči agregaci částic vlivem působení elektrolytu, kdy ke vzniku aglomerátů dochází až při vyšších koncentracích NaCl. Nelze rovněž opomenout ani jeho antimikrobiální aktivitu, která byla potvrzena především u grampozitivních bakterií.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HANUŠ, L. O., ŘEZANKA T., et al. *Myrrh - Commiphora chemistry*. Biomedical Papers [online]. 2005, **149**(1), 3-28 [cit. 2021-01-15]. ISSN 12138118. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2005.001
- [2] *Commiphora myrrha images*. [online]. [cit. 2020-01-15]. Dostupné z: <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Commiphora+myrrha>
- [3] *Commiphora myrrha*. [online]. [cit. 2020-01-15]. Dostupné z: http://apps.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Commiphora_myrrha.PDF
- [4] EDWARDS, H. G. M., FALK M. J. *Fourier-transform Raman spectroscopic study of frankincense and myrrh*. Spectrochimica Acta Part A. Elsevier, 1997, s. 2393-2401. ISBN 1386-1425.
- [5] CAO B., WEI, X., XU, X., et al. *Seeing the Unseen of the Combination of Two Natural Resins, Frankincense and Myrrh: Changes in Chemical Constituents and Pharmacological Activities*. Molecules [online]. 2019, **24**(17) [cit. 2021-01-15]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24173076
- [6] *Assessment report on Commiphora molmol Engler, gummi-resina*. European Medicines Agency. 2010. [online]. [cit. 2021-01-15]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-commiphora-molmol-engler-gummi-resina_en.pdf
- [7] BIGGS, I., SIRDAARTA, J., WHITE A., EDWIN COCK, I. *GC-MS Analysis of Commiphora molmol Oleo-Resin Extracts which Inhibit the growth of Bacterial Triggers of Selected Autoimmune Diseases*. Pharmacognosy Journal [online]. 2016, **8**(3), 191-202 [cit. 2021-1-15]. ISSN 09753575. Dostupné z: doi:10.5530/pj.2016.3.4
- [8] SHEN, T., LOU, H. *Bioactive Constituents of Myrrh and Frankincense, Two Simultaneously Prescribed Gum Resins in Chinese Traditional Medicine*. Chemistry & Biodiversity [online]. 2008, **5**(4), 540-553 [cit. 2021-01-15]. ISSN 16121872. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.200890051
- [9] SHEN, T., LI, G., WANG, X., LOU, H. *The genus Commiphora: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology*. Journal of Ethnopharmacology [online]. 2012, **142**(2), 319-330 [cit. 2021-01-15]. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2012.05.025

- [10] MARONGIU, B., PIRAS A., et al. *Chemical Composition of the Essential Oil and Supercritical CO₂ Extract of Commiphora myrrha (Nees) Engl. and of Acorus calamus L.* Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2005, **53**(20), 7939-7943 [cit. 2021-01-15]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf051100x
- [11] HANUŠ, L. O., ROSENTHAL, D., ŘEZANKA, T., DEMBITSKY, V. M., MOUSSAIEF, A. *Fast and easy GC/MS identification of myrrh resins.* Pharmaceutical Chemistry Journal [online]. 2008, **42**(12), 719-720 [cit. 2021-1-15]. ISSN 0091-150X. Dostupné z: doi:10.1007/s11094-009-0209-z
- [12] SULLIVAN, A. *Myrrh Essential Oil: Benefits, Properties, Applications, Studies & Recipes.* CreateSpace Independent Publishing Platform, 2017. ISBN 9781545427477.
- [13] *Oficiální webová stránka Nobilis Tilia.* [online]. [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: https://www.ceska-biokosmetika.cz/nobilis-tilia/?gclid=CjwKCAjw-e2EBhAhEiwAJI5jg896ULWyF5VQShKnrPc_juyTYRoOh6lybh58NAYjx2NxMcmFXYvfBoCCJYQAvD_BwE
- [14] TADROS, THARWAT F., et al. *Emulsion Science and Technology.* 2009. Weinheim: WILEY-VCH GmbH & Co., 2009. ISBN 978-3-527-32525-2.
- [15] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav.* Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 807080579-x.
- [16] GRUMEZESCU, A. M. *Emulsions: Nanotechnology in the Agri-Food Industry.* Volume 3. USA: Elsevier, 2016, 786 s. ISBN 9780128043066.
- [17] SCHRAMM, L. L. *Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and applications.* Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 3-527-30743-5.
- [18] GUPTA, A., ERAL H. B., HATTON T. A., DOYLE P. S. *Nanoemulsions: formation, properties and applications.* Soft Matter [online]. 2016, **12**(11), s. 2826-2841 [cit. 2020-01-15]. ISSN 1744-683x. Dostupné z: 10.1039/b000000x
- [19] BUTT, H., GRAF, K., KAPPL M. *Physics and Chemistry of Interfaces.* Weinheim: WILEY-VCH GmbH & Co., 2006. ISBN 978-3-527-60640-5.
- [20] SOLANS, C., GARCÍA-CELMA M. J. *Microemulsions and Nano-emulsions for Cosmetic Applications.* Cosmetic Science and Technology [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 507-518 [cit. 2021-01-15]. ISBN 9780128020050. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802005-0.00029-X

- [21] LEAL-CALDERON, F., SCHMITT, V., BIBETTE, J. *Emulsion science: Basic principles*. 2nd ed. New York: Springer, 2007. ISBN 9780387396835.
- [22] SURABHI, K., OP, K., ATUL, N., ARUN, G. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences: microemulsions: Developmental aspect* [online]. 2010. [cit. 2020-01-15]. ISBN 0975-8585.
- [23] JAISWAL, P. L., DAREKAR, A. B., SAUDAGAR, R. B. *A Recent Review on Nasal Microemulsion For Treatment of CNS Disorder*. International Journal of Current Pharmaceutical Research [online]. 2017, **9**(4), 5-13 [cit. 2021-01-15]. ISSN 0975-7066. Dostupné z: doi:10.22159/ijcpr.2017v9i4.20963
- [24] *Emulze: Příprava a stabilizace*. [online]. [cit. 2020-01-15]. Dostupné z: <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/cwUA.pdf?redirected>
- [25] TADROS, T. F. *Applied Surfactants: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2005, 634 s. ISBN: 9783527306299
- [26] MYERS, D. *Surfactant science and technology*. 3. vyd., Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006. ISBN: 978-0-471-68024-6
- [27] SARKER, D. K. (Ed). *Pharmaceutical Emulsions: A Drug Developer's Toolbag*. Wiley-Blackwell, 2013, ISBN: 978-0-470-97683-8
- [28] FENG, N. *Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil*. International Journal of Nanomedicine [online]. [cit. 2021-5-13]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S30085
- [29] ETMAN, M., AMIN, M., et al. *Emulsions and rectal formulations containing myrrh essential oil for better patient compliance*. Drug Discoveries & Therapeutics [online]. 2011, **5**(3), 150-156 [cit. 2021-5-13]. ISSN 1881-7831. Dostupné z: doi:10.5582/ddt.2011.v5.3.150
- [30] MESTRY, M., RANE M., BAJAJ, A.. *Commiphora mukul and Quercetin Loaded Liposphere Gel: Potential Treatment for Psoriasis*. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research [online]. 2020, **54**(3), 654-667 [cit. 2021-5-13]. ISSN 00195464. Dostupné z: doi:10.5530/ijper.54.3.115
- [31] EID, R. A. A. *Efficacy of Commiphora myrrh mouthwash on early wound healing after tooth extraction: A randomized controlled trial*. The Saudi Dental Journal [online]. 2021, **33**(1), 44-54 [cit. 2021-5-13]. ISSN 10139052. Dostupné z: doi:10.1016/j.sdentj.2019.11.011

- [32] CHAKRAVARTY, N., KELLOGG, C., et al. *UV Protection by Natural Products: C. myrrha Oil Versus Sunscreen*. J Drugs Dermatol. 2018, **17**(8), 905-907. PMID: 30124732
- [33] HU, Y., et. al. *Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems*. Journal of Food and Drug Analysis [online]. 2017, **25**(1), 16-26 [cit. 2021-5-13]. ISSN 10219498. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfda.2016.10.021
- [34] Uživatelská příručka: *Technical note, Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*. (Malvern Instruments Ltd, Enigma Business Park, Grovewood Road, Malvern, Worcestersire, UK, WR14 1XZ.
- [35] Uživatelská příručka: *Technical note, Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes*. (Malvern Instruments Ltd, Enigma Business Park, Grovewood Road, Malvern, Worcestersire, UK, WR14 1XZ.
- [36] ROLAND, I. *Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design*. International Journal of Pharmaceutics [online]. 2003, **263**(1-2), 85-94 [cit. 2021-5-13]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(03)00364-8
- [37] SOURY, E., BEHRAVESH, A. H., RIZVI, G. M. et. al. *Rheological Investigation of Wood-Polypropylene Composites in Rotational Plate Rheometer*. J Polym Environ. [online]. 2012, **20**, 998–1006 [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0502-x>
- [38] MIKULA, R. J. *Emulsion Characterization*. SCHRAMM, Laurier L., ed. *Emulsions* [online]. Washington, DC: American Chemical Society, 1992, 1992-05-05, s. 79-129 [cit. 2021-5-13]. Advances in Chemistry. ISBN 9780841220065. Dostupné z: doi:10.1021/ba-1992-0231.ch003
- [39] NWANESHIUDU, A., KUSCHAL, CH. et. al. *Introduction to Confocal Microscopy*. Journal of Investigative Dermatology [online]. 2012, **132**(12), 1-5 [cit. 2021-5-13]. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2012.429
- [40] DI GIANFRANCESCO, A. *Technologies for chemical analyses, microstructural and inspection investigations*. Materials for Ultra-Supercritical and Advanced Ultra-Supercritical Power Plants [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 197-245 [cit. 2021-5-13]. ISBN 9780081005521. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100552-1.00008-7

- [41] ZHONG, Q., CHEN, H., ZHANG, Y., PAN, K., WANG, W. *Delivery systems for food applications*. SABLIOV, Cristina M., Hongda CHEN a Rickey Y. YADA, ed. Nanotechnology and Functional Foods [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2015, 2015-04-24, s. 91-111 [cit. 2021-5-13]. ISBN 9781118462157. Dostupné z: doi:10.1002/9781118462157.ch6
- [42] MIKULCOVÁ, V., BORDES, R., KAŠPÁRKOVÁ, V. *On the preparation and antibacterial activity of emulsions stabilized with nanocellulose particles*. Food Hydrocolloids [online]. 2016, **61**, 780-792 [cit. 2021-5-13]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2016.06.031
- [43] KEOWMANEECHAI, E., MCCLEMENTS, D. J. *Influence of EDTA and Citrate on Physicochemical Properties of Whey Protein-Stabilized Oil-in-Water Emulsions Containing CaCl₂*. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2002, **50**(24), 7145-7153 [cit. 2021-5-13]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf020489a
- [44] CHANTRAPORNCHAI, W., CLYDESDALE, F. M., MCCLEMENTS, D. J. *Influence of Flocculation on Optical Properties of Emulsions*. Journal of Food Science [online]. 2001, **66**(3), 464-469 [cit. 2021-5-13]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb16130.x
- [45] MARTÍN-RAMOS, P., et al. *Potential of ATR-FTIR Spectroscopy for the Classification of Natural Resins*. Biology, Engineering, Medicine and Science Reports [online]. 2018, **4**(1), 03-06 [cit. 2021-5-13]. ISSN 24546895. Dostupné z: doi:10.5530/bems.4.1.2
- [46] HORST, D. J., et al. *Bioactive Potential of 3D-Printed Oleo-Gum-Resin Disks: B. papyrifera, C. myrrha, and S. benzoin Loading Nanooxides—TiO₂, P₂₅, Cu₂O, and MoO₃*. Bioinorganic Chemistry and Applications [online]. 2017, **2017**, 1-16 [cit. 2021-5-13]. ISSN 1565-3633. Dostupné z: doi:10.1155/2017/6398167
- [47] ROEGES, N. P. G. *A Guide to the Complete Interpretation of Infrared Spectra of Organic Structures*. Chichester: Wiley, Chichester, 1993. ISBN 978-0-471-93998-6.
- [48] *Technický list – éterický olej Hřebíček, plody* [online]. [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: https://cdn.nobilis.cz/image/original/content/Hrebicek_plod_E0144.pdf?

v=5w5rRT&_gl=1*2upzmf*_ga*NTk4NDE0NDYzLjE2MjAzNDU1MDk.*_ga_Z21ZXNSVCB*MTYyMDkzNDI0OC41LjEuMTYyMDkzNDQ1MS41OQ.

- [49] *Technický list – éterický olej Skořice, kůra* [online]. [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: https://cdn.nobilis.cz/image/original/content/Skorice_E0074.pdf?v=5w5rRT&_gl=1*1etyjxh*_ga*NTk4NDE0NDYzLjE2MjAzNDU1MDk.*_ga_Z21ZXNSVCB*MTYyMDkzNDI0OC41LjEuMTYyMDkzNDYzMi41OQ.
- [50] *Technický list – éterický olej Myrha* [online]. [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: https://cdn.nobilis.cz/image/original/content/Myrha_E0041.pdf?v=5w5rRT&_gl=1*mmrp3f*_ga*NTk4NDE0NDYzLjE2MjAzNDU1MDk.*_ga_Z21ZXNSVCB*MTYyMDkzNDI0OC41LjEuMTYyMDkzNDI0OS41OQ.
- [51] *Technický list – éterický olej Máta peprná* [online]. [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: https://cdn.nobilis.cz/image/original/content/Mata_peprna_E0009.pdf?v=5w5rRT&_gl=1*t4npej*_ga*NTk4NDE0NDYzLjE2MjAzNDU1MDk.*_ga_Z21ZXNSVCB*MTYyMDkzNDI0OC41LjEuMTYyMDkzNDc4OS41NA.
- [52] *Technický list – éterický olej Lemongras* [online]. [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: https://cdn.nobilis.cz/image/original/content/Lemongras_E0036.pdf?v=5w5rRT&_gl=1*8pais6*_ga*NTk4NDE0NDYzLjE2MjAzNDU1MDk.*_ga_Z21ZXNSVCB*MTYyMDkzNDI0OC41LjEuMTYyMDkzNDk5My41OQ.
- [53] *Technický list – éterický olej Limetka* [online]. [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: https://cdn.nobilis.cz/image/original/content/Limetka_E1055.pdf?v=5w5rRT&_gl=1*1pzp4lk*_ga*NTk4NDE0NDYzLjE2MjAzNDU1MDk.*_ga_Z21ZXNSVCB*MTYyMDkzNDI0OC41LjEuMTYyMDkzNTA4NS41OQ.
- [54] ZHANG, Y., LIU, X.. *Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Food Control [online]. 2016, **59**, 282-289 [cit. 2021-5-13]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2015.05.032
- [55] KAMMON, A., ALMAEYOUFI A., ASHEG, A. A. *In Vitro Antimicrobial Activity of Clove Oil against Gram Negative Bacteria Isolated from Chickens*. Medicinal Plants. 2020. Dostupné z: doi:10.31031/APDV.2019.06.000635

- [56] XU, J. *Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2016. **21**.
[online]. Dostupné z: doi:10.3390

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Absorbance
BHA	Butylhydroxyanisol
c_{MM}	Koncentrace myrhového mýdla
c_{NaCl}	Koncentrace chloridu sodného
CI	Index krémování
CMC	Kritická micelární koncentrace
°C	Stupeň Celsia
γ	Povrchové napětí
DLS	Dynamický rozptyl světla
E	Emulze
EE	Enkapsulační účinnost
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
FMO	Frankincense and myrrh oil
FMO-SLN	Frankincense and myrrh oil solid lipid nanoparticles
FID	Plamenoionizační detektor
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	Plynová chromatografie
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GC/FTIR	Plynová chromatografie s infračervenou spektroskopií
H _s	Výška séra (průhledné vrstvy)
H _E	Celková výška emulze v tubě
HCl	Kyselina chlorovodíková
HD	Hydrodestilace
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KBr	Bromid draselný

MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MM	Myrhové mýdlo
MO	Mikroorganismus
NaCl	Chlorid sodný
NaOH	Hydroxid sodný
O/V	Olej ve vodě
O/V/O	Olej ve vodě v oleji
PAL	Povrchově aktivní látka
PDI	Index polydisperzity
PEG	Polyethylenglykol
PIC	Phase inversion composition
PIT	Phase inversion temperature, teplota fázové inverze
σ	Průměrné povrchové napětí
®	Registrovaná ochranná známka
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
SFE	Extrakce superkritickým CO ₂
SD	Destilace vodní parou
SLN	Pevné lipidové nanočástice
TAG	Triacylglycerol
TEM	Transmisní elektronový mikroskop
™	Ochranná známka
UV	Ultrafialové
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná
V _{enkaps}	Objemový podíl enkapsulované látky
V _{total}	Celkový objem látky
V/O	Voda v oleji

V/O/V	Voda v oleji ve vodě
λ	Vlnová délka
XG	Xanthanová guma
ζ	Zeta

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 Commiphora myrrha [2]</i>	12
<i>Obrázek 2 Aromatické seskviterpeny izolované z myrhové pryskyřice [1] (upraveno)</i>	14
<i>Obrázek 3 Sloučeniny obsažené v myrhovém oleji [1] (upraveno).....</i>	16
<i>Obrázek 4 Sloučeniny typické pro myrhové aroma [1].....</i>	16
<i>Obrázek 5 Produkty značky Nobilis Tilia</i>	18
<i>Obrázek 6 Typy emulzí dle polaroty disperzního prostředí [17] (upraveno).....</i>	20
<i>Obrázek 7 Fázové rovnováhy dle Winsora [22] (upraveno).....</i>	24
<i>Obrázek 8 Pseudoternární fázový diagram [23] (upraveno).....</i>	25
<i>Obrázek 9 Mechanismy rozpadu emulze [24] (upraveno)</i>	26
<i>Obrázek 10 Schéma přístroje pro měření DLS [34] (upraveno).....</i>	34
<i>Obrázek 11 Typy rotační reometrů [37]</i>	36
<i>Obrázek 12 Grafická závislost povrchového napětí na koncentraci MM.....</i>	52
<i>Obrázek 13 Distribuční křivka disperzních částic (micel) MM.....</i>	54
<i>Obrázek 14 Grafická závislost velikosti disperzních částic MM na pH</i>	55
<i>Obrázek 15 Grafická závislost velikosti disperzních částic MM na koncentraci NaCl.....</i>	57
<i>Obrázek 16 Grafická závislost ζ potenciálu MM na koncentraci NaCl</i>	57
<i>Obrázek 17 Distribuční křivky disperzních částic (micel) MM pro nejvyšší koncentrace NaCl</i>	58
<i>Obrázek 18 Infračervené spektrum pro spodní vrstvu MM (pozadí vzduch).....</i>	60
<i>Obrázek 19 Infračervené spektrum pro horní vrstvu MM (pozadí vzduch).....</i>	60
<i>Obrázek 20 Infračervené spektrum pro horní vrstvu MM (pozadí čistá KBr tableta)</i>	61
<i>Obrázek 21 Průměrná velikost kapek emulzí s obsahem olejů na bázi TAG a jojobového vosku. S výjimkou emulze s trikaprylinem se ostatní vzorky rozpadly</i>	63
<i>Obrázek 22 Distribuční křivky kapek emulzí s obsahem olejů na bázi TAG (monomodální distribuce).....</i>	63
<i>Obrázek 23 Distribuční křivky kapek emulzí s obsahem olejů na bázi TAG a jojobového vosku (bimodální distribuce).....</i>	64
<i>Obrázek 24 Průměrná velikost kapek emulzí myrhového mýdla s obsahem olejů na bázi TAG stabilizovaných XG. Srovnání s emulzemi bez XG.</i>	65
<i>Obrázek 25 Distribuční křivky emulzí myrhového mýdla s trikaprylinem/trikaprylinem. Srovnání emulzí stabilizovaných a nestabilizovaných XG.....</i>	65
<i>Obrázek 26 Průměrné hodnoty ζ potenciálu pro emulze s obsahem olejů na bázi TAG a jojobového vosku. S výjimkou emulze s trikaprylinem se ostatní vzorky rozpadly</i>	66
<i>Obrázek 27 Stabilita emulzí – 7. den od přípravy</i>	68

<i>Obrázek 28 Stabilita emulzí – po měsíci od přípravy</i>	68
<i>Obrázek 29 Emulze stabilizované kromě myrhového</i>	69
<i>Obrázek 30 Průměrná velikost kapek emulzí s esenciálními oleji</i>	70
<i>Obrázek 31 Distribuční křivky kapek emulzí s esenciálními oleji podléhajícími sedimentaci (ihned po přípravě)</i>	71
<i>Obrázek 32 Průměrná velikost kapek emulzí s esenciálními oleji stabilizovaných xanthanovou gumou. Srovnání s emulzemi bez XG</i>	71
<i>Obrázek 33 Distribuční křivky kapek emulzí pro myrhu a myrhu stabilizovanou XG</i>	72
<i>Obrázek 34 Průměrná velikost kapek emulzí s obsahem esenciálních olejů podléhajících krémování</i>	72
<i>Obrázek 35 Distribuční křivky kapek emulzí s obsahem esenciálních olejů podléhajících krémování</i>	73
<i>Obrázek 36 Průměrná velikost kapek emulzí s esenciálními oleji stabilizovaných xanthanovou gumou. Srovnání s emulzemi bez XG</i>	73
<i>Obrázek 37 Průměrné hodnoty ζ potenciálu pro emulze s esenciálními oleji. Emulze připravené s 1 % MM</i>	74
<i>Obrázek 38 Velikost kapek emulzí s obsahem složek esenciálních olejů připravených s 1 % MM</i>	75
<i>Obrázek 39 Distribuční křivky kapek emulzí s obsahem složek esenciálních olejů připravené s 1 % MM</i>	75
<i>Obrázek 40 Průměrná velikost kapek emulzí s obsahem složek esenciálních olejů stabilizovaných XG</i>	76
<i>Obrázek 41 Průměrné hodnoty ζ potenciálu pro emulze s obsahem složek esenciálních olejů připravených s 1 % MM</i>	76
<i>Obrázek 42 Stabilita sedimentujících emulzí – 7. den od přípravy</i>	79
<i>Obrázek 43 Stabilita sedimentujících emulzí – po měsíci od přípravy</i>	79
<i>Obrázek 44 Stabilita sedimentujících emulzí stabilizovaných XG</i>	80
<i>Obrázek 45 Stabilita krémujících emulzí – 7. den od přípravy</i>	81
<i>Obrázek 46 Stabilita krémujících emulzí – po měsíci od přípravy</i>	82
<i>Obrázek 47 Stabilita krémujících emulzí se XG – 7. den od přípravy</i>	82
<i>Obrázek 48 Inhibiční zóny emulzí s obsahem skořicového EO a cinnamaldehydu pro gramnegativní bakterie</i>	84
<i>Obrázek 49 Inhibiční zóny emulzí s obsahem hřebíčkového EO a eugenolu pro gramnegativní bakterie</i>	84
<i>Obrázek 50 Inhibiční zóny emulzí s obsahem hřebíčkového EO a eugenolu pro grampozitivní bakterie</i>	85
<i>Obrázek 51 Inhibiční zóny vzorků s obsahem myrhy pro gramnegativní bakterie: MM myrhové mýdlo, EO esenciální myrhový olej, E emulze s myrhovým olejem</i>	86
<i>Obrázek 52 Inhibiční zóny vzorků s obsahem myrhy pro grampozitivní bakterie: MM myrhové mýdlo, EO esenciální myrhový olej, E emulze s myrhovým olejem</i>	86

Obrázek 53 Chromatografická analýza myrhového esenciálního oleje Nobilis Tilia87

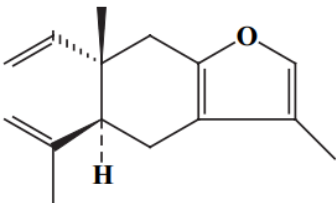
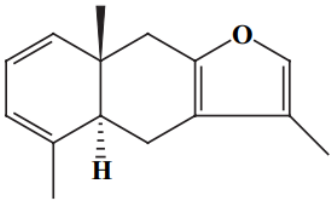
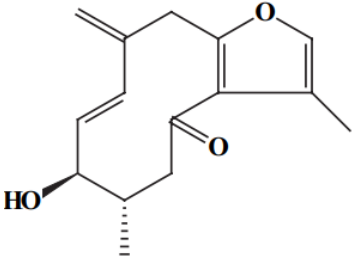
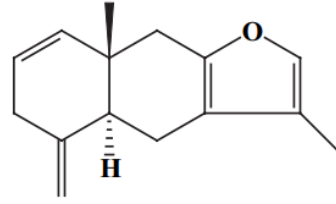
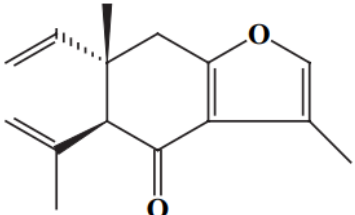
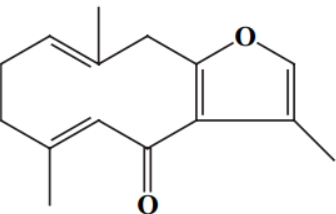
SEZNAM TABULEK

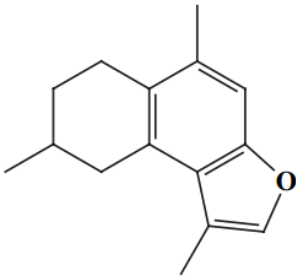
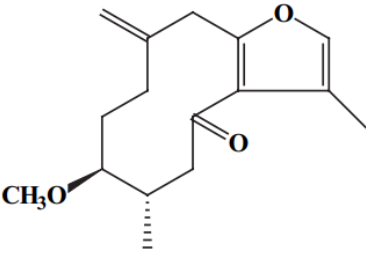
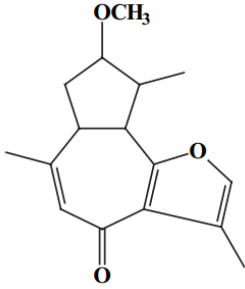
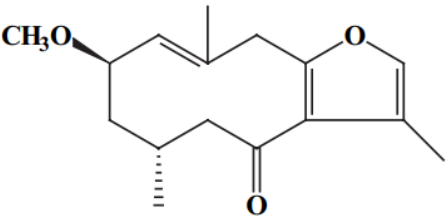
<i>Tabulka 1 Složky obsažené v myrhovém oleji [10] (upraveno).....</i>	17
<i>Tabulka 2 Souhrn typických vlastností pro jednotlivé typy emulzí [18], [20].....</i>	21
<i>Tabulka 3 Koncentrace vzorků a objem myrhového mýdla (MM) vztažený na 5ml</i>	45
<i>Tabulka 4 Složení horní vrstvy myrhového mýdla</i>	51
<i>Tabulka 5 Složení spodní vrstvy myrhového mýdla</i>	51
<i>Tabulka 6 Naměřené hodnoty povrchového napětí v závislosti na koncentraci.....</i>	52
<i>Tabulka 7 Hodnoty mezifázového napětí v závislosti na koncentraci MM.....</i>	53
<i>Tabulka 8 Naměřené hodnoty velikosti disperzních částic (micel) MM a ζ potenciálu</i>	54
<i>Tabulka 9 Hodnoty velikosti disperzních částic MM a ζ potenciálu v závislosti na pH.....</i>	56
<i>Tabulka 10 Naměřené hodnoty velikosti disperzních částic MM a ζ potenciálu v závislosti na koncentraci NaCl</i>	58
<i>Tabulka 11 Souhrn signálů FTIR pro jednotlivé vzorky [47]</i>	61
<i>Tabulka 12 Sledování stability emulzí s obsahem olejů na bázi TAG a jojobového vosku (nestabilní emulze (E)</i>	67
<i>Tabulka 13 Sledování stability emulzí s obsahem olejů na bázi TAG (stabilní emulze, (E))</i>	68
<i>Tabulka 14 Sledování stability emulzí s obsahem olejů na bázi TAG stabilizovaných myrhovým mýdlem a XG (1 %)</i>	69
<i>Tabulka 15 Fyzikální vlastnosti EO [48], [49], [50], [51], [52], [53].....</i>	77
<i>Tabulka 16 Sledování stability sedimentujících emulzí s obsahem esenciálních olejů</i>	78
<i>Tabulka 17 Sledování stability sedimentujících emulzí s obsahem složek EO</i>	78
<i>Tabulka 18 Sledování stability sedimentujících emulzí (E) s obsahem EO po – stabilizaci 1% XG.....</i>	80
<i>Tabulka 19 Sledování stability sedimentujících emulzí (E) s obsahem složek EO po stabilizaci 1% XG</i>	80
<i>Tabulka 20 Sledování stability krémujících emulzí (E) s obsahem EO a limonenem.....</i>	81
<i>Tabulka 21 Sledování stability krémujících emulzí (E) s obsahem EO po stabilizaci 1% XG</i>	82
<i>Tabulka 22 Inhibiční zóny vzniklé po působení emulzí se studovanými esenciálními oleji, eugenolem a cinnamaldehydem</i>	84
<i>Tabulka 23 Inhibiční zóny vzniklé po působení vzorků obsahujících myrhu.....</i>	85
<i>Tabulka 24 Složení éterického oleje myrha (Nobilis Tilia) uvedené v analytickém certifikátu a zjištěné chromatografickou analýzou</i>	87

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Sloučeniny obsažené v myrhovém esenciálním oleji

**PŘÍLOHA P I: SLOUČENINY OBSAŽENÉ V MYRHOVÉM
ESENCILÁNÍM OLEJI [1]**

Sloučenina	%	Chemická struktura
Curzeren	11,9	
Furanoedesma-1,3-dien	12,5	
1,10(15)-furanodien-6-one	1,2	
Lindestren	3,5	
Curzerenon	11,7	
Furanodien-6-one	0,4	

Sloučenina	%	Chemická struktura
Dihydropyrocurzerenon	1,1	
3-methoxy-10(15)-dihydrofuranodien-6-one	1,5	
3-methoxyfuranoguaia-9-en-8-one	0,1	
2-methoxy-4,5-dihydrofuranodien-6-one	0,2	
3-methoxy-10-methylenefuranogermacra-1-en-6-one	0,9	