



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE POTRAVINÁŘSKÝCH A KOSMETICKÝCH PRODUKTŮ S OBSAHEM VYBRANÝCH VITAMÍNŮ

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF FOOD AND COSMETIC PRODUCTS CONTAINING  
SELECTED VITAMINS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Jana Kubošová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1649/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Jana Kubošová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Příprava a charakterizace potravinářských a kosmetických produktů s obsahem vybraných vitamínů

### Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Optimalizace metod pro stanovení vybraných vitamínů a aktivních látek
- 3) Příprava a charakterizace potravinářských a kosmetických produktů s obsahem vybraných vitamínů
- 4) Vyhodnocení výsledků a diskuse

### Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Jana Kubošová  
student(ka)

-----  
Ing. Petra Matoušková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou a charakterizací enkapsulovaných forem lipofilních vitaminů v modelových podmínkách se zaměřením na kosmetické a potravinářské aplikace. V teoretické části jsou popsány jednotlivé vitaminy, jejich fyziologické účinky, fyzikální a chemické vlastnosti, zdroje a důsledky hypo/hypervitaminóz. Dále je diskutován jejich přínos v medicíně, potravinářství a kosmetice, metody stanovení a v poslední části metody enkapsulace. Zvláštní pozornost je věnována technice zapouzdření částic pomocí liposomů, která byla využita v praktické části.

Experimentální část je zaměřena na studium liposomů vybraných látek vitaminové povahy. Konkrétně byla řešena problematika cholekalciferolu, tokoferolu a  $\beta$ -karotenu, pro něž byla zavedena vhodná metoda stanovení. Následně probíhala enkapsulace těchto látek a charakterizace připravených liposomů. Byla stanovována jejich velikost, stabilita a enkapsulační účinnost, jež dosahovala vysokých procentuálních hodnot. Liposomy byly dále podrobeny testům stability v trávicích šťávách a v modelových prostředích simulujících kosmetické produkty. V měřeném časovém úseku bylo sledováno uvolňování enkapsulovaných látek do okolí a jejich postupná degradace. V závěru práce byly extrahovány analyty z reálných potravin a kosmetických výrobků a naměřené koncentrace byly porovnávány s deklarovanými hodnotami.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Vitamíny, lipofilní vitamíny, enkapsulace, liposomy, modelové trávení

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with the preparation and characterization of encapsulated forms of lipophilic vitamins in model conditions, focusing on cosmetic and food applications. The theoretical part describes the individual vitamins, their physiological effects, physical and chemical properties, sources and sequels of hypo/hypervitaminoses. Furthermore, their contribution in medicine, food industry and cosmetics, methods of determination and in the last part of the encapsulation method are discussed. Special attention is dedicated to the technique of particles encapsulation using liposomes, which was used in the practical part.

The experimental part is focused on the study of liposomes of selected substances of vitamin nature. Namely, the issue of cholecalciferol, tocopherol and  $\beta$ -carotene was addressed, for which a suitable method of determination was introduced. Subsequently, encapsulation of these substances and characterization of the prepared liposomes took place. Their size, stability and encapsulation efficiency, which reached high percentages, were determined. Liposomes were further put to the stability tests in digestive juices and model medium simulating cosmetic products. During the measured time, the release of encapsulated substances into the surroundings and their gradual degradation was monitored. At the end of the work, analytes were extracted from real foods and cosmetic products and the measured concentrations were compared with the declared values.

## **KEYWORDS**

Vitamins, lipophilic vitamins, encapsulation, liposomes, model digestion

KUBOŠOVÁ, Jana. Příprava a charakterizace potravinářských a kosmetických produktů s obsahem vybraných vitamínů [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-01-04]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131452>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petra Matoušková.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady. Déle bych chtěla poděkovat své konzultance Ing. Agátě Bendové za trpělivost, ochotu a všestrannou pomoc. V neposlední řadě patří velký dík také mé rodině, která mě podporovala v průběhu celého studia.

## OBSAH

1 Úvod .....	8
2 Teoretická část.....	9
2.1 Vitaminy .....	9
2.1.1 Historie.....	9
2.1.2 Vitamin A.....	10
2.1.3 Vitamin D.....	12
2.1.4 Vitamin E .....	15
2.1.5 Vitamin K.....	17
2.1.6 Přehled hydrofilních vitaminů.....	18
2.2 Aplikace lipofilních vitaminů.....	21
2.2.1 Medicína.....	21
2.2.2 Potravinářství.....	22
2.2.3 Kosmetika .....	22
2.3 Metody stanovení .....	23
2.3.1 Spektrofotometrie .....	23
2.3.2 Fluorimetrie .....	24
2.3.3 Chromatografie.....	24
2.4 Enkapsulace.....	25
2.4.1 Sprejové sušení .....	26
2.4.2 Sprejové chlazení.....	26
2.4.3 Extruze .....	26
2.4.4 Emulgace.....	26
2.4.5 Fluidní vrstva.....	26
2.4.6 Koacervace .....	27
2.4.7 Kokrytalizace .....	27
2.4.8 Liposomy.....	27
2.5 Metody charakterizace liposomů.....	29
2.5.1 Enkapsulační účinnost .....	29
2.5.2 Velikost .....	29
2.5.3 Stabilita .....	29
3 Cíl práce .....	30
4 Experimentální část .....	31

4.1 Použité přístroje a pomůcky .....	31
4.2 Použité chemikálie.....	31
4.3 Použité reálné potraviny a kosmetické produkty .....	32
4.4 Příprava roztoků pro kalibrační řadu .....	32
4.5 Analýza vzorků metodou HPLC .....	32
4.6 Příprava liposomů.....	33
4.7 Charakterizace připravených liposomů .....	33
4.7.1 Stanovení enkapsulační účinnosti.....	33
4.7.2 Stanovení velikosti a stability.....	34
4.7.3 Stanovení dlouhodobé stability .....	34
4.8 Stanovení stability liposomů v modelových prostředích.....	34
4.9 Modelové trávení .....	35
4.9.1 Příprava žaludeční šťávy .....	35
4.9.2 Příprava pankreatické šťávy .....	35
4.9.3 Příprava žlučové šťávy.....	35
4.9.4 Stanovení stability vitaminů v trávicích šťávách .....	36
4.9.5 Stanovení stability liposomů v trávicích šťávách.....	36
4.10 Extrakce a stanovení vitaminů z potravinářských a kosmetických produktů .....	36
5 Výsledky a diskuze .....	38
5.1 Výběr vhodné metody stanovení .....	38
5.2 Příprava a charakterizace liposomů.....	39
5.2.1 Stanovení enkapsulační účinnosti.....	39
5.2.2 Stanovení velikosti a stability.....	40
5.2.3 Stanovení dlouhodobé stability .....	42
5.3 Stanovení stability částic v modelových prostředích .....	44
5.4 Stanovení stability částic v trávicích šťávách .....	47
5.5 Extrakce a stanovení vitaminů z potravinářských a kosmetických produktů .....	50
6 Závěr .....	53
7 Seznam použitých zdrojů .....	55
8 Seznam použitých zkratk .....	60

# 1 ÚVOD

S rozvojem chemických a biologických věd byly postupně objevovány nové nízkomolekulární látky vitaminové povahy a odhalován jejich význam pro funkci četných fyziologických pochodů. V dnešní době je již známo 13 základních druhů vitaminů, jejichž nevyvážený přísun může mít pro lidský organismus katastrofální důsledky. Přestože existuje několik výjimek ve tvorbě vitaminů v lidském těle, většina nároků je pokrývána příjmem ze zdrojů okolního prostředí. Jejich přítomnost je v těle vyžadována v poměrně nízkých koncentracích, přesto však zastávají vitaminy mnoho dílčích rolí. Podílí se na metabolismu a syntéze řady látek, udržování tělesných funkcí a v neposlední řadě také na podpoře imunitního systému. Vzhledem ke strukturálním rozdílům mají vitaminy široké spektrum aplikací a jsou tak uplatňovány v potravinářském, farmaceutickém i kosmetickém průmyslu.

Vitaminy jsou látky často náchylné k oxidaci, vlivům světla a teploty. V čase přirozeně degradují a pozvolna ztrácí svou biologickou aktivitu. Těmto procesům lze do určité míry předcházet a jednou z možností je využití enkapsulačních technik. Během enkapsulace jsou aktivní látky obalovány do nosných systémů, jež poskytnou patřičnou fyzikální a chemickou ochranu před nepříznivými účinky vnějšího prostředí. Látky tak získají lepší stabilitu a zachovávají si své funkce i v průběhu zpracování či skladování. Zapouzdření přináší také další výhody v podobě zlepšení transportu, řízeného uvolňování, snadnější manipulace aj.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Vitaminy

Vitaminy obecně jsou nízkomolekulární esenciální látky organického původu. Jejich název vznikl spojením dvou latinských slov – vita (život) a amin, poněvadž se předpokládalo, že se jedná o sloučeniny tvořené především aminy. Dnes již víme, že mezi vitaminy neexistují žádné obecné strukturální spojitosti, ale zavedený název jim byl ponechán [1, 2]. Pojem se správně využívá pouze v souvislosti s heterogenními organismy, pro které jsou tyto látky (až na některé výjimky) exogenní a musí je přijímat z vnějšího prostředí. Ne vždy lze ovšem předpokládat, že stejná látka bude vitamínem dvou různých organismů [1].

Do těla vstupují vitaminy přímo nebo ve formě svých provitaminů – neaktivních forem. K jejich přeměně dochází až následně působením speciálních enzymů či záření [3, 4]. Na rozdíl od jiných biomolekul, zejména sacharidů, lipidů a proteinů, je přítomnost vitaminů v organismu vyžadována pouze v malých množstvích, za kterých již působí jako katalyzátory biochemických reakcí. Neuplatňují se ovšem jako stavební jednotky ani zdroj energie [3]. V současné době je známo 13 základních druhů vitaminů, jež jsou předně děleny podle jejich rozpustnosti ve vodě či v tucích. Jedná se o vitaminy hydrofilní a lipofilní [2, 5]. Mezi první jmenované řadíme skupinu vitaminů B-komplexu a vitamin C, které nachází uplatnění především jako kofaktory různých enzymů a mají tedy významný katalytický účinek. Naproti tomu lipofilní – vitaminy A, D, E a K – mají funkce rozmanité. Jednotlivá označení vitaminů vychází z pořadí, ve kterém byly objeveny, přičemž vitaminy s podobnými funkcemi v organismu nesou navíc pro své rozlišení číselné indexy za názvem písmene [1].

#### 2.1.1 Historie

Na objevu vitaminů se podílela celá řada vědců od počátku 19. do poloviny 20. století. Tento dlouhý vývoj byl podmíněn výskytem vitaminů v přírodě pouze v malých koncentracích, jež nebylo možné tehdejší technikou analyzovat. Důvodem výzkumů se staly neznámé příčiny chorob, které se u lidí objevovaly již po staletí. Ještě na konci 19. století převládala teorie, že nemoci typu beri-beri, kurděje, krivice či pelagra jsou způsobeny infekčními organismy nebo toxiny jimi produkovanými a předpokládalo se, že základní složky výživy tvoří pouze cukry, tuky, bílkoviny a minerální látky. Tyto hypotézy a mnohé další však byly vyvráceny pokusy na zvířatech krmených různou stravou. Na základě příznaků, jež se u zvířat začaly projevovat, byla vznesena domněnka, že příčina těchto nemocí tkví v absenci dosud nepoznaných složek v potravě. Roku 1912 polský chemik C. Funk shrnul dosavadní poznatky o těchto látkách a navrhl pro ně označení vitaminy [5, 6].

Na přelomu 19. a 20. století probíhala studie, která spočívala v krmení krys moukou smísenou s mlékem (mléčný chléb). Výzkum ukázal na přítomnost neznámé složky, jejíž alkoholová a etherová extrakce z potravy vedla bezprostředně do tří dnů k úmrtí zvířat. Po navrácení extraktu do potravy krysy přežívaly normálně a dospělo se tedy k závěru, že je v mléce obsažena lipofilní látka nezbytná pro život. Následně byl odhalen její výskyt pouze

ve stopových množstvích a látka dostala označení jako vedlejší faktor, později vitamin A. V čisté formě se jej podařilo izolovat až v roce 1937 [6, 7].

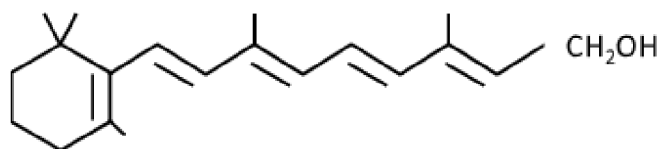
Nedostatek vitaminu D vyvolává nemoc zvanou rachitida neboli křivice. Ta byla prvně podrobněji popsána v 17. století, její původ však byl připisován např. požívání alkoholu matkou v době těhotenství. Následné poznatky a postřehy například o zvýšeném výskytu tohoto onemocnění u dětí s omezeným přístupem ke slunečnímu svitu vedly k postupnému odhalování příčiny v deficitu určité látky. Roku 1906 se objevily první předpoklady, že jde o látku vitaminového charakteru a o pár let později bylo prokázáno její antirachitické působení příkrmováním nemocných psů rybím tukem. Léčebné účinky byly původně přiřazovány tehdy již známému vitaminu A. Že přísluší jinému vitaminu, bylo prokázáno až roku 1922 a jelikož se jednalo o čtvrtý objevený vitamin, dostal označení D. Dodnes je známý také pod pojmem antirachitický vitamin [5, 8].

Objev vitaminu E je datován přibližně ve stejné době, jako vitamin D. Roku 1922 bylo krmením krys semipurifikovanou stravou zjištěno, že březí samice rodí pouze mrtvá mláďata. Po doplnění potravy o čerstvý salát nebo pšeničné klíčky se již mláďata rodila zdravá a neznámá složka dostala označení faktor X. Z potravy se jí podařilo izolovat lipidovou extrakcí, čímž se zařadila mezi lipofilní látky. Zároveň se začala předpokládat její vitaminová povaha, a proto byla coby vitamin označena podle abecedního pořadí písmenem E. Následným výzkumem struktury a vlastností si pro svůj vliv na správnou funkci pohlavních orgánů vysloužila také název tokoferol vyplývající z řeckých slov *tocos* (narození), *feroin* (přivést) a koncovky -ol označující alkoholy [9].

Vitamin K byl objeven jako poslední z řady lipofilních vitaminů, a to v 30. letech 20. století v rámci studování metabolismu cholesterolu. Tehdy byla u kuřat pozorována hemoragie vyvolaná nedostatečným přísunem tukových složek v potravě. Tu nebylo možné odvrátit podáním žádného ze známých vitaminů a začalo se proto uvažovat o potenciálně novém vitaminu lipofilní povahy, který byl pojmenován přízviskem koagulační (odtud také vitamin K). Začaly se zkoumat vlastnosti a účinky tohoto vitaminu a v roce 1939 se jej podařilo poprvé izolovat. Později byla prokázána existence více forem vitaminu s antihemoragickými vlastnostmi, některé z nich byly připraveny synteticky [5].

### 2.1.2 Vitamin A

Vitamin A neboli retinol se svou strukturou řadí mezi alkoholy. Skládá se z  $\beta$ -jononového kruhu (4-[2,6,6-trimethyl-2-cyklohexen-1-yl]-3-buten-2-on) s navázaným postranním řetězcem obsahujícím dvě izoprenové jednotky. Přítomnost konjugovaného systému pěti dvojných vazeb ve struktuře molekuly podmiňuje existenci celkem šestnácti různých cis-trans izomerů, z nichž pouze dva jsou biologicky aktivní. Obě tyto izomerní formy se v přírodních látkách vyskytují povětšinou společně s mastnou kyselinou, obvykle se jedná o estericky vázanou kyselinu palmitovou [5, 10].



Obrázek 1: Struktura retinolu [11]

### 2.1.2.1 Fyziologické účinky

Do těla se vitamin A dostává přímo nebo ve formě svých provitaminů – karotenoidů. Jedná se o chemicky příbuzná žlutá barviva rostlinného původu, která se na vitaminy přeměňují již ve střevní sliznici a v játrech působením enzymu karotinázy [5, 12]. Nejúčinnější z řady karotenoidů je  $\beta$ -karoten, který je v případě symetrického štěpení hydrolyzován za vzniku dvou molekul retinolu. Ostatní formy svým rozkladem poskytují molekulu pouze jednu. Účinnost přeměn závisí na množství přijatých provitaminů, přičemž se zvyšujícími se dávkami klesá [5]. Vstřebávají se stejně jako retinol ve střevě současně s tuky, míra absorpce může být však až šestkrát nižší [4, 13].

Vitamin A je ukládán zejména v játrech, méně v ledvinách a tukové tkáni [12]. Určité množství jaterního retinolu je vyloučeno žlučí a je zapojeno do enterohepatálního oběhu. V krvi je vázán na speciální bílkoviny, jejichž koncentrace řídí hladinu vitaminu v séru [5]. V organismu se vitamin A mění řadou metabolických reakcí. Nejprve podléhá reverzibilní přeměně na aldehyd – retinal, následně oxidaci na kyselinu retinovou. Tato reakce již je však nevratná [12]. Oxidační reakce podmiňuje také tvorbu 11-cis-retinalu, jenž je součástí renálního pigmentu [5]. Dalšími transformacemi mohou vznikat inaktivní produkty, v poslední řadě oxid uhličitý a voda [12].

Základní funkci uplatňuje vitamin A v procesu vidění – účastní se syntézy již zmíněných fotosenzitivních pigmentů oční sliznice (rodopsinu a jodopsinu) [13]. Je nezbytný také pro diferenciaci, růst a správnou funkci epitelových buněk [4, 5]. Ovlivňuje stabilitu membrán, vývoj pohlavních buněk a plodu a podílí se na syntéze proteinů, lipoproteinů a nukleových kyselin. Méně významné uplatnění nachází retinol v antioxidačních dějích [5].

### 2.1.2.2 Nedostatek vitaminu A

Nedostatek vitaminu A typicky postihuje oči a kůži [13]. Způsobuje snížení sekreční činnosti slzných žláz, suchost spojivek (xeroftalmii), zakalení a poškození rohovky, které může vést k oslepnutí. Zároveň je ovlivněna adaptace na šero, nastává porucha vidění za šera až šeroslepost. Změny epitelu zasahují kůži i sliznici, jsou doprovázeny suchostí kůže a sníženou obranyschopností sliznice vůči infekcím. Poruchy střevní sliznice způsobují průjemy a sliznice močových cest usnadňují tvorbu močových kamenů [12, 13]. U dětí se nedostatek může projevit zpomalením či zastavením růstu a horším hojením ran [5].

### 2.1.2.3 Nadbytek vitaminu A

Jednorázové požití vyššího množství vitaminu A vyvolá v organismu akutní intoxikaci, která se projeví nauzeou, zvracením, bolestí břicha a hlavy, závratí, podrážděností nebo zvýšeným nitrolebečným tlakem. Při dlouhodobém užívání vyšších dávek poté vzniká chronická forma. Pro tu je typické nechutenství, bolest hlavy, horečka, svědění odlupující se kůže a vypadávání

vlasů. Chronická hypervitaminóza postihuje také kosti, dochází k dekalifikaci a osteoporóze, rozšíření metafýz či periostálním otokům dlouhých kostí. Závažným projevem je předčasně uzavírání epifýz, které vede k zástavě růstu, není vyloučeno ani poškození jater. Některé příznaky jsou navíc podpořeny současným výskytem hypervitaminózy D [12, 13].

#### **2.1.2.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti**

Retinol tvoří žlutě zbarvené jehlicovité krystaly s matným vzhledem. Stejně jako jeho deriváty je rozpustný v široké škále organických rozpouštědel a v tucích, nerozpustný v prostředí glycerolu a vody. Vitamin A, a zejména jeho estery, vykazují stabilitu vůči zahřívání, rozkládají se však za přístupu kyslíku či oxidačních činidel a UV záření. Oxidační působení je navíc katalyzováno přítomností kovů (železo, měď) a oxidací vznikajících peroxidů z mastných kyselin. Pro aplikační využití je možné stabilitu navýšit tvorbou tzv. mikrokapslí, při které je vitamin obalen vrstvou vodného koloidního roztoku želatiny nebo glukózy. Tento vitamin navíc díky dvojným vazbám silně pohlcuje záření. V závislosti na cis-trans konformaci a na použitém organickém rozpouštědle se maximum absorpce vlnových délek pohybuje v rozmezí 318 až 360 nm. Některé estery navíc poskytují fluorescenci [3, 10].

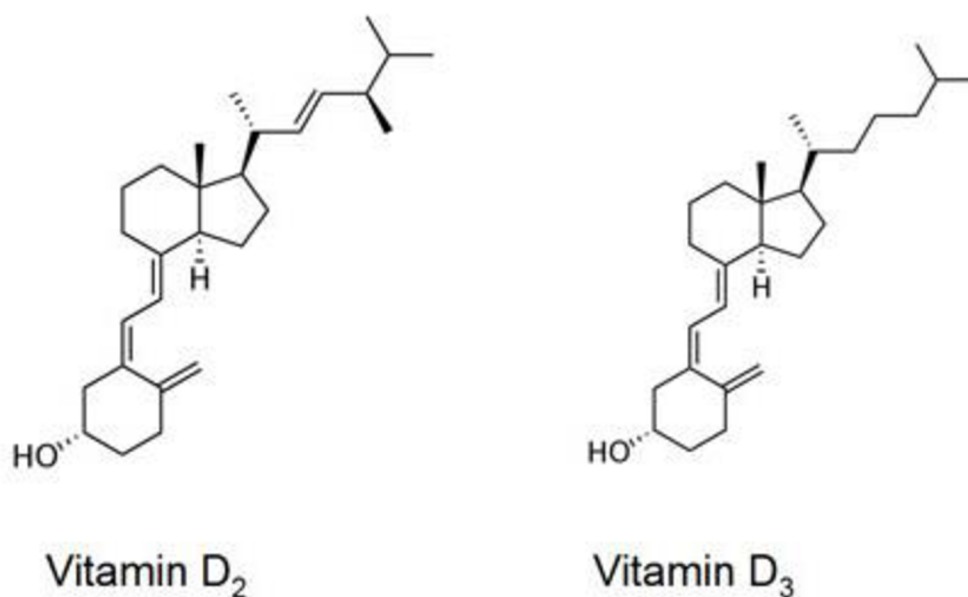
#### **2.1.2.5 Zdroje vitamínu A**

Vitamin A je obsažen v živočišných produktech, zvláště bohaté jsou játra, rybí tuk, máslo, mléko a sýry. Tyto potraviny jsou navíc schopny dlouhodobějšího uskladnění vitamínu. Karotenoidy naopak pochází spíše z rostlinných zdrojů, ovoce a zeleniny [4, 5].

### **2.1.3 Vitamin D**

Vitamin D je souhrnné označení pro skupinu látek též nazývaných jako kalciferoly. Jedná se o deriváty steranu (cyklopentanoperhydrofenanthrenu) a patří tedy mezi steroidní látky. Přesněji jde o sekosteroidy, u nichž je jeden z kruhů skeletu steranu otevřený. Mezi jejich (pro nás nejvýznamnější) zástupce patří vitamin D<sub>2</sub> (ergokalciferol) a D<sub>3</sub> (cholecalciferol) [10].

Ergokalciferol je rostlinný sterol, který v těle vzniká působením UV záření. Jeho přeměna probíhá v kůži z ergosterolu neboli provitaminu D<sub>2</sub>, jež je přijímán z rostlinných zdrojů [14], [15]. Z chemického hlediska jde o 9,10-seco(5Z,7E)5,7,10(19),22-ergostatetraen-3-β-ol. Cholecalciferol na rozdíl od něj postrádá jednu methylovou skupinu a jednu dvojnou vazbu a jeho systematický název zní 9,10-seco(5Z,7E)5,7,10(19)-cholestatrien-3-β-ol [10]. Tato forma je naopak živočišného původu a vzniká ozářením 7-dehydrocholesterolu, jež je jedním z přirozených metabolitů cholesterolu. Tento provitamin D<sub>3</sub> tedy může být v těle syntetizován a je v hojné míře zastoupen v kůži [14, 16].



Obrázek 2: Struktura kalciferolů [17]

### 2.1.3.1 Fyziologické účinky

Obě zmíněné formy vitamínu D si jsou velice podobné co do struktury i biologických účinků [10]. V těle vznikají působením nejčastěji slunečního záření, a jsou proto někdy označovány jako tzv. sluneční vitaminy [18]. Fotolytické reakce probíhají v kůži po ozáření UV světlem o vlnových délkách v rozmezí 280-320 nm za štěpení kruhu B. Jejich účinnost při tom závisí na řadě faktorů, jako například době vystavení záření, ročním období, zeměpisné šířce, pigmentaci či použití opalovacích krémů. V případě dlouhodobější expozice je reakce schopná autoregulace, při níž dochází ke vzniku inaktivních izomerů [16]. Také ergokalciferol a cholekalciferol jsou samy o sobě neaktivní, na aktivní formy jsou však převáděny pomocí speciálních enzymů [18]. V krevní plazmě se nachází proteiny DBP (vitamin D Binding Protein) schopné vázat a přenášet vitamin D. Ergokalciferol a cholekalciferol jsou transportovány do jater, kde jsou vystaveny enzymatickému působení 25-hydroxylázy za vzniku 25-hydroxykalciferolu, zjednodušeně kalcidiolu, jenž představuje hlavní formu tohoto vitamínu. Vlivem další hydroxylázy v ledvinách (1-hydroxylázy) vzniká naopak neúčinnější forma – kalcitriol (1,25-dihydrokalciferol), též hormonální forma [4, 14].

Ačkoli je vitamin D, jak vypovídá z názvu, tradičně řazen mezi vitaminy, vykazuje hormonální aktivitu, pro kterou je řazen také mezi hormony podílející se na metabolismu vápníku. Je schopen vázat se na receptory a pronikat do jádra buněk, kde stimuluje produkci proteinů regulujících resorpci především vápníku a fosfátů ve střevech [8, 12].

Kalciferoly celkově zvyšují hladiny vybraných látek v krvi. Podporují zpětné vstřebávání vápníku, sodíku a fosfátů v ledvinách, konkrétně v distálních tubulech nefronů, a mají rozsáhlý vliv na tkáň pohybové soustavy [12, 18]. Podněcují dělení osteoklastů, čímž uvolňují vápník z povrchu částí kostí, které již neosifikují, ve prospěch částí rostoucích [8]. Napomáhají tvorbě kolagenových vláken, a ovlivňují tak minerální i organickou složku kostí. S regulací vápníku

v těle souvisí i účinky na svalstvo, pro jehož správnou funkci jsou vápníkové ionty nezbytné [12, 18].

Mimo jiné byla u tohoto vitamínu prokázána účast v imunitním systému, kde ovlivňuje diferenciaci makrofágů z prekursorů a zvyšuje jejich aktivitu. Zvyšuje také působení bílých krvinek proti antigenům a podílí se na tvorbě speciálních bílkovin, které jsou součástí nespecifické imunity [19].

#### **2.1.3.2 Nedostatek vitamínu D**

Jak již bylo zmíněno, vitamin D řídí spolu s dalšími hormony (parathormonem a kalcitoninem) metabolismus vápenatých iontů, přičemž hypovitaminóza (vedle omezení jeho funkcí) souvisí především s poruchami kostní tkáně [4]. U dětí se projevuje jako křivice (špatné ukládání vápníku do nově vznikajících kostí), u dospělých jako osteomalacie (měknutí a ohyb kostí již plně vyvinutých) [5, 12]. Příčin nedostatku může být hned několik. Může se jednat o pouhý deficit jeho přísunu v potravě či nedostatek slunečního záření. Ve složitějším případě jde o různá onemocnění, která způsobují špatné vstřebávání této látky [12].

#### **2.1.3.3 Nadbytek vitamínu D**

Hypervitaminóza D vzniká pouze v případě nadměrného přísunu v potravě, projevuje se osteoporózou, zvýšeným vylučováním vápníku močí, polyurií, pocitem na zvracení, samotným zvracením a průjmem [4, 5, 12]. Při déletrvajícím zvýšeném příjmu nastává kalcifikace orgánů (zejména ledvin) vedoucí k jejich selhání [12].

#### **2.1.3.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti**

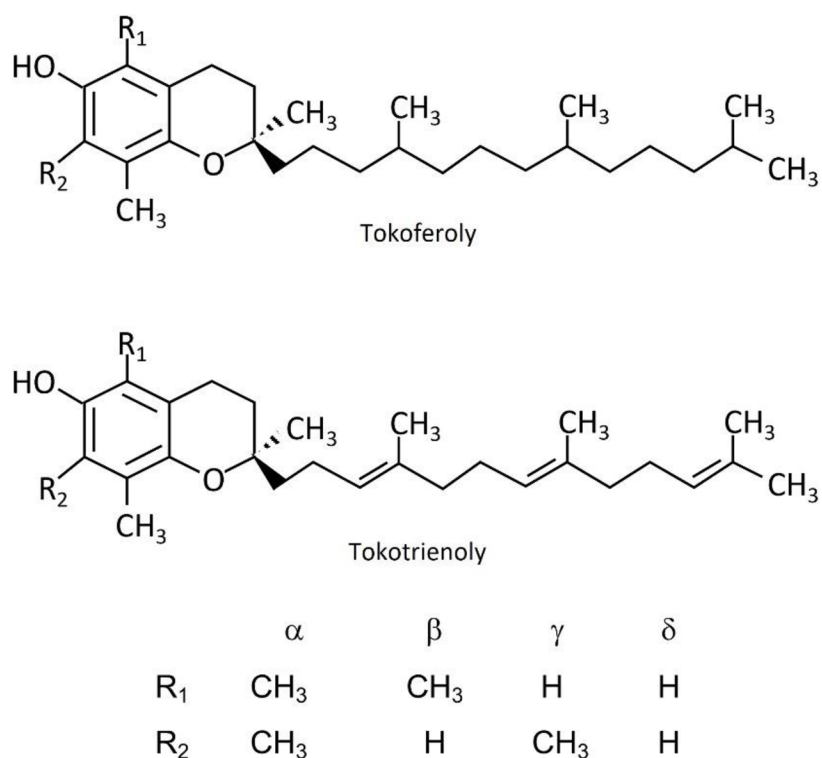
Vitamíny skupiny D jsou bezbarvé krystalické látky nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v tučných a organických rozpouštědlech (např. acetonu, methanolu, etheru). Díky jejich třem konjugovaným dvojným vazbám silně absorbují záření v UV oblasti a rozpuštěné v hexanu vykazují podobná absorpční spektra s maximem při 264,5 nm. Zároveň přítomnost dvojných vazeb podmiňuje náchylnost k oxidaci či adici a k případnému rozkladu. Obecně jsou tyto látky na vzduchu i světle nestálé a podléhají fotoizomeraci. Citlivé jsou také na kyselá prostředí, naopak v alkalických jsou stabilní, při vyšších teplotách rovněž izomerují. Teplota tání ergokalciferolu se pohybuje kolem 115-118 °C, zatímco u cholekalciferolu jsou hodnoty podstatně nižší, přibližně 84-85 °C [3, 10].

#### **2.1.3.5 Zdroje vitamínu D**

Většina potřebného množství vitamínu D je v lidském organismu pokrývána jeho tvorbou v kůži ze 7-dehydrocholesterolu a v závislosti na geografických, klimatických a kulturních faktorech je nutný větší či menší příjem z exogenních zdrojů [5]. Jelikož vitamin D patří mezi lipofilní látky, bývá součástí potravin s vysokým podílem tuků, což představuje problém z hlediska kardiovaskulárních chorob [16]. Nejbohatším zdrojem jsou játra, rybí tuk, mléko, fortifikované margaríny či vejce. Rostlinné zdroje pak tvoří například kokosové máslo či houby, zvláště hříby, ve kterých je vitamin zastoupen především ve formě ergosterolu [5].

## 2.1.4 Vitamin E

Vitamin E je představován skupinou osmi derivátů tokolu (2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-6-hydroxychromanu) a tokotrienolu (2-methyl-2-(4,8,12-trimethyldecyl-3,7,11-trienyl)-6-hydroxychromanu) vykazujících stejné biologické aktivity [5, 13]. Jedná se o sloučeniny tvořené stejným základem – chromanovým kruhem s navázanou hydroxylovou skupinou – a nasyceným (tokoferoly) nebo nenasyceným (tokotrienoly) šestnácti-uhlíkatým postranním řetězcem, též nazývaným jako fytolový [9]. Podle přítomnosti methylových skupin na chromanovém jádře jsou rozlišovány čtyři formy těchto sloučenin ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ ), z nichž každá má zastoupení u tokoferolů i tokotrienolů. Nejvýznamnějším vitagenem E je  $\alpha$ -tokoferol, proto je celá skupina obecně označována také pojmem tokoferoly [9, 10].



Obrázek 3: Struktura tokoferolů a tokotrienolů – převzato a upraveno [20]

### 2.1.4.1 Fyziologické účinky

Vstřebávání vitamínu E probíhá v tenkém střevě a závisí na povaze tuku, se kterým je přijímán a absorbován. Nasycené mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem přispívají ke snadnějšímu vstřebávání, v opačném případě polynenasycené jej mohou až inhibovat. Většina absorbovaného vitamínu je dále převedena do lymfy, zbytkové množství do krve. Transport je uskutečňován lipoproteiny, především nízkodenzitními LDL, dále HDL a VLDL [5].

Radikály v organismu poškozují lipidy a produkují jejich hydroperoxydy, které svým rozkladem spouští kaskádu dějů. Vitamin E působí jako ochranný faktor, který vstupuje do reakcí, odchyťává a přeměňuje sekundární radikály a brání řetězovému mechanismu. Tato funkce je uplatňována u membránových lipidů univerzálně a vitamin je proto lokalizován ve všech tkáních, speciálně v tukových a v játrech. Působí tedy jako antioxidant, pozitivně ovlivňuje

stabilitu řady látek (vitaminu A, některých hormonů a enzymů), účinkuje na buňky hladké svaloviny, inhibuje jejich proliferaci a předchází vzniku kardiovaskulárních chorob [5, 12].

Za neúčinnější z řady vitaminu E je považován  $\alpha$ -tokoferol obsahující tři methylové skupiny na chromanovém kruhu. S klesajícím počtem těchto skupin a s přítomností dvojných vazeb se biologická účinnost snižuje [10, 21]. Zvláštní funkci vykazuje  $\gamma$ -tokoferol jakožto silný nukleofil, který vychytává elektrofilní mutageny a napomáhá tak činnosti glutathionu [5].

#### **2.1.4.2 Nedostatek vitaminu E**

Hypovitaminóza je spojena se špatným vstřebáváním nebo transportem tohoto vitaminu, u lidí je však velmi vzácná a nebyla spolehlivě popsána [9, 15]. Také její projevy nejsou zcela objasněny, jelikož se deficit začíná projevovat až po delší době. Některá onemocnění sice vykazují podobné příznaky, jaké byly pozorovány u zvířat při nedostatku vitaminu E (např. sterilita, svalová dystrofie), u člověka však nebylo prokázáno, že se jedná o projevy právě této hypovitaminózy [21]. V jejím důsledku jsou pouze předpokládány změny v krevtvorbě (snížená životnost červených krvinek), reprodukovatelnosti a změny v cévní a nervové soustavě [5, 12].

#### **2.1.4.3 Nadbytek vitaminu E**

Hypervitaminózy, obvykle vzniklé předávkováním, jsou svými toxickými účinky nebezpečné hlavně u vitaminů A, D a popřípadě K [1, 4]. V jejich srovnání je nadbytek vitaminu E v organismu snáze tolerovatelný [5].

#### **2.1.4.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti**

Za normálních teplot tvoří tokoferoly bezbarvé nebo lehce nažloutlé viskózní oleje, při nižších teplotách mohou některé z nich vyskytující se v přírodě krystalovat. Tyto látky patří mezi hydrofobní, rozpouštějí se v tučných a lipoфильných rozpouštědlech (etheru, petroletheru, chloroformu či hexanu), méně v alkoholech a acetonu. V alkalickém prostředí jsou stabilní do teploty 40 °C, poté se rozkládají, naproti tomu v kyselém jsou stabilní i za vyšších teplot. Disponují silně redukčními vlastnostmi díky přítomnosti hydroxylové skupiny, a jsou tedy citlivé na vzdušný kyslík a oxidační činidla. Mírná oxidace vede k otevření chromanového kruhu a vzniku žlutého tokoferylcholinu, který snadno podléhá redukci s následnou zpětnou cyklizací v kyselém prostředí. Za účasti různých kovů, radikálů, světla nebo zvýšené teploty je oxidace značně urychlena. Esterifikací vznikají stabilnější sloučeniny se zachováním stejné nebo vyšší biologické účinnosti. Všechny formy vitaminu E jsou opticky aktivní a většinou pravotočivé, synteticky připravené pak tvoří racemické směsi. UV absorpční spektra tokoferolů i jejich esterů jsou velmi podobné, přičemž maximálně absorbují záření o vlnových délkách v rozmezí 280-300 nm. Vykazují také silné fluorescenční vlastnosti [10, 21].

#### **2.1.4.5 Zdroje vitaminu E**

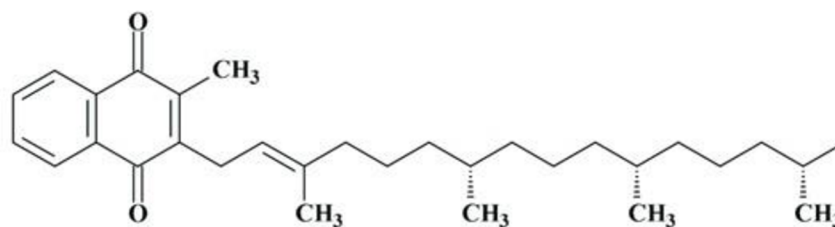
Vitamin E představuje hlavní přírodní antioxidant produkovaný pouze v rostlinách a obsažený ve všech lipidech rostlinného původu. Přední zastoupení má v rostlinných olejích – olejích z obilných klíčků, slunečnicových, řepkových a sójových. V malých množstvích se vyskytuje také v jádrech ořechů, kukuřici, hrášku, obilných produktech či v některých zeleninách a živočišných produktech (vejce, mléko, vnitřnosti). V těchto zdrojích se tokoferoly vyskytují



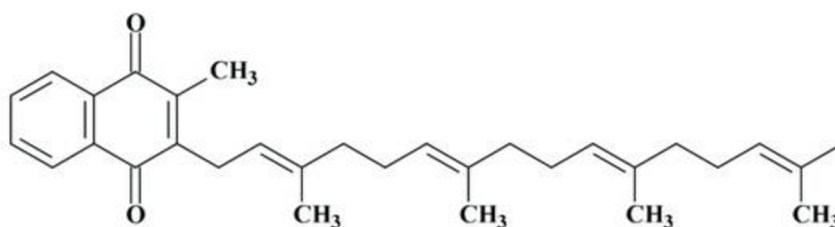
především ve formě volných derivátů, minoritně jako estery nejčastěji mastných kyselin.  $\alpha$ -tokoferol může být v obou formách přítomen v přírodních zdrojích nebo připravován synteticky jako směs osmi stereoizomerů [5, 15].

### 2.1.5 Vitamin K

Vitamin K zahrnuje skupinu látek přirozeného i syntetického původu odvozených od sloučeniny 2-methyl-1,4-naftochinonu, která samotná nebyla z přírodních zdrojů izolována. Tato skupina si svůj název vysloužila díky svým hemokoagulačním účinkům, podle kterých byla označována jako koagulační vitamin, vitamin K. Řadí se zde několik sloučenin, přičemž nejvýznamnější je dvojice vitaminů  $K_1$  a  $K_2$ . První, vitamin  $K_1$  (fylochinon, fytomenedion), je látka pocházející z rostlinných zdrojů, která má na třetím uhlíku navázanou fytolovou skupinu. Naopak vitamin  $K_2$  (menachinon, farnochinon) nese na třetím uhlíku polyizoprenový řetězec obvykle o délce šesti nebo sedmi izoprenových jednotek a podobně jako vitamin H může být v těle syntetizován střevní mikroflórou [5, 12].



Obrázek 4: Struktura vitaminu  $K_1$  [22]



Obrázek 5: Struktura vitaminu  $K_2$  [22]

#### 2.1.5.1 Fyziologické účinky

Vitamin K patří mezi lipofilní látky a z potravy je vstřebáván v tenkém střevě společně s přijatými tuky. Účinnost absorpce je značně proměnlivá, pohybuje se v rozsahu 10–80 % a závisí na typu mastných kyselin. Krátké nasycené mastné kyseliny vstřebávání podporují, naopak polynenasycené s delším řetězcem jej snižují [5]. Výjimku představují vitaminy  $K_3$  (menadion) a  $K_4$  (menadiol) tvořící ve vodě rozpustné soli, k jejichž absorpci není zapotřebí působení žluči. Tyto látky se řadí mezi syntetické formy vitaminu K a v přírodě se běžně nevyskytují [12].

Vitamin K se v těle hromadí zejména v jaterní tkáni [5]. Je nezbytný pro tvorbu protrombinu a koagulačních faktorů (II, VII, IX, X), a má tedy důležitou roli v procesu srážení krve [13].

Mimoto je složkou transportních systémů, účastní aerobní fosforylace a syntézy některých bílkovin. V kostech působí společně s vitamínem D a podporuje tvorbu osteokalcinu. Konkrétně napomáhá  $\gamma$ -karboxylaci glutamátové části proteinu, která poté zprostředkovává vazbu vápníku [5]. Proti vitamínu K působí látka dikumarol a jeho deriváty, které brání procesu srážení krve a využívají se jako léčebná antikoagulancia [13].

#### **2.1.5.2 Nedostatek vitamínu K**

Nedostatek je u tohoto vitamínu vzácný a může být způsoben nízkým příjmem v potravě, chudou střevní mikroflórou například v důsledku užívání antibiotik, sníženou činností jater či poruchou vstřebávání tuků. Mnohem častější je jeho výskyt u novorozenců, u kterých vzniká vlivem nedostatečné zásoby a příjmu nebo vlivem sterility střev [12, 13]. Primárním projevem hypovitaminózy je pokles hladiny protrombinu a koagulačních faktorů, který vede k poruše krevního srážení a nadměrné krvácivosti [5, 13]. U novorozenců může dokonce dojít ke krvácení do nadledvinek, gastrointestinálního traktu nebo cévní nervové soustavy [12].

#### **2.1.5.3 Nadbytek vitamínu K**

Hypervitaminózy K<sub>1</sub> a K<sub>2</sub> nebyly prokázány ani při příjmu v mnohonásobně vyšším množství. V ojedinělých případech mohou způsobovat kožní alergické reakce, tyto vitamíny však nejsou považovány za toxické látky. Naproti tomu uměle připravený vitamín K<sub>3</sub> vykazuje v organismu vedlejší účinky a jeho zvýšená koncentrace se může projevit hyperbilirubinemií a hemolytickou anémií [5].

#### **2.1.5.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti**

Vitamín K<sub>1</sub> je žlutý olej a K<sub>2</sub> žlutá krystalická látka. Obě sloučeniny jsou dobře rozpustné v tucích, acetonu a jiných organických rozpouštědlech (např. benzenu, etheru, petroletheru), méně rozpustné v alkoholech a nerozpustné ve vodě. Zároveň obě vykazují termostabilitu a vytváří charakteristická UV absorpční spektra dána přítomností chinonu ve struktuře molekuly. S alkoholy poskytují modré až červenofialové zbarvení postupně přecházející do červenohněda. Vitamín K<sub>1</sub> na rozdíl od K<sub>2</sub> může navíc disponovat optickou aktivitou. Obecně je vitamín K velmi citlivý vůči přítomnosti světla, alkáliím, silným kyselinám či redukčním činidlům. Naopak v prostředí oxidačních látek je stabilní. Redukčním působením ztrácí tyto vitamíny biologickou aktivitu a vznikají hydrochinony s fluorescenčními vlastnostmi [3, 10].

#### **2.1.5.5 Zdroje vitamínu K**

V přírodě je vitamín K zastoupen v potravě rostlinného i živočišného původu. Rostlinné zdroje obsahují fytochinon, který vzniká během fotosyntézy v zelených částech rostlin či u řas. Významné jsou hlavně některé druhy zeleniny – špenát, kapusta, květák, brokolice aj. Ze živočišných zdrojů vitamínu K jsou nejbohatší játra [5, 12].

### **2.1.6 Přehled hydrofilních vitamínů**

#### **2.1.6.1 Vitamín B<sub>1</sub> (Thiamin)**

Thiamin, dříve zvaný aneurin, je prvním vitamínem B-komplexu, jehož nedostatek v krajním případě způsobuje nemoc beri-beri (avitaminóza). Výskyt této nemoci je v dnešní době vzácný,

jelikož má vitamin v přírodě hojné zastoupení mezi rostlinnými i živočišnými produkty. Významné zdroje představují zejména kvasnice, které jsou schopné biosyntézy tohoto vitaminu, dále rýže, obiloviny, luštěniny, maso a masné výrobky, ovoce a zelenina [5, 12].

Pro organismus jsou podstatné dvě biologicky aktivní formy thiaminu. První, thiamindifosfát (TDP), se jako koenzym účastní řady enzymatických reakcí. Působí v metabolismu sacharidů, kde se podílí na přeměně pyruvátu na acetyl-CoA (pyruvátdehydrogenáza), v pentózovém a citrátovém cyklu a také v metabolismu aminokyselin. Druhou formu představuje thiamintrifosfát (TTP) působící v nervových a svalových tkáních [5].

#### **2.1.6.2 Vitamin B<sub>2</sub> (Riboflavin)**

Riboflavin se již podle názvu řadí do skupiny flavinových látek. V organismu se vyskytuje volně nebo ve své fosforylované formě jako součást oxidačně redukčních enzymů. Nejčastěji se jedná o koenzymy flavinových (též žlutých) enzymů, převážně flavinmononukleotidy (FMN) a flavinadenindinukleotidy (FAD), které se uplatňují při přenosu vodíkových iontů. Svou funkcí riboflaviny přispívají také k vidění za šera (převádí modré paprsky na žlutohnědé) nebo k metabolismu jiných vitaminů B-komplexu (např. niacinu) [4, 5].

V přírodě je tento vitamin velice rozšířený a je obsažen ve stejných zdrojích jako thiamin [4, 13]. Hypovitaminóza není příliš častá, může se objevit například při dlouhodobějším průjmovém onemocnění a obvykle se vyskytuje paralelně s hypovitaminózami jiných vitaminů skupiny B [5, 12, 13]. Postihuje zejména kůži a sliznici a mezi její typické příznaky patří ragády ústních koutků, praskání rtů, seboroická dermatitida a oční poruchy [12].

#### **2.1.6.3 Niacin**

Pojem niacin zahrnuje skupinu dvou příbuzných látek (kyselinu nikotinovou, nikotinamid) a jejich deriváty. Kyselina nikotinová byla původně označována jako vitamin PP díky svému antipelagrovému principu. Hlavní funkce niacinu vzniká v souvislosti s nukleotidy, se kterými se váže ve formě amidu kyseliny nikotinové. Společně představují nezbytné koenzymy (NAD, NADP) podílející se na přenosu vodíku a jsou součástí dehydrogenáz. Současně má kyselina nikotinová silné vazodilatační účinky [4, 5].

V těle může být niacin syntetizován z esenciální aminokyseliny tryptofanu v jaterní tkáni za přítomnosti vitaminů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> a K. V potravě je obsažen zvláště v kvasnicích, játrech, masu a v obilovinách. Těžký nedostatek (avitaminóza) se projevuje jako pelagra [5, 13].

#### **2.1.6.4 Vitamin B<sub>6</sub> (Pyridoxin)**

Pyridoxin je souhrnné označení pro skupinu tří látek – pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin, též označovaných jako pyridoxinová triáda. S kyselinou fosforečnou vytváří významné estery působící jako prostetické skupiny mnoha enzymů. Uplatňují se především v metabolismu aminokyselin u transamináz a dekarboxyláz, při přeměně tryptofanu na niacin, v metabolismu cukrů a tuků. Podstatné jsou také pro správnou funkci nervové a imunitní soustavy [5, 13].

Bohatými zdroji jsou rostlinné i živočišné produkty, obzvláště sójové boby, pšeničné klíčky, droždí, maso a vnitřnosti [5]. Nedostatek se projevuje kožními změnami, zvýšenou dráždivostí či křečemi [12, 13].

#### **2.1.6.5 Vitamin B<sub>12</sub> (Kyanokobaltamin)**

Vitamin B<sub>12</sub> obsahuje porfyrinový skelet s centrálně vázaným atomem kobaltu a jeho vstřebávání v těle závisí na přítomnosti vnitřního faktoru v tenkém střevě. V aktivní formě působí jako koenzym a podílí se na přenosu methylových skupin. Je důležitý pro krvetvorbu, syntézu nukleových kyselin a metabolismus aminokyselin a bílkovin [5]. Při nedostatečném příjmu se může objevit anémie, glositida, změny žaludeční sliznice a poruchy nervové soustavy [13]. Hlavním zdrojem tohoto vitamínu jsou játra, maso a další živočišné produkty. Rostlinná strava obsahuje pouze stopová množství [5].

#### **2.1.6.6 Kyselina listová**

Kyselina listová (folová, pteroylglutamová) působí v organismu zejména v jaterní a hematopoetické tkáni. K jejím funkcím patří syntéza nukleových kyselin, krvetvorba, metabolismus aminokyselin a přenos jednonukleotidových skupin. Vstřebávání probíhá ve střevech a je ovlivňováno řadou faktorů – formou přijaté látky, složením potravy, přítomností alkoholu a drog, genetickými faktory atd. V přírodě jsou zastoupeny převážně její deriváty – foláty, které však disponují nižší biologickou účinností. Nejbohatší výskyt kyseliny listové vykazují zdroje rostlinného původu, konkrétně zelené části rostlin, z živočišných zdrojů jsou to játra. Hypovitaminóza způsobuje anémii, na rozdíl od hypovitaminózy B<sub>12</sub> však nevznikají neurologické potíže [4, 5].

#### **2.1.6.7 Kyselina pantotenová**

U lidí a zvířat představuje kyselina pantotenová důležitý faktor pro růst, reprodukci a optimální funkci organismu. Její biologické působení je podmíněno přítomností β-alaninu ve struktuře látky. Při nahrazení této aminokyseliny jinou dochází ke ztrátě funkce vitamínu. Kyselina pantotenová tvoří optické izomery, přičemž L(-) formy jsou rovněž fyziologicky neaktivní [5].

V těle slouží jako součást koenzymu A. Podílí se tak na přenosu zbytku karboxylových kyselin a zasahuje do metabolismu sacharidů, lipidů i aminokyselin. Je obsažena téměř ve všech potravinách a její příjem je zajištěn normální denní stravou, proto se její hypovitaminóza prakticky nevyskytuje [4, 5].

#### **2.1.6.8 Vitamin H (biotin)**

Biotin může být, na rozdíl od většiny vitaminů, syntetizován v těle střevní mikroflórou. V potravě se vyskytuje volně nebo vázaný na bílkoviny. S albuminem díky silné vazbě vytváří nevstřebatelný a tedy pro organismus nevyužitelný avidin-biotinový komplex. Naopak nejbohatším zdrojem jsou játra. Biotin má v přírodě zastoupení v podobě osmi stereoizomerů, z nichž biologickou aktivitu vykazuje pouze D-biotin. Působí ve formě koenzymu v mnoha enzymatických reakcích, zejména při karboxylačních procesech [5, 13].

### **2.1.6.9 Vitamin C (kyselina askorbová)**

Kyselina askorbová se uplatňuje ve většině biologických pochodů a zabezpečuje jejich správnou funkci [4]. Je schopná reverzibilních přenosů elektronů, dokud si zachovává kruhovou strukturu. Při pasterizaci, vaření či delším skladování dochází k porušení této struktury a ztrátě biologické aktivity [5, 13]. V organismu má vitamin C řadu funkcí. Podílí se na tvorbě kolagenu, keratinu a mezibuněčné hmoty, je důležitý pro činnost osteoblastů, krvetvorbu, přeměnu kyseliny listové, metabolismus tryptofanu a fenylalaninu, syntézu steroidů v nadledvinkách atd. V neposlední řadě napomáhá v boji proti infekci a při ochraně mastných kyselin před oxidací [4, 5, 13]. V potravě se vyskytuje hlavně v čerstvém ovoci a zelenině a v případě avitaminózy vzniká skorbut (kurděje) [4, 5].

## **2.2 Aplikace lipofilních vitaminů**

### **2.2.1 Medicína**

Retinoidy označují skupinu přírodních i syntetických látek vykazujících biologickou aktivitu vitamínu A. Jsou děleny do tří generací na základě aromaticity. V organismu se vážou na speciální proteiny (retinol-binding protein, RBP), které umožňují jejich transport po těle [23]. S cílovými buňkami interagují většinou prostřednictvím jaderných receptorů kyseliny retinové a retinoidů X a ovlivňují tak transkripci genů. Kontrolují růst a diferenciaci mnoha typů kožních buněk (keratinocytů, fibroblastů), stimulují epidermální buněčnou proliferaci a v hyperproliferačních tkáních ji naopak normalizují. Podílí se na obnově epitelu, kompenzují inhibiční působení sterolů na protizánětlivé faktory a usnadňují hojení ran [23, 24]. V současnosti jsou retinoidy široce užívány v oblasti dermatologie. Díky svým protizánětlivým a imunomodulačním vlastnostem se aplikují při léčbě lupénky, zánětlivých dermatóz, akné a dalších poruch mazových a apokrinních žláz. Uplatňují se také proti vlivům stárnutí a fotostárnutí (viz kosmetické aplikace) [23, 25].

Vitamin D je klasicky využíván při léčbě zlomenin, tuberkulóz či dermatologických onemocnění a jako prevence křivice a osteomalacie [3]. Největší potenciál však představuje v medicínských aplikacích jeho použití v boji proti různým typům rakoviny. Bylo zjištěno, že hladiny aktivních forem vitamínu D v těle souvisí s výskytem této nemoci a byly prokázány jejich diferenciační a proliferační účinky na nádorové buňky. Výzkumy jsou však spojené s problémy testování na lidech a je také nutné stanovit tolerovatelná množství vitamínu D kvůli případné intoxikaci [26, 27].

Také vitamin E je v současné době v medicíně hojně využíván. Esterifikace sukcinátu vitamínu E s polyethylenglykolem 1000 dává vzniku tzv. vitamínu E TPGS, zkráceně TPGS (d- $\alpha$ -tokoferyl polyethylenglykol 1000 sukcinát), jež byl schválen jako bezpečná biokompatibilní farmaceutická látka s podpůrnými vlastnostmi (adjuvans). TPGS je uplatňován při inkorporaci léčiv, zvyšování jejich rozpustnosti a permeace. Zároveň disponuje selektivní toxicitou k nádorovým buňkám, je schopný inhibovat P-glykoprotein a omezovat tak rezistenci těchto buněk vůči léčivům. Hydrofobní část (sukcinát) navíc může sloužit jako doplněk vitamínu E a hydrofilní (PEG 1000) umožňuje tvorbu micel [28, 29].

### **2.2.1.1 COVID-19**

Vzhledem k současné celosvětové pandemické krizi je často diskutována role vitamínu D v souvislosti s onemocněním COVID-19. Několik studií již prokázalo příznivé účinky suplementace tohoto vitamínu na snižování rizika akutních virových infekcí dýchacích cest, avšak spojitost mezi hladinami vitamínu a úmrtností je stále neprůkazná. Faktem zůstává, že nedostatek vitamínu D je v dnešní populaci běžný, proto by se mělo dbát na udržování optimální hladiny cirkulujícího 25 (OH) D – kalcidiolu kvůli podpoře imunitního systému [30, 31].

### **2.2.2 Potravinářství**

Přísun veškerých potřebných živin by měl být zajištěn běžnou vyváženou stravou, v mnoha zemích je však nedostatek vitamínů častým problémem, který zasahuje všechny věkové kategorie. Největší dopady mívá na děti a těhotné ženy, může způsobit závažné stavy, dokonce vést ke smrti. Řešením je okamžité doplnění vitamínů v případě již existujícího deficitu. Z dlouhodobého hlediska je možná prevence konzumací rozmanité stravy či fortifikovaných potravin [32].

Vitamíny patří mezi labilní složky potravy, jejichž obsah se časem prokazatelně snižuje v závislosti na působení vnějších faktorů (teplo, vlhko, kyslík, pH, světlo). Stabilita klesá také v přítomnosti různých látek, které s vitamíny interagují [33]. Fortifikace je využívána ke zvyšování množství jednoho nebo více vitamínů v potravinách bez ohledu na to, zda jsou jejich přirozeným zdrojem [34]. Opírá se o studie zabývající se nedostatky mikroživin a je založena na potřebách cílové skupiny nebo populace na daném území a v daném ročním období. Nejvíce obohacovány jsou potraviny vitamíny A, B, C a D [32, 34]. K fortifikaci vitamínem A jsou často užívány syntetické  $\beta$ -karoteny, které se přidávají zejména do olejů a margarínů. Mezi produkty doplňované vitamínem D patří například mléko, mléčné výrobky a také margaríny [34].

### **2.2.3 Kosmetika**

Vitamíny patří mezi základní živiny potřebné pro život. Ovlivňují metabolismus veškerých orgánů lidského těla, čímž se zásadně odlišují od většiny kosmetických látek. Při jejich nedostatku je časté poškození kůže, které bývá také jedno z prvních indikátorů deficitu. Na druhou stranu má aplikace vitamínů na pokožku řadu pozitivních účinků. Z lipofilních vitamínů jsou v kosmetice nejvíce využívány vitamíny A a E [35].

Kůže přirozeně podléhá procesu stárnutí, při kterém dochází k jejímu ztenčení, úbytku kolagenu v tkáni (cca 1 % ročně) a ztrátě některých bariérových vlastností. Schopnost vázat vodu je často omezená, kůže je suchá a může praskat [35]. Vitamin A působí proti těmto vlivům. Reguluje obnovu epidermálních keratinocytů (starší buňky jsou nahrazovány nově vytvořenými, rohovatí a jsou odstraněny z povrchu kůže), podporuje zesílení epidermis a zvyšuje obsah elastinu, fibrinu a kolagenu, který má navíc větší odolnost [25, 35, 36]. Vitamin přispívá k redukci vrásek a k sourodější pigmentaci, jeho účinkem se kůže jeví hladší a pružnější [25].

V organismu se neustále tvoří volné radikály ať už prostřednictvím biologických reakcí či vlivem vnějších chemických a fyzikálních faktorů. Mezi nejběžnější patří UV záření, které při nadměrném působení vyvolává v kůži oxidační stres a po vyčerpání přirozené vnitřní kapacity antioxidantů poškozuje tkáň. Dochází k oslabení imunity a v krajním případě může vznikat rakovina kůže. Vitamin E v těle pracuje jako neenzymatický antioxidant. Nejčastěji je aplikován ve formě esterů, které vykazují vyšší stabilitu a jsou hydrolyticky aktivovány po průchodu kožními vrstvami. Vitamin je užíván v kosmetických přípravcích k posílení antioxidační aktivity pokožky, ochraně před slunečním zářením, případně k prevenci a redukci příznaků jeho působení (tvorba vrásek, erytémů, otoků a nepravidelné pigmentace). Zlepšuje také schopnost zadržování vody a hydrataci kůže [35, 36].

## 2.3 Metody stanovení

### 2.3.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je analytická metoda pro identifikaci a kvantifikaci látek, která studuje interakce světla s hmotou. Během interakcí dopadající fotony předávají svou energii částicím, které ji mohou pohltit či opětovně vyžářit. Míra absorpce přitom závisí na vlnové délce světla a je charakterizována veličinou transmitancí udávající nejčastěji v procentech, o kolik se snížila intenzita záření po průchodu danou látkou. Počítá se jako poměr intenzity prošlého ( $I$ ) a vstupního ( $I_0$ ) světla podle vzorce:

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100 \quad (2.1)$$

a dosahuje maximální hodnoty 100 % v případě plně propustného vzorku. Její útlum nastává při zvyšujícím se množství absorbujících molekul v dráze šíření a pro dokonale nepropustný vzorek klesá až na 0 %. Absorbance je definována jako záporný dekadický logaritmus transmitance:

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0}. \quad (2.2)$$

Jedná se o bezrozměrnou aditivní veličinu vypovídající o množství absorbovaného světla vzorkem, která nabývá hodnot 0 až nekonečno. Absorbance je přímo úměrná koncentraci  $c$  podle Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (2.3)$$

kde  $\varepsilon$  je absorpční (extinkční) koeficient a  $l$  je délka optické dráhy. Absorpční koeficient vyjadřuje schopnost molekuly absorbovat světlo určité vlnové délky a je závislý na jednotkách koncentrace. Typicky se  $c$  udává v jednotkách molarity,  $l$  jakožto délka kyvety v cm a  $\varepsilon$  poté v jednotkách  $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Lambert-Beerův zákon tedy udává lineární závislost absorbance na délce dráhy a koncentraci vzorku, platí ovšem pouze při velkém zředění [37].

K měření se využívá přístroj zvaný spektrofotometr sestávající z několika základních částí. První je zdroj záření, u kterého je požadován stabilní výkon a pokrytí širokého rozsahu vlnových délek. Běžně využívaná je deuterinová výbojka, xenonová lampa či žárovka

s wolframovým vláknem. Následuje monochromátor (optický filtr, difrakční mřížka nebo hranol), který vybírá jednu vlnovou délku napříč spektrem. Záření dále prochází kyvetou se vzorkem o známé tloušťce umístěnou kolmo na směr šíření paprsku. Prošlé fotony dopadají na detektor (fotodiodu), zaznamenaný signál je zesílen a následně digitalizován [37].

UV-VIS spektrofotometrie je rychlou a levnou analytickou metodou, vhodnou pro kvantifikaci a kontrolní analýzu lipofilních vitaminů. Její nevýhoda však spočívá v nedostatečné specifčnosti absorpce tohoto záření a překrývání spekter jednotlivých vitaminů (především D a E), což znemožňuje jejich současné stanovení [38].

### 2.3.2 Fluorimetrie

Fluorimetrická stanovení využívají jevu zvaného fotoluminiscence, při kterém je fotoluminiscenční látka vystavena elektromagnetickému záření o dostatečné energii za excitace jejich elektronů. Po návratu elektronů zpět do nižších energetických hladin dochází k uvolnění části energie ve formě fotonů a vzniku emitovaného záření vždy o vyšší vlnové délce (tj. nižší energii), než mělo záření excitační. Hodnota vlnové délky přitom závisí na chemické povaze sloučeniny. Ustává-li tento jev prakticky ihned po odstranění zdroje záření, hovoříme o fluorescence. Fluorescence mnoha látek je povětšinou závislá na řadě parametrů okolního prostředí – teplotě, pH či povaze rozpouštědla. Její intenzita je přímo úměrná koncentraci flouoroforu v rozsahu několika řádů, avšak při vyšších koncentracích dochází k samovolnému potlačování fluorescence – zhášení. Zhášení může vznikat i za přítomnosti rušivých faktorů a patří k hlavním negativům této metody [39, 40].

Fluorimetry se skládají ze zdroje záření, nejčastěji halogenové žárovky či xenonové výbojky, dvou optických monochromátorů umístěných před a za vzorkem a detektoru. Fluorescence je měřena vždy pod úhlem  $90^\circ$  a emitovaný signál vybrané vlnové délky je zesílen po dopadu na fotonásobič [39]. Těto metody lze využít nejen pro přirozené flouorofory, ale také pro nefluoreskující látky po navázání fluorescenčního činidla či chemické úpravě [40].

Ačkoliv není fluorimetrické stanovení v tučích rozpustných vitaminů příliš časté, byly vyvinuty mnohé postupy této techniky speciálně využívající. Mezi možné aplikace se tak řadí například metoda analýzy tokoferolu v tkáních [41].

### 2.3.3 Chromatografie

Chromatografie je analytická metoda, která slouží k separaci složek analytu na rozhraní dvou fází v pevném, kapalném či plynném skupenství. Mobilní neboli pohyblivá fáze protéká skrz fázi stacionární, nepohyblivou, a unáší s sebou složky směsi rozdílnou rychlostí. Oddělení probíhá na základě odlišných afinit látek k jednotlivým fázím, přičemž mechanismus interakce může být různý (např. polarita). Složky s větší afinitou ke stacionární fázi budou touto fází zbrzděny a budou kolonou postupovat pomaleji. Celková doba, kterou analyt stráví v koloně, se nazývá retenční čas [42].



Chromatografické metody jsou děleny především podle fyzikálního stavu mobilní fáze, která může být představována plynem (GC), kapalinou (LC) nebo superkritickou tekutinou (SFC). K subklasifikaci těchto metod přispívá také stacionární fáze, která se vyskytuje v pevném či kapalném skupenství [42].

Ačkoli se jedná o separační metodu, je chromatografie klasicky kombinována se spektroskopickými metodami (absorpční, hmotnostní spektroskopie) a spektrometry jsou již běžnou součástí chromatografů. Výstupem měření jsou tzv. chromatogramy, které zobrazují odezvy detektoru jako funkci času a pro něž lze chromatografii využít ke kvalitativní i kvantitativní analýze. Při kvalitativní analýze se uplatňují zadržovací parametry (např. retenční čas), které jsou porovnávány s tabelovanými hodnotami. U kvantifikace se naopak sledují výšky nebo plochy píků [42].

V současné době patří chromatografie mezi základní metody stanovení vitaminů. Často aplikovaná je především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) pro svou citlivost, selektivitu a snadné použití. Jedná se o rychlou a plně automatizovanou metodu umožňující stanovení lipofilních vitaminů v jedné analýze, avšak s nutností předúpravy vzorku [43, 44].

## 2.4 Enkapsulace

Enkapsulace představuje proces úplného obalení aktivních látek do nosného systému, který poskytuje fyzikálně-chemickou bariéru a chrání látku před vlivy vnějšího prostředí. Cílem zapouzdření je zlepšení transportu a biologické účinnosti aktivních složek, zachování jejich biologických funkcí během zpracování a skladování, zabránit interakci s komponentami potravy a zajistit tak vyšší stabilitu. Tato technologie navíc umožňuje řízené uvolňování, zamaskování nepříjemné chuti a vůně či vhodné pozměnění fyzikálních vlastností látek například za účelem snazší manipulace. Produkované částice obvykle dosahují poloměrů v řádech několika nanometrů až milimetrů. Nosné materiály, též zvané obaly, kapsle či matrice, jsou nejčastěji tvořeny polysacharidy, využívané jsou také proteiny a lipidy. Tyto materiály musí být inertní vůči zabudované látce a v rámci cílené aplikace musí splňovat stanovená kritéria. Nejprísnější požadavky jsou kladeny v potravinářství, kde musí matrice spadat pod GRAS materiály (obecně uznávané jako bezpečné) a být biologicky odbouratelná [45, 46].

Všechny vitaminy vykazují v čase určitou nestabilitu a jsou degradovány působením řady faktorů během procesu zpracování a skladování. Často náchylné bývají k vlivům světla, teploty, kyslíku, pH, vlhkosti či přítomnosti iontů přechodných kovů, jež podmiňují jejich významné ztráty. V této souvislosti je proto vhodná ochrana vitaminů za využití enkapsulace vedoucí ke zlepšení stability [47, 48]. Mezi možné techniky jejich zapouzdření se řadí sprejové sušení a chlazení, extruze, emulgate, fluidní vrstva, koacervace, kokrytalizace a enkapsulace pomocí liposomů [49, 50].

### **2.4.1 .Sprejové sušení**

Sprejové sušení je jednou z nejstarších a vzhledem k ekonomice a účinnosti také jednou z nejrozšířenějších enkapsulačních technik [45, 50]. V potravinářském průmyslu může pokrývat až 90 % připravovaných částic [45]. Nejprve dochází ke smíchání zapouzdřované látky s nosným materiálem. Homogenizovaná směs je vnášena do sušárny a rozprašována tryskou. Následuje odpařování vody horkým vzduchem a vznikající kapsle se hromadí na dně sušárny, odkud jsou sbírány [50, 51]. Tato metoda vede k tvorbě částic s dobrou kvalitou a velikostí do 40  $\mu\text{m}$  [45, 51].

### **2.4.2 Sprejové chlazení**

Na rozdíl od předchozí metody sprejové chlazení nezahrnuje odpařování vody [51]. Směs obalované a obalující látky je rozprašována do ochlazené komory nebo chlazená proudem vzduchu [46, 52]. Dochází k tuhnutí stěny kolem jádra tvořeného aktivní složkou a k vytvoření kapsle. Jako vnější materiály jsou obvykle používány oleje a jejich deriváty, které poskytují lipidové potahy a tedy hydrofobní charakter kapslí. Typicky se proto metoda využívá k zapouzdření ve vodě rozpustných látek [51].

### **2.4.3 Extruze**

Extruze, též vytlačování, využívá jako potahovací materiál taveninu sacharidů, která je spolu s jádrem tlačena přes trysky do lázně obsahující dehydratační kapalinu. Nosič při kontaktu s tímto rozpouštědlem tuhne a zachytává enkapsulovanou látku. Následně jsou kapsle vysušeny a upravovány na požadované velikosti. Metoda může vést k přípravě částic o velikosti až 50  $\mu\text{m}$  (elektrostatická extruze) a bývá často využívána k enkapsulaci příchutí [45, 51].

### **2.4.4 Emulgace**

Emulgace je technika užívaná pro hydrofilní aktivní látky, při které jsou připravovány emulze olej/voda či voda/olej anebo dvojité emulze voda/olej/voda. Mikrokapsle se tvoří po odpaření rozpouštědla během sušení, které může probíhat řadou metod. V případě sušení emulze typu olej ve vodě sprejovým chlazením nebo lyofilizací lze získat částice ve formě prášku [45].

### **2.4.5 Fluidní vrstva**

Obalování fluidní vrstvou je další z řady enkapsulačních technik, která se využívá k zapouzdření ve vodě rozpustných složek. Aktivní částice jsou suspendovány v proudu ohřivaného vzduchu v komoře s regulovanou teplotou a vlhkostí a dochází k jejich postřiku atomizovaným potahovým materiálem [45, 51, 52]. Potážené částice jsou následně ochlazeny za vytvoření kapslí s pevnou skořápkou [52]. Nosným materiálem může být vodný roztok celulózy, škrob či bílkoviny a jejich deriváty [45].

#### **2.4.6 Koacervace**

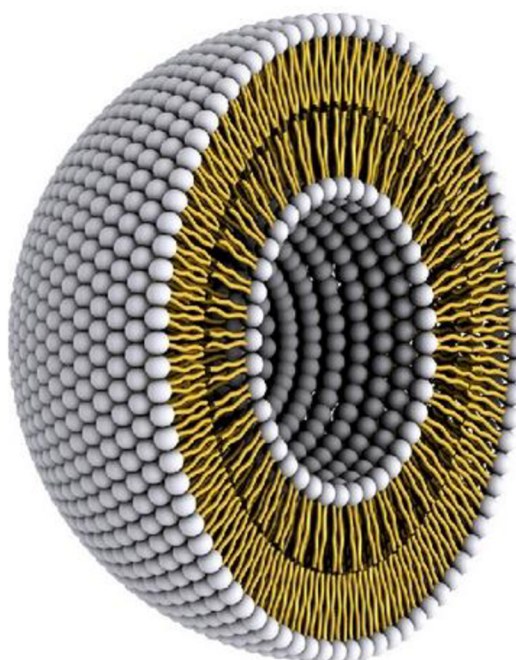
Koacervace je proces, který zahrnuje tři po sobě jdoucí kroky – tvorbu tří nemísitelných fází, nanášení povlaku a tuhnutí povlaku. Podle mechanismu vzniku fází v prvním kroku jsou rozlišovány metody jednoduché a komplexní. Během této techniky je polymerní roztok rozdělen na fázi bohatou (koacervát) a chudou (koacervační médium) na polymery [53]. Kolem jádra se hromadí koacervát, který se adsorbuje na povrch materiálu. Následně dochází ke stabilizaci pomocí zesíťovacích činidel a po ztuhnutí se mikrokapsle shromažďují filtrací nebo centrifugací [51, 52]. Proces je využíván zejména k enkapsulaci kapalin nemísitelných s vodou či pevných látek ve vodě nerozpustných [52].

#### **2.4.7 Kokrystalizace**

U kokrystalizace je nosný materiál, sacharózový sirup, udržován ve stavu přesycení při dostatečně vysoké teplotě bránící krystalizaci. Koncentrovaný roztok je intenzivně míchán a obohacen o přesně stanovené množství materiálu jádra. Zapouzdření probíhá po dosažení potřebné teploty a krystalizace sirupu. Dle nutnosti jsou vzniklé kapsle dále zbavovány přebytečné vlhkosti a tříděny podle velikostí [51].

#### **2.4.8 Liposomy**

Liposomy jsou uměle připravené sférické vezikuly sloužící obvykle k transportu léčiv, hormonů, enzymů a vitaminů. Tvořeny jsou na základě hydrofilně-hydrofobních interakcí z tělu vlastních, a tedy netoxických látek – lipidů a cholesterolu [45, 50]. Fosfolipidy se ve vodě formují do liposomů samovolně, vytváří fosfolipidové dvojvrstvy, které jsou svými hydrofobními částmi přivraceny k sobě a hydrofilními do vodného prostředí. Vzhledem k amfipatickým vlastnostem jsou schopny uchovávat vodné i lipidové materiály ve svém jádře či přímo ve stěně membrány [50, 54]. Liposomy dosahují rozměrů od 25 nm až po několik mm a jsou členěny do dvou tříd podle počtu lipidových dvojvrstev. První skupinou jsou liposomy obsahující pouze jednu lamelu, tedy unilamelární, které jsou dále děleny podle velikosti na malé (SUV) a velké (LUV) vezikuly. U multilamelárních liposomů (MLV) se pak vyskytuje minimálně dvě nebo více vrstev. Stabilita a další vlastnosti liposomů jsou značně proměnlivé v závislosti na povrchovém náboji, velikosti, složení lipidů (saturaci mastných kyselin) a způsobu přípravy. Některé z přípravných metod jsou uvedeny v následujících kapitolách [51, 54].



Obrázek 6: Struktura liposomu [55]

#### **2.4.8.1 Hydratace lipidového filmu**

Při této metodě je směs lipidů a cholesterolu rozpuštěná v organickém rozpouštědle odpařována za vytvoření suchého lipidového filmu na stěnách nádoby. Po přidání vodného roztoku dochází za stálého míchání k formování a vzniku multilamelárních liposomů [56, 57].

#### **2.4.8.2 Odpaření reverzní fáze**

Stejně jako v předchozím případě je lipidový film připraven odpařením organického rozpouštědla, avšak následuje znovu rozpuštění v další organické fázi. Zavedení vodného pufru do připravené směsi a odstranění rozpouštědla vede k přípravě velkých unilamelárních vezikul tvořených ze značné části vodným objemem. Metoda je vysoce účinná i při zapouzdření makromolekulárních látek [56].

#### **2.4.8.3 Sonikace**

Sonikace je běžnou metodou aplikující zvukovou energii pro produkci malých unilamelárních vezikul o velikosti 15-50 nm. Provádí se za pomoci sonikátorů typu lázně či sondy a vede k přípravě částic s velmi malým vnitřním objemem. Vzhledem k obtížné reprodukci ultrazvukových podmínek je však častá velikostní variabilita částic jednotlivých sérií [54, 58].

#### **2.4.8.4 Vstřikování rozpouštědla**

Technika vstřikování zahrnuje rozpuštění lipidové složky v organickém rozpouštědle (etheru či ethanolu) s následným vstřikováním této směsi do prostředí vodného média. Při použití etheru se vodná fáze zahřívá nad teplotu varu tohoto rozpouštědla nebo se pracuje za sníženého tlaku [56, 58]. Po vstřikování pak dochází k odpaření etheru a výsledkem je tvorba malých unilamelárních vezikul. SUV vznikají také metodou vstřikování ethanolu [57]. Rozpouštědlo se zde ředí ve velkém nadbytku vodné fáze a jeho koncentrace klesá pod kritickou hodnotu, která zapříčiní spontánní formaci liposomů [57, 58].

## 2.5 Metody charakterizace liposomů

Vzhledem k využívání a aplikacím liposomů je nutná adekvátní kontrola jejich kvality zhodnocením řady parametrů. Mezi nejběžnější charakteristiky patří sledování enkapsulační účinnosti, velikosti, složení a stability vezikul [56].

### 2.5.1 Enkapsulační účinnost

Účinnost zapouzdření je veličina udávaná v procentech jako poměr aktivní látky začleněné do nosiče k celkovému vstupnímu množství použitého pro enkapsulaci [59]. K jejímu stanovení je zapotřebí nejprve oddělit připravené částice od média s volnou aktivní látkou a narušit obal lipidové dvojvrstvy. K vlastní kvantifikaci jsou běžně využívány spektrofotometrické metody, fluorescenční spektroskopie či vysokoúčinná kapalinová chromatografie [56].

### 2.5.2 Velikost

Vhodnou technikou pro sledování distribuce velikosti vezikul je dynamický rozptyl světla (DLS) neboli fotonová korelační spektroskopie (PCS). Metoda je postavena na principu náhodného Brownova pohybu částic podléhajících srážkám s molekulami obklopující kapaliny, který souvisí právě s velikostí. Menší částice si zachovávají vyšší rychlosti, naopak větší se pohybují pomaleji. Za předpokladu rozdílného indexu lomu oproti rozpouštědлу jsou schopny suspendované částice po ozáření laserem světlo rozptýlit. Měření časové závislosti rychlosti fluktuace intenzity rozptýleného světla pak podává potřebné informace k dopočtu hledaných velikostí [56, 60].

### 2.5.3 Stabilita

Částice při kontaktu s vodným roztokem získávají náboj v závislosti na pH tohoto prostředí a dochází k tvorbě elektrické dvojvrstvy. První vrstvou kapaliny obklopující částici představuje tzv. Sternova vrstva, ve které jsou ionty pevně vázány. V následující difuzní oblasti jsou již ionty přitahovány slaběji a při pohybu spolu s částicí migruje pouze část této vrstvy. Pomezí pohyblivé a nepohyblivé části se nazývá rovina skluzu a elektrostatický potenciál na této hranici je označován jako potenciál zeta (ZP) [56, 60].

Znalost velikosti zeta potenciálu je určující pro stanovení stability částic koloidního systému. V oblasti -30 až +30 mV jsou mezi částicemi slabé odpudivé síly, což vede k jejich shlukování. Naopak, dosahují-li částice velkých záporných či kladných hodnot, vzájemně se odpuzují a jsou považovány za stabilní [60].

### 3 CÍL PRÁCE

Hlavní náplní této práce je příprava a charakterizace funkčních potravin a kosmetických produktů s obsahem vybraných vitamínů. V jejím rámci byla řešena a diskutována problematika  $\beta$ -karotenů, cholekalciferolů a tokoferolů se zaměřením na následující úkoly:

1. Zpracování rešerše na dané téma.
2. Optimalizace metod pro stanovení vybraných vitamínů a aktivních látek.
3. Příprava a charakterizace potravinářských a kosmetických produktů s obsahem vybraných vitamínů.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy Pioneer PX224, Ohaus (USA)

Automatické pipety, Discovery (DE)

Centrifuga – U-32 R, Boeco (DE)

Centrifuga MiniSpin plus, Eppendorf (DE)

Chromatografická sestavě Dionex UltiMate 3000 s DAD detektorem řady Vanquish, Thermo Fischer (USA)

Koloidní DLS analyzátor – ZetaSizer Nano ZS, Malvern (UK)

Kolona Kinetex C18 EVO, 5 mm, 4,6 x 150 mm

Magnetická míchačka s ohřevem, Benchmark (USA)

Mini Vortex Mixer, Fixed Speed, Ohaus (USA)

pH metr – pH 50 VioLab benchtop, XS Instruments (IT)

Předvážky CS200, Ohaus (USA)

Termostat blokový digitální, VWR international (USA)

Ultrazvuková čistička PS 02000, Powersonic

Ultrazvukový homogenizátor – Bandelin Sonoplus HS3200, Sonorex Technik (DE)

Vortex-Genie 2, Scientific Industries (USA)

### 4.2 Použité chemikálie

Acetonitril, HPLC gradient grade, Chem-Lab (BEL)

$\beta$ -karoten, Sigma Aldrich (DE)

Bile salts – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma Aldrich (DE)

Chloroform stabilizovaný ~ 1% ethanolu p.a., Penta (ČR)

Cholekalciferol  $\geq$  98% (HPLC), Sigma Aldrich (DE)

Cholesterol – směs 5-Cholesten-3 $\beta$ -olu a 3 $\beta$ -Hydroxy-5-cholestenu, Sigma Aldrich (DE)

Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát, Lachema (ČR)

Ethanol, UVAPUR, BC – CHEMSERVIS (ČR)

Ethylacetát, ROTISOLV<sup>®</sup> HPLC, Carl Roth (DE)

n-Hexan 99% p.a., Penta (ČR)

n-Hexan RS - pro HPLC - Isocratic grade, Carlo Erba (FRA)

Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Serva (USA)  
Hydrogenuhličitan sodný p.a., Penta (ČR)  
Hydroxid sodný, Lach:Ner (ČR)  
Kyselina chlorovodíková 35% p.a., Lach:Ner (ČR)  
Kyselina sírová 96% p.a., Penta (ČR)  
L- $\alpha$ -Fosfatidylcholin ze sóje, Sigma Aldrich (DE)  
Metanol, HPLC grade, Chem-Lab (BEL)  
Pankreatin z vepřové slinivky, Sigma Aldrich (DE)  
Pepsin z vepřové žaludeční sliznice, Sigma Aldrich (DE)  
( $\pm$ )- $\alpha$ -tokoferol, Sigma Aldrich (DE)

### **4.3 Použité reálné potraviny a kosmetické produkty**

Cereálie CINI MINIS, Nestlé  
Krém pod oči s vitamínem E, Ziaja (POL)  
Krém proti vráskám květ slunečnice, Ziaja (POL)  
Rybí olej Omega 3 s citronovou příchutí, Möller's (NOR)  
Slunečnicový olej BIO DEO, CZ-BIO-003 Zemědělská produkce EU

### **4.4 Příprava roztoků pro kalibrační řadu**

Roztoky standardů byly přichystány navážením vždy 10 mg vzorku, které byly rozpuštěny ve směsi ethylacetátu a acetonitrilu (2:1) a doplněny na objem 10 ml. Následným ředěním byly připraveny kalibrační řady roztoků v koncentračním rozmezí od 0,005 do 0,2 mg/ml.

### **4.5 Analýza vzorků metodou HPLC**

Veškeré vzorky byly podrobeny binární gradientové eluci s průtokem mobilní fáze 1,2 ml/min při teplotě 25 °C. Měření probíhalo na chromatografické sestavě Dionex UltiMate 3000 s DAD detektorem řady Vanquish a kolonou C18. Složení a gradientovou změnu mobilní fáze v daných časech uvádí tabulka 1 a 2.  $\beta$ -karoten, cholekalciferol a tokoferol byly identifikovány při vlnové délce 450, 293 a 265 nm v uvedeném pořadí.



Tabulka 1: Složení mobilní fáze

Mobilní fáze	Složení	% zastoupení
A	acetonitril	84
	methanol	2
	trisHCl, pH=8	14
B	ethylacetát	40
	methanol	60

Tabulka 2: Časová změna gradientu mobilní fáze

Retenční čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
25	100	0

## 4.6 Příprava liposomů

Do Eppendorfovy zkumavky bylo naváženo 10 mg vzorku, 10 mg cholesterolu a 90 mg lecitinu a byl přidán 1 ml chloroformu. Směs byla důkladným promícháním zhomogenizovaná a přidána do 10 ml destilované vody přichystaných v 50ml kádince. Obsah kádinky byl vystaven působení tyčového ultrazvuku po dobu 1 minuty v přerušovaných 15sekundových intervalech, mezi kterými byla směs promíchána. Roztok s připravenými liposomy byl následně zahříván na magnetické míchačce za kontinuálního míchání při teplotě 60 °C do vymizení zápachu a odpaření zbytkového chloroformu.

## 4.7 Charakterizace připravených liposomů

Liposomové částice všech analytů byly podrobeny testům enkapsulační účinnosti, stability a velikosti bezprostředně po přípravě. Enkapsulační účinnost se stabilitou byly navíc znovu proměřeny s odstupem dvou týdnů pro zjištění celkové degradace částic v průběhu času.

### 4.7.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Při určování enkapsulační účinnosti byl roztok liposomů ihned po přípravě centrifugován po dobu 60 minut při 14 000 ot/min. 1 ml odděleného supernatantu byl odpipetován do 15ml plastové centrifugační zkumavky a byl přidán 1 ml chloroformu. Roztok byl následně protřepán na vortexu v intervalu 15 minut. Po vytvoření dvou fází byla chloroformová fáze odebrána do skleněné zkumavky a rozpouštědlo bylo odpařeno při teplotě 45 °C za probublávání inertním

dusíkem. V posledním kroku byl přidán 1 ml směsi ethylacetát-acetonitrilu (2:1), odparek byl důkladně rozpuštěn a přefiltrován pomocí injekční stříkačky a PTFE filtru do skleněné šroubovací vialky. Analýza proběhla metodou HPLC. Enkapsulační účinnost byla určena porovnáním zjištěného množství volného vitamínu v roztoku s původní navázkou a výpočtem podle vzorce (vyjádřeného v procentech):

$$EU = \frac{\text{celkové množství aktivní látky} \cdot \text{množství volné aktivní látky}}{\text{celkové množství aktivní látky}} \cdot 100 \quad (3.1)$$

#### 4.7.2 Stanovení velikosti a stability

Distribuce velikosti částic v roztoku byla měřena prostřednictvím koloidního analyzátoru Malvern ZetaSizer Nano ZS metodou dynamického rozptylu světla (viz kap. 2.5.2). Analýzou byla získána data distribuce velikosti částic, průměrných velikostí částic a indexu polydispersity. Za pomoci nástavce s elektrodou byl stanovován také zeta potenciál, jehož velikost má vypovídající hodnotu o stabilitě částic (viz kap. 2.5.3).

Měření probíhalo u třech kontrolních skupin připravených z jednoho roztoku liposomů. První skupinu představoval 1 ml tohoto roztoku zředěný 100x. Pro přípravu druhé skupiny byl odpipetován 1 ml roztoku do Eppendorfovy zkumavky a 60 min stáčen při 14 000 ot/min. Usazené liposomy byly odděleny a rozsuspendovány v 1 ml destilované vody. Výsledný roztok byl vhodně naředěn. Poslední skupina byla opět připravena odebráním 1 ml roztoku do Eppendorfovy zkumavky, avšak stáčením nejprve po dobu 5 min při 14 000 ot/min. Supernatant byl převeden do čisté Eppendorfovy zkumavky a poté již stáčen 60 minut při stejných otáčkách. Sedimentované liposomy byly po odstranění supernatantu rozsuspendovány v 1 ml destilované vody a vzniklý roztok byl vhodně naředěn.

#### 4.7.3 Stanovení dlouhodobé stability

Připravené liposomy byly uchovávány ve vodném prostředí při teplotě 8 °C. Skladování probíhalo 14 dní, poté byla stanovena enkapsulační účinnost a stabilita částic.

Enkapsulační účinnost byla zjištěna ze supernatantu 1 ml vzorku centrifugovaného při 14 000 ot/min po dobu 60 minut. Dlouhodobá stabilita částic byla poté určena opětovným proměřením hodnoty ZP na přístroji Malvern ZetaSizer Nano ZS za použití nástavce s elektrodou. Analyzovány byly dvě kontrolní skupiny – 1000x ředěné a s 60minutovým stáčením, připravené ze stejného roztoku liposomů a za shodných podmínek, jako při prvotním měření (kap. 4.6.2).

#### 4.8 Stanovení stability liposomů v modelových prostředích

Liposomy byly vystaveny vlivům tří různých prostředí a v průběhu 14 dnů byla sledována jejich stabilita a uvolňování aktivních látek do okolí. Měření proběhlo celkem 2x v jednotýdenních intervalech. Testováno bylo vždy 100 µl roztoku liposomů v 900 µl vodného prostředí,

suspenze oleje ve vodě (2:7) a suspenze vody v oleji ve stejném poměru. Vzorky byly skladovány v Eppendorfových zkumavkách za nepřístupu přímého slunečního světla při laboratorní teplotě a v průběhu experimentu byly pravidelně promíchávány.

Množství látek uvolněných do prostředí bylo stanoveno pomocí metody HPLC po předešlém zpracování vzorku. Eppendorfova zkumavka se směsí byla umístěna na centrifugu a stáčena při 14 000 ot/min po dobu 60 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán a přidán do 15ml centrifugační zkumavky spolu s 1 ml hexanu pro HPLC. Po 15minutovém protřepání na vortexu byla hexanová fáze převedena do skleněné zkumavky a odpařena pomocí dusíku na termobloku při teplotě 45 °C. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml směsi rozpouštědel ethylacetát:acetonitril (2:1) a přefiltrován do šroubovací vialky.

## **4.9 Modelové trávení**

Pro stanovení stability částic v gastrointestinálním traktu během procesu trávení byla provedena simulace fyziologického prostředí za přítomnosti tří trávicích šťáv – žaludečních, pankreatických a žlučových. Testováno bylo vždy 10 ml roztoku liposomů příslušného standardu či stejné množství roztoku standardu odpovídající koncentrace. Vzorek byl nejprve smíchán se žaludeční šťávou v poměru 1:1 a inkubován na temperované třepačce při teplotě 37 °C za nepřístupu světla. Po 30 minutách byla do roztoku přidána směs pankreatické a žlučové šťávy (1:1), taktéž v poměru 1:1 ke vzorku se žaludeční šťávou. Trávení pokračovalo za stejných podmínek další 2 hodiny. V průběhu celé analýzy byly odebírány vzorky v čase 0 a 30 minut, po přidání směsi střevních šťáv opět v počátečním čase, následně po 1 a 2 hodinách. Stanovení probíhalo pomocí metody HPLC.

### **4.9.1 Příprava žaludeční šťávy**

Žaludeční šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pepsinu ve 100 ml destilované vody a následným přidáním 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 0,9.

### **4.9.2 Příprava pankreatické šťávy**

Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pankreatinu a 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného ve 100 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 8,9.

### **4.9.3 Příprava žlučové šťávy**

Žlučová šťáva byla připravena rozpuštěním 0,8 g žlučových solí v 200 ml fosfátového pufru. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 8.

#### **4.9.3.1 Příprava fosfátového pufru**

Byly přichystány dva výchozí roztoky. Roztok A – 0,2M hydrogenfosforečnan sodný (dihydrát) a roztok B – 0,2M dihydrogenfosforečnan sodný (monohydrát). Pro přípravu 0,1M fosfátového

pufro o pH 8 bylo smícháno 47,35 ml roztoku A a 2,65 ml roztoku B. Výsledný roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml.

#### **4.9.4 Stanovení stability vitaminů v trávících šťávách**

Testování stability v prostředí trávících šťáv byly podrobeny roztoky jednotlivých standardů připravené rozpuštěním 20 mg vzorku v 1 ml ethanolu a doplněním destilovanou vodou na objem 10 ml. Během trávení byl odebírán vždy 1 ml směsi do 15ml plastové centrifugační zkumavky za přidání 1 ml hexanu p.a. Zkumavka byla umístěna na vortex a třepána po dobu 15 minut. Po ustálení byla odebrána horní hexanová fáze do skleněné zkumavky a rozpouštědlo bylo odpařeno v prostředí inertního dusíku při teplotě 45 °C. Zůstatek byl důkladně rozpuštěn v 1 ml směsi ethylacetátu a acetonitrilu (2:1), přefiltrován do skleněné šroubovací vialky a analyzován pomocí metody HPLC.

#### **4.9.5 Stanovení stability liposomů v trávících šťávách**

Pro stanovení stability liposomů v průběhu modelového trávení bylo připraveno 10 ml jejich roztoku s celkovou navázkou 20 mg analytu. Vzorky byly pro analýzu odebírány v objemu 1 ml nejprve do Eppendorfovy zkumavky a roztok byl centrifugován 60 min při 14 000 ot/min. Vzniklý supernatant byl oddělen a přelit do 15ml plastové centrifugační zkumavky za přidání 1 ml hexanu p.a. Následný postup byl shodný s postupem uvedeným v předchozí kapitole (4.8.4).

### **4.10 Extrakce a stanovení vitaminů z potravinářských a kosmetických produktů**

Extrakci bylo celkově podrobena pět reálných vzorků – dva krémy značky Ziaja, rybí olej Omega 3 s citronovou příchutí, cereálie Cini Minis a slunečnicový olej. Stanovení probíhalo metodou HPLC.

K naváženému vzorku byl do 15ml centrifugační zkumavky přidán 1 ml destilované vody a 1 ml hexanu p.a. Zkumavka byla ponechána na vortexu a třepána po dobu 15 minut. Následně byla hexanová fáze odpipetována do skleněné zkumavky a zahřívána na termobloku při teplotě 45 °C do odpaření rozpouštědla. Neodpařený zbytek byl rozpuštěn v potřebném množství směsi ethylacetát:acetonitril (2:1) a přes PTFE filtr převeden do šroubovací vialky, kde proběhla analýza. U rybího tuku a slunečnicového oleje byl použit hexan s HPLC kvalitou. Hexanová fáze byla po protřepání rovnou přefiltrována do skleněné vialky bez předchozího odpaření a rozpuštění v ethylacetátu a acetonitrilu.

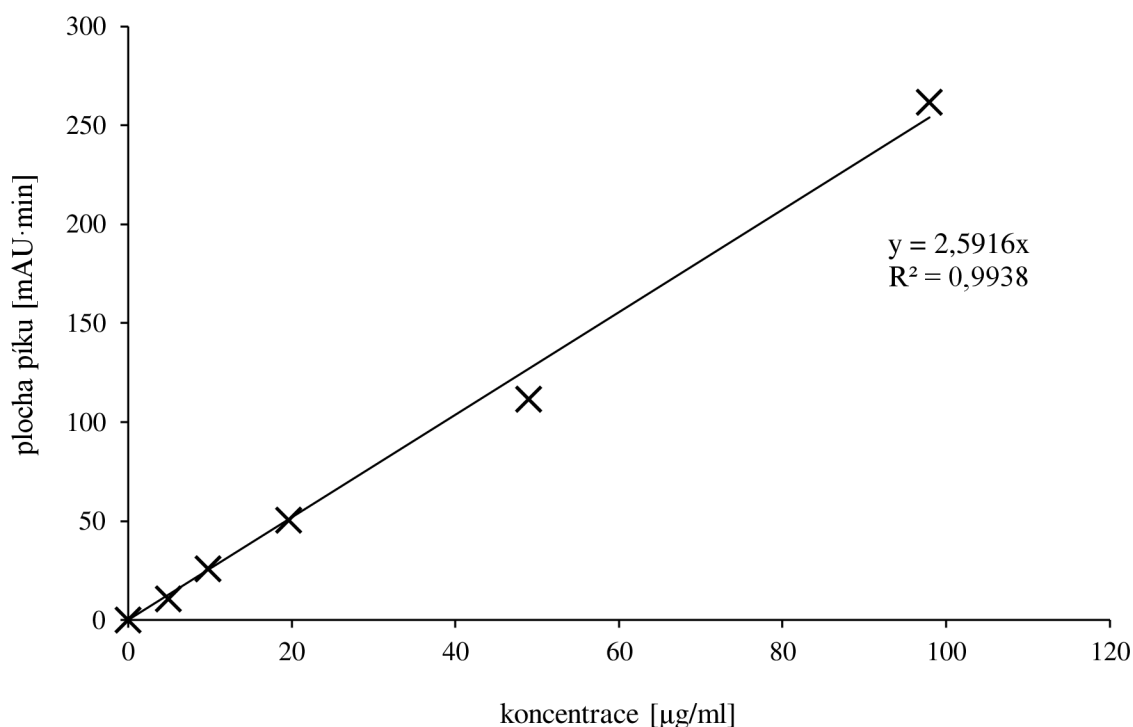
Druhou aplikovanou metodou byla extrakce dle Folsche použitá pro stanovení cereálií. Cereálie byly nejprve rozemlety v třecí misce na jemný prášek a 20 mg tohoto vzorku bylo hydratováno v 1 ml destilované vody po dobu 60 minut. Poté byla směs další hodinu centrifugována a vzniklý supernatant byl slit. Ke zbylému sedimentu bylo přidáno 0,5 ml skleněných kuliček a 1 ml metanolu. Vzorek byl 15 minut třepán na vortexu a následně kvantitativně převeden do 15ml centrifugační zkumavky za přidání 2 ml chloroformu. Po 5minutovém protřepání byl přidán 1 ml destilované vody a vzorek opět umístěn na vortex na dobu 10 minut. Směs byla

ponechána ustálení a po oddělení dvou fází byla chloroformová fáze odpipetována do skleněné zkumavky. Zkumavka byla umístěna do termobloku vyhřívaného na teplotu 45 °C a vzorek byl odpařován za pomoci inertního dusíku do odstranění rozpouštědla. Odparek byl důkladně rozpuštěn ve směsi rozpouštědel ethylacetátu a acetonitrilu (2:1) a přefiltrován přes PTFE filtr do skleněné vialky. Analýza proběhla metodou HPLC.

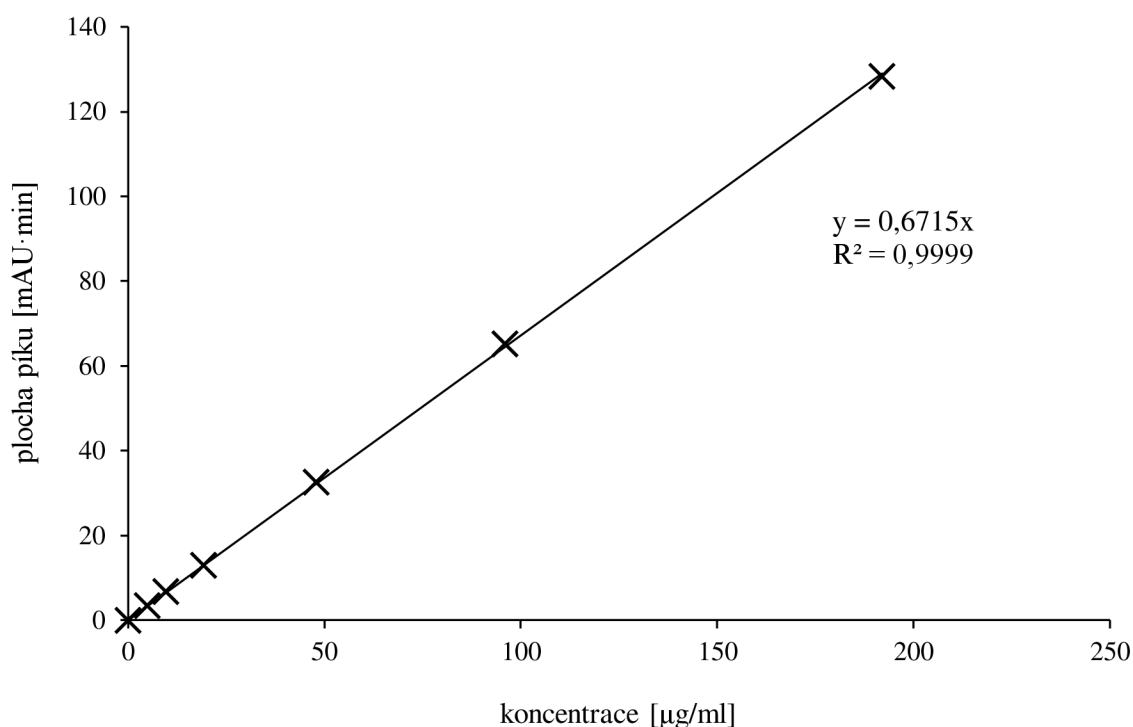
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Výběr vhodné metody stanovení

Na počátku experimentální části této bakalářské práce byla hledána vhodná metoda pro spolehlivé stanovení lipofilních vitaminů a jejich prekurzorů, které je lidské tělo schopno transformovat na aktivní formy. Jako příhodnou technikou se jevila HPLC metoda se spektrofotometrickým detektorem, která je pro analýzu vitaminových látek s výhodou využívána (viz kap. 2.3.3). Na laboratorním HPLC přístroji již byla zavedena funkční metoda pro stanovení  $\beta$ -karotenu s kalibrační rovnicí  $y = 3,9153x$  [ $\mu\text{g/ml}$ ], proto byla stejná metoda vyzkoušena ke stanovení cholekalciferolu a tokoferolu. Pro přípravu roztoků kalibrační řady a jejich proměření bylo postupováno podle popisu v kapitolách 4.4 a 4.5. Analýza probíhala na chromatografické sestavě Dionex UltiMate 3000 s DAD detektorem při gradientové eluci. Absorpční maxima cholekalciferolu a tokoferolu byly zaznamenány při vlnových délkách 293 a 265 nm v uvedeném pořadí ( $\beta$ -karoten byl identifikován při 450 nm). Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu závislosti velikosti signálu na koncentraci analytu a byla zobrazena rovnice kalibrační křivky (viz graf 1 a 2). Křivky vykazovaly lineární závislost s vysokým koeficientem spolehlivosti.



Graf 1: Kalibrační závislost pro cholekalciferol



Graf 2: Kalibrační závislost pro tokoferol

## 5.2 Příprava a charakterizace liposomů

V této části práce byly přichystány liposomové částice podle postupu v kapitole 4.6, které byly testovány na velikost, stabilitu a enkapsulační účinnost. Měření bylo provedeno ihned po přípravě částic a následně s dvoutýdenním odstupem, kdy byla ověřována stabilita liposomů v průběhu času. Skladování probíhalo při teplotě 8 °C a kvůli náchylnosti použitých vitamínových látek bylo zamezeno přístupu světla. Enkapsulovány byly standardy  $\beta$ -karotenu, vitamínu D a E a rovněž byly pro srovnání přichystány prázdné liposomy bez přítomnosti aktivní složky. Z roztoků všech liposomů byly připraveny 3 kontrolní skupiny s odlišnou dobou centrifugace. V rámci jednotlivých analytů byly skupiny mezi sebou vzájemně porovnávány a byly určovány částice nejvhodnější pro aplikaci do potravinářských či kosmetických produktů (viz kap. 4.7.2). Celkově tedy bylo analyzováno 12 druhů liposomů.

### 5.2.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost připravených částic byla stanovena ze všech roztoků liposomů obsahujících aktivní látku. Měření bylo provedeno dle postupu popsaného v kapitole 4.7.1, kdy byl stáčen vždy 1 ml vzorku a analýza probíhala ze supernatantu po jeho oddělení od usazených částic. Z detekovaného množství analytu a znalosti jeho původní navážky byla určena enkapsulační účinnost v jednotkách procent. Každý vzorek byl podroben dvojímu testování a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr s odchylkou měření. Tyto hodnoty společně s průměrnými koncentracemi vzorků v supernatantu uvádí tabulka 3.

Tabulka 3: Koncentrace látek v supernatantech a enkapsulační účinnosti stanovené po přípravě

	$c_{\text{sup.}}$ [mg/g]	EU [%]
$\beta$ -karoten	$0,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$
cholekalCIFerol	$6,8 \pm 1,9$	$99,3 \pm 0,2$
tokoferol	$9,3 \pm 9,3$	$99,1 \pm 0,9$

Bezprostředně po přípravě vykazovaly všechny částice vysoké enkapsulační účinnosti v rozmezí od 99 do 100 %. Nejvyšší možné účinnosti se podařilo dosáhnout obalením  $\beta$ -karotenu, kdy nebyla ani v jednom případě zaznamenána žádná odezva na HPLC přístroji. Je však nutno zmínit, že samotné zpracování vzorku probíhalo po dobu cca 2 hodin, během kterých již mohly uvolněné látky degradovat.

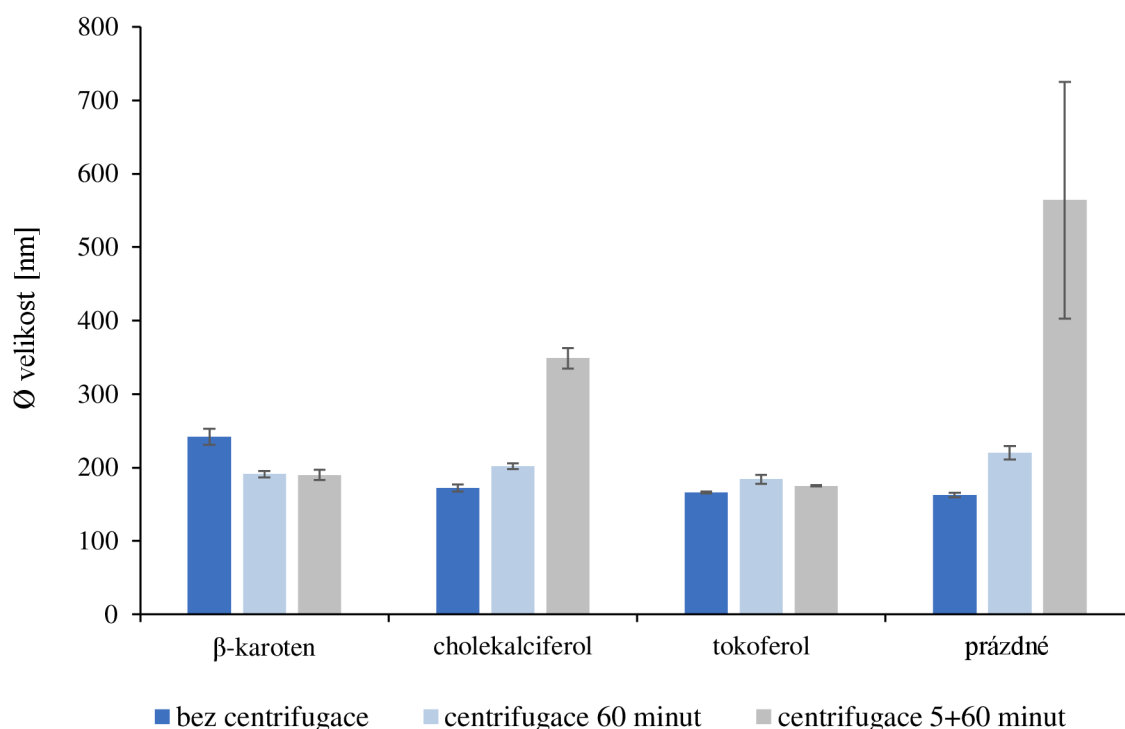
### 5.2.2 Stanovení velikosti a stability

Metody přípravy jednotlivých druhů liposomových částic byly popsány v kapitole 4.7.2. Velikost byla měřena společně s distribucí velikosti a indexem polydisperzity na koloidním analyzátoru Malvern ZetaSizer Nano ZS. Následně byl pomocí nástavce s elektrodou proměřen také zeta potenciál pro posouzení stability částic. Všechna měření proběhla v trojím opakování a ze získaných dat byly stanoveny průměrné hodnoty, které uvádí tabulka 4. Pro přehledné zobrazení a srovnání průměrných velikostí i zeta potenciálů připravených liposomů byly sestaveny grafy 3 a 4.

Tabulka 4: Průměrná velikost, intenzita distribuce velikosti a stabilita připravených liposomů

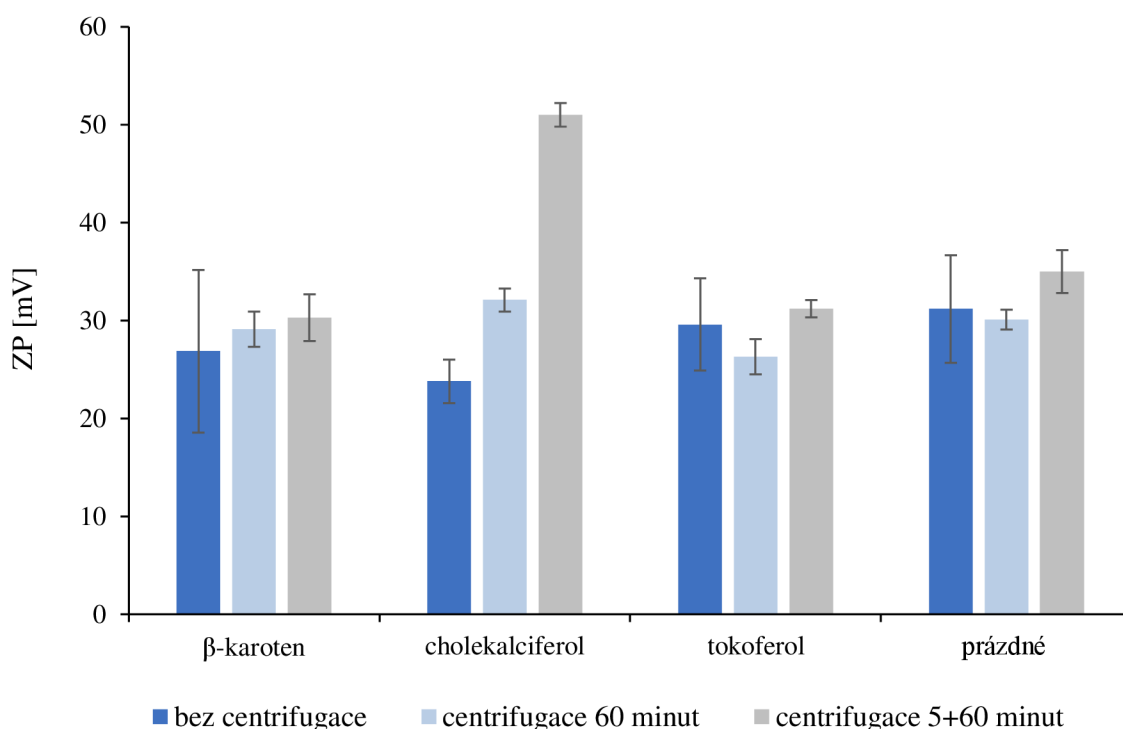
	doba centrifugace [min]	$\varnothing$ velikost [nm]	PdI [-]	ZP [mV]
$\beta$ -karoten	0	$241,9 \pm 11,3$	$0,364 \pm 0,009$	$-26,9 \pm 8,3$
	60	$191,4 \pm 4,3$	$0,211 \pm 0,027$	$-29,1 \pm 1,8$
	5+60	$190,4 \pm 7,3$	$0,223 \pm 0,018$	$-30,3 \pm 2,4$
cholekalCIFerol	0	$172,1 \pm 5,5$	$0,243 \pm 0,009$	$-23,8 \pm 2,2$
	60	$202,3 \pm 4,1$	$0,196 \pm 0,013$	$-32,1 \pm 1,2$
	5+60	$349,4 \pm 14,4$	$0,542 \pm 0,008$	$-51,0 \pm 1,2$
tokoferol	0	$165,5 \pm 1,5$	$0,210 \pm 0,015$	$-29,6 \pm 4,7$
	60	$183,8 \pm 6,2$	$0,199 \pm 0,023$	$-26,3 \pm 1,8$
	5+60	$174,7 \pm 1,4$	$0,146 \pm 0,025$	$-31,2 \pm 0,9$
prázdné	0	$162,9 \pm 3,3$	$0,257 \pm 0,008$	$-31,2 \pm 5,5$
	60	$219,9 \pm 9,0$	$0,242 \pm 0,058$	$-30,1 \pm 1,0$
	5+60	$563,8 \pm 160,5$	$0,712 \pm 0,102$	$-35,0 \pm 2,2$





Graf 3: Průměrná velikost připravených liposomů

Dle očekávání byla nejnižší průměrná hodnota velikosti naměřena u prázdných liposomů. Při začlenění aktivních složek nastalo vždy alespoň mírné zvětšení velikosti. K zřetelně nejmenšímu nárůstu došlo enkapsulací standardu tokoferolu, většina částic se však velikostně pohybovala v rozmezí 150 až 250 nm. Horní hranice tohoto intervalu byla překročena pouze ve dvou případech a to u cholekalciferolu a prázdných liposomů při celkovém stáčení po dobu 65 minut. Vzhledem k vysokým hodnotám polydisperzity se usazené liposomy patrně nepodařilo ve vodě zcela rozsuspendovat. V porovnání velikosti částic v rámci jednotlivých enkapsulovaných látek je proto možno pozorovat největší rozdíly právě u liposomů s vitamínem D. Centrifugací jsme chtěli docílit úpravy velikosti připravených částic a přečištění jejich roztoku odstraněním supernatantu s nezačleněnými složkami či jinými kontaminujícími látkami. U vzorků s prvotním 5minutovým stáčením a separací sedimentu byla očekávána nejmenší velikost a polydisperzita, tohoto předpokladu však bylo dosaženo pouze v polovině případů. Je zde tedy nutno počítat s možností shlukování částic a vzniku heterogenního systému.



Graf 4: Stabilita připravených liposomů

Zeta potenciál představuje elektrický potenciál částice na rovině skluzu, která rozděluje okolní médium na část migrující a nemigrující s částicí při pohybu. Jeho hodnota je výchozím parametrem pro určení stability suspenze. Za obecně stabilní jsou považovány částice s absolutní hodnotou zeta potenciálu nad 30 mV. Z grafu 4 vyplývá, že se nepodařilo připravit všechny liposomy tuto hranici překračující, avšak většina se kolem ní pohybovala. Nejnížší stabilitu vykazovaly nestáčené liposomy s cholecalciferolem a to s hodnotou zeta potenciálu rovnou  $(-23,8 \pm 2,2)$  mV. Naměřená velikost stejného vzorku však nekorresponduje s agregací částic a jeho nestabilitu tedy nepotvrdila. Stejněho výsledku bylo dosaženo také u tokoferolu s centrifugací 60 minut. Nižších hodnot rovněž nabývaly nestáčené i 60 minut stáčené částice β-karotenu a nestáčené částice tokoferolu, avšak s poměrně velkými odchylkami.

### 5.2.3 Stanovení dlouhodobé stability

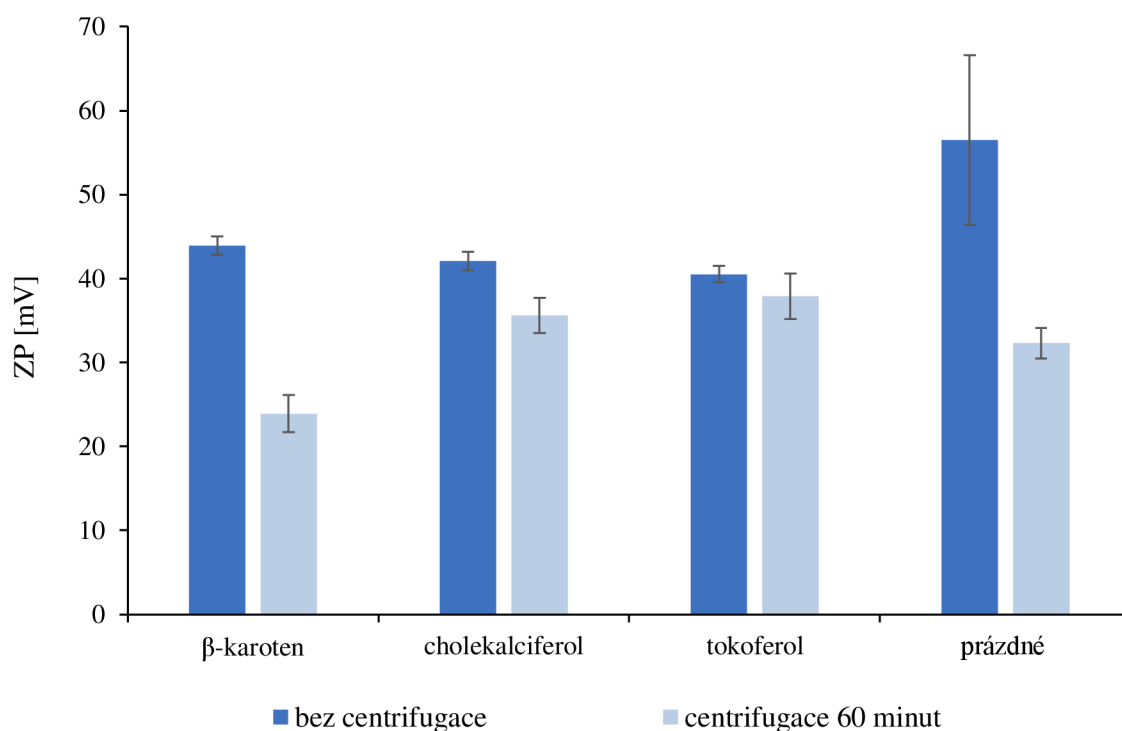
Dlouhodobá stabilita připravených částic byla zjišťována dle postupu uvedeného v kapitole 4.7.3. Ke stanovení byla proměřena hodnota zeta potenciálu na koloidním analyzátoru Malvern ZetaSizer Nano ZS za pomoci elektrodového nástavce. Testování probíhalo ze stejných vzorků liposomů, připraveny byly ovšem pouze dvě kontrolní skupiny. Ačkoliv částice celkově stáčené 65 minut vykazovaly v prvotním měření vysokou stabilitu (viz graf 3), byla u nich zaznamenána značná polydisperzita a tedy velké velikostní rozdíly, jež by mohly vést k neobjektivním výsledkům. Dále proto bylo pracováno pouze se vzorky s maximální dobou stáčení 60 minut, ze kterých byl navíc po centrifugaci odebrán supernatant pro stanovení enkapsulační účinnosti.

Získané výsledky byly zpracovány do tabulky 5. Pro přehlednost byl sestaven také graf 5, ze kterého je jasně patrná stabilita většiny částic. Částice se tedy v čase stabilizovaly

a vykazovaly vyšší hodnoty zeta potenciálů. Pouze  $\beta$ -karoten podrobený 60minutové centrifugaci spadl do oblasti nestability v obou z měřených případů.

Tabulka 5: Dlouhodobá stabilita připravených liposomů

	doba centrifugace [min]	ZP [mV]
$\beta$ -karoten	0	$-43,9 \pm 1,1$
	60	$-23,9 \pm 2,2$
cholecalciferol	0	$-42,1 \pm 1,1$
	60	$-35,6 \pm 2,1$
tokoferol	0	$-40,5 \pm 1,0$
	60	$-37,9 \pm 2,7$
žádná	0	$-56,5 \pm 10,1$
	60	$-32,3 \pm 1,8$

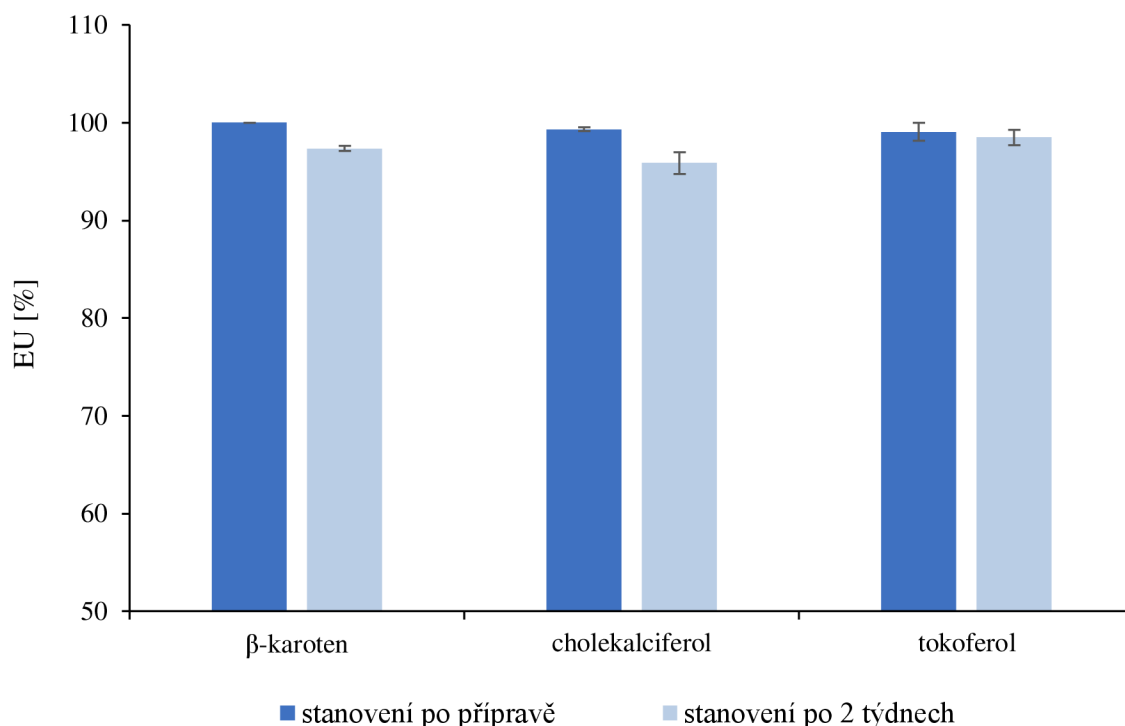


Graf 5: Dlouhodobá stabilita připravených liposomů

Enkapsulační účinnosti byly opět zjišťovány u liposomů obsahujících aktivní složku. Po proměření množství uvolněných látek v supernatantu byla účinnost zapouzdření určena výpočtem podle rovnice 3.1. Analýza proběhla u všech vzorků 2x a ze získaných dat byly stanoveny průměrné hodnoty. Pro porovnání enkapsulačních účinností jednotlivých látek v průběhu času byl sestrojen graf 6, který zahrnuje data naměřená ihned po přípravě (tabulka 3) a po 2 týdnech skladování (tabulka 6).

Tabulka 6: Koncentrace látek v supernatantech a enkapsulační účinnosti stanovené po 2 týdnech

	$c_{sup.}$ [mg/g]	EU [%]	pokles EU [%]
$\beta$ -karoten	$26,5 \pm 2,6$	$97,4 \pm 0,3$	2,6
cholecalciferol	$41,2 \pm 11,0$	$95,9 \pm 1,1$	3,4
tokoferol	$15,1 \pm 8,1$	$98,5 \pm 0,8$	0,6



Graf 6: Enkapsulační účinnosti

V grafu 6 je možno pozorovat snížení enkapsulační účinnosti u všech z uvedených standardů. Největší množství enkapsulované látky uvolněné z liposomů bylo zaznamenáno u cholecalciferolu, kde úbytek činil 3,4 %. I zde je potřeba zmínit, že během skladování a zpracovávání vzorku mohlo dojít k degradaci volného analytu, který nebyl během měření detekován a výsledek zatížil větší chybou.

Celkově tyto částice skladované ve vodném prostředí vykazovaly ve zkoumaném časovém úseku značnou stabilitu. Pro optimální stanovení dlouhodobé stability by však bylo vhodné proměření i po delší době.

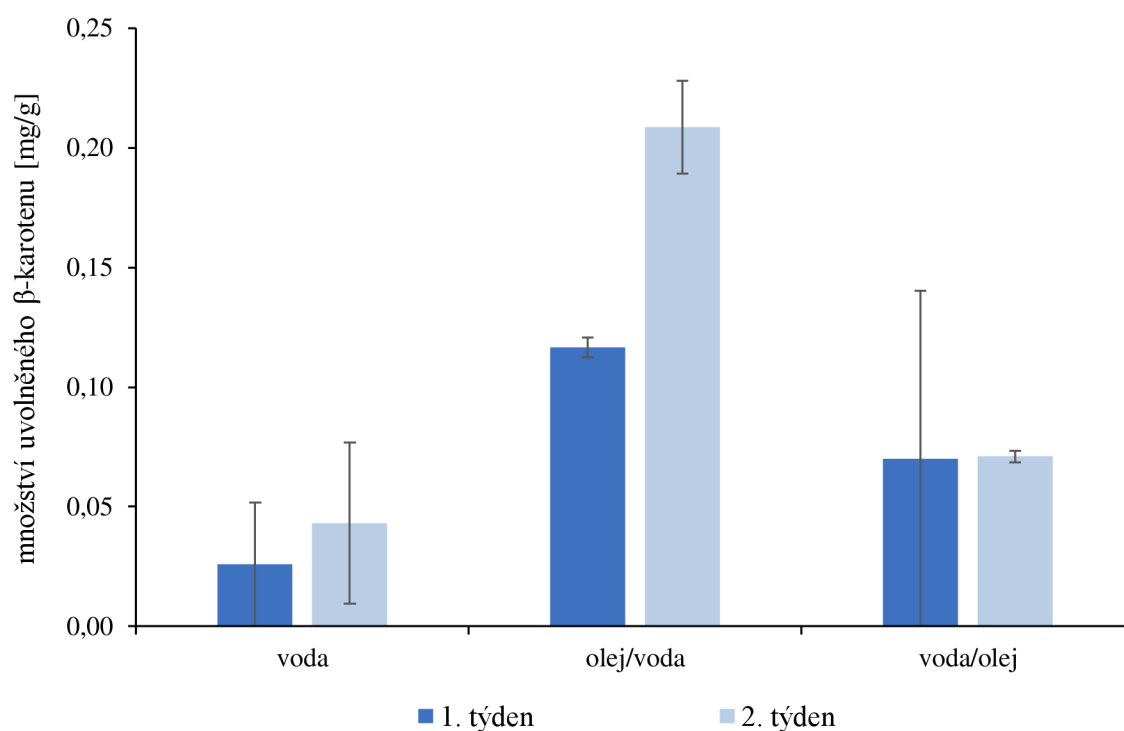
### 5.3 Stanovení stability částic v modelových prostředích

Liposomy připravené podle postupu v kapitole 4.6 byly testovány na stabilitu ve třech modelových prostředích. První bylo prostředí destilované vody, další dvě představovaly suspenze olej ve vodě a voda v oleji v poměru uvedeném v kapitole 4.8. Liposomy byly ponechány v prostředích po dobu 14 dnů, během kterých u nich bylo sledováno uvolňování látek do okolí. Pro simulaci běžně užívaných kosmetických produktů byly vzorky uchovávány

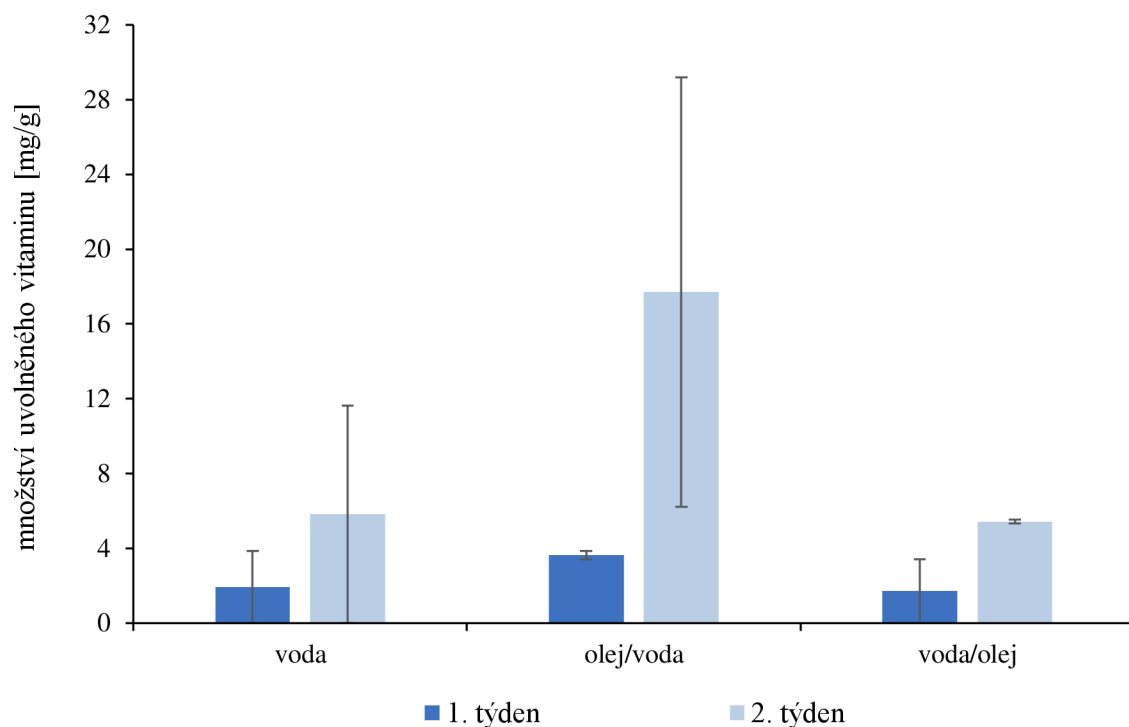
při laboratorní teplotě na přirozeném světle, avšak mimo přímé sluneční záření. V průběhu experimentu byly navíc v pravidelných intervalech promíchávány. Testování proběhlo celkem 2x vždy po týdnu skladování a výsledky byly zaznamenány do následující tabulky a dílčích grafů.

Tabulka 7: Koncentrace látek v supernatantech modelových prostředí

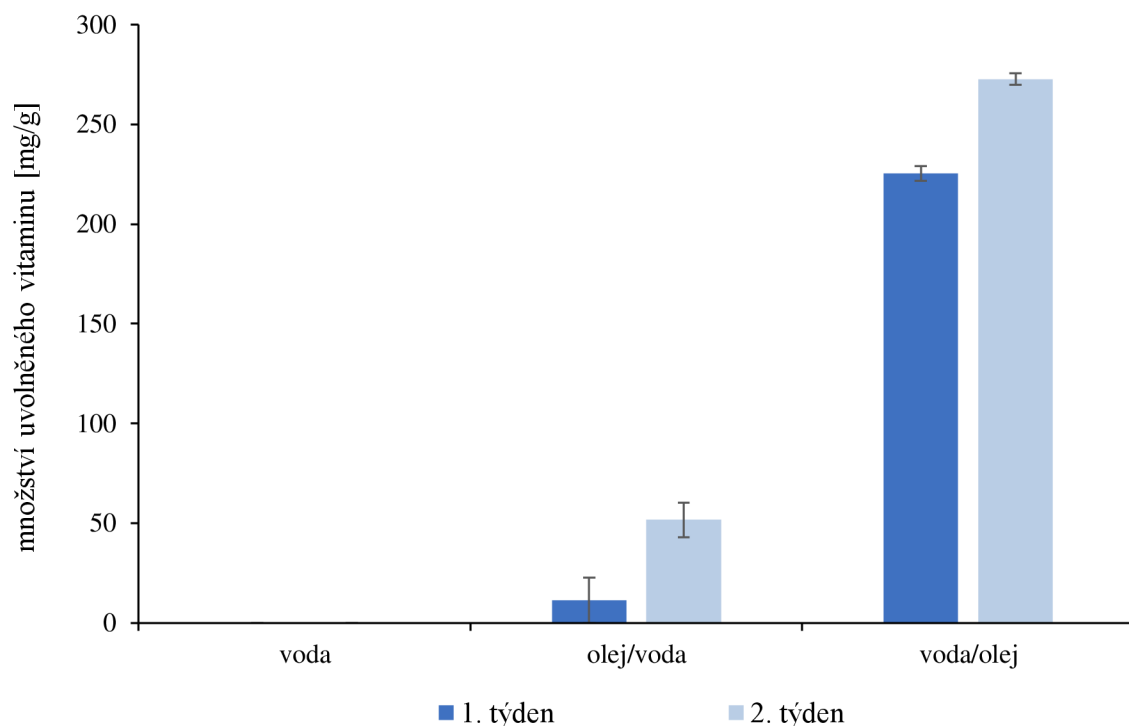
	koncentrace [mg/g]					
	voda		olej/voda		voda/olej	
	1. týden	2. týden	1. týden	2. týden	1. týden	2. týden
β-karoten	0,03	0,04	0,12	0,21	0,07	0,07
cholecalciferol	1,93	5,81	3,64	17,71	1,70	5,43
tokoferol	0,00	0,00	11,38	51,62	225,31	272,70



Graf 7: Množství β-karotenu uvolněného do prostředí



Graf 8: Množství cholecalciferolu uvolněného do prostředí



Graf 9: Množství tokoferolu uvolněného do prostředí

Na přípravu prostředí byl využit slunečnicový olej, u kterého byla předpokládána přítomnost vitamínu E. Olej byl proto podroben extrakcím podle postupů v kapitole 4.10. Poprvé byl vzorek stanovován na HPLC ve směsi acetátu a acetonitrilu (2:1), avšak bez jakékoliv odezvy. Během další extrakce byl použit hexan s HPLC kvalitou a měření probíhalo bez odpaření přímo

v tomto rozpouštědle. Tímto způsobem se nám podařila stanovit přítomnost vitamínu, avšak vitamínu D (viz kap. 5.5). Jelikož analýza vzorků modelových prostředí probíhala v uvedeném rozpouštědle ethylacetát-acetonitrilu, nebylo toto množství cholekalciferolu odečítáno.

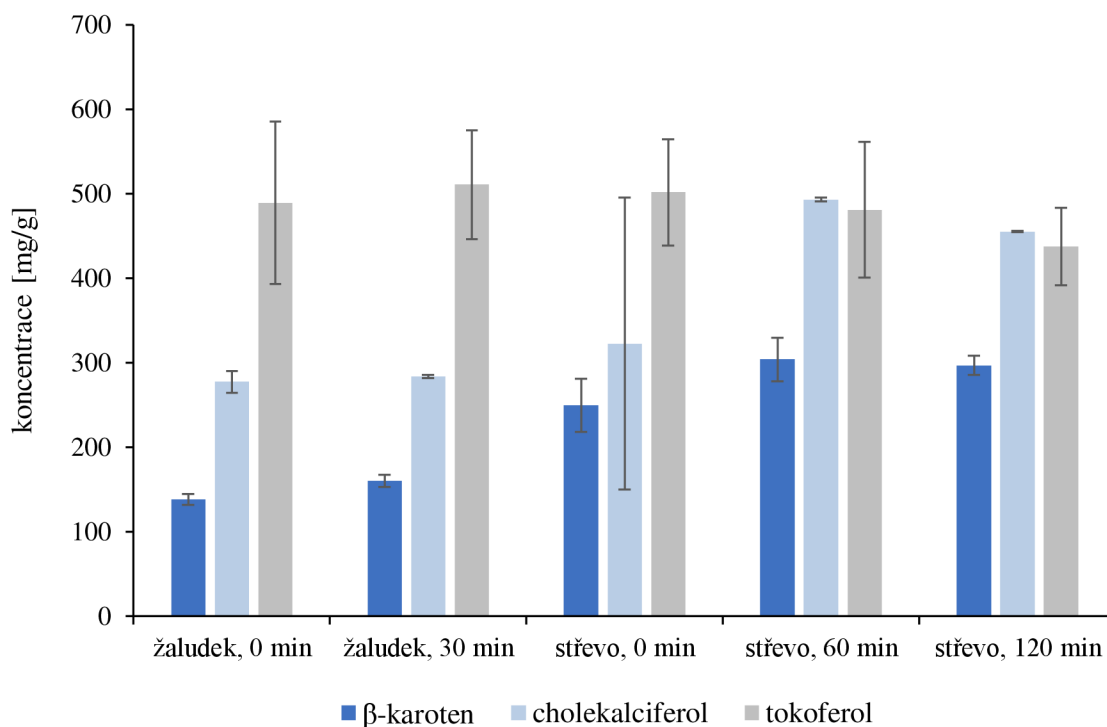
Uvedené výsledky naznačují, že k největšímu uvolňování docházelo u tokoferolu. V suspenzi olej/voda bylo po 2 týdnech skladování naměřeno až 272,7 mg/g jeho volné formy, což odpovídá téměř 27,3 % původního množství. Uvolňování u tohoto vitamínu probíhalo podle očekávaného trendu. V přítomnosti většího množství oleje byla předpokládána detekce také většího množství těchto lipofilních látek, naopak ve vodném prostředí byla předpokládána největší stabilita (viz kap. 5.2.3). U  $\beta$ -karotenu i cholekalciferolu byly nejvyšší koncentrace zaznamenány v suspenzi olej/voda, avšak během vyhodnocování všech vzorků se nám podařilo identifikovat rovněž degradační produkty. Je tedy zřejmé, že část látek po uvolnění z liposomů degradovala, v přehledu však nejsou tyto formy uváděny pro ztrátu svých vitamínových účinků. Lze říci, že tokoferol pravděpodobně odolával laboratorním podmínkám nejlépe, avšak pro dosažení přesnějších výsledků by bylo vhodné experiment provádět současně s měřením za podmínek příhodných pro skladování aplikovaných standardů.

#### 5.4 Stanovení stability částic v trávicích šťávách

Roztoky enkapsulovaných a neenkapsulovaných standardů byly aplikovány do modelového prostředí gastrointestinálního traktu a byla sledována jejich stabilita v průběhu trávení. Příprava roztoků s trávicími šťávami a samotná analýza probíhaly dle popisu v kapitole 4.9. Vzorky byly nejprve vystaveny působení žaludečních šťáv po dobu 30 min, poté byla přidána směs pankreatické a žlučové šťávy, ve které probíhalo trávení další 2 hodiny. Tyto časy byly stanoveny na základě postupu trávení polysacharidové matrice vhodné pro aplikaci vitamínu v potravinářských produktech [61]. Vzorky pro analýzu byly odebírány v předem určených intervalech a naměřené hodnoty byly zapsány do tabulek 8 a 9. Tyto výsledky posloužily ke srovnání množství využitelného vitamínu po procesu trávení a posouzení vlivu ochrany na jeho stabilitu.

Tabulka 8: Modelové trávení vitamínů – koncentrace látek v roztoku

	koncentrace [mg/g]				
	žaludek		střevo		
	0 min	30 min	0 min	60 min	120 min
$\beta$ -karoten	138,65	160,62	249,91	304,08	296,99
cholekalciferol	277,56	283,98	322,66	493,14	455,40
tokoferol	489,47	510,93	501,76	481,11	437,72



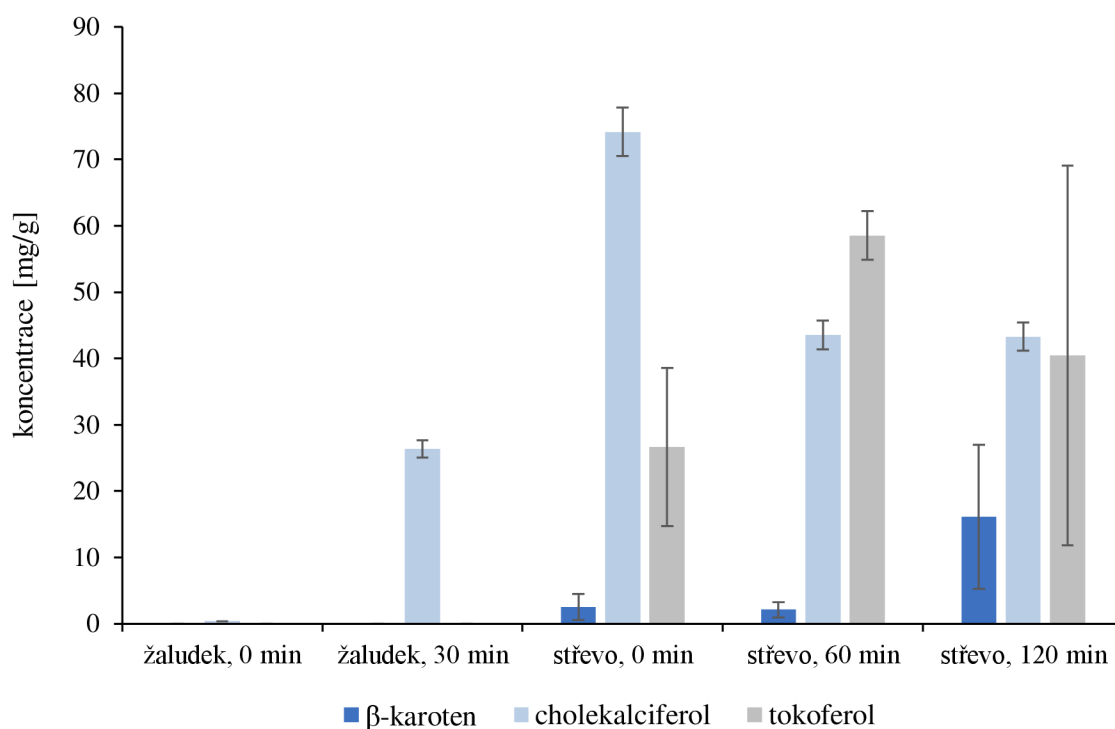
Graf 10: Průběh trávení neenkapsulovaných vitamínů

V průběhu trávení byla očekávána postupná degradace volného vitamínu a pokles jeho množství v roztoku. Tento trend byl ovšem registrován pouze u tokoferolu, u zbylých látek byl až do času 60 minut ve střevě zaznamenán koncentrační růst. To mohlo být způsobeno nedostatečným promícháním a tedy nehomogenitou roztoku. V žaludku byly ovšem změny množství všech vzorků jen nepatrné a dala by se proto předpokládat relativní stabilita těchto látek v žaludečních šťávách. Ve střevních šťávách již byla vždy po určitém čase detekována degradace.

Tabulka 9: Modelové trávení liposomů – koncentrace látek uvolněných do roztoku

	koncentrace [mg/g]				
	žaludek		střevo		
	0 min	30 min	0 min	60 min	120 min
β-karoten	0,00	0,00	2,49	2,09	16,12
cholecalciferol	0,35	26,35	74,19	43,56	43,29
tokoferol	0,00	0,00	26,64	58,54	40,42





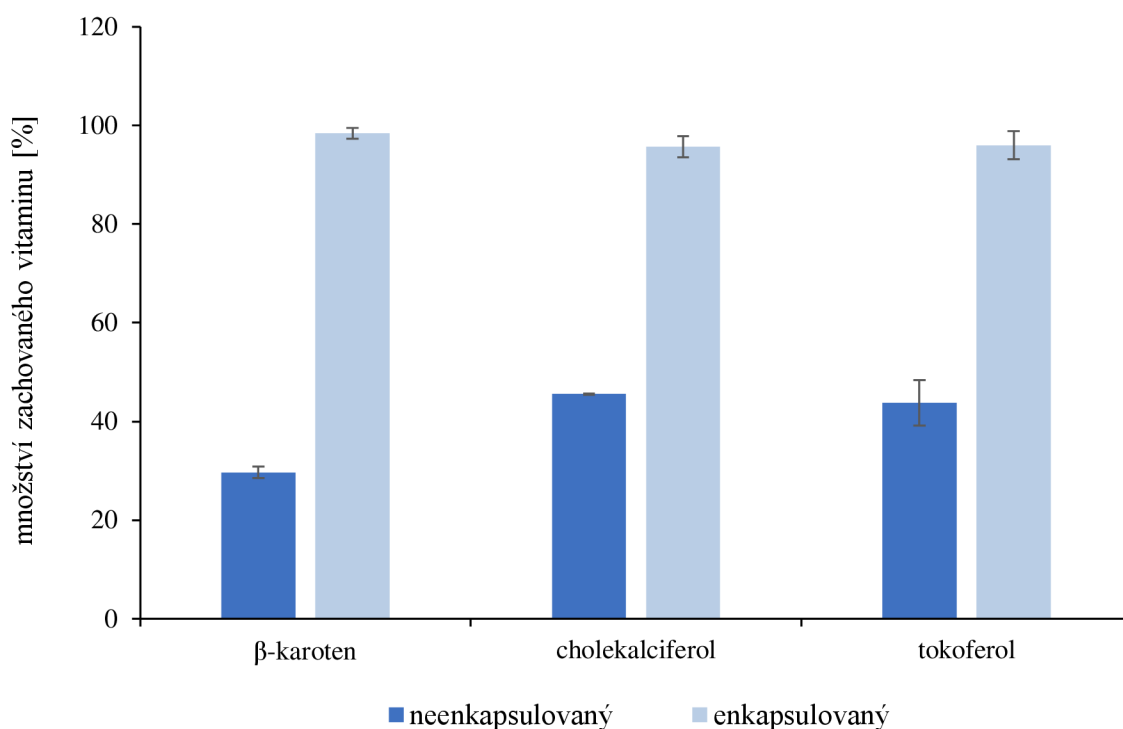
Graf 11: Průběh trávení enkapsulovaných vitaminů

Na počátku trávení enkapsulovaných vitaminů v žaludečních šťávách nebyla zaznamenána žádná nebo jen velmi malá koncentrace analytu. K prudkému uvolnění látek došlo dle očekávání po přidání střevních šťáv, kdy byly liposomy vystaveny velké změně pH. Pouze u β-karotenu se koncentrace zvýšila jenom nepatrně, což mohlo být způsobeno intenzivnější degradací tohoto provitaminu. Skokový nárůst u něj nastal až v poslední fázi trávení ve střevě. U ostatních vitaminů došlo na konci analýzy k ponížení koncentrace vlivem postupné degradace.

Pro porovnání množství analytu v obalené a neobalené formě, které nebylo v průběhu trávení zdegradováno a zachovalo si svou biologickou aktivitu, byla sestavena tabulka 10 a graf 12.

Tabulka 10: Zachované množství vitaminu po trávení

	množství zachovaného vitaminu [%]	
	neenkapsulovaný	enkapsulovaný
β-karoten	29,70 ± 1,16	98,39 ± 1,09
cholekalciferol	45,54 ± 0,09	95,67 ± 2,16
tokoferol	43,77 ± 4,59	95,96 ± 2,86



Graf 12: Procentuální vyjádření množství zachovaného vitamínu během trávení

Podle teoreticky vypočítaných hodnot enkapsulované vitaminy disponují vysokou stabilitou a přečkají lidské trávení s mnohem vyšší účinností než vitaminy bez ochrany. Na konci každé analýzy enkapsulovaných částic však byl odebrán další 1 ml roztoku a jeho stanovení proběhlo stejným způsobem jako u roztoků nezapouzdřené látky (viz kap. 4.9.4). Výsledné hodnoty vykazovaly mnohem nižší procentuální zastoupení celkového vitamínu než hodnoty zobrazené v grafu 12. U  $\beta$ -karotenu, cholecalciferolu a tokoferolu činily pouze 77,3; 48,2 a 24,4 % v uvedeném pořadí. Během analýzy byla patrně část vitaminů degradována a nedošlo k plnému uvolnění všech látek z liposomů. Pro určení skutečného obsahu zachovaného vitamínu v roztoku a liposomech na konci trávení by proto bylo vhodné zvážit jinou metodu stanovení. Vzhledem ke snadné degradaci všech vitaminů v roztoku by navíc bylo patřičné odebrání vzorků v kratších časových intervalech.

## 5.5 Extrakce a stanovení vitaminů z potravinářských a kosmetických produktů

V následující části práce byly vitaminy extrahovány z reálných vzorků metodou uvedenou v kapitole 4.10. Analýza proběhla u všech vzorků minimálně v dvojnásobném opakování a ze získaných hodnot byla vypočítána průměrná hodnota koncentrace. Z kosmetických produktů byly vybrány dva krémy značky Ziaja – krém pod oči s vitamínem E a krém proti vráskám květ slunečnice. U prvního z uvedených krémů uvádí výrobce přítomnost vitamínu E ve formě tokoferolu a tokoferylacetátu. Ve druhém krému je propagována opět přítomnost tokoferylacetátu a dále vitamínu A ve formě retinylpalminátu. Stanovení těchto vzorků probíhalo ve směsi rozpouštědel ethylacetátu a acetonitrilu (2:1) po předchozím protřepání do hexanu a odpařením rozpouštědla.

Tabulka 11: Koncentrace extrahovaných látek z kosmetických produktů v mg/g

	koncentrace [mg/g]		
	β-karoten	cholekalCIFerol	tokoferol
krém s vitamínem E, Ziaja	-	-	1,037 ± 0,017
krém květ slunečnice, Ziaja	-	-	0,840 ± 0,007

Naměřené výsledky zaznamenané v tabulce 11 jasně vypovídají o přítomnosti tokoferolu v obou vzorcích. Metodou bylo tedy možné detekovat také tokoferylacetát zastupující vitamin E ve slunečnicovém krému. Tento ester má však blokovanou fenolovou skupinu a nemůže vitamin v kosmetických produktech přímo nenahrazovat. Uvolňuje pouze jeho nepatrná množství během hydrolýzy v kůži. Jeho výhodou je ovšem menší kyselost a tím i možnost delšího skladování [62].

Z potravinářských produktů byl testován rybí tuk značky Möller's a slunečnicový olej použitý k přípravě modelového prostředí v kapitole 4.8. Oba z uvedených výrobků byly podrobeny extrakci v hexanu HPLC kvality za přítomnosti vody. Po protřepání byla hexanová fáze přefiltrována přes PTFE filtr a analýza probíhala v uvedeném rozpouštědle. Tímto bylo předcházeno špatnému odpařování olejového zbytku a případné tvorbě dvou fází.

Tabulka 12: Koncentrace extrahovaných látek z reálných potravin v mg/ml

	koncentrace [mg/ml]		
	β-karoten	cholekalCIFerol	tokoferol
rybí olej, Möller's	-	-	0,483 ± 0,034
slunečnicový olej	-	0,392 ± 0,004	-

Výrobce deklarovaná množství vitaminů v rybím tuku jsou uvedena v tabulce 13. Reálné obsahy vitaminů A a D v produktu byly velmi nízké a nespádaly do oblasti detekce. Ze vzorku se však povedlo extrahovat vitamin E a jeho koncentrace byla stanovena jako (0,483 ± 0,034) mg/ml. V porovnání s tabelovanou hodnotou je možno pozorovat pouze malou odchylku, čímž byla ověřena spolehlivost metody pro stanovení tohoto výrobku.

Tabulka 13: Charakteristika rybího tuku Möller's

	koncentrace [mg/ml]
vitamin A	0,05
vitamin D	0,002
vitamin E	0,6

Za bohatý zdroj vitaminu E jsou považovány rostlinné oleje, mezi něž patří také olej slunečnicový (viz kap. 2.1.4.5). I přes tento předpoklad však nebyl tokoferol ve vzorku detekován. Vzhledem k ověření postupu při analýze rybího oleje se obsah tokoferolu v oleji

zřejmě pohyboval pod hranicí detekce nebo již došlo k jeho degradaci. Ve vzorku se podařilo stanovit pouze vitamin D, jehož přítomnost naopak není ve slunečnicovém oleji běžná. Dle výrobce tvoří množství vitaminů ve výrobku 0,1%, bližší informace však nejsou uvedeny. Olej tedy mohl být o tento vitamin obohacen.

Posledním analyzovaným produktem byly cereálie Cini Minis s uváděným obsahem vitaminu D, které byly podrobeny extrakci metodou dle Folche. Extrakce byla provedena dvěma způsoby za využití jiných rozpouštědel. První postup byl aplikován podle popisu uvedeného v kapitole 4.10. V druhém případě proběhla extrakce s použitím rozpouštědla hexanu p.a. namísto chloroformu. Obě metody však zůstaly bez odezvy.

Vzhledem k výrobcem udávanému množství vitaminu D, které činí pouze 0,93  $\mu\text{g}$  na 30gramovou porci, spadala koncentrace cholekalciferolu pravděpodobně mimo detekovatelnou mez. Pro možné stanovení by bylo nutné vzorek zakoncentrovat a vzhledem ke složitosti matrice vhodné také přečistit.

## 6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce se zabývala studiem liposomových částic s obsahem vybraných látek vitaminové povahy. Jejím cílem bylo charakterizovat vliv fosfolipidové dvojvrstvy obalující aktivní částici na zlepšení její stability v modelových prostředích. Z řady lipofilních vitaminů byly pro analýzu vybrány dva vitaminy – cholekalciferol a tokoferol. Trojici doplňoval  $\beta$ -karoten, jakožto látka přeměnitelná v lidském těle na aktivní vitamin A.

V první části práce byla hledána vhodná metoda pro stanovení vybraných látek. Vzhledem k již zavedené a optimalizované HPLC metodě pro  $\beta$ -karoten, byla tato technika s DAD detektorem a gradientovou elucí s úspěchem aplikována také na zbývající vitaminy.  $\beta$ -karoten, cholekalciferol i tokoferol vykazovali odlišná absorpční maxima bez překryvu spekter a mohly být stanovovány současně. Proměřením řady kalibračních roztoků byly sestaveny kalibrační křivky a určeny jejich rovnice pro následnou analýzu vzorků. Další část již byla věnována přípravě liposomových částic a jejich charakterizaci. Liposomy byly testovány na velikost, enkapsulační účinnost a stabilitu z okamžitého i dlouhodobého hlediska. Ze všech jejich roztoků byly přichystány vždy tři kontrolní skupiny s rozdílnou dobou centrifugace. Skupiny byly v rámci jednoho analytu porovnávány a byly vybírány částice nejvýhodnější pro aplikaci do potravinářských a kosmetických produktů. Velikostně spadala většina připravených částic do rozmezí 150 až 250 nm, pouze u nejdéle stáčených liposomů se objevily i větší velikosti. Tyto vzorky ovšem vykazovaly také vyšší hodnoty polydisperzity, jež vypovídaly o shlukování a nehomogenitě částic. Stabilita liposomů byla zjišťována pomocí zeta potenciálu. Měření proběhlo ihned po přípravě vzorku a pro zjištění dlouhodobé stability po 14 dnech skladování. Pouze  $\beta$ -karoten s 60minutovým stáčením spadl do oblasti nestability v obou z měřených případů. U ostatních vzorků byly po dvou týdnech zaznamenány absolutní hodnoty zeta potenciálu vyšší než 30 mV. Také měření enkapsulační účinnosti bylo provedeno ve dvou sériích s dvoutýdenním intervalem. Všechny vzorky vykazovaly vysoké enkapsulační účinnosti v rozmezí od 99 do 100 %. V průběhu skladování došlo k nepatrnému uvolňování zapouzdřených látek a poklesu EU. Největšího úbytku aktivních složek dosáhl cholekalciferol o 3,4 %. Celkově však částice skladované ve vodném prostředí vykazovaly v měřeném časovém úseku značnou stabilitu.

Dále byly liposomy aplikovány do modelových prostředí a byla sledována jejich degradace v průběhu času. Jako první byly simulovány kosmetické produkty na olejové bázi a byla zjišťována stabilita liposomů ve 3 různých médiích. K posouzení stability částic byla použita jako první prostředí destilovaná voda. Další dvě tvořily suspenze oleje a vody v poměrech 2:7 a 7:2. Největší degradace liposomů byla zaznamenána u tokoferolu, kdy bylo po dvou týdnech skladování uvolněno téměř 27,3 % původního množství látek do prostředí s nejvyšším podílem oleje. Během analýzy všech vzorků však byla odhalena přítomnost také degradačních produktů, které ovlivnily detekci skutečného množství uvolněných látek. Tokoferol tak jednoznačně odolával vlivům laboratorní teploty a světla nejlépe. Nejvhodněji se pro liposomy jeví prostředí destilované vody. Následně byla testována stabilita částic v modelových trávicích šťávách a bylo zjišťováno využitelné množství vitamínu po procesu trávení v případě jeho pojetí v polysacharidové matici. Současně byl tráven roztok volného analytu pro porovnání

vlivu ochrany při průchodu vzorku trávicím traktem. Na konci měření byl u neenkapsulovaných látek detekován pokles jejich původního množství o více než polovinu. U  $\beta$ -karotenu dosahovala degradace nejvyšších hodnot a bylo zachováno pouze 29,7 % provitaminu. Enkapsulované částice vykazovaly slibnější výsledky. Maximální množství uvolněného analytu bylo na konci naměřeno u cholekalciferolu v koncentraci 43,29 mg/g. V průběhu trávení však byla zaznamenána degradace složek ve vzorku a celkové množství zachovaného vitaminu se nepodařilo přesně určit.

V poslední části práce byl stanovován obsah vybraných analytů v reálných vzorcích. Pro analýzu byly použity cereálie, rybí a slunečnicový olej a z kosmetických produktů dva krémy. Výsledky byly porovnávány s informacemi uváděnými výrobcem.

Vzhledem k labilitě a degradaci zkoumaných látek v průběhu zpracování a skladování potravinářských i kosmetických produktů byla ověřena vhodnost jejich zapouzdření do liposomových obalů. Chráněné formy vitaminů vykazovaly dobrou stabilitu a to především ve vodných prostředích. Aplikace těchto částic by proto byla nejefektivnější právě do produktů s vysokým obsahem vody. Jejich příkladem mohou být fortifikované nápoje, energetické gely či micelární vody.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk, 1996. *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [2] ODSTRČIL, Jaroslav a Milada ODSTRČILOVÁ, 2006. *Chemie potravin*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. ISBN 80-701-3435-6.
- [3] FRAGNER, Jiří, 1961. *Vitaminy, jejich chemie a biochemie*. 1. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd.
- [4] WENKE, Maxmilián, 1990. *Farmakologie: učebnice pro lékařské fakulty*. 2. vyd. Praha: Avicenum. ISBN 80-201-0028-8.
- [5] HLÚBIK, Pavol a Libuše OPLTOVÁ, 2004. *Vitaminy*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0373-4.
- [6] SEMBA, Richard D., 2012. The Discovery of the Vitamins. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* [online]. **82**(5), 310-315 [cit. 2020-12-21]. ISSN 0300-9831. Dostupné z: doi:10.1024/0300-9831/a000124
- [7] SEMBA, Richard D., 2012. On the Discovery of Vitamin A. *Annals of Nutrition and Metabolism* [online]. **61**(3), 192-198 [cit. 2021-02-24]. ISSN 1421-9697. Dostupné z: doi:10.1159/000343124
- [8] DELUCA, Hector F, 2004. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. **80**(6), 1689S-1696S [cit. 2021-7-20]. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/80.6.1689S
- [9] PAPAS, Andreas M., c2001. *Vitamin E: záračný antioxidant při prevenci a léčbě srdečních chorob, rakoviny a stárnutí*. Praha: PRAGMA. ISBN 80-720-5773-1.
- [10] DOUŠA, Michal, 2007. *Stanovení vitamínů, doplňkových látek a vybraných léčiv v krmivech*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. ISBN 978-80-86548-94-4.
- [11] HERSCHEL, H. a Ulf H., 2011. Retinoids and Bone. *Contemporary Aspects of Endocrinology* [online]. InTech, 2011-11-30 [cit. 2021-7-12]. ISBN 978-953-307-357-6. Dostupné z: doi:10.5772/21425
- [12] KORDAČ, Václav, 1989. *Vnitřní lékařství III*. Praha 1: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., 620 s.
- [13] HOUŠTĚK, Josef, 1990. *Dětské lékařství*. Vydání 3. Praha 1: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p. ISBN 80-201-0032-6.
- [14] BIKLE, Daniel D., 2014. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem Biol* [online]. **21**(3), 319-329 [cit. 2021-7-20]. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2013.12.016
- [15] ŽAMBOCH, Jan, 1996. *Vitaminy*. Praha: Grada. ISBN 80-716-9322-7.
- [16] TOPOLČAN, Ondřej, 2012. *Vitamin D*. Brno: Tribun EU. ISBN 978-80-263-0321-3.
- [17] UCC certified by the CDC's Vitamin D Standardisation Certification Program, 2020. *School of Food and Nutritional Sciences* [online]. Cork: University College Cork [cit. 2020-12-31]. Dostupné z: <https://www.ucc.ie/en/fns/news/ucc-certified-by-the-cdcs-vitamin-d-standardisation-certification-program.html>
- [18] WACKER, Matthias a Michael HOLICK, 2013. Vitamin D — Effects on Skeletal and Extraskelatal Health and the Need for Supplementation. *Nutrients* [online]. **5**(1), 111-148 [cit. 2021-7-21]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu5010111

- [19] The immunological functions of the Vitamin D endocrine system., 2003. *Cellular and Molecular Biology* [online]. **49**(2), 277-300 [cit. 2021-7-20]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12887108/>
- [20] NIKI, Etsuo a Kouichi ABE, 2019. CHAPTER 1. Vitamin E: Structure, Properties and Functions. *Vitamin E* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2019, **2019**, 1-11 [cit. 2020-12-31]. Food Chemistry, Function and Analysis. ISBN 978-1-78801-240-9. Dostupné z: doi:10.1039/9781788016216-00001
- [21] FRAGNER, Jiří, 1961. *Vitaminy, jejich chemie a biochemie*. 2. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd.
- [22] KASPERKIEWICZ, Kinga, Michał B. PONCZEK, Jacek OWCZAREK, Piotr GUGA a Elżbieta BUDZISZ, 2020. Antagonists of Vitamin K—Popular Coumarin Drugs and New Synthetic and Natural Coumarin Derivatives. *Molecules* [online]. **25**(6) [cit. 2021-7-12]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25061465
- [23] Retinoidy v dermatologii, 2008. *Dermatol. praxi* [online]. **2**(4), 171-174 [cit. 2021-02-25]. Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2008/04/03.pdf>
- [24] POLCZ, Monica E. a Adrian BARBUL, 2019. The Role of Vitamin A in Wound Healing. *Nutrition in Clinical Practice* [online]. **34**(5), 695-700 [cit. 2021-02-25]. ISSN 08845336. Dostupné z: doi:10.1002/ncp.10376
- [25] KHALIL, Samar, Tara BARDAWIL, Carla STEPHAN, Nadine DARWICHE, Ossama ABBAS, Abdul Ghani KIBBI, Georges NEMER a Mazen KURBAN, 2017. Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects. *Journal of Dermatological Treatment* [online]. **28**(8), 684-696 [cit. 2021-02-25]. ISSN 0954-6634. Dostupné z: doi:10.1080/09546634.2017.1309349
- [26] KIM, Minji, Leonardo MIRANDOLA, Apurva PANDEY, Diane D. NGUYEN, Marjorie R. JENKINS, Meryem TURCEL, Everardo COBOS a Maurizio CHIRIVA-INTERNATI, 2012. Application of vitamin D and derivatives in hematological malignancies. *Cancer Letters* [online]. **319**(1), 8-22 [cit. 2020-12-31]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2011.10.026
- [27] SUN, Jun, 2017. The Role of Vitamin D and Vitamin D Receptors in Colon Cancer. *Clinical and Translational Gastroenterology* [online]. **8**(6) [cit. 2020-12-31]. ISSN 2155-384X. Dostupné z: doi:10.1038/ctg.2017.31
- [28] GUO, Yuanyuan, Jun LUO, Songwei TAN, Ben Oketch OTIENO a Zhiping ZHANG, 2013. The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **49**(2), 175-186 [cit. 2020-12-31]. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2013.02.006
- [29] YANG, Conglian, Tingting WU, Yan QI a Zhiping ZHANG, 2018. Recent Advances in the Application of Vitamin E TPGS for Drug Delivery. *Theranostics* [online]. **8**(2), 464-485 [cit. 2020-12-31]. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.22711
- [30] ALI, Nurshad, 2020. Role of vitamin D in preventing of COVID-19 infection, progression and severity. *Journal of Infection and Public Health* [online]. **13**(10), 1373-1380 [cit. 2021-04-09]. ISSN 18760341. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiph.2020.06.021



- [31] TROVAS, George a Symeon TOURNIS, 2021. Vitamin D and COVID-19. *Hormones* [online]. **20**(1), 207-208 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1109-3099. Dostupné z: doi:10.1007/s42000-020-00231-9
- [32] LIBERATO, Selma Coelho a Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA, 2006. Fortification of industrialized foods with vitamins. *Revista de Nutrição* [online]. **19**(2), 215-231 [cit. 2021-02-27]. ISSN 1415-5273. Dostupné z: doi:10.1590/S1415-52732006000200009
- [33] OTTAWAY, P. Berry, 1993. *The Technology of Vitamins in Food*. UK: Springer Science+Business Media. ISBN 978-1-4613-5889-3.
- [34] ROMINA ALINA, Vlaic, Mureşan CRINA CARMEN, Muste SEVASTITA, Mureşan ANDRUŢA, Muresan VLAD, Suharoschi RAMONA, Petruţ GEORGIANA a Mihai MIHAELA, 2019. Food Fortification through Innovative Technologies. *Food Engineering* [online]. IntechOpen, 2019-9-11 [cit. 2021-03-01]. ISBN 978-1-83881-975-0. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.82249
- [35] MAIBACH, Howard I., 2001. *Handbook of cosmetic science and technology*. New York: Marcel Dekker. ISBN 08-247-0292-1.
- [36] MANELA-AZULAY, Mônica a Ediléia BAGATIN, 2009. Cosmeceuticals vitamins. *Clinics in Dermatology* [online]. **27**(5), 469-474 [cit. 2021-03-01]. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/j.clindermatol.2009.05.010
- [37] MORRIS, Rob, 2015. Spectrophotometry. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* [online]. **11**(1) [cit. 2021-04-05]. ISSN 1948-3430. Dostupné z: doi:10.1002/9780470089941.et0201s11
- [38] BLANCO, M., J. COELLO, H. ITURRIAGA, S. MASPOCH, T. GÓMEZ-COTÍN, S. ALAOUI-ISMAILI a E. ROVIRA, 1995. Simultaneous spectrophotometric determination of fat-soluble vitamins in multivitamin pharmaceutical preparations. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* [online]. **351**(2-3), 315-319 [cit. 2021-7-10]. ISSN 0937-0633. Dostupné z: doi:10.1007/BF00321656
- [39] ZIMA, Tomáš, c2002. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén. ISBN 80-726-2201-3.
- [40] BEYERMANN, Klaus, 1987. *Organická stopová analýza*. Praha: SNTL. Ochrana životního prostředí.
- [41] TAYLOR, Steve L., Merton P. LAMDEN a AL. L. TAPPEL, 1976. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipids* [online]. **11**(7), 530-538 [cit. 2021-7-17]. ISSN 0024-4201. Dostupné z: doi:10.1007/BF02532898
- [42] MILLER, James M., 2009. Chromatography. *Digital Encyclopedia of Applied Physics* [online]. 1055-1102 [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: doi:10.1002/3527600434.eap064.pub2
- [43] KARAŹNIEWICZ-ŁADA, Marta a Anna GŁÓWKA, 2016. A review of chromatographic methods for the determination of water- and fat-soluble vitamins in biological fluids. *Journal of Separation Science* [online]. **39**(1), 132-148 [cit. 2021-7-10]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201501038
- [44] QUESADA, J.M., J.M. MATA-GRANADOS a M.D. LUQUE DE CASTRO, 2004. Automated method for the determination of fat-soluble vitamins in serum. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. **89-90**, 473-477 [cit. 2021-7-10]. ISSN 09600760. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsbmb.2004.03.056
- [45] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI, 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. **1**, 1806-1815. ISSN 2211601X. Dostupné z: doi:10.1016/j.profoo.2011.09.265
- [46] GONNET, M., L. LETHUAUT a F. BOURY, 2010. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release* [online]. **146**(3), 276-290 [cit. 2021-03-07]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2010.01.037

- [47] BERRY OTTAWAY, P., 2010. Stability of vitamins during food processing and storage. *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages* [online]. Elsevier, 2010, 539-560 [cit. 2021-7-11]. ISBN 9781845694951. Dostupné z: doi:10.1533/9781845699260.3.539
- [48] REDDY, Manju B. a Mark LOVE, 1999. The Impact of Food Processing on the Nutritional Quality of Vitamins and Minerals. *Impact of Processing on Food Safety* [online]. Boston, MA: Springer US, 1999, (459), 99-106 [cit. 2021-7-11]. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-1-4613-7201-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4615-4853-9\_7
- [49] RIBEIRO, A. Marisa, Berta N. ESTEVINHO a F. ROCHA, 2021. One century of Vitamin E: The progress and application of vitamin E encapsulation – A Review. *Food Hydrocolloids* [online]. [cit. 2021-7-11]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2021.106998
- [50] F. GIBBS, SELIM KERMASHA, INTEAZ AL, Bernard, 2009. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* [online]. **50**(3), 213-224 [cit. 2021-03-09]. ISSN 0963-7486. Dostupné z: doi:10.1080/096374899101256
- [51] DESAI, Kashappa Goud H. a Hyun JIN PARK, 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology* [online]. **23**(7), 1361-1394 [cit. 2021-03-09]. ISSN 0737-3937. Dostupné z: doi:10.1081/DRT-200063478
- [52] THIES, Curt, 2004. Microencapsulation. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* [online]. [cit. 2021-03-09]. Dostupné z: doi:10.1002/0471440264.pst198
- [53] JYOTHI, N. Venkata Naga, P. Muthu PRASANNA, Suhas Narayan SAKARKAR, K. Surya PRABHA, P. Seetha RAMAIAH a G. Y SRAWAN, 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation* [online]. **27**(3), 187-197 [cit. 2021-03-14]. ISSN 0265-2048. Dostupné z: doi:10.3109/02652040903131301
- [54] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. **8**(1) [cit. 2021-03-16]. ISSN 1556-276X. Dostupné z: doi:10.1186/1556-276X-8-102
- [55] BITOUNIS, Dimitrios, Raphaele FANCIULLINO, Athanassios ILIADIS a Joseph CICCOLINI, 2012. Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. *ISRN Pharmaceutics* [online]. **2012**, 1-11 [cit. 2021-7-12]. ISSN 2090-6153. Dostupné z: doi:10.5402/2012/738432
- [56] LAOUINI, A., C. JAAFAR-MAALEJ, I. LIMAYEM-BLOUZA, S. SFAR, C. CHARCOSSET a H. FESSI, 2012. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* [online]. **1**(2), 147-168 [cit. 2021-03-16]. ISSN 2164-9634. Dostupné z: doi:10.1166/jcsb.2012.1020
- [57] PATIL, Yogita P. a Sameer JADHAV, 2014. Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. **177**, 8-18 [cit. 2021-03-16]. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011
- [58] DUA, J. S., A. C. RANA a A. K. BHANDARI, 2012. LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* [online]. [cit. 2021-03-20]. 2229-4619.
- [59] ZHANG, Zhiping a Si-Shen FENG, 2006. The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. *Biomaterials* [online]. **27**(21), 4025-4033 [cit. 2021-03-21]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.03.006

- [60] *Zetasizer Nano User Manual* [online], 2013. Anglie: Malvern Instruments [cit. 2021-03-21]. Dostupné z: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20User%20manual.pdf>
- [61] ENGLYST, Klaus N, Hans N ENGLYST, Geoffrey J HUDSON, Tim J COLE a John H CUMMINGS, 1999. Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycemic response. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. **69**(3), 448-454 [cit. 2021-7-23]. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/69.3.448
- [62] BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, Gerard M.J., Hans E. JUNGINGER a Henk DE VRIES, 1995. Hydrolysis of RRR- $\alpha$ -tocopheryl acetate (vitamin E acetate) in the skin and its UV protecting activity (an in vivo study with the rat). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. **29**(1), 45-51 [cit. 2021-7-23]. ISSN 10111344. Dostupné z: doi:10.1016/1011-1344(95)90251-1

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

TDP – thiamindifosfát  
TTP – thiamintrifosfát  
FMN – flavinmononukleotid  
FAD – flavinadenindinukleotid  
NAD – nikotinamidadenindinukleotid  
NADP – nikotinamidadenindinukleotidfosfát  
UV – ultrafialové  
TPGS – d- $\alpha$ -tokoferyl polyethylenglykol 1000 sukcinát  
GC – plynová chromatografie  
LC – kapalinová chromatografie  
SFC – superkritická fluidní chromatografie  
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
GRAS – všeobecně považovaný za bezpečný  
SUV – malé unilamelární vezikuly  
LUV – velké unilamelární vezikuly  
MLV – multilamelární vezikuly  
DLS – dynamický rozptyl světla  
PCS – fotonová korelační spektroskopie  
ZP – zeta potenciál