

Enkapsulace vitamínu C

Bc. Romana Burešová

Diplomová práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Romana Burešová**
Osobní číslo: **T16581**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Enkapsulace vitamínu C**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Vitamín C a jeho vliv na zdraví organismu, zastoupení ve výživě a vstřebatelnost v těle**
2. **Možnosti enkapsulace aktivních látek**

II. Praktická část

1. **Experimentální příprava koloidních disperzí s cílem enkapsulace vitamínu C v lyozomálních micelách**
2. **Fyzikálně-chemická charakterizace připravených disperzních systémů**
3. **Zpracování a vyhodnocení získaných experimentálních dat ve formě tabulek a grafů**
4. **Statistické vyhodnocení získaných výsledků**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin II*. Vyd. 3. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-16-9.

[2] PULLAR, J.M., CARR, A.C. and VISSERS, M.C.M., 2017. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients*, 9(8), pp. 866.

[3] FANG, T., ZHEN, Q., LIAO, L., OWITI, A., ZHAO, L., KORBAN, S.S. and HAN, Y., 2017. Variation of ascorbic acid concentration in fruits of cultivated and wild apples. *Food Chemistry*, 225, pp. 132-137.

[4] GREGORIADIS, G. *Liposome technology: Liposome Preparation and Related Techniques*. New York: Informa Healthcare, 2007, 324 s. ISBN 978-0-8493-8821-7.

[5] OZSAGIROGLU, E. and GUVENLIR, Y.A., 2015. Encapsulation of L-ascorbic acid via polycaprolactone-polyethylene glycol-casein bioblends. *Polish Journal of Chemical Technology*, 17(4), pp. 32-36.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **2. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **25. dubna 2018**

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ROMANA BUREČOVÁ


Obor: TECHNOLOGIE
POTRAVIN

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 25.4.2018


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihledne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Vitamín C je jedním z nejdůležitějších vitamínů vůbec. Je nezbytný pro řadu biochemických dějů, účastní se imunitního systému a může být nápomocen při léčení závažných onemocnění. Vyskytuje se téměř ve všech živých organismech, nejvíce v ovoci a zelenině, je však nestabilní a při tepelné úpravě a nešetrném průmyslovém zpracování se rychle ničí. Pro zvýšení stability bylo vyvinuto mnoho metod, jak tuto aktivní látku zapouzdřit. Na jednu z nich, lipozomální enkapsulaci, je zaměřená tato práce. Lipozomy jsou fosfolipidové vezikuly schopné ve své struktuře zachytit a ochránit hydrofobní i hydrofilní látky. S přidáním vhodného biopolymeru, v našem případě derivátu karboxymethylcelulózy, je možné tyto ochranné vlastnosti ještě podpořit. Praktická část této práce je zaměřená na studium stability lipozomální disperze obsahující sójový lecitin a karboxymethylcelulózu jako enkapsulační pouzdro pro kyselinu askorbovou a fyzikálně-chemické změny disperze při působení zvýšených teplot.

Klíčová slova: vitamín C, kyselina askorbová, sójový lecitin, karboxymethylcelulóza, enkapsulace, lipozomy, stabilita.

ABSTRACT

Vitamin C is one of the most important vitamins of all. It is necessary for a number of biochemical processes, participates in the immune system, and can be helpful in the treatment of serious disorders. It occurs in almost all living organisms, mostly in fruits and vegetables, but it is unstable and is rapidly destroyed by heat treatment and industrial processing. Several methods have been developed to enhance stability for encapsulating active compounds. One of these, liposomal encapsulation, is a topic of this thesis. Liposomes are phospholipid vesicles and they can protect hydrophobic and hydrophilic substances by their structure. With the addition of a suitable biopolymer, in our case a carboxymethyl cellulose derivative, these protective properties can be further enhanced. The practical part of this thesis is focused on the study of stable liposomal dispersion containing soy lecithin and carboxymethylcellulose as encapsulation compound for ascorbic acid and physicochemical changes of dispersion at elevated temperatures.

Keywords: vitamin C, ascorbic acid, soya lecithin, carboxymethyl cellulose, encapsulation, liposomes, stability.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych touto cestou velmi poděkovat vedoucímu mé diplomové práce

prof. Ing. Lubomíru Lapčíkovi, Ph.D.,

za odborné vedení, cenné rady a trpělivou pomoc při konzultacích.

Mé poděkování také patří Ing. Tomáši Valentovi za odbornou asistenci v laboratoři
a UP Olomouc za provedení TEM mikroskopie.

Velké poděkování patří také mé rodině a přátelům za podporu po celou dobu mého studia.

„Non schoale sed vitae discimus.

Neučíme se pro školu, ale pro život.“

Lucius Anneaus Seneca

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VITAMÍN C	12
1.1 STANOVENÍ VITAMÍNU C	13
1.2 DENNÍ DÁVKA VITAMÍNU C	13
1.3 VÝSKYT V POTRAVINÁCH	14
1.3.1 Vliv šlechtění rostlin	14
1.4 SKLADOVÁNÍ A PRŮMYSLOVÉ ZPRACOVÁNÍ	15
1.4.1 Chlazení	15
1.4.2 Mražení	16
1.4.3 Tepelné opracování	16
1.4.4 Sušení	16
1.4.5 Konzervace vysokým tlakem	16
1.5 VLIV NA ZDRAVÍ ORGANISMU	17
1.5.1 Vitamín C a diabetes mellitus	18
1.5.2 Vitamín C a kůže	18
1.5.3 Vitamín C a rakovina	19
1.5.4 Vitamín C a srdeční onemocnění	19
1.5.5 Vitamín C a věkem podmíněná makulární degenerace a šedý zákal	19
2 ENKAPSULACE	21
2.1 SPREJOVÉ SUŠENÍ	22
2.2 KOACERVACE	23
2.3 EMULZIFIKACE	23
2.4 ZAPOUZDŘENÍ DO LIPOZOMŮ	24
2.4.1 Lipozomy	24
2.4.1 Metody přípravy	25
2.4.2 Mechanismus vstřebávání v organismu	28
2.4.3 Změny při skladování	28
2.5 SYSTÉM LIPOZOM – POLYMER	29
2.5.1 Využitelné polymery	29
2.5.1.1 Polysacharidy	30
2.5.2 Lipozomální systém Stealth (dlouhodobě cirkulující)	30
2.5.3 Lipozomální systém založený na zacílení „targeted“	30
2.6 DRUHY LIPOZOMŮ NOVÉ GENERACE	31

3	STABILITA LIPOZOMÁLNÍCH SOUSTAV	33
3.1	BIOLOGICKÁ STABILITA LIPOZOMŮ.....	33
3.2	CHEMICKÁ STABILITA LIPOZOMŮ	33
3.3	FYZIKÁLNÍ STABILITA LIPOZOMŮ	33
3.4	KOLOIDNÍ STABILITA LIPOZOMŮ.....	34
3.4.1	Sterická stabilizace.....	34
3.4.2	Elektrostatická stabilizace	35
II	PRAKTICKÁ ČÁST	36
4	CÍLE PRÁCE	37
5	MATERIÁL A METODY	38
5.1	MATERIÁLY	39
5.1.1	Sójový lecitin	39
5.1.2	Polysacharidy na bázi celulózy.....	39
5.1.3	Hydrogenuhličitan draselný	40
5.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	40
5.3	METODY FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ ANALÝZY.....	41
5.3.1	Určení velikosti částic lipozomů metodou rozptylu světla.	41
5.3.1.1	Použitý přístroj a parametry měření.....	41
5.3.2	Určení elektrokinetického Zeta potenciálu (ζ -potenciál)	42
5.3.2.1	Použitý přístroj a parametry měření.....	42
5.3.3	Termická analýza TG DSC disperzí.....	42
5.3.3.1	Použitý přístroj a parametry měření.....	43
5.3.4	Měření reologických vlastností.....	43
5.3.4.1	Použitý přístroj a parametry měření.....	44
5.3.5	Analýza TEM.....	44
5.3.5.1	Použitý přístroj a parametry měření.....	44
6	VÝSLEDKY	45
6.1	POLOMĚR ČÁSTIC	45
6.2	ZETA POTENCIÁL	47
6.3	REOLOGIE	48
6.4	TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE	53
6.5	TERMICKÁ ANALÝZA METODOU DSC	53
7	DISKUZE	56
	ZÁVĚR	59
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	68
	SEZNAM OBRÁZKŮ	69
	SEZNAM TABULEK	70
	SEZNAM PŘÍLOH	71

ÚVOD

Vitamín C je velmi malá molekula, která ovšem značně ovlivňuje lidskou existenci. Bez vitamínu C přijatého stravou by totiž člověk nedokázal dlouho žít. Neumí si jej syntetizovat z jiných látek sám, a proto nejlepší způsob, jak se zásobit pravidelnou dávkou tohoto pro život nezbytného vitamínu, je konzumace ovoce a zeleniny, což jak jistě každý ví, tvoří jeden ze základních pilířů našeho zdravého stravování.

Než byl vitamín objeven, sužovalo námořníky na dlouhých objevitelských cestách a lid trpící hladem krvácivé onemocnění z jeho nedostatku zvané kurděje. Dnes už se s ním téměř nesečkáme, za což vděčíme objevitelům vitamínu C a především Siru Walteru Normanu Hawthorthovi z Birminghamské univerzity, držiteli Nobelovy ceny za chemii z roku 1937, který jako první vypracoval přesnou chemickou strukturu vitamínu C a vyrobil ho syntetickou cestou, čímž odjistil pomyslnou zbraň nejen v boji proti kurdějím, ale také k ochraně proti dalším onemocněním i tzv. civilizačním chorobám, provázející lidské životy. Mnoho studií totiž potvrzuje, že dobré zásobování tkání a orgánů vitamínem C má vliv na redukci volných radikálů, pomáhá buňkám vyrovnávat se s oxidačním stresem, uplatňuje se v imunitním systému a celkově v metabolismu každého z nás.

V poslední době se ale řeší jiné otázky – jak docílit toho, aby byl vitamín v těle optimálně vstřebán a co udělat pro to, aby mohl být přijímán ve větších dávkách. Jako odpověď byla vyvinuta řada metod a postupů, jak nestabilní, ve vodě rozpustný vitamín obalit neboli zapouzdřit a dopravit na místo určení bez rizika, že bude látka předčasně uvolněna. Jednou z těchto metod je enkapsulace do podoby lipozomů. Těmto lipozomům lze navíc pomoci přidáním polymerní látky, systém pak může lépe odolávat kyselému prostředí žaludečních šťáv nebo vitamín C dodávat na přesně specifikované místo určení. V praktické části této práce bude studována stabilita lipozomálního systému při zvýšených teplotách, jakožto dílčí součást badatelské práce zabývající se enkapsulací vitamínů a aktivních látek.

I. TEORETICKÁ ČÁST

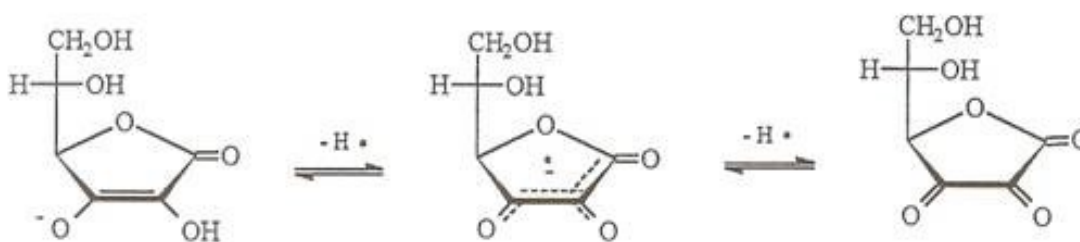
1 VITAMÍN C

L-askorbová kyselina, běžně nazývaná vitamínem C, je nezbytný metabolit pro rostliny a zvířata. Pro některá zvířata (primáti, netopýři, morčata) a zejména pro lidi tvoří důležitou součást stravy, jelikož ztratili část genetické informace umožňující tuto látku syntetizovat. Bohužel, zatímco kyselina L-askorbová poskytuje mnoho pro zdraví prospěšných účinků, její stabilita je také snadno ovlivnitelná teplotou, slunečním světlem a kyslíkem. Hlavní biologická aktivita se vztahuje k udržování oxidačně-redukčního potenciálu, zahrnující inaktivaci volných radikálů. Reaguje s aktivními formami kyslíku a s oxidovanými formami vitamínu E, čímž zabezpečuje ochranu vitamínu E a lipidů membrán před oxidací. Účastní se inhibice tvorby nitrosaminů, syntézy kolagenu (biosyntéza mukopolysacharidů, prostaglandinů) absorpce iontových forem železa a jeho transportu a stimuluje transport sodných a chloridových iontů. Uplatňuje se také v metabolismu cholesterolu a histaminu. [1,2,3]

Vitamín C je společný název, který zahrnuje nejen kyselinu askorbovou, ale také celý reverzibilní redoxní systém složený z L-askorbové kyseliny, produktu její jednoelektronové oxidace (L-askorbylradikálu) a produktu dvouelektronové oxidace (L-dehydroaskorbové kyseliny). Kyselina askorbová a askorbylradikál se v roztocích o fyziologickém pH vyskytují jako anionty. Aktivitu vitamínu C má ze čtyř možných stereoisomerů kyseliny askorbové pouze L-askorbová kyselina (γ -lakton L-threo-hex-2-hexenonové kyseliny). [3]

V potravinách rostlinného i živočišného původu je 90-95 % vitamínu přítomno ve formě askorbové kyseliny, zbytek tvoří dehydroaskorbová kyselina. L-askorbová kyselina je ve vyšších rostlinách a zvířatech syntetizována z D-glukosy a existuje ve volné i vázané formě. Ve vázané formě ji například můžeme najít jako askorbigen, vznikající reakcí askorbové kyseliny s degradačními produkty indolových glukosinolátů v zástupcích čeledi brukvovitých. [3,4]

Vodné roztoky vitamínu C jsou při normální teplotě za současného vyloučení kyslíku poměrně stálé, avšak při zvýšení teploty a za přístupu světla dochází k rychlé oxidaci a vzniku přes dehydroaskorbovou kyselinu až po kyselinu šťavelovou a L-threonovou. Jako rozkladné produkty byly identifikovány také furfurool a oxid uhličitý. Stabilizující účinek má kyselina metafosforečná a citronová. [4]



Obr. 1 Biologicky aktivní formy vitamínu C (*L*-askorbová kyselina, anion askorbylradikálu, *L*-dehydroaskorbová kyselina) [3]

1.1 Stanovení vitamínu C

Na stanovení askorbové kyseliny mohou být použity různé analytické metody, včetně titrační metody, vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), voltametrie, průtokové vstříkovací analýzy (FIA), chemiluminiscence, spektrofotometrie a amperometrie. Právě elektrochemické metody včetně voltametrie a amperometrie, jsou jedny z nejatraktivnějších postupů v potravinářské, farmaceutické, environmentální a biologické analýze kvůli nízké ceně, vysoké citlivosti a účinnosti. Obecně nejvýhodnějším způsobem analýzy pro stanovení vitamínu C je však HPLC, protože poskytuje vyšší selektivitu než spektrofotometrické, titrační nebo enzymatické metody. Citlivost HPLC závisí ve velké míře na výběru vhodných detektorů. Nejčastěji se používají spektrofotometrické a elektrochemické detektory. [5,6]

1.2 Denní dávka vitamínu C

Vitamín C je nejčastěji užívaným doplňkem stravy. Pro perorální podání existuje běžně ve formě tablet, v kapslích, v nápojových mixech, multivitaminových přípravcích, antioxidantních prostředcích i jako samotný krystalický prášek. Dalším způsobem je intravenózní podání. Orální podání je omezeno na přibližně 2 až 3 gramy denně, jelikož při vyšších dávkách může dojít k podráždění střev a průjmům z důvodu překročení limitu tolerance střev. Použití vitamínu C ve vysokých dávkách však bylo dlouho hájeno při léčbě různých onemocnění a poruch včetně kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny, šedého zákalu, dny a otravě těžkými kovy (jako je olovo a arsen). Vysoké dávky vitamínu C jsou tradičně podávány intravenózně, aby se zabránilo vedlejším účinkům perorálních dávek a aby se zvýšily plazmatické hladiny nad úroveň obvykle dosažené při perorálním podání. Pro zvýšení absorpce a snížení vedlejších účinků perorálního podávání je výhodné vitamín C zapouzdřit do lipozomů.

Pestrá strava s vysokým obsahem ovoce a zeleniny by měla být dostatečná k pokrytí potřeb vitamínu C zdravého jedince. Podle FDA je referenční příjem pro vitamín C stanoven na 45 až 120 mg denně pro dospívající a dospělé. Kuřákům se doporučuje konzumovat dalších 35 mg denně navíc. Obecně platí, že „vysoká dávka“ a „mega dávka“ se vztahují k dávce mezi přibližně 1000 až 10 000 mg denně a doporučuje se podávat pacientům s respiračním onemocněním a při rekonvalescenci. Některé studie také uvádí, že vysoké dávky vitamínu C mohou zmírnit následky ohromujícího oxidačního stresu a výrazně zkvalitnit zotavení u lidí, kteří prodělali infarkt mozku či myokardu nebo trpících ischemickou chorobou. Nedostatečné dávky vitamínu ve výživě se projevují různými symptomy, nejčastěji únavou. Příznakem akutní avitaminózy jsou kurděje [3,7,8]

1.3 Výskyt v potravinách

Vitamín C se nachází téměř ve všech živých organismech, nejvíce ho obsahuje čerstvá zelenina a ovoce. Nejdůležitějším zdrojem ve vodě rozpustné kyseliny askorbové z hlediska přirozeného výživového příjmu jsou některé zeleniny z čeledi brukvovitých, brambory a citrusové plody, kde se obsah látky pohybuje mezi 0,02 a 1,7 %. Brambory jsou v podmínkách České republiky zdrojem asi 30 % vitamínu C. Dalšími bohatými zdroji jsou šípky nebo plody jeřábu. V současnosti se látka připravuje výhradně synteticky a přidává se k džusům, konzervovanému a mrazírensky skladovanému ovoci pro prevenci oxidace a dalších nežádoucích změn. [3,4,9]

1.3.1 Vliv šlechtění rostlin

V obsahu vitamínu C u rostlin může hrát roli lidská selekce vybraných odrůd a jejich modifikace za účelem zisku plodu s určitými vlastnostmi. Jelikož jsou známy mezidruhové hybridizační techniky, mohou být některé druhy užitečnými genetickými zdroji pro vývoj nových odrůd s vyšším obsahem vitamínu, jako je tomu například u Aktinidie. Plody této rostliny jsou známé jako kiwi. Tento rod obsahuje více než 60 druhů, ale pouze tři z nich jsou úspěšně domestikované. Vysoký obsah vitamínu C je jedním z důležitých a atraktivních parametrů kvality tohoto ovoce a správné vyhodnocení obsahu vitamínu C je nutné pro výběr nebo vývoj nových kultivarů. Z jiné studie zkoumající kultivované a divoce rostoucí jablka vyplývá, že divoce rostoucí ovoce obsahuje vyšší úroveň askorbové kyseliny než pěstované ovoce. Rozdíl v obsahu askorbové kyseliny v ovoci je připisován nepřímému následku se-

lekce směřující k získání většího a sladšího ovoce. U jablek je koncentrace askorbové kyseliny extrémně vysoká v ranném stádiu růstu a výrazně klesá se zvyšujícím se stupněm zralosti. Mimořádně vysoká hladina u mladých plodů je pravděpodobně výsledkem koordinovaného nárůstu askorbové kyseliny během její syntézy, regenerace a translokace z listů. [10,11]

1.4 Skladování a průmyslové zpracování

Přestože se hojně kyselina askorbová vyskytuje v ovoci a zelenině, většina z ní je zničena během zpracování. Vitamín C při skladování podléhá oxidativní a enzymatické degradaci na kyselinu dehydroaskorbovou (DHAA) a také ireverzibilní oxidaci DHAA na kyselinu diketogulonovou, která již nevykazuje aktivitu vitamínu C. Askorbát oxidáza je endogenní enzym podílející se na tomto procesu. Různé faktory, včetně přítomnosti kyslíku a kovových iontů z nádobí a náradí (zejména Cu^{2+} , Ag^+ , Fe^{3+}), alkalického pH a vysoké teploty ovlivňují obsah vitamínu C v surovinách před okamžikem spotřeby a mají za následek změnu skutečných úrovní obsahu v potravinách. Při zjišťování vlivu různých konzervačních metod na snižování obsahu vit. C je proto vhodné zamyslet se nad všemi aspekty, které mohou proces ovlivnit. Pro prodloužení doby trvanlivosti sezónního ovoce a zeleniny při zachování zdravotních přínosů a smyslových charakteristik (sladkosti) těchto komodit se zmrazení jeví jako nejlepší metoda ve srovnání s konzervací vysokými teplotami, sušením a lyofilizací. Tepelné zpracování, jako je například blanšírování, může také eliminovat enzymatickou oxidaci vitamínu C díky inaktivaci oxidázy kyseliny askorbové. Ztráta během zpracování je rovněž způsobena vyluhováním, čemuž lze zabránit zahříváním a rozmrazováním surovin v uzavřeném systému. Zachování kyseliny askorbové v produktech z ovoce a zeleniny je hlavní záležitostí potravinářských zpracovatelů. [9,12,13,14]

1.4.1 Chlazení

Ztráty vitamínu během manipulace a skladování v chladničce jsou způsobeny jejich rozpustností ve vodě, tepelnou degradací a enzymatickou oxidací. Přítomnost chelatačních činidel nebo inhibitorů oxidázy kyseliny askorbové v potravinách může chránit vitamín C proti oxidaci a může vysvětlovat jednotlivé vzorce změn u různých druhů ovoce a zeleniny. Odlišnosti v obsahu vitamínu C můžou být navíc výsledkem změny exprese genů a aktivity enzymů v metabolismu vitamínu C během skladování, jelikož vitamín může být syntetizován jako

reakce na stres způsobený teplotou skladování a pak využít jako antioxidační sloučenina při odpovědi na oxidační stres způsobený nízkými teplotami. [15]

1.4.2 Mražení

K nejmenším ztrátám Vitamínu C dochází při procesu mražení, při sušení i lyofilizaci jsou ztráty znatelně vyšší. Při studiu bobulovitého ovoce byly zjištěny jednotlivé ztráty v porovnání s čerstvým ovocem při sušení 89 %, při lyofilizaci 84 % a při mražení 14 %, přičemž k nejnižším ztrátám dochází v ovoci s nejvyšším obsahem sušiny. Vitamín C ve zmrazeném ovoci a zelenině může být stabilní po určitou dobu při typickém způsobu zpracování a skladování, například nebyla zaznamenána žádná významná změna v obsahu vitamínů v mandarinkách klementina zmrazených po dobu jednoho roku. U brambor byl pozorován kumulativní pokles už po 1 měsíci, dokonce i při skladování při $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ v inertní atmosféře a chráněných před světlem. [12,16]

1.4.3 Tepelné opracování

Ze všech metod jsou ztráty vitamínu působením vysokých teplot nejvyšší. Existuje spousta možností, jak lze suroviny tepelně opracovávat. K nejnižším ztrátám dochází při mikrovlnném ohřevu a při vaření v tlakovém hrnci. Při klasickém vaření se pohybují ztráty kolem 50 % a lze je snížit, pokud suroviny vkládáme do vařící vody. Rozsah ztrát po tepelných úpravách byl zaznamenán v širokém rozsahu od 14,4 % až po 94,6 % v závislosti na podmínkách procesu jako je pH, teplota a přítomnost vody. Nejmenší ztráty lze dosáhnout aplikací vysokoteplotní krátkodobé sterilace. U kompotů dochází k největším ztrátám během skladování. [3,9,17,18,]

1.4.4 Sušení

K nejvyšším ztrátám dochází při sušení, pokud teplota přesáhne $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sušením se ztrácí až 80 % vitamínu. Moderní metody dehydratace jako lyofilizace a extruze jsou mnohem šetrnější než klasické sušení. [3,9,16]

1.4.5 Konzervace vysokým tlakem

Konzervace vysokým tlakem přináší významný konzervační potenciál vitamínu C nejen během zpracování, ale také během skladování za chladících teplot. To činí produkt bezpečný

a zvyšuje dostupnost a zachování vitamínu při dlouhodobém skladování. Prostřednictvím vhodných kombinací tlaku, času a teploty může být tato konzervační metoda vhodnou alternativou k tepelnému zpracování v určitých potravinářských produktech. [25]

1.5 Vliv na zdraví organismu

Vitamín C je nepostradatelný při syntéze kolagenu, kde hydroxyluje L-prolin. Nepřímo se účastní odbourávání tyrosinu, je nezbytný pro β -hydroxylaci dopaminu při syntéze adrenalinu z tyrosinu a uplatňuje se při biosyntéze karnitinu, thyroxinu, noradrenalinu, dopaminu a tryptofanu i při syntéze žlučových kyselin. Pomáhá vstřebávání železa v gastrointestinálním traktu. Významně chrání tkáň proti reaktivním formám kyslíku a dusíku, je součástí imunitního systému a předpokládá se i vliv na inhibici LDL-cholesterolu, čímž potlačuje aterosklerózu. [4]

Vitamín C se vstřebává ve sliznici proximální části tenkého střeva pomocí sodíko-dependentního aktivního přenosu kyseliny askorbové. Obrat kyseliny askorbové v organismu je velmi rychlý. Jsou známy 2 transportéry vitamínu C závislé na sodíku: SVCT1 a SVCT2. Oba jsou glykoproteiny, které dopravují vitamín k buňkám. SVCT1 je schopný devět krát rychlejšího transportu, zatímco SVCT2 má k vitamínu vyšší afinitu. Vlastnosti těchto dvou transportérů vysvětluje jejich distribuce v tkáních. SVCT1 se nejčastěji vyskytuje v epiteliálních tkáních (např. v tenkém střevě), kde je transport vitamínu větší, než požaduje buňka. SVCT2 najdeme především v mozku, kosterních svalech, placentě a očích, kde je přínos vitamínu přísně řízen k udržení adekvátní koncentrace v tkáni. Genetické odchylky transportních molekul SVCT1 a SVCT2 jsou jedním z faktorů ovlivňujících plazmatickou hladinu vitamínu, jelikož tyto molekuly ovlivňují nejen vstřebávání vitamínu C ze střeva, ale i jejich dostupnost pro tkáň. Plazmatická hladina vitamínu je dále snižována kouřením a zvýšeným příjmem alkoholu i řadou onemocnění, například chorob zažívacího traktu, ledvin či onkologických onemocnění. Dostupnost vitamínu v organismu je ovlivňována i ekonomickými faktory – až čtvrtina nízkopříjmové populace má snížený příjem tohoto velmi důležitého vitamínu. [9,19,20]

Nedávný pokrok v oblasti epigenetiky naznačuje, že nedostatečný příjem vitamínu C může narušit dynamiku methylace a demethylace DNA a histonu, což může následně přispět k fenotypovým změnám organismu. Narušení epigenetických procesů tak může vést

ke vzniku vrozených vad i k řadě různých chorob. Regulováním epigenomu může být vitamín C zapojen do embryonálního a postnatálního vývoje i stárnutí. [19]

Vyšší spotřeba ovoce a zeleniny je spojena s nižším rizikem výskytu většiny typů rakoviny, pravděpodobně částečně kvůli vysokému obsahu vitamínu C. Většina případových kontrolních studií zjistila souvislost mezi obsahem vitamínu C v krvi a rakovinou plic, prsu, tlustého střeva nebo konečníku, žaludku, ústní dutiny, hrtanu nebo hltanu a jícnu. [7]

1.5.1 Vitamín C a diabetes mellitus

Diabetes mellitus je skupina onemocnění charakterizovaná vysokými hladinami glukózy v krvi, které jsou výsledkem poruch schopnosti těla produkovat nebo užívat inzulin. Vitamín C může pomoci při léčbě diabetu stimulací inzulínového mechanismu a může být také použit pro prevenci nebo snížení poškození krevních cév způsobených diabetem u pacientů se špatnou kontrolou glukózy. Ze studií vyplívá, že denní konzumace alespoň přibližně 1000 mg doplňkového vitamínu C je přínosem pro snížení krevního cukru a lipidů u pacientů s diabetem typu II. Existují studie, které naznačují, že lidé s diabetem mohou mít zvýšenou aktivitu vychytávání vitamínu buňkami a tím pádem rychlý obrát vitamínu C, což vyžaduje jeho vyšší příjem a znamená také zvýšené riziko nedostatku. Z přehledu 23 studií zabývajících se stavem vitamínu C u lidí s diabetem publikovaných v letech 1935 až 1996 bylo zjištěno, že lidé s diabetem mají alespoň o 30 % nižší koncentrace vitamínu C než lidé bez cukrovky. [7,21]

1.5.2 Vitamín C a kůže

Antioxidační aktivita vitamínu C z něj činí vynikajícího kandidáta jako ochranný faktor proti UV záření. Kožní fibroblasty mají absolutní závislost na vitamínu C pro syntézu kolagenu a pro regulaci rovnováhy kolagenu a elastinu v dermis. Kožní keratinocyty mají schopnost akumulovat vysoké koncentrace vitamínu C, a to ve spojení s vitamínem E poskytuje ochranu proti UV záření. Vitamín C ovlivňuje genovou expresi antioxidačních enzymů, organizaci a akumulaci fosfolipidů a podporuje tvorbu rohové vrstvy a diferenciaci epitelu obecně. Dobré zdraví kůže je pozitivně spojeno s příjmem ovoce a zeleniny v řadě studií. Vitamín C napomáhá hojení ran, minimalizuje vznik jizev a snižuje příznaky stárnutí. [23]

1.5.3 Vitamín C a rakovina

Kyselina askorbová působí v různých koncentracích jako antioxidant několika mechanismy, zejména tlumí cytotoxicitu, snižuje apoptózu, snižuje růst nádorů a sekreci zánětlivých cytokinů. Jako protinádorové činidlo působí prostřednictvím inhibice buněčné progresy, má antiproliferační účinek na nádorové buňky, indukuje jejich apoptózu a další. Vysoká koncentrace vitamínu C může působit jako pro-oxidant a vytváří peroxid vodíku, který má selektivní toxicitu vůči rakovinným buňkám. Jsou však potřebné další studie pro určení přesné dávky, pochopení změn a odezvy mechanismů jednotlivých procesů, které napomáhají při léčbě a prevenci rakoviny s cílem zlepšit kvalitu života jak u pacientů, tak u celkové populace. Existuje také několik případových studií s pacienty s pokročilým onkologickým onemocněním, u kterých byla pozorována pozoruhodná doba přežití po podání vysokých dávek intravenózního vitamínu C. [7,22]

1.5.4 Vitamín C a srdeční onemocnění

Bylo prokázáno, že vitamín C snižuje adhezi monocytů na výstelku krevních cév. Přílnost cirkulujících monocytů k endotelovým buňkám je klíčovým faktorem při tvorbě aterosklerózy. Vitamín C také zvyšuje produkci oxidu dusnatého v endotelu, podporuje vazodilataci a snižuje krevní tlak. Kromě toho může vitamín C zabránit apoptóze buněk hladkého svalstva cév, které pomáhá udržovat plaky stabilnější při již vyvinuté ateroskleróze. Současná literatura však poskytuje pouze malou podporu pro použití doplňku vitamínu C ke snížení rizika srdečních chorob. Mnoho studií ukazuje, že neexistuje žádný vztah mezi příjmem vitamínu C a rizikem srdečních onemocnění, jen málo naznačuje mírné přínosy a některé předpovídají dokonce i mírné zvýšení rizika. [7,24]

1.5.5 Vitamín C a věkem podmíněná makulární degenerace a šedý zákal

Věkem podmíněná makulární degenerace a šedý zákal jsou dvě z hlavních příčin ztráty zraku u starších jedinců. Postihuje makulu a vede k postupné ztrátě ostrého, centrálního vidění. Mokrá forma onemocnění nastává, když zvětšené krevní cévy za sítnicí rostou pod makulou a způsobují její poškození. Suchá forma nastává v případě, když se buňky citlivé na světlo v makule pomalu rozpadávají, což způsobí rozmazání centrálního vidění. Současnou léčbou závažných případů je operace a nahrazení čočky. Protože oxidační stres může přispět

k rozvoji katarakty, mohou být antioxidanty, jako je vitamín C, použity k léčbě nebo prevenci těchto onemocnění. Výzkum ukázal, že vitamín C může zpomalit progresi. [7]

2 ENKAPSULACE

Většina běžných průmyslových potravin je charakterizována nízkým obsahem nutričně významných látek především pokud jde o kvantitativní a kvalitativní složení mikroživin. Tento problém je důsledkem rozvoje technologií zpracování surovin, jejich rafinací a zajištěním konzervačních vlastností hotových výrobků. Dochází především k inaktivaci vitamínů a dalších fyziologicky aktivních látek v důsledku různých reakcí a interakcí s jinými složkami potravin. Zapouzdřování mikronutrientů nezajišťuje pouze jejich udržení v přirozené formě při obohacování potravin, ale také přispívá k jejich účinnému vstřebání lidským tělem. [27]

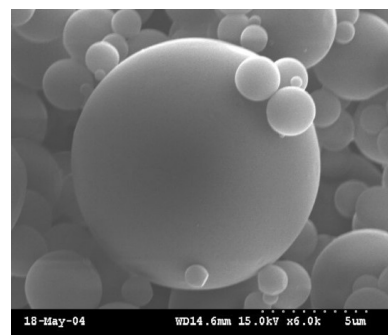
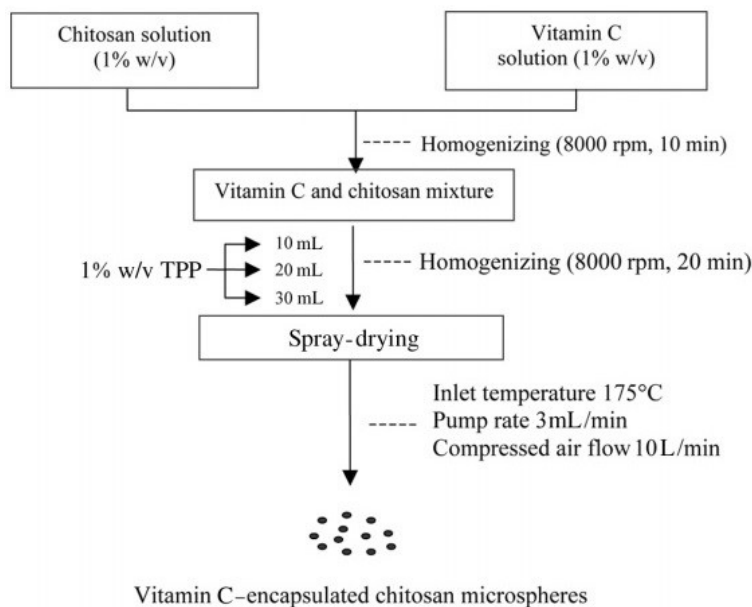
Tab. 1 Metody enkapsulace [26]

Metoda enkapsulace	Hlavní kroky metody
Sprejové sušení	Příprava disperze, homogenizace, rozptýlení částic vstříkáním, dehydratace částic
Sprejové chlazení	Příprava disperze, homogenizace, rozptýlení částic vstříkáním
Potahování částic při fluidizaci	Příprava enkapsulační směsi, fluidizace jádrových částic a jejich potažení
Extruze	Příprava enkapsulační směsi, disperze jádrových částí ve směsi, chlazení nebo sušení dehydratační kapalinou
Odstředivá extruze	Příprava enkapsulační i jádrové směsi, koextruze obou směsí pomocí trysek při centrifugaci
Lyofilizace	Smíchání vnitřní látky s látkou potahovací, sušení mrazem
Koacervace	Tvorba tří nemísitelných chemických fází, uložení a tuhnutí obalové fáze
Odstředivá separace suspenzí	Smíchání vnitřní látky s látkou potahovací, pokrytí částic pomocí rotačního disku, sušení
Kokrystalizace	Příprava přesyceného roztoku sacharózy, přidání jádrových částic, krystalizace
Tvorba lipozomů	Mikrofluidizace, ultrasonikace

Enkapsulace je technologie balení pevných, kapalných i plyných materiálů do malých kapslí, kdy jsou aktivní složky kompletně chráněné, zakryté a oddělené fyzikální bariérou. Tento systém uvolňuje svůj obsah v řízeném množství během delšího časového období za specifických podmínek [26,28]

2.1 Sprejové sušení

Sušení patří mezi nejstarší a nejrozšířenější techniky enkapsulace. Proces výroby suchých pevných látek, ať už v prášku, granulátu nebo aglomerátu, spočívá v rozpuštění, emulgaci či disperzi aktivní látky v nosiči a následném roztržení sprejováním v horké sušící komoře. Rozpouštědlo se rychle odpaří proudem ohřátého vzduchu, který transformuje malé kapičky do pevných mikročástic. Výsledkem je tvorba filmu na povrchu kapek. Sušení rozprašováním je použitelné pro látky odolné i citlivé na teplo, pro ve vodě rozpustné i nerozpustné látky a hydrofilní i hydrofobní polymery. Nosiče jako metakrylátové kopolymery (Eudragit®) zajišťují pozvolné uvolňování léčiv a aktivních látek v GIT. Ve formě acidorezistentních obalů zajišťují ochranu žaludeční sliznice před agresivními látkami nebo naopak chrání senzitivní látky před působením žaludečních šťáv, zajišťují uvolňování léčiv v místě vhodném pro absorpci nebo v oblasti jejich lokálního působení při onemocnění určité části GIT. Mikročástice Eudragit® mohou být použity k dodávání kyseliny askorbové v dolní části střeva a také v jejunu a v ileu. [29,30,31]



Obr. 2 Proces enkapsulace vitamínu C pomocí chytosanu metodou sprejového sušení a fotografie mikrokapsle enkapsulovaného vitamínu C pořizená elektronovou skenovací mikroskopií [26]

Pro zapouzdření vitamínu C metodou sprejového sušení je možno použít také chitosan, hydrofilní, biokompatibilní a biologicky odbouratelný polysacharid s nízkou toxicitou. Chitosan lze zesítovat netoxickým tripolyfosfátem. Vzniklé mikrokapsle mají sférický tvar a hladký povrch pozorovatelný skenovací elektronovou mikroskopií. [26]

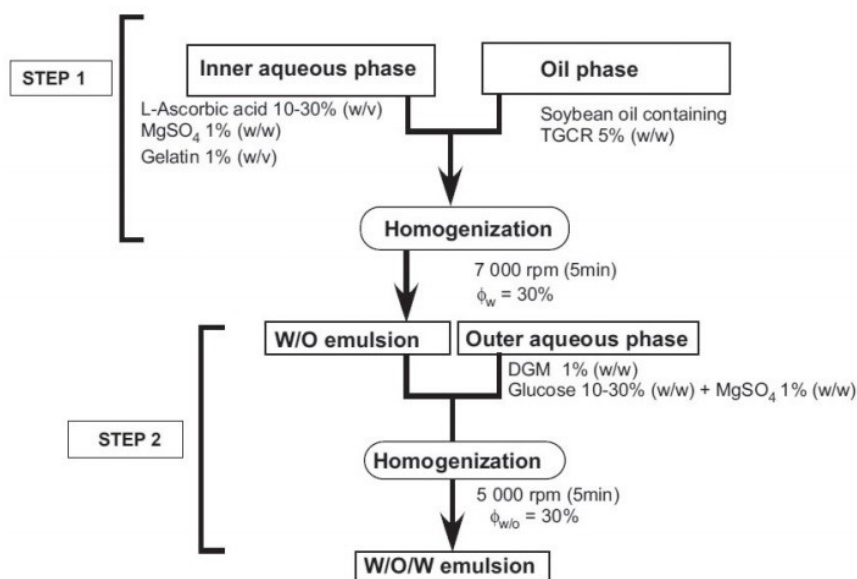
2.2 Koacervace

Tento proces, který se obvykle vyznačuje vzájemnou interakcí dvou protichůdně nabitých biopolymerů, vede k fázové separaci a vzniku koacervátové fáze kolem tzv. jádrového materiálu. V průběhu procesu se vytváří drobné kapky, ty se usazují nebo spojují, a následně tak tvoří oddělenou koacervovanou fázi. Kapky koacervátu se pak následně hromadí kolem přítomných jader a po přidání vhodného síťovacího činidla vytváří stěnu koacervátu. Biopolymery používané k tomuto účelu obvykle zahrnují proteinovou a polysacharidovou molekulu, kdy vývoj koacervátu může být dosažen úpravou náboje proteinu pomocí změny pH a/nebo změny poměru polysacharid/bílkovina. Enkapsulace koacervací kyseliny askorbové za použití želatiny a arabské gummy jako enkapsulačních činidel vykazuje vysokou účinnost zapouzdření. Kyselina askorbová byla chráněna a byla stabilnější v mikrokapslích než v roztoku, což naznačuje možnost řízeného uvolňování za specifických podmínek a maskování kyselé chuti kyseliny askorbové. [29,32,33]

2.3 Emulzifikace

Emulze se skládá nejméně ze dvou nemísitelných kapalin, obvykle oleje a vody. První z těchto fází nazýváme disperzním prostředím a druhou, v ní rozptýlenou, dispergovanou látkou. Dispergovanou látku potom většinou pozorujeme ve formě malých kapiček. [26]

Emulze typu V/O/V, jsou slibné aplikace v potravinářském průmyslu díky lepší ochraně aktivních složek a funkčnosti než jednoduché emulze V/O. Vysoké koncentrace zapouzdřené kyseliny L-askorbové bylo dosaženo při použití vhodně vybraných prostředků, včetně želatiny ve vnitřní vodné fázi a glukózy v obou vodných fázích. Zejména formulace obsahující želatinu přispěly k vyšší retenci kyseliny L-askorbové. [35]



Obr. 3 Proces enkapsulace vitamínu C emulsifikací typu V/O/V. [35]

Monodisperzní emulze typu V/O/V s vysokou koncentrací kyseliny askorbové ve vnitřních vodních emulzích byly úspěšně formulovány homogenizací a následnou mikrokanálkovou emulzifikací MCE. Úspěšná MCE se dosahuje za vhodných koncentrací hydrofobního emulgátoru přidaného v olejové fázi a hydrofilního emulgátoru přidaného do vnější vodné fáze. [34]

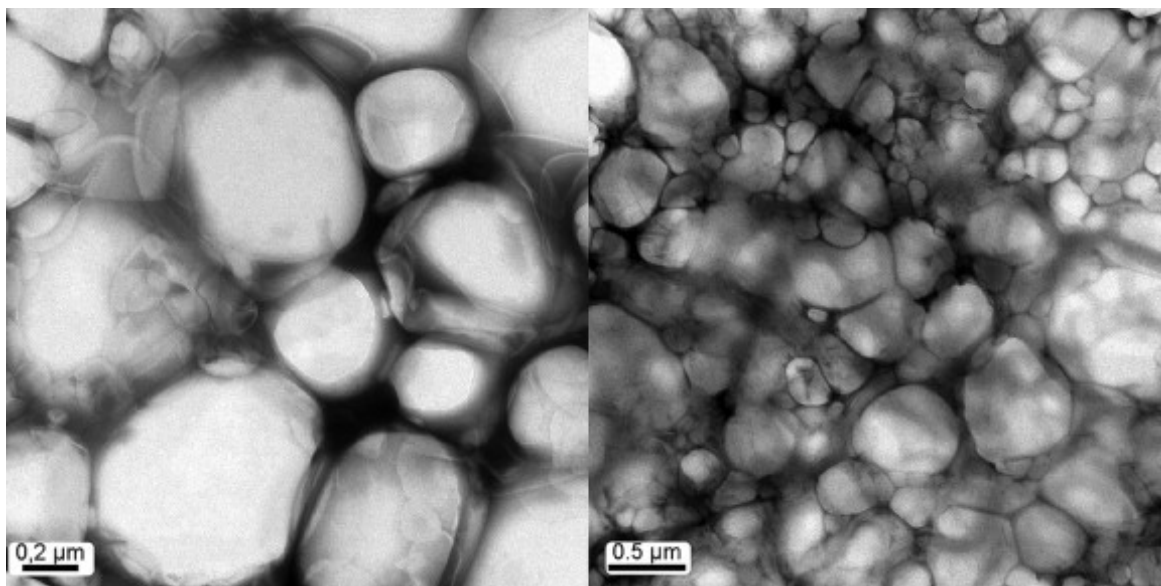
2.4 Zapouzdření do lipozomů

Lipozomy jsou mikroskopické váčky, které mohou být uměle připraveny jako kulovité nosiče, do nichž je možné zapouzdřit aktivní molekuly.

2.4.1 Lipozomy

Lipozomy (lipidové vezikuly) jsou syntetické útvary, jejichž stěna je tvořena dvojitou vrstvou lipidů, která odděluje vnitřní a vnější prostředí. Lipozomy mohou být unilamelární, mající jednu lipidovou dvojvrstvou membránu o rozměrech 50 až 250 nm nebo vícelamelární, mající dvě nebo více koncentricky uspořádaných dvojvrstev s rozsahem 500 až 5000 nm. Hlavní výhodou lipozomů je jejich schopnost zapouzdřovat jak hydrofobní, tak i hydrofilní aktivní látky. Lipofilní látky jsou obecně zachyceny téměř výhradně v lipidových dvojvrstvách lipozomů a protože jsou slabě rozpustné ve vodě, problémy, jako je ztráta zachyceného léčiva při skladování, se vyskytují jen zřídka. Hydrofilní léčiva mohou být buď zachycena

uvnitř dutin lipozomů nebo umístěna ve vnější vodní fázi. Procento zapouzdření hydrofilních látek lipozomy závisí na dvouvrstvé kompozici a postupu přípravy lipozomů. Další výhodou je, že vnitřní pH je nastavitelné, takže mohou obsahovat složky, které by jinak za daných podmínek nebyly stabilní. Četné studie uvádějí úspěšné zapouzdření vitamínů A, D, E, K i začlenění ve vodě rozpustných vitamínů. Lipozomy mohou být používány ke stabilizaci a dodávání vitamínů pro zvýšení nutriční kvality výrobků. [36,37,38]



Obr. 4 Obrázky čerstvě připravených lipozomů se zabudovanou kyselinou askorbovou získanou transmisním elektronovým mikroskopem. [39]

2.4.1 Metody přípravy

Podmínkou ke vzniku lipozomu je rozptýlení lipidů ve vodné fázi. Způsobem přípravy lze ovlivnit počet lamel, velikost lipozomu i množství enkapsulované látky. Při přípravě lipozomové kompozice může být použito více než jeden typ lipidů. Výběr lipidů a jejich poměrů se může měnit, aby se dosáhlo požadovaného stupně tekutosti nebo tuhosti, aby byla kontrolována stabilita a/nebo aby byla řízena rychlost uvolňování zachyceného činidla. Pokud se při přípravě lipozomové kompozice používá více než jeden typ lipidů, mělo by se použít vhodné množství relativně nenasyceného lipidů (jako je fosfatydlcholin), aby se vytvořily stabilní lipozomy. [7,38,39]

Postup přípravy lipozomů:

- a) příprava lipidové a vodné fáze
- b) hydratace lipidů ve vodném médiu
- c) úpravy k dosažení požadované velikosti, struktury a stability lipozomů

Techniky přípravy:

1. Techniky pasivní

- Mechanická disperze
- Rozpuštění v organickém rozpouštědle
- solubilizace pomocí detergentu

2. Aktivní loading [40]

Typické způsoby přípravy lipozomů zahrnují zahřívání lipidů nebo lipozomové kompozice lipid-rozpouštědlo, aby se usnadnila rozpustnost lipidu v rozpouštědle. Běžné způsoby přípravy lipozomů vyžadují krok homogenizace, sonikace nebo mikrofluidace. Během homogenizace je kompozice vytlačována komorou homogenizátoru při vysoké rychlosti, která generuje teplo a vede k zahřívání směsi účinných látek na vysoké teploty. Mnoho aktivních látek, lipidů a sloučenin, včetně vitamínů a dalších výživových doplňků, jako je vitamín C, jsou citlivé na oxidaci, která se urychluje při vysokých teplotách. Při studeném procesu jsou lipidy rozpuštěny ve vodném rozpouštědle nebo v rozpouštědle mísitelném s vodou, jako je většina alkoholů. Pokud je rozpouštědlem alkohol, dochází k vytvoření malých lipozomů ve velikosti přibližně 200-500 nm. Studený způsob rozpuštění lipidů v alkoholu může být proveden i při zvýšené teplotě (vyšší, než je teplota místnosti), roztok lipidů však před hydratací vodným roztokem musí být ochlazen na pokojovou teplotu. Některé provedení obsahují vodný roztok kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA). [7]

Nevýhodou při zapouzdřování hydrofilních látek je obvykle velmi nízká účinnost zapouzdření, protože se aktivní látka musí rozpustit v hydratačním médiu, které je pak zapouzdřeno ve vnitřním vodném kompartmentu lipozomu. Určité množství látky tak zůstává v externím vodném médiu nezapouzdřené. Metody, které vedou ke zlepšení účinnosti zapouzdření hydrofilních molekul uvnitř lipozomů jsou: cykly zmrazování a rozmrazování, odpařování

reverzní fáze a dehydratace-rehydratace předem vytvořených prázdných vezikul. Opakované cykly zmrazení a rozmrazování vícemelárních vezikul způsobují narušení lipozomálních fosfolipidových dvojvrstev, protože vytváří ledové krystaly během procesu zmrazení a dochází tak ke zvýšení poměru vodné rozpuštěné látky k lipidu v lipozomech, což má za následek vyšší účinnost. Odpařování reverzní fáze se skládá z vytvoření emulze organické fáze (obsahující lipid) a vodné fáze (obsahující látku) s následným odpařením organického rozpouštědla, hydratací a tvorbou lipozomů. [41]

Ze všech zmíněných metod přípravy je jednou z nejjednodušších sonikace, která se řadí mezi mechanické techniky. Hlavní velkou nevýhodou této metody je nižší úroveň zapouzdření, možná degradace fosfolipidů a látek, které mají být zapouzdřeny, eliminace velkých molekul a znečištění kovy ze sondy. Disperze jsou vystaveny působení ultrazvuku buď v lázni nebo pomocí vhodné sondy.

a) Sonikace pomocí sondy: Špička sonikátoru je přímo vnořena do disperze lipozomů. Spotřeba energie pro vstup do disperze lipidů je velmi vysoká, což má za následek zahřev disperze v místě vstupu, proto musí být proces prováděn ve studené vodní lázni. Během ultrazvuku může být do 1 hodiny deesterifikováno více než 5 % lipidů.

b) sonikace v lázni: Liposomová disperze je umístěna do sonikátoru. Ovládání teploty lipidové disperze je obvykle jednodušší. Materiál může být chráněn před znečištěním ve sterilní nádobě, nebo pod inertní atmosférou. [40]

Lipozomové kompozice mohou být podávány samotné nebo s příměsí pomocných látek, například s farmaceuticky nebo fyziologicky přijatelnými organickými nebo anorganickými nosiči vhodnými pro orální, enterální nebo parenterální aplikaci jako je voda, roztoky solí (Ringerův roztok), alkoholy, želatiny, oleje a sacharidy (laktóza, amyulóza nebo škrob) estery mastných kyselin, hydroxymethylcelulóza a polyvinylpyrrolidon. Mohou být smíchány s pomocnými činidly, jako jsou stabilizátory, smáčecí činidla, emulgátory, soli pro ovlivnění osmotického tlaku, pufrů, barviva a aromatické látky, které s kompozicemi reagují neškodně. Přípravky lze také kombinovat, pokud je to žádoucí, s jinými účinnými látkami pro snížení metabolické degradace. [7]

2.4.2 Mechanismus vstřebávání v organismu

U živočišných buněk tvoří důležitou složku membrán fosfolipidy a cholesterol, který snižuje jejich tekutost a činí tedy membrány méně propustnými. Transport malých nepolárních molekul přes membránu probíhá difuzí, pro velké a nabitě molekuly se používají zvláštní transportní proteiny, přenos pomocí nich se nazývá aktivní transport. Hlavní interakce lipozomů s buňkami je buď jednoduchá adsorpce (specifickými interakcemi s komponenty na povrchu buňky, elektrostatickými silami) nebo endocytóza (například fagocytujícími buňkami retikuloendotelového systému). Fúze s membránou plazmatických buněk zapojením lipidové dvojvrstvy lipozomu do plazmatické membrány, se současným uvolňováním lipozomálního obsahu do cytoplazmy, je velmi vzácná. Čtvrtá možná interakce je například výměna dvouvrstevných složek cholesterolu, lipidů a membránou navázaných molekul se složkami buněčných membrán. Často je těžké určit, jak funguje mechanismus a může jich probíhat více ve stejnou dobu. [40,42]

Lipozomy jsou obecně nestabilní v krevní plazmě, což vede ke krátkému poločasu v krevním oběhu. Lipozomální formulace se setkávají s mnoha problémy jako je toxicita a rychlé vychytávání z oběhu. Východiskem může být úprava vlastností lipidové membrány. Jeden z pokusů se zaměřil na manipulaci s cholesterolem. Přidání cholesterolu k běžným formulacím snižuje rychlé uvolňování zapouzdřené bioaktivní sloučeniny do plazmy, čímž zvyšuje jejich stabilitu. Nevýhodou je však jeho možné a prokázané spojení s aterosklerózou. Některé studie uvádí, že použití kyseliny stearové může být vhodnou alternativou. [37,56]

Intravenózní podávání vitamínu C snižuje oxidační stres. Perorální podávání vitamínu C je typicky méně účinné než intravenózní, částečně díky nižší biologické dostupnosti. Dle provedené placebem kontrolované studie bylo prokázáno, že orální podání 4 g vitamínu C zapouzdřeného v lipozomech produkuje cirkulující vitamín C v koncentraci, která je větší než při nezapouzdřeném orálním podání, ale menší než při intravenózním. [43]

2.4.3 Změny při skladování

Jedním z nejobtížnějších problémů, které v současné době omezuje využití lipozomů v komerčních potravinách a nápojích, je jejich špatná fyzikální a chemická stabilita. V důsledku toho se mohou vlastnosti lipozomů měnit během skladování a přepravy. Lipozomy mají

jinou hustotu než obklopující vodná fáze a jsou proto náchylné ke gravitační separaci, přičemž rychlost oddělování se zvyšuje s rostoucí velikostí částic. Rychlost separace závisí také na struktuře lipozomů. Při změně okolních podmínek jako je pH, iontová síla, teplota nebo kvalita rozpouštědel, mohou lipozomy podléhat flokulaci nebo fúzi. Lipozomy mají typicky negativní náboj, a proto jsou částečně stabilizovány proti agregaci elektrostatickým odporem. Všechny faktory, které snižují elektrostatické interakce, mohou podporovat agregaci lipozomů. Fyzikální stabilita lipozomů u tohoto typu agregace může být někdy zlepšena jejich potahováním biopolymery za zvýšení elektrostatické stability (např. kationtového chitosanu). Zahřívání roztoku lipozomů může rovněž podporovat agregaci nebo vést k úniku jakýchkoli enkapsulovaných bioaktivních složek v důsledku změn propustnosti membrány a struktury. [7,39,44]

2.5 Systém lipozom – polymer

Systém lipozom-polymer byl vyvinut tak, aby integroval výhody a současně se vyhnul nevýhodám obou systémů na bázi lipozomů a polymerů. Lipozomy jsou nestabilní a rychle vychytávány z krevního oběhu. Jsou však více biokompatibilní než systémy založené na bázi polymeru. Na druhé straně je známo, že systémy založené na bázi polymeru jsou stabilnější a mohou poskytnout řízené uvolňování. Jejich hlavní nevýhodou je však špatná biologická kompatibilita, která je spojena se ztrátou aktivní látky během výrobního procesu (zahříváním, sonikací nebo vystavení organickým rozpouštědlům). Výhody kompozitního systému tak zahrnují zlepšení stability lipozomů, schopnost lipozomu řídit uvolňování léčiva po delší dobu a zachování bioaktivity látek. [37,45]

2.5.1 Využitelné polymery

Různé polymery byly pro aplikaci zkoumány na základě jejich základních vlastností, jako je biologická odbouratelnost, biologická kompatibilita, případně toxicita. Přírodní a syntetické biologicky odbouratelné polymerní systémy jako chitosan, kolagen, želatina, fibrin, alginát, dextran a polyvinylalkohol, mohou být využity, protože splňují většinu výše uvedených požadavků. [37]

2.5.1.1 Polysacharidy

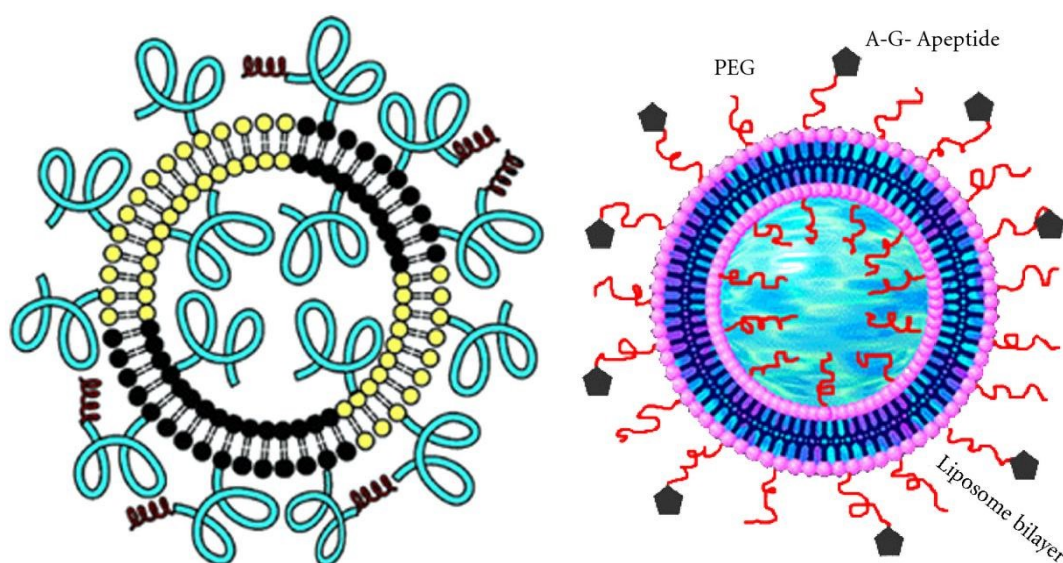
Polysacharidy získávané z přírodních zdrojů mohou být podrobeny širokému rozsahu chemických a enzymatických reakcí, jsou biokompatibilní a biologicky odbouratelné a mají přirozeně nízkou imunogenicitu, což z nich dělá ideální látky pro zapouzdřování. Jsou schopny uvolnit se ve vhodném čase a místě účinku. Příklady polysacharidů rostlinného původu zahrnují škroby, celulózu, hemicelulózu, hyaluronové kyseliny, algináty a gumu guar. Polysacharidy, které pocházejí ze zvířat, jsou chitin a chondroitin sulfát. Tyto přírodní biologicky rozložitelné polymery se používají jako pojidla v tabletách a jako látky zlepšující viskozitu v kapalinách nebo emulzích. Rychlost uvolňování látky pak závisí na zesíťování polymeru, hustší síťování poskytuje pomalejší uvolnění látky. [46]

2.5.2 Lipozomální systém Stealth (dlouhodobě cirkulující)

Ačkoli mají lipozomy podobné složení jako biomembrány, pro organismus představují cizí předměty. Proto jsou lipozomy rozpoznány mononukleárním fagocytovým systémem po kontaktu s plazmatickými bílkovinami a následně odstraněny z krevního oběhu. Stealth systém byl vyvinut tak, aby překonal většinu problémů, jako je právě neschopnost vyhnout se zachycení imunitním systémem, toxicita způsobená nabitými lipozomy, a slabá sterická stabilita. Strategie byla dosažena jednoduše modifikací povrchu membrány liposomů hydrofilními polymerními konjugáty, které mohou být přírodní nebo syntetické. Patří sem: polyethylenglykol (PEG), chitosan, a polyvinylalkohol (PVA). Přestože většina hydrofilních polymerů splňuje výše uvedená kritéria, PEG zůstává nejrozšířenějším používaným polymerem. Je specificky používán ke zvýšení hydrofilnosti povrchu liposomů prostřednictvím zesíťování lipidu. [37,40]

2.5.3 Lipozomální systém založený na zacílení „targeted“

Ve své struktuře obsahují antigeny, protilátky, enzymy, proteiny, glykoproteiny, sacharidy nebo receptory pro afinitní reakci. Afinitní reakce nastane při kontaktu s cílovou oblastí, dojde k akumulaci liposomů a postupnému uvolnění transportované aktivní látky. Peptidy, proteiny a protilátky byly nejvíce zkoumány jako látky pro řízení liposomů na místa působení díky strukturám molekuly, které jsou v podstatě složeny ze známých aminokyselinových sekvencí. Jsou také zaznamenány pokusy generovat konjugáty s dvojitým ligandem zaměřené na cílení více typů receptorů buněčného povrchu. [37]



Obr. 5 Stealth lipozom, Targeted lipozom [37]

2.6 Druhy lipozomů nové generace

Tento typ by vyvinut pro zlepšení přenosu bioaktivních molekul do cytoplazmy pomocí endosomu. Zahrnují virozomy a stimulační lipozomy, které jsou citlivé na podněty, vyskytující se v závislosti na faktorech vnějšího prostředí a vyvolávající dodávku aktivních látek, bílkovin a genů. Stimulační činidla zahrnují pH, světlo, magnetismus, teplotu a ultrazvukové vlny. Velká pozornost je věnována především lipozomům, které jsou citlivé na pH a fungují na principu neutralizace povrchového náboje membrány. Při neutralizaci dochází ke ztrátě náboje fosfolipidů, což vede ke kolapsu celé membrány. Uplatňují se především v případech, kdy při velkém množství patologických procesů buňky (např. nádory, záněty) dochází v postižené oblasti ke snížení pH. Tato změna je většinou poměrně malá (okolo 0,4 až 0,8 jednotek), byly však navrženy i lipozomy, které jsou schopny reagovat i na takto nepatrný rozdíl.

Charged lipozomy obsahují kladně nabitě fosfolipidy, které reagují s opačně nabitými makromolekulami (DNA, RNA a proteiny) za vzniku kovalentních vazeb. Přenos velké aniontové bioaktivní DNA přes buňku je velmi obtížný, jelikož DNA je snadno degradována cirkulujícími a intracelulárními deoxyribonukleázami a navzdory tomu musí být dodávána neporušená přes buňku a nukleární membrány až do jádra. Lipozomy jsou připraveny z fosfolipidů s aminovou hydrofilní hlavovou skupinou. Aminy mohou být buď kvartérní amoniové, terciární, sekundární nebo primární a lipozomy připravené tímto způsobem se běžně označují.

jí jako kationtové lipozomy, protože mají při fyziologickém pH kladný povrchový náboj. Pro možnost přepravy DNA jsou hojně využívány v genovém inženýrství, rovněž mají potenciál pro léčbu rakoviny, srpkovité anémie, cystické fibrózy, hemofilie a jiných genetických onemocnění. [37]

3 STABILITA LIPOZOMÁLNÍCH SOUSTAV

Stabilitu lipozomů lze posuzovat z hlediska fyzikálního, chemického, a biologického a kolidního.

3.1 Biologická stabilita lipozomů

Biologická stabilita závisí na přítomnosti látek schopných reagovat s lipozomy při jejich aplikaci. Velmi důležitý je způsob aplikace do organismu. Je nutné předcházet vhodnými prostředky bakteriální kontaminaci, neboť lipozomální disperze je vhodným prostředím pro růst mikroorganismů. [62]

3.2 Chemická stabilita lipozomů

Chemická stabilita je určena povahou látky a prostředím, ve kterém se vyskytuje. Lipidy, stejně jako většina biomolekul, mohou degradovat oxidačními nebo hydrolytickými procesy. Tyto procesy lze zmírnit nebo jim zcela zabránit dodržáním určitých pravidel a podmínek při tvorbě a skladování lipozomálních disperzí (např. vhodná teplota, pH, použití čistých surovin a rozpouštědel). Oxidaci jsou vystaveny především hydrofobní řetězce polynenasycených mastných kyselin. Nasycené mastné kyseliny mohou být oxidovány zejména při vysokých teplotách. Násobné vazby jsou cílovým místem kyslíkových radikálů, dochází k jejich štěpení, případně k tvorbě cyklických peroxidů, pokud se setkají se dvěma sousedícími dvojnými vazbami. Proces oxidace je zvyšován při expozici světlu či stopovému množství kontaminace kovovými ionty. Oxidaci lze tedy částečně zabránit omezením působení světla a kyslíku, používáním čistých chemikálií a skladováním za nízké teploty. Při hydrolyze dochází k odštěpování molekul reakcí s vodou a v molekule fosfolipidů k ní nejčastěji dochází v místě esterových vazeb. Při reakci vznikají lysofosfolipidy, kdy dochází k odštěpení mastných kyselin z hlavní fosfolipidové kostry. Lysofosfolipidy mohou být dále hydrolyzovány až na glycerofosfát. Hydrolyza je ovlivňována zejména faktory jako je teplota a pH. [62,64]

3.3 Fyzikální stabilita lipozomů

Fyzikální stabilitu lze chápat jako schopnost, kdy se systém brání procesům vedoucím ke změnám struktury, rozdělení částic dle velikosti nebo stupně disperzity. Je dána složením fosfolipidů, velikostí částic, zeta potenciálem a jinými faktory a parametry, které ovlivňují

interakce lipozomů mezi sebou, s disperzním prostředím, buňkami, složkami krevní plazmy a extracelulárními strukturami. Vyšší stability je možné dosáhnout inkorporací různých látek do membrány (např. cholesterol). Tato stabilita může být ovlivňována mnoha faktory jako skupenství a složení disperzního prostředí i disperzního podílu, nebo koncentrací disperzních částic. Kinetická stabilita je definována jako stálost soustavy zachovávající si rozdělení koncentrace částic v gravitačním poli, agregátní stabilitou se rozumí schopnost systému zachovávat svůj stupeň disperzity. Disperzní soustavy zanikají při agregaci disperzních částic, kdy dochází ke shlukování částic ve větší celky. Když se k sobě částice vykonávající neustálý tepelný pohyb přiblíží na dostatečně malou vzdálenost, spojí se v místě dotyku vlivem přitažlivých sil. K vytvořeným dvojicím se připojují další částice, až celek získá potřebnou hmotnost, sedimentuje a vznikne dvoufázová soustava. Proces agregace může být omezen vytvořením ochranné vrstvy na povrchu disperzních částic. [62,63,64]

3.4 Koloidní stabilita lipozomů

Jednou z nejdůležitějších vlastností lipozomálních disperzí je koloidní stabilita. Tato stabilita je dána interakcemi mezi částicemi, které na sebe působí přitažlivými i odpuzivými silami. Pokud rostou odpuzivé síly mezi částicemi, stabilita se zvyšuje. Existují dva hlavní způsoby stabilizace koloidní disperze. [64]

3.4.1 Sterická stabilizace

Sterická, někdy zvaná polymerová stabilizace je na složení vzorku relativně nezávislá a je stejně účinná v polárním i nepolárním prostředí. Tuto stabilitu zajišťují látky rozpustné v disperzním prostředí, které jsou zároveň schopné dostatečně velké adsorpce na povrchu lyofobních částic. Pro sterickou stabilizaci se používají povrchově aktivní látky tvořící asociativní koloidy a některé makromolekuly.

Stericky chráněné lipozomy jsou stabilní v biologickém prostředí, nekoagulují a získávají lyofilní povrch. Na svém povrchu mívají často navázané inertní hydrofilní polymery např. PEG (polyethylenglykol). Pokud jsou tyto lipozomy použity pro léčiva, mohou dlouhodobě cirkulovat v krevním oběhu. [63,64]

3.4.2 Elektrostatická stabilizace

Elektrostatická stabilizace využívá faktu, že hustota povrchového náboje částic je dost velká na to, aby odpudivé elektrostatické síly převážily nad van der Waalsovými. Stabilizaci zajišťuje dvojrůstava tvořící se okolo částic, jejichž povrch bývá elektricky nabitý a přitahuje ionty opačného znaménka. Částice se navenek jeví jako elektricky nabitá, protože na ní při pohybu ulpívá část protiiontů difúzní vnější vrstvy. Všechny částice téže látky ve stejném disperzním prostředí mají náboj stejného znaménka. Při srážce částic se tak mohou uplatnit odpudivé elektrostatické síly, částice se od sebe opět oddálí a díky tomu nedojde k jejich spojení. Elektrostatická stabilita disperzí závisí na mnoha faktorech. Jeden z nejdůležitějších je přítomnost elektrolytů, jež ovlivňují iontovou sílu a tloušťku dvojrůstavy. Díky většímu přídatku elektrolytů může být elektrická dvojrůstava stlačena až na pohybové rozhraní, kdy se částice při pohybu vůči kapalině začnou jevit jako elektricky neutrální a bude docházet ke koagulaci. [63,64]

Molekulární interakce mezi zapouzdřenou látkou a lipidovou dvojrůstovou hraje důležitou roli při tvorbě a stabilitě lipozomů při zapouzdřování. Elektrostatické interakce jsou obzvláště zajímavým přístupem ke zvýšení enkapsulace hydrofilních léků použitím negativně nebo pozitivně nabitých lipidů k interakci s látkami s opačným nábojem. [41]

Sterická stabilizace je výhodnější než elektrostatická v mnoha ohledech. Stabilita disperzí zajišťovaná pouze elektrickou dvojrůstovou může být snadno narušena i drobnými změnami ve složení disperzního prostředí. Stericky stabilizované disperze jsou k těmto změnám, především k přítomnosti či množství elektrolytu, poměrně necitlivé, protože řetězce neionogenních řetězců se s koncentrací elektrolytu mění jen velmi málo. Sterická stabilizace je účinná ve vodném i organickém prostředí, při různých koncentracích disperzního podílu. [65]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je příprava koloidních disperzí lecitinu s vitamínem C takovým způsobem, který umožní zapouzdření vitamínu C ve formě lipozomálních micel. Dalším cílem je provedení fyzikálně-chemické charakterizace micelárních disperzí ve smyslu určení velikosti částic dispergované fáze a jejího elektrokinetického náboje. Dále budou sledovány změny těchto fyzikálních charakteristik v závislosti na době tepelné zátěže s cílem určení jejich stability při zvýšených teplotách skladování.

Budou použity následující metody fyzikálně-chemické charakterizace připravených disperzních systémů:

- Měření reologických vlastností pomocí rotačního viskozimetru v konfiguraci válec-válec.
- Určení elektrokinetického zeta potenciálu dispergovaných micel.
- Určení velikosti částic dispergovaných micel metodou rozptylu světla.
- Termická analýza TG DSC lipozomálních disperzí
- Dle možností spolupracujícího pracoviště UP Olomouc bude provedena analýza TEM.
- Získané výsledky experimentálních měření budou podrobeny analýze statistické významnosti jednotlivých dat metodou ANOVA.

5 MATERIÁL A METODY

V rámci této práce bylo vytvořeno a zkoumáno 5 různých vzorků lipozomální disperze obsahujících v různém poměru vysokomolekulární derivát karboxymethylcelulózy a sójový lecitin jako vhodné médium pro zapouzdření vitamínu C. Všechny pět vzorků již obsahovalo optimální koncentraci pro tvorbu micel lipozomů a rozdíly mezi nimi se vztahovaly pouze k přidávku roztoku 2 hm. % CMC. Vzniklé lipozomální disperze byly následně podrobeny působení teplot 25 °C, 40 °C, 50 °C a 60 °C po různou dobu (20 hod a 60 hod) s cílem charakterizace jejich teplotní stability. Tyto podmínky byly voleny tak, aby simulovaly skladování přípravku za zvýšených teplot.

Označení vzorků se skládá ze 2 parametrů: obsahu 2 hm. % CMC a teploty skladování. Podle přidavku roztoku 2 hm. % CMC jsou vzorky označeny číslem od 1 do 5, viz *Tab. 2*.

Teplota skladování je označena písmeny:

$$A = 25 \text{ °C,}$$

$$B = 40 \text{ °C,}$$

$$C = 50 \text{ °C}$$

$$D = 60 \text{ °C.}$$

Vzorek 1A tedy označuje lipozomální disperzi s přidavkem 1 ml roztoku 2 hm. % CMC skladovaný při teplotě 25 °C.

Doba skladování byla 20 hod (u disperzí skladovaných při 50 a 60 °C) nebo 60 hod (u disperze skladované při 40 °C) při dané konstantní teplotě. Doba skladování disperze při pokojové teplotě (25 °C) nebyla sledována.

Tab. 2 Složení jednotlivých vzorků v ml.

Objem [ml]	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
Lecitin + askorbát	9	9	9	9	9
CMC 2 hm. %	1	2	2,5	3	4,5
voda	4	3	2,5	2	0,5

5.1 Materiály

Jako vhodný materiál pro zapouzdření byl zvolen práškový sójový lecitin a karboxymethylcelulóza. Obě látky byly rozpuštěny a homogenizovány v purifikované vodě. Aktivní zapouzdřenou látkou byla kyselina askorbová.

5.1.1 Sójový lecitin

Lipidy pro použití při přípravě lipozomové kompozice zahrnují lipidy vytvářející micely se dvěma uhlovodíkovými řetězci a polární hlavou. Do této třídy patří fosfolipidy. Fosfolipidy používané v potravinářských aplikacích jsou typicky označovány jako lecitiny a ve skutečnosti obsahují komplexní směs různých fosfolipidů (jako je fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin a fosfatidylinositol) a jiné lipidy (jako jsou triglyceridy, glykolipidy nebo steroly). Fosfolipidy se skládají ze dvou nepolárních mastných kyselin esterifikovaných na glycerolový skelet, který má polární fosfátovou skupinu s hydrofilním zbytkem připojeným např. Cholinem, inositolem, ethanolaminem nebo serinem. Dva uhlovodíkové řetězce zde obsahují typicky mezi 14-22 uhlíky a různý počet nenasycených vazeb. Pro enkapsulaci je výhodný relativně nenasycený fosfolipid s jednou, dvěma nebo třemi dvojnými vazbami v uhlovodíkovém řetězci. Zvláště výhodný je fosfatidylcholin, který obsahuje cholin jako hlavní skupinu a kombinuje kyselinu glycerofosforečnou s dvěma mastnými kyselinami, je hlavní složkou biologických membrán a může být extrahován ze zdrojů, jako je vaječný žloutek nebo sójové boby. Lecitiny používané v potravinářském průmyslu jsou získávány také z mléka, slunečnice, rýže nebo řepky. [7,47]

5.1.2 Polysacharidy na bázi celulózy

Tyto přírodní polysacharidy mají ekonomické výhody oproti syntetickým protějškům. Špatná rozpustnost polysacharidů ve vodě významně omezuje jejich aplikace. Taková omezení lze překonat různými modifikacemi. Karboxymethylcelulóza (CMC) je polosyntetický derivát celulózy mající karboxymethylové skupiny (-CH₂-COONa). Tyto karboxymethylové skupiny jsou navázány na některé z hydroxylových skupin na celulóze. CMC je ve vodě rozpustná a má rozsáhlé uplatnění ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu díky hypoalergenní povaze, viskozitě a netoxicitě. Je to slibný materiál pro farmaceutické aplikace díky vynikajícím vlastnostem, jako je rozpustnost, bezpečnost a výborná chemická stabilita. Navíc je biokompatibilní a biologicky odbouratelná. Karboxylové kyseliny přítomné v CMC

v disperzích stabilizují vytvořené nanočástice. Karboxymethylcelulóza je aniontový polysacharid, jeho výroba zahrnuje zpracování celulózy vodným hydroxidem sodným a následnou reakcí s kyselinou chloroctovou. Je rozpustný ve vodě a jeho roztoky vykazují ne-Newtonské, pseudoplastické chování. [48,49]

5.1.3 Hydrogenuhličitan draselný

Hydrogenuhličitan draselný (KHCO_3) je draselná sůl kyseliny uhličitě, je bezbarvý, bez zápachu a mírně zásaditý, při reakci s kyselinou askorbovou vzniká za silné endotermní reakce askorbát draselný.

5.2 Příprava vzorků

1. Rozpuštění Lecitinu ve vodě v definovaném koncentračním poměru a mechanická homogenizace s cílem dosažení hladké směsi disperze.
2. Vytvoření roztoku askorbátu draselného smícháním kyseliny askorbové s hydrogenuhličitanem sodným a vodou. Po proběhnutí silné endotermní reakce směs vložena do ultrazvukové lázně k homogenizaci.
3. Vzájemné smíchání vzniklých směsí z předchozích kroků a následné ponechání působení ultrazvuku.
4. Příprava vodného roztoku karboxymethylcelulózy.
5. Příprava 5 různých vzorků disperzí obsahujících v různém poměru směs lecitinu s askorbátem sodným, roztok 2 hm.% CMC a vody.
6. Termostatování vzorků při definovaných teplotách po dobu 20 nebo 60 hod.



Obr. 6 Příprava vzorků

5.3 Metody fyzikálně-chemické analýzy

5.3.1 Určení velikosti částic lipozomů metodou rozptylu světla.

Rozptyl záření se vyskytuje u soustav s různými indexy lomu disperzní fáze a disperzního prostředí, v koloidních disperzích se projevuje jemným zákalem, opalescencí, jejíž příčinou jsou srovnatelné nebo menší rozměry disperzních částic s vlnovou délkou světelných paprsků. Rozptyl záření vzniká jak odrazem a lomem světla na částicích, tak i ohybem světla, roste s rostoucí velikostí koloidních částic a s klesající vlnovou délkou. Z měření lze tedy zjistit informace o velikosti a koncentraci disperzních částic. Pokud se nahradí klasický zdroj světla laserem, dojde v některých směrech k vzájemnému ovlivňování rozptýleného záření, jež má za následek zesílení intenzity záření. Jde o tzv. dynamický rozptyl světla. Základem této neinvazivní techniky je měření změny intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty, které souvisí s interferenčním zeslabováním a zesilováním světla rozptýleného na pohyblivých částicích disperzní fáze, podléhajících Brownovu pohybu. Rychlost těchto změn je přímo závislá na pohybu částic, jelikož čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění. Metodu lze využít při charakterizaci emulzí, micel, lipozomů, latexů a pigmentů. [50,51]

5.3.1.1 Použitý přístroj a parametry měření

Efektivní průměr lipozomálních částic byl hodnocen dynamickým rozptylem světla pomocí přístroje Zeta Plus, Brookhaven Instruments, USA. Měření byla provedena při 25 °C s indexem lomu 1,330, vlnovou délkou 658 nm a detekčním úhlem 90°. Vzorky lipozomální

disperze byly zředěny v poměru 1:10 redestilovanou vodou. Měření byla provedena 4krát pro každý vzorek.

5.3.2 Určení elektrokinetického Zeta potenciálu (ζ -potenciál)

Každá částice rozptýlená v disperzi je na svém povrchu obalena elektrickou dvojvrstvou, kde vnitřní oblast, známá jako Sternova vrstva, obsahuje ionty silně vázané a vnější vrstva obsahuje ionty vázané slaběji. Uvnitř vnější vrstvy existuje pomyslná hranice označovaná často jako rovina skluzu, v níž částice s ionty tvoří stabilní jednotku. Ionty uvnitř této hranice se pohybují s částicí, ionty za touto hranicí nikoli. Potenciál na této linii (pomyslné hranici), se nazývá Zeta potenciál a jeho velikost udává stabilitu koloidního systému. Znaménko zeta potenciálu je opačné než znaménko iontů vnější vrstvy elektrické dvojvrstvy. Obecně platí, že systém, kde je naměřen zeta potenciál vyšší než +30 mV, nebo nižší než -30 mV, se považuje za stabilní. Hlavním faktorem ovlivňujícím hodnotu potenciálu je pH. V bodě, kde křivka prochází nulovým zeta potenciálem, se nachází izoelektrický bod, což je oblast, kde je koloidní systém nejméně stabilní. [52]

5.3.2.1 Použitý přístroj a parametry měření

Zeta potenciál byl měřen pomocí přístroje Zeta Plus, Brookhaven Instruments, USA. Jednotlivé vzorky byly naředěny v poměru 1:10 s redestilovanou vodou. PH měřených vzorků bylo 5. Teplota byla udržována konstantní při 25 °C. Měření byla převedena na hodnoty zeta potenciálu aplikací matematického modelu Smoluchowski a jsou uváděny jako průměr pěti cyklů opakování, z nichž každý byl pětkrát měřen. Zeta potenciál se měří elektroforézou v kapilární kyvetě.

5.3.3 Termická analýza TG DSC disperzí

Termické metody obecně jsou založeny na sledování účinků dodávaného nebo odebíraného tepla na vlastnosti vzorků. Princip metody diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) spočívá v udržení stejné teploty studovaného i srovnávacího vzorku, které jsou zahřívány současně vedle sebe, čehož se dosahuje buď dodáním energie do vzorku (pokud v něm probíhá endotermní děj) nebo do referenční látky (ve vzorku probíhá exotermní děj).

DSC s tepelným tokem se skládá z:

- měřicí hlavy s držákem pro vzorek a srovnávací látku,
- pece,
- termostatu,
- zdroje plynů a zdroje napětí,
- regulátoru teploty a záznamového zařízení-počítače.

Pro metodu DSC je možné použít vzorky velmi malých hmotností (1 až 100 mg), vkládají se do keramických nebo kovových misek, aby se docílilo dokonalého kontaktu s topným tělískem a teplotními čidly. Oba vzorky, referenční i měřený, jsou umístěny zvlášť na samostatných teplotních čidlech ve společné kalorimetrické cele spojeny tepelným mostem. Při změnách teploty v měřeném vzorku způsobené endotermními nebo exotermními ději je rozdíl teplot zaznamenán jako tepelný tok od/do vzorku a je považován za úměrný rozdílu teplot. [53]

5.3.3.1 Použitý přístroj a parametry měření

Diferenciační skenovací kalorimetrie byla provedena pomocí přístroje DSC 1 (Mettler – Toledo, Švýcarsko) při rychlosti záhřevu 10 °C za minutu. Tepelné chování bylo zkoumáno zahříváním/chlazením vzorků v hliníkových pánvičkách o objemu 40 µl, v teplotním rozmezí -40 až 210 °C a 25 až -50 °C. Navážka vzorku se ohybovala kolem 16 až 17 mg. Použité vzorky pro analýzu byly vzorky disperze skladované při 25 °C.

5.3.4 Měření reologických vlastností

Reologické chování tekutin hraje významnou roli v řadě technologických operací. Znalost základních reologických veličin, viskozity, meze toku a modulů pružnosti je potřebná nejen k charakterizování surovin ale i k řešení mnoha technologických operací. Matematickým vyjádřením tokových vlastností kapalin jsou reologické stavové rovnice, které zpravidla vyjadřují vztah mezi deformačním smykovým (tečným, vazkým) napětím τ a deformací kapaliny. Jejich grafickou podobou jsou tokové křivky. [54]

5.3.4.1 Použitý přístroj a parametry měření

Viskozimetr Haake, Viscotester 6L/R, který byl v našem případě použit, má stupně rychlosti v rozsahu od 0,3 do 200 otáček za minutu. K měření je možno použít čtyři různé měřicími vřetena (L1 až L4), která jsou volena podle hustoty měřené látky. V našem případě probíhalo měření v konfiguraci válec-válec. Použitá vřetena i stupně otáček byly voleny podle možností detekce. Rotační viskozimetr pracuje na principu měření síly, nutné k otáčení rotačního tělesa ve tvaru válce ponořeného do kapaliny. Těleso je připevněno k hřídeli otáčející se definovanou rychlostí. U ne-Newtonských kapalin lze viskozitní charakteristiku popsat pomocí tokové křivky, nebo s pomocí tzv. relativní viskozity.

5.3.5 Analýza TEM

Transmisní elektronové mikroskopy nacházejí využití při pozorování a analýze vnitřní struktury vzorku, kdy umožňují zobrazit mikrostrukturu uvnitř materiálu v měřítku od několika mikronů až po atomové rozlišení. Pomocí elektronové difrakce dokáží určit symetrii krystalové mřížky a pokud je mikroskop vybaven příslušnými spektrometry, provést lokální analýzu chemického složení. Vzorek musí být analyzován v dostatečně tenké vrstvě (10-500 nm), aby elektrony nebyly vzorkem zcela pohlceny. Elektrony jsou emitovány buď žhavou wolframovou katodou, nebo autoemisní tryskou. [55]

5.3.5.1 Použitý přístroj a parametry měření

Analýza TEM proběhla ve spolupráci s pracovištěm UP Olomouc. Každý vzorek byl zředěn ve zkumavce destilovanou vodou a ponechán 20-30 minut v ultrazvuku k homogenizaci. Suspenze pak byla nakapána na měděnou mřížku potaženou uhlíkovým filmem a vysušena na vzduchu. TEM analýza byla prováděna na přístroji JEOL JEM 2100 při akceleračním napětí 200 kV.

6 VÝSLEDKY

6.1 Poloměr částic

Měření velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla bylo provedeno 4krát pro každý z pěti vzorků skladovaných při čtyřech různých teplotách. Výsledky byly statisticky zpracovány a vyhodnoceny metodou ANOVA.

Velikost částic byla stanovena dynamickým rozptylem světla (Zeta Plus, Brookhaven Instruments, USA) po zředění v poměru 1:10 redestilovanou vodou. Bylo provedeno 4 měření pro každý z 5 vzorků lipozomální disperze.

Tab. 3 Průměrná velikost částic – průměr d [nm].

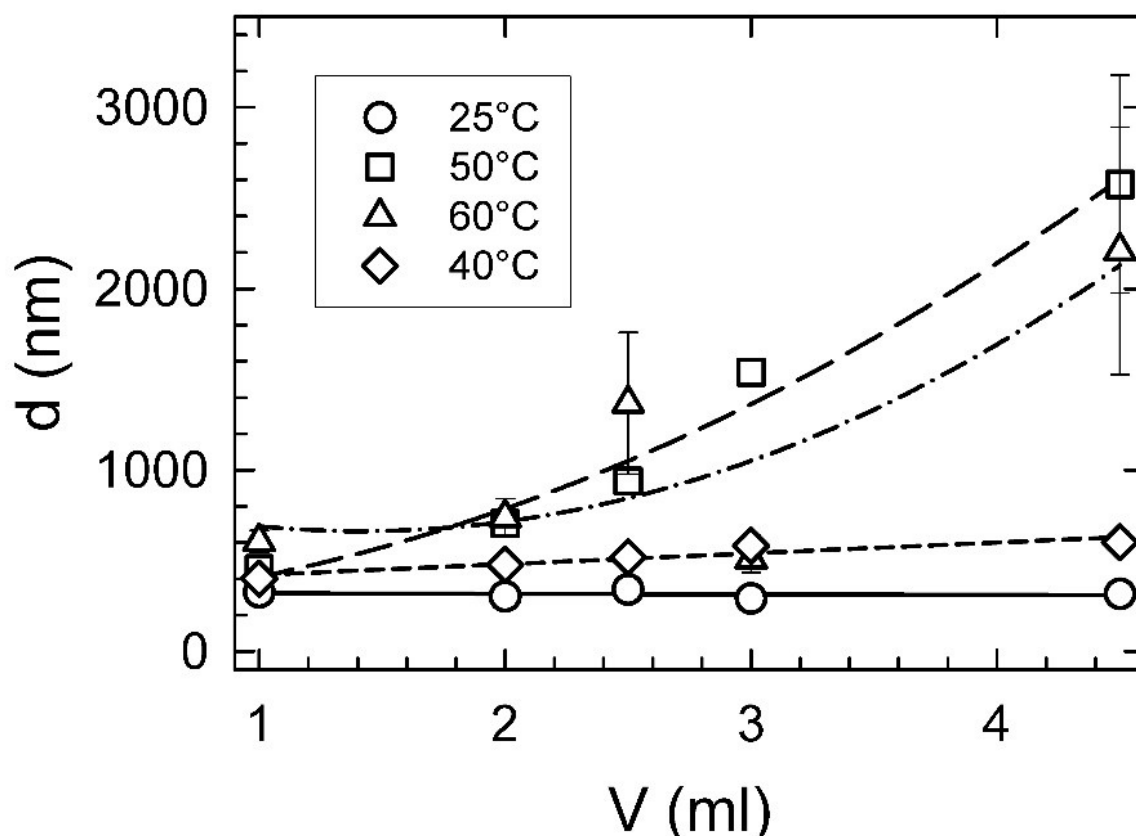
d [nm]	1	2	3	4	5
A (25 °C)	330 ± 30	300 ± 30	340 ± 40	290 ± 10	320 ± 30
B (40 °C)	400 ± 60	480 ± 50	520 ± 40	580 ± 100	600 ± 100
C (50 °C)	460 ± 20	710 ± 50	940 ± 120	1540 ± 100	2580 ± 1040
D (60 °C)	610 ± 110	740 ± 180	1370 ± 680	1510 ± 130	2210 ± 1180

Vzorky lipozomální disperze uchovávané při pokojové teplotě (vzorky A) měly průměrnou velikost částic $d = (310 \pm 30)$ nm (d je průměr částic) a oproti disperzím skladovaným při vyšších teplotách se průměrná velikost částic s vyšším obsahem CMC ve vzorku nezvyšovala. Naproti tomu vzorky skladované při teplotách 40, 50 a 60 °C vykazovaly vyšší průměrnou velikost částic se zvyšující se koncentrací CMC. Nejmenší velikost částic vykazovaly vzorky 2A ($d = 300 \pm 30$ nm) a 4A ($d = 290 \pm 10$). Naopak největší částice obsahovaly disperze 5C a 5D, vzorky s nejvyšším přídatkem CMC uloženy při 50 a 60 °C. Z těchto údajů vyplývá, že jak vyšší teplota, tak i vyšší přídatvek CMC může ovlivňovat velikost částic lipozomální disperze. S rostoucí teplotou se menší micely shlukují ve větší agregáty a disperze se stává méně stabilní.

Po statistickém vyhodnocení dat pomocí analýzy rozptylu ANOVA bylo zjištěno, že neexistují statisticky významné rozdíly mezi průměrnými velikostmi částic disperzí v závislosti na přidaném množství CMC u vzorků skladovaných při teplotě 25 °C, lze tedy říci, že velikosti částic jsou si podobné a jejich velikost nezávisí na přidaném množství CMC. U disperzích skladovaných při 40 °C však byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi vzorky

s různým obsahem CMC, podobně jako u vzorků skladovaných při 50 a 60 °C. Analýzou rozptylu byly také potvrzeny statisticky významné rozdíly v průměrné velikosti částic všech jednotlivých vzorků lišících se v přidavku CMC v závislosti na teplotě skladování. Hypotézy byly hodnoceny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Z níže uvedeného obrázku je patrná vysoká stabilita připravených micelárních disperzí při teplotách 25 °C, kdy přidavek polymerního tenzidu CMC nemá vliv na rozměr micel, který je konstantní (rovnoběžka s osou x). Zvýšená teplota disperze vede k její destabilizaci, což má za následek vznik větších agregátů. Tento nárůst velikosti částic jako funkce přidavku CMC má tvar exponenciální funkce. Nejkompatnější strukturu micel vykazoval přídavek 1 a 2 ml CMC.



Obr. 7 Závislost průměru částic micelární emulze vitamínu C a lecitinu na přidavku CMC a na teplotě skladování disperze. Doba skladování vzorků 1,3,4 byla 20 hod, vzorek 2 byl skladován po dobu 60 hodin při konstantní teplotě

6.2 Zeta potenciál

Elektrokinetický zeta potenciál byl měřen na přístroji Zeta Plus (Brookhaven Instruments, USA) po zředění vzorků v poměru 1:10 redestilovanou vodou. Byla provedena 4 měření pro každý z 5 vzorků lipozomální disperze a každou teplotu skladování.

Tab. 4 Průměrná velikost zeta potenciálu lipozomálních disperzí.

ζ [mV]	1	2	3	4	5
A (25 °C)	-25 ± 2	-24 ± 1	-24 ± 1	-25 ± 5	-27 ± 3
B (40 °C)	-21 ± 2	-21 ± 2	-21 ± 2	-20 ± 3	-20 ± 4
C (50 °C)	-20 ± 1	-20 ± 3	-18 ± 2	-18 ± 1	-15 ± 3
D (60 °C)	-20 ± 5	-19 ± 3	-18 ± 3	-16 ± 1	-11 ± 4

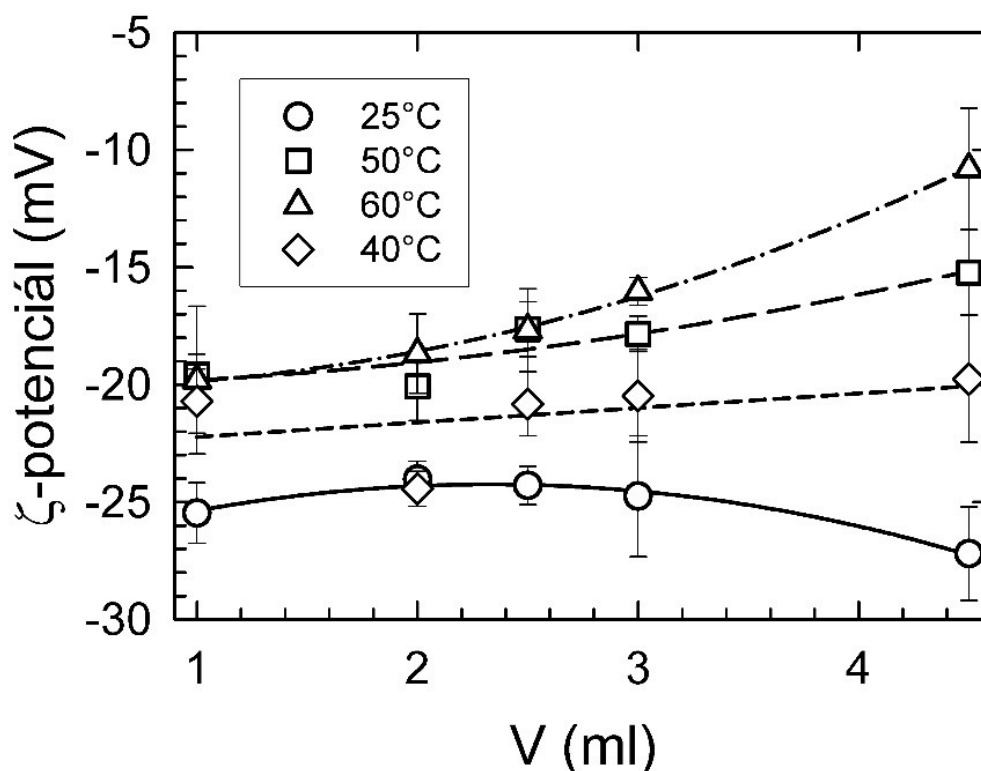
Vzorky lipozomální disperze uchovávány při pokojové teplotě (vzorky A) měly průměrný zeta potenciál $\zeta = (-25 \pm 3)$ mV, vzorky uloženy při 40 °C (vzorky B) $\zeta = (-20 \pm 3)$ mV, vzorky skladovány při teplotě 50 °C (vzorky C) $\zeta = (-18 \pm 3)$ mV, a vzorky skladovány při 60 °C (vzorky D) $\zeta = (-17 \pm 5)$ mV.

Z naměřených údajů vyplívá, že jak vyšší teplota, tak i vyšší přídavek CMC může ovlivňovat elektrokinetický zeta potenciál a stabilitu lipozomální disperze. Zajímavá skutečnost je, že vzorky s nejvyšším přídavkem CMC (vzorky 5) vykazovaly nejnižší zeta potenciál, což znamená nejvyšší stabilitu při skladování při pokojové teplotě (25 °C), ale naopak nejnižší zeta potenciál, a tedy nejméně stabilní disperzní systém při skladování při teplotě 60 °C. Vzorky s nejnižšími přídavky CMC (vzorky 1 a 2) vykazovaly nejmenší změny velikosti v závislosti na teplotě skladování.

Po statistickém vyhodnocení dat bylo potvrzeno, že nebyly shledány statisticky významné rozdíly mezi vzorky skladovanými při jednotlivých teplotách v závislosti na přidaném množství CMC. Byly ovšem zjištěny statisticky významné skutečnosti, že vzorky se stejným přídavkem CMC se kromě vzorku s nejnižším přídavkem CMC statisticky významně lišily v závislosti na teplotě skladování. Hypotézy byly hodnoceny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Z níže uvedeného obrázku je patrný vyšší elektrokinetický zeta potenciál připravených lipozomálních disperzí skladovaných při teplotách 25 °C, přičemž nejstabilnější se jeví vzorek

s nejvyšším přidavkem CMC. Z obrázku lze také vyčíst, že naopak nejnižší stabilitu vykazuje tentýž vzorek skladovaný při teplotě 60 °C. Jelikož rozdíly mezi naměřenými daty zeta potenciálu disperzí jednotlivých teplot nebyly příliš rozdílné, jeví se křivky jen lehce odchýlené od vodorovného směru osy x.



Obr. 8 Závislost ζ -potenciálu micelární emulze vitamínu C a lecitinu na přidavku CMC a na teplotě skladování disperze. Doba skladování vzorků 1,3,4 byla 20 hod, vzorek 2 byl skladován po dobu 60 hodin při konstantní teplotě.

6.3 Reologie

Reologické vlastnosti lipozomálních disperzí byly měřeny pomocí přístroje Viskozimetr Haake, Viscotester 6L/R. Každý vzorek byl proměřen jeden krát při stoupajícím i klesajícím počtu otáček za minutu. Vzorky skladované při pokojové teplotě byly navíc proměřeny dvakrát pro ověření správnosti výsledků.

K porovnání tokových i viskozitních křivek byl použit Ostwald-de Waeleho mocninový model, jenž definuje vztah mezi smykovým napětím a smykovou (deformační rychlostí) rovnicí:

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$$

Na základě indexu toku (n) a koeficientu konzistence (k) lze určit o jaký druh kapaliny se jedná. Pokud platí $k = \eta$ a $n = 1$, uvažuje se Newtonská kapalina. Pokud platí $n \neq 1$, jedná se o ne-Newtonskou kapalinu. Dále bylo potřeba rozhodnout, o jakou ne-Newtonskou kapalinu se jedná. Pokud by bylo $n > 1$, považovali bychom látku za dilatantní. V našem případě je ovšem $n < 1$, proto je zřejmé, že se jedná o látku pseudoplastickou. [54]

Z výsledků disperzí skladované při 25 °C je patrné, že hodnoty n klesají s rostoucí koncentrací CMC. Tento jev lze připisovat tomu, že nižší hodnoty n potvrzují přítomnost asociativních reakcí mezi řetězci polymerů. Proto s nárůstem hodnoty n na hodnotu 1 by bylo chování disperze mnohem více podobné Newtonovské tekutině. Naopak s vyšším přídatkem CMC se index toku snižuje směrem k hodnotě nula, což značí vysoce pseudoplastickou disperzi.

Tab. 5 Indexu toku (n) a koeficientu konzistence (k) pro disperzi skladovanou při 25 °C

	k	n	r^2
Vzorek 1	0,06 ± 0,003	0,88 ± 0,01	0,98
Vzorek 2	1,8 ± 0,2	0,67 ± 0,02	0,97
Vzorek 3	3,4 ± 0,4	0,56 ± 0,03	0,96
Vzorek 4	7,2 ± 0,5	0,46 ± 0,02	0,96
Vzorek 5	13,0 ± 0,6	0,41 ± 0,01	0,93

Výsledky disperzí po tepelné zátěži ukazují, že k největším změnám došlo u disperzí s 1 a 2 ml přídatku CMC.

Tab. 6 Indexu toku (n) a koeficientu konzistence (k) pro disperzi skladovanou při 40 °C.

	k	n	r^2
Vzorek 1	1,4 ± 0,1	0,46 ± 0,02	0,93
Vzorek 2	5,4 ± 0,4	0,37 ± 0,02	0,88
Vzorek 3	1,7 ± 0,3	0,69 ± 0,04	0,97
Vzorek 4	9,4 ± 0,4	0,46 ± 0,01	0,93
Vzorek 5	11,1 ± 0,5	0,41 ± 0,01	0,92

Tab. 7 Indexu toku (n) a koeficientu konzistence (k) pro disperzi skladovanou při 50 °C.

	k	n	r^2
Vzorek 1	11,1 ± 0,6	0,52 ± 0,01	0,95
Vzorek 2	4,3 ± 0,4	0,6 ± 0,02	0,96
Vzorek 3	6,2 ± 1	0,48 ± 0,03	0,94
Vzorek 4	10,8 ± 0,8	0,38 ± 0,02	0,91
Vzorek 5	3,3 ± 0,2	0,48 ± 0,01	0,94

Tab. 8 Indexu toku (n) a koeficientu konzistence (k) pro disperzi skladovanou při 60 °C

	k	n	r^2
Vzorek 1	3,7 ± 0,2	0,55 ± 0,01	0,95
Vzorek 2	3,9 ± 0,4	0,51 ± 0,02	0,95
Vzorek 3	5,6 ± 0,3	0,47 ± 0,01	0,94
Vzorek 4	3,7 ± 0,2	0,51 ± 0,01	0,94
Vzorek 5	8 ± 0,3	0,46 ± 0,01	0,93

Z tabulky naměřených hodnot uvedené pod textem lze vyčíst, že chování lipozomálních disperzí se vyznačovalo poklesem velké počáteční zdánlivé viskozity s rostoucím smykovým napětím. Tento jev se vyskytuje u koncentrovanějších lyofilních koloidů a u některých micelárních systémů s anizometrickými částicemi a je vysvětlován existencí spojitých struktur, které představují přechod ke spletené síti tvořící gely. Tyto struktury však nejsou souvislé a vlivem tepelného pohybu nové spoje neustále vznikají a opět zanikají. Pseudoplastické tekutiny při sebemenším napětí tečou, proto toková křivka prochází počátkem, stejně jako u Newtonských kapalin. Pokud se smykové napětí zvyšuje, struktury se rozbíjejí, v disperzi se snižuje počet přechodných spojů, vznikají menší a jednodušší celky, a proto viskozita systému klesá. Tento typ viskozitního chování předpokládá, že systém má sklon ke gelaci. [60]

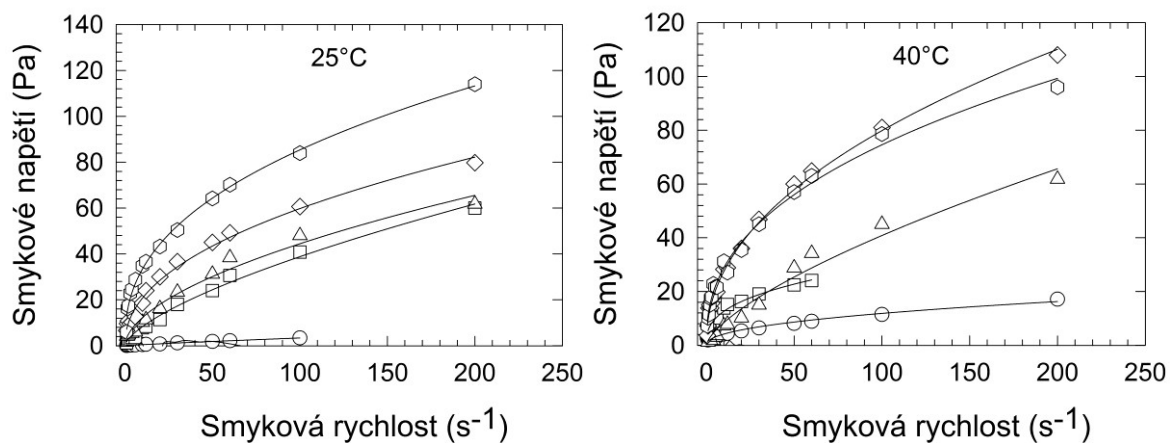
Tab. 9 Naměřené hodnoty smykového napětí a zdánlivé viskozity na smykové rychlosti RPM [min^{-1}]

40 °C	vzorek 1				vzorek 2				vzorek 3				
	rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.		
	RPM	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]
0,6	2,67	4,45	0,72	1,2									
1	1,92	1,92	1,05	1,05	7,89	7,89				1,2	1,2	3	3
1,5	2,1	1,4	1,35	0,9	6,63	4,42	3,66	2,44		3	2	3,6	2,4
2	2,34	1,17	1,8	0,72	6,6	3,3	4,23	2,12		3	1,5	4,2	2,1
2,5	2,46	0,984	1,92	0,768	7,11	2,84	4,86	1,94		3	1,2	4,2	1,68
3	2,73	0,88	2,16	0,72	6,69	2,2	5,58	1,86		2,4	0,8	4,2	1,4
4	2,81	0,705	2,7	0,675	7,47	1,867	6,81	1,7		1,8	0,45	4,2	1,05
5	3,03	0,606	3	0,6	8,58	1,716	7,83	1,566		3	0,6	6	1,2
6	3,15	0,525	3,33	0,555	10,11	1,75	8,82	1,47		3,6	0,6	6	1
10	4,17	0,405	4,17	0,417	13,86	1,389	11,07	1,107		7,2	0,72	9,6	0,96
12	4,38	0,362	4,47	0,383	15,15	1,25	12,12	1,01		7,8	0,65	11,4	0,95
20	5,28	0,264	5,55	0,278	16,3	0,813	15	0,75		10,2	0,51	16,8	0,84
30	6,39	0,213	6,7	0,223	19,02	0,634	18,09	0,6		15	0,5	25,2	0,84
50	8,1	0,162	8,16	0,163	22,44	0,448	22,2	0,44		28,8	0,576	31,8	0,636
60	8,88	0,148	9,09	0,152	24,06	0,401	23,85	0,4		34,2	0,57	37,8	0,63
100	11,4	0,114	11,55	0,1155						45	0,45	45	0,45
200	17,1	0,085	17,1	0,085						61,8	0,309	61,8	0,309

40 °C	vzorek 4				vzorek 5			
	rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.	
	RPM	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]
0,6	3,6	6			7,2	12	3	5
1	7,2	7,2	4,8	4,8	10,2	10,2	6,6	6,6
1,5	13,8	9,2	6	4	11,4	7,6	10,2	6,8
2	15	7,5	6	3	15	7,5	12,6	6,3
2,5	13,8	5,52	7,2	2,88	17,4	6,96	13,8	5,52
3	15,6	5,2	7,2	2,4	18	6	14,4	4,8
4	18	4,5	8,4	2,1	22,8	5,7	16,8	4,2
5	19,2	3,72	10,2	2,04	21,6	4,32	20,4	4,08
6	19,8	3,2	12,6	2,1	21,6	3,6	23,4	3,9
10	28,2	2,82	19,2	1,92	31,2	3,12	34,2	3,42
12	28,8	2,35	22,8	1,85	27	2,25	36	3
20	36	1,8	37,2	1,86	35,4	1,77	39,6	1,98
30	46,8	1,56	50,4	1,68	45	1,5	44,4	1,48
50	60	1,2	58,8	1,176	57	1,14	49,8	0,996
60	64,8	1,08	63	1,06	63	1,05	54,6	0,91
100	81	0,81	78	0,78	78,6	0,78	69	0,69
200	108	0,54	108	0,54	96	0,48	96	0,48

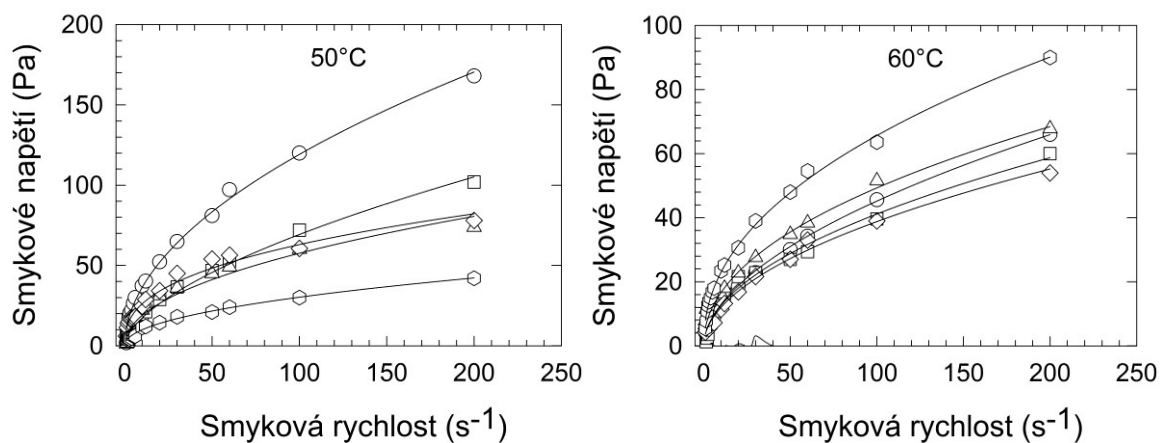
Naměřené hodnoty smykového napětí a zdánlivé viskozity na smykové rychlosti disperze skladované při 40 °C jsou uvedeny pro ukázkou, další studované disperze a naměřené hodnoty jsou přiloženy na konci práce jako příloha III.

Na obrázcích 9 a 10 jsou vykresleny jednotlivé tokové křivky sledovaných disperzí.



Obr. 9 Závislost smykového napětí na smykové rychlosti (toková křivka) micelární emulze vitamínu C a lecitinu na přídatku CMC při teplotě disperze 25 a 40 °C.

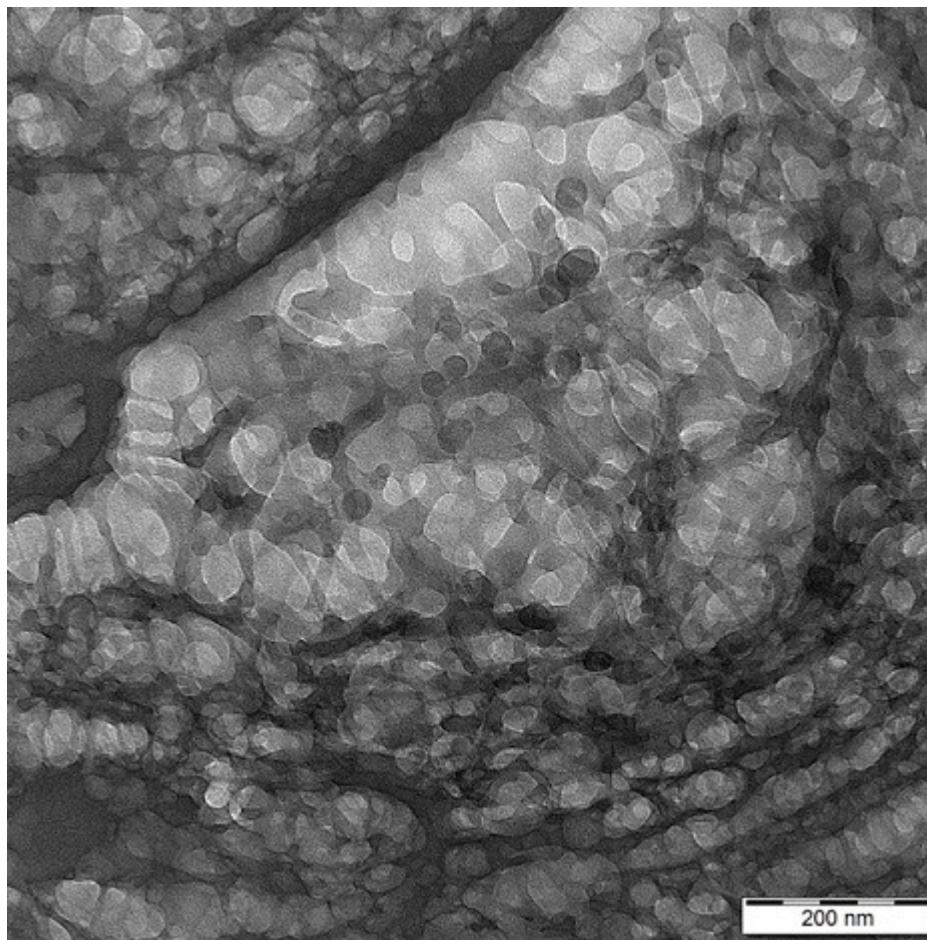
Legenda: ○ vzorek 1, □ vzorek 2, △ vzorek 3, ◇ vzorek 4, △ vzorek 5



Obr. 10 Závislost smykového napětí na smykové rychlosti (toková křivka) micelární emulze vitamínu C a lecitinu na přídatku CMC při teplotě disperze 50 a 60 °C.

Legenda: ○ vzorek 1, □ vzorek 2, △ vzorek 3, ◇ vzorek 4, △ vzorek 5

6.4 Transmisní elektronová mikroskopie



Obr. 11 TEM analýza vzorku koloidní disperze zapouzdřeného C vitamínu v lipozomálním micelárním systému.

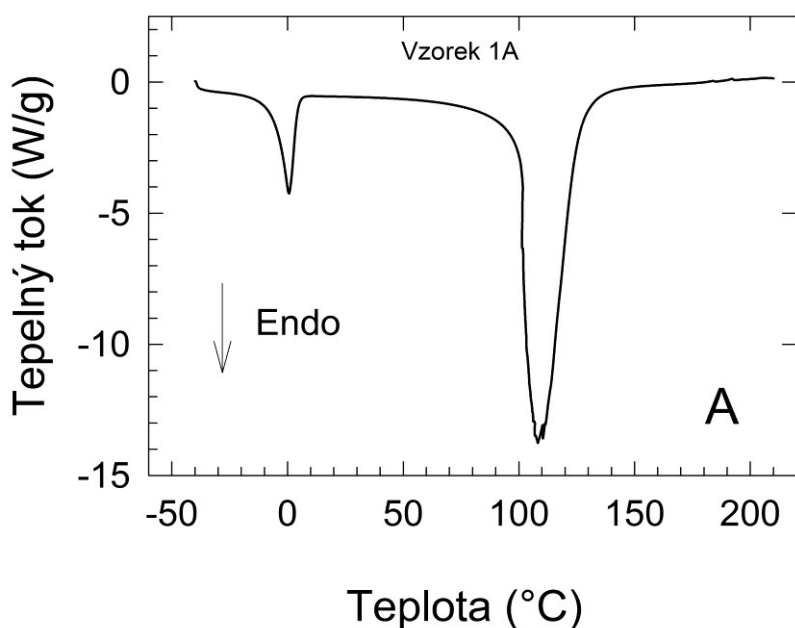
6.5 Termická analýza metodou DSC

Tab. 10 Intenzity jednotlivých píků v závislosti na množství CMC skladované při 25 °C.

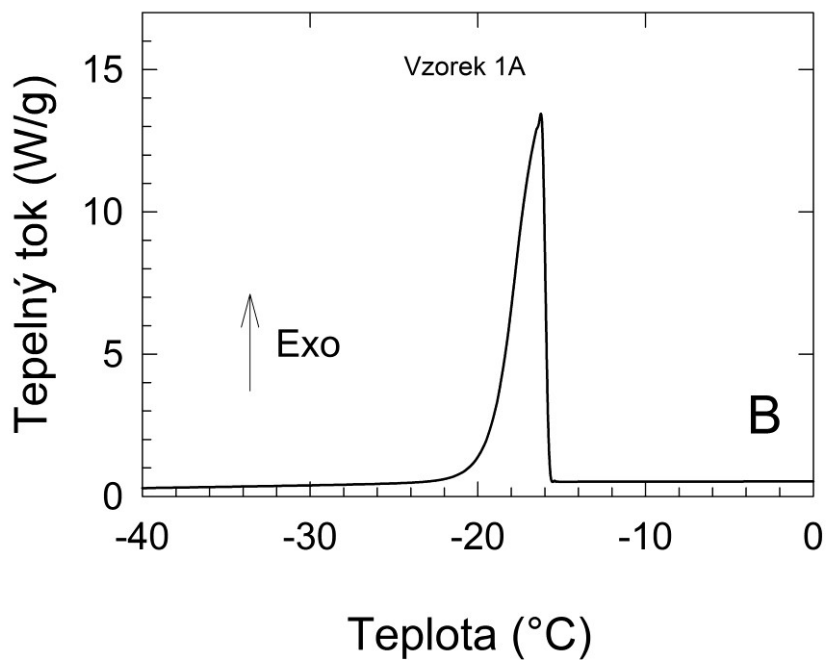
Vzorek	DSC píky					
	Ohřevova křivka				Chladící křivka	
	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_{BP} (°C)	ΔH_{BP} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)
1	0,358	-4,20749	108,203	-13,7621	-11,345	13,1995
2	0,397	-4,29713	104,937	-14,5659	-15,395	16,3574
3	0,535	-4,33936	104,702	-15,8162	-14,331	17,3562
4	0,284	-4,37259	105,114	-16,2056	-11,799	13,7827
5	-0,187	-4,54263	104,976	-17,1737	-16,087	15,8087

Typický průběh ohřevové a chladicí křivky DSC záznamu je uveden na Obr. 4. Získané hodnoty jednotlivých teplot a tepel fázových přechodů jsou uvedeny v Tabulce 9. Jak je patrné z Obr. 12 a 13 lze na obou křivkách záznamu z DSC měření, jak ohřevové, tak i ochlazovací, rozlišit 3 základní formy vody přítomny ve struktuře studovaných koloidních disperzí. Jedná se o jeden pík související s táním vody, nacházející se při teplotě $-0,2$ až $0,5$ °C, další pík odpovídá fázovému přechodu l/g, tzn. teplota odpařování při teplotě 104 až 108 °C a teplota krystalizace vody v oblasti -11 až -16 C. Z našich měření, byla zjištěna zajímavá skutečnost, že hodnota teploty tání pro vzorky 1 až 4 měla kladnou hodnotu nad 0 °C, a vzorek č. 5 vykazoval zápornou hodnotu. Tuto skutečnost lze připsat efektu tzv. zamrzající vázané vody, která je charakteristická vysokým stupněm vazeb zejména formou vodíkových můstků. [61]

Měrné teplo tání studovaných liposomálních disperzí se pohybovalo kolem $4,3$ J/g. Výparné teplo se pohybovalo kolem hodnoty $15,3$ J/g. Uvedené hodnoty jsou relativně vyšší než pro čistou vodu ($\Delta H_{\text{tání}} = 334$ kJ/kg, $\Delta H_{\text{výparné}} = 2257$ kJ/kg), což lze připsat komplexnímu složení vodní disperzní fáze a liposomální dispergované fáze složené z CMC a lecitinu s vitamínem C.



Obr. 12 Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové při zahřevu od -40 do $+210$ °C.



Obr. 13 Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové při chlazení od +25 do - 210 °C.

Pro ukázkou uvádíme termogram disperze s nejmenším přídavkem CMC. Termogramy všech čtyř dalších disperzí jsou přiloženy v příloze na konci této práce, jelikož píky křivek všech disperzí vykazovaly stejný trend a lišily se jen lehce ve velikosti.

7 DISKUZE

Lipozomální disperze (LD) s přídatkem 2 hm.% karboxymethylcelulózy byly použity pro zapouzdření kyseliny askorbové. Byla stanovena velikost, struktura a stabilita lipozomů pomocí dynamického rozptylu světla, zeta potenciálu, a transmisní elektronové mikroskopie před i po provedení teplotní zátěže při 40, 50 a 60 °C. Dále byly zkoumány reologické vlastnosti pomocí tokových křivek a tepelné vlastnosti disperze pomocí DSC.

Stabilita LD byla hodnocena prostřednictvím změn velikostí částic v závislosti na složení a teplotě skladování. Výsledky prokázaly, že oba faktory, jak přídatek CMC, tak teplota skladování může ovlivnit velikost částic. Agregace lipozomů je fyzikálně chemický mechanismus, který závisí na pH, tepelné zátěži, vnějším zatížení a přítomnosti kationtů. [56] Pro suspenze s velikostí částic menší než 1 mikrometr je obvykle pro udržení částic v disperzní fázi podstatný Brownův pohyb. Kvůli Brownovu pohybu se budou částice nepřetržitě srážet mezi sebou a následkem toho se díky Van der Waalsovým přitažlivým silám mohou shlukovat. To může vést k vytváření sekundárních částic (vloček) o mnohem větší velikosti. [58] V této práci bylo zjištěno, že systém LD s přídatkem CMC vykazuje nejvyšší stabilitu při teplotě 25 °C, což se předpokládalo. Přídatek polymerního tenzidu CMC zde nemá vliv na rozměr částic. Nejkompaktnější strukturu micel dále vykazoval přídatek 1 a 2 ml CMC u všech teplot skladování. Zvýšená teplota disperze však vede k její destabilizaci, což má za následek vznik větších agregátů, tato skutečnost se projevila zejména u disperzí s vyšším přídatkem CMC. Nejnižší stabilitu vykazoval systém s největším přídatkem CMC skladovaný za vysokých teplot (50 a 60 °C), kdy byl soubor naměřených hodnot průměrů částic různorodý a kdy částice dosahovaly velikosti až 3500 nm.

Aby se zabránilo shlukování částic, je nezbytné poskytnout určitou zábranu. Toho lze dosáhnout prostorovými či elektrostatickými prostředky adsorbujícími polymery nebo zavedením náboje na povrch částice. Stabilní systém vznikne ve chvíli, kdy odpudivá síla převyšuje přitažlivou sílu. Energetická bariéra vznikající z odpudivé síly brání částicím ve vzájemném přiblížení a tvoření shluků, pokud tyto částice nemají dostatečnou tepelnou energii pro překonání této bariéry. Velikost této potenciálové bariéry lze vyjádřit velikostí zeta potenciálu, což je potenciál na rovině skluzu mezi částicí a sduženou dvojvrstvou s obklopujícím rozpouštědlem a může být použit jako indikátor jejich fyzikální stability. [58] Vysoké pozitivní nebo záporné povrchové náboje vedou k silným elektrostatickým odpudivým interakcím

mezi lipozomy. Plošný náboj ± 30 mV je typicky považován za dostatečný k zajištění tvorby stabilní vodné disperze v důsledku elektrostatické stabilizace lipozomů. [59] Jestliže částice mají nízké hodnoty zeta potenciálu, pak odpuzování nebude dostatečné k tomu, aby se zabránilo shlukování částic a jejich vysrážení jako vločky.

Výsledky zeta potenciálu LD se zapouzdřenou kyselinou askorbovou se blížily hranici stability - 30 mV pouze v případě disperzí, které nepodstoupily teplotní zátěž a byly skladovány při 25 °C, nejlépe stabilní se ukázal vzorek s nejvyšším přídatkem CMC $\zeta = (-27 \pm 3)$ mV. Se zvyšující se teplotou se stabilita snižovala. Pokud dodáme tepelnou energii systému, částice zmítané Brownovým pohybem se pohybují rychleji a mohou lépe překonat elektrostatickou bariéru a spojit se. Můžeme tedy říct, že vysoká teplota skladování má významný vliv na snížení elektrokinetického zeta potenciálu a následně vede ke shlukování částic, které se od sebe už dostatečně neodpuzují. Vznikající agregáty můžeme pozorovat jako změnu velikostí pozorovaných částic pomocí analýzy rozptylu světla, která byla provedena a potvrdila tak získané výsledky analýzy zeta potenciálu. Vliv přídatku CMC na výsledný zeta potenciál nebyl statisticky potvrzen, je však nutno podotknout, že přídatky, které byly použity, již byly pro daný systém experimentálně zhodnoceny v předešlé práci jako optimální.

Zajímavá byla skutečnost, že vzorky skladované při 40 °C byly při této konstantní teplotě ponechány 3krát tak dlouho, jako vzorky skladované při 50 a 60 °C, tedy 60 hodin. Výsledky analýzy těchto vzorků ale nevykazovaly žádné enormní změny oproti předpokládaným výsledkům. Je ovšem potřeba dalších experimentů, abychom mohli posoudit vliv faktoru času na stabilitu LD skladovaných při vyšších teplotách.

Při analýze chování LD s CMC vykreslením smykového napětí jako funkce smykové rychlosti byly zjištěny dva typy křivek (lineární a nelineární) v závislosti na různé koncentraci (přídatku) CMC, což by mohlo indikovat přítomnost dvou typů chování proudění. Přítomnost lineárního vztahu mezi smykovým napětím a smykovou rychlostí ukazuje na Newtonovo chování. Tento typ chování lze však konstatovat pouze v případě, že platí $k = \eta$ a $n = 1$, což nebylo pozorováno v žádném ze sledovaných vzorků. Index toku n se blížil k ($n = 1$) pouze v případě LD s nejmenším přídatkem CMC skladované při 25 °C, kdy $n = 0,88$, v tomto případě tedy můžeme očekávat chování podobné Newtonskému. Ve všech ostatních případech byl pozorován nelineární vztah, který představuje ne-Newtonské chování kapaliny. [54]

Roztoky CMC stejně jako mnohých jiných polymerů s vysokou molekulovou hmotností jako je betalaktoglobulin a xanthan vykazují pseudoplastické chování. Trend pseudoplastického chování kapaliny podporuje agregace v systému. Proto LD, u kterých vlivem skladování při vysoké teplotě došlo k tvorbě shluků částic, vykazovala pseudoplastické chování nejvíce. Tyto systémy obsahují vysoce zapletené polymery s dlouhými řetězci, které jsou náhodně orientované a uspořádané tak, aby zaujímaly jejich minimální energetický stav. Při nízkých úrovních vnějšího namáhání systém odolává jakékoliv deformaci, usiluje o zachování své struktury a vykazuje vysokou hodnotu zdánlivé viskozity. Se zvyšující se úrovní smykového napětí postupně strukturální jednotky reagují na působící napětí buď vyrovnáním řetězců ve směru toku nebo deformováním a orientací podél proudových linií či cestou rozkladu agregátů na primární částice. Všechny tyto mikrostrukturní změny usnadňují průtok systému, což se projeví snížením efektivní viskozity se zvyšující se smykovou rychlostí. [60]

Pokud jsou řetězce polymerů příliš krátké nebo jejich koncentrace jsou příliš nízké, aby vzájemně spolupracovaly, chovají se jako neinteraktivní systémy. Toto chování je podobné Newtonskému, což se projevilo právě u disperze s nejnižším přídatkem CMC nepodrobené tepelné zátěži.

Stav vody v polymeru poskytuje cenné informace o absorpčních, difúzních a permeačních vlastnostech hydrofilních materiálů. Mechanické a fyzikální vlastnosti hydrofilních materiálů se mohou výrazně změnit po absorpci vody v důsledku modifikace polymerní řetězové struktury. Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) je běžně používaným nástrojem k provádění těchto studií. Kvůli chování fázového přechodu a molekulární pohyblivosti během interakce mezi vodou a molekulami polymeru jsou popsány tři druhy vody: nezamrzající, zamrzající a volná voda. Nezamrzající voda je úzce spojena s polymerní maticí a nevykazuje fázový přechod pomocí kalorimetrické analýzy. Zamrzající (krystalizační) voda je frakce vázaná na maticí méně těsně a vykazuje teplotu tání a krystalizace výrazně odlišnou od vody jako samostatné kapaliny. Volná voda vykazuje podobnou teplotu tání / krystalizace jako samostatná voda. Teploty vody v hydrogelu mohou odrážet stav vzájemného působení vody a polymeru. Hodnota měrného tepla tání a výparného tepla studovaných LD byla relativně vyšší než pro čistou vodu, což můžeme připsat komplexnímu složení vodní disperzní fáze a liposomální dispergované fáze složené z CMC a lecitinu s vitamínem C. [61]

ZÁVĚR

Cílem této studie bylo zapouzdřit vitamín C do lipozomální formy pomocí lecitinu a karboxymethylcelulózy a sledování fyzikálně-chemických změn při skladování vzniklé lipozomální disperze za zvýšených teplot. Pomocí měření elektrokinetického zeta potenciálu a rozměru částic bylo zjištěno, že lipozomální disperze vykazuje při pokojové teplotě vysokou stabilitu. Tato stabilita ovšem rapidně klesá se stoupající teplotou skladování, kdy za sníženého elektrokinetického potenciálu dochází ke shlukování částic a tvorbě větších agregátů. Nejkompatnější strukturu za zvýšených teplot skladování vykazovaly disperze s nejmenším přídatkem CMC, je však třeba podotknout, že všechny přídatky CMC se již blížily k optimální hodnotě potřebné pro udržení stability při skladování za pokojové teploty. Nejnížší stabilitu pak prokázaly vzorky lipozomální disperze skladované při teplotách 50 a 60 °C s nejvyšším přídatkem CMC. Jelikož agregace v systému podporuje pseudoplastické chování látek, bylo pomocí měření reologických vlastností prokázáno, že se systém podrobený působení vysokých teplot stává nestabilním a má tendenci ke koagulaci a gelatinaci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] OZSAGIROGLU, Erhan a Yuksel Avcibasi GUVENILIR. Encapsulation of L-ascorbic acid via polycaprolactone-polyethylene glycol-casein bioblends. *Polish Journal of Chemical Technology* [online]. 2015, vol. 17, no. 4, s. 32-36. ISSN 1509-8117.
- [2] MAIA, Adriana M. et al. Validation of HPLC stability-indicating method for Vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants. *Talanta* [online]. 2007, vol. 71, no. 2, s. 639-643. ISSN 0039-9140.
- [3] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-4-5.
- [4] OPLETAL, Lubomír. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita. sv. 1. Primární metabolity a látky obsažené ve strukturovaných biologických systémech*. Karolinum, Praha 2010. ISBN 978-80-246-1884-5.
- [5] WU, Wei, Zhenlian SUN a Wei ZHANG. Simple and Rapid Determination of Vitamin C in Vegetables and Fruits by a Commercial Electrochemical Reader. *Food Analytical Methods* [online]. 2016, vol. 9, no. 11, s. 3187-3192. ISSN 1936-9751.
- [6] NOVAKOVA, Lucie, Dagmar SOLICHOVA a Petr SOLICH. Hydrophilic interaction liquid chromatography-charged aerosol detection as a straightforward solution for simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, vol. 1216, no. 21, s. 4574-4581. ISSN 0021-9673.
- [7] LIVON LABORATORIES. Method of making liposomes, liposome compositions made by the methods, and methods of using the same. Inventor: Yuanpeng Zhang. US. WO 2012/094033 A1. 12. 07. 2012
- [8] Spoelstra-de Man, Angelique M E, Paul W. G. ELBERS a Heleen M. OUDEMANS-VAN STRAATEN. Making sense of early high-dose intravenous vitamin C in ischemia/reperfusion injury. *Critical Care* [online]. 2018, vol. 22, s. 70. ISSN 1466-609X
- [9] HLÚBIK, Pavel a Libuše OPLTOVÁ. *Vitaminy*. Praha, 2004. ISBN 80-247-0373-4

- [10] FANG, Ting et al. Variation of ascorbic acid concentration in fruits of cultivated and wild apples. *Food Chemistry* [online]. 2017, vol. 225, s. 132-137. ISSN 0308-8146.
- [11] NISHIYAMA, I. et al. Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other Actinidia species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, vol. 52, no. 17, s. 5472-5475. ISSN 0021-8561.
- [12] PHILLIPS, Katherine M. et al. Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2010, vol. 23, no. 3, s. 253-259. ISSN 0889-1575.
- [13] SEHRAWAT, Rachna, Prabhat K. NEMA a Barjinder Pal KAUR. Effect of superheated steam drying on properties of foodstuffs and kinetic modeling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [online]. 2016, vol. 34, s. 285-301. ISSN 1466-8564.
- [14] LEONG, Sze Ying a Indrawati OEY. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chemistry* [online]. 2012, vol. 133, no. 4, s. 1577-1587. ISSN 0308-8146.
- [15] GALANI, Joseph H. Y. et al. Storage of Fruits and Vegetables in Refrigerator Increases their Phenolic Acids but Decreases the Total Phenolics, Anthocyanins and Vitamin C with Subsequent Loss of their Antioxidant Capacity. *Antioxidants* [online]. 2017, vol. 6, no. 3, s. UNSP 59. ISSN 2076-3921.
- [16] SADOWSKA, Katarzyna, Jadwiga ANDRZEJEWSKA a Lukasz KLOSKA. Influence of freezing, lyophilisation and air-drying on the total monomeric anthocyanins, vitamin C and antioxidant capacity of selected berries. *International Journal of Food Science and Technology* [online]. 2017, vol. 52, no. 5, s. 1246-1251. ISSN 0950-5423.
- [17] SOMSUB, Weenanan et al. Effects of three conventional cooking methods on vitamin C, tannin, myo-inositol phosphates contents in selected Thai vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2008, vol. 21, no. 2, s. 187-197. ISSN 0889-1575.
- [18] SELMAN, J. D. Vitamin Retention during Blanching of Vegetables. *Food Chemistry* [online]. 1994, vol. 49, no. 2, s. 137-147. ISSN 0308-8146.

- [19] CAMARENA, Vladimir a Gaofeng WANG. The epigenetic role of vitamin C in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2016, vol. 73, no. 8, s. 1645-1658. ISSN 1420-682X.
- [20] FIGUEROA-MENDEZ, Rodrigo a Selva RIVAS-ARANCIBIA. Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain. *Frontiers in Physiology* [online]. 2015, vol. 6, s. 397. ISSN 1664-042X.
- [21] CHRISTIE-DAVID, Darshika J., Christian M. GIRGIS a Jenny E. GUNTON. Effects of vitamins C and D in type 2 diabetes mellitus. *Nutrition and Dietary Supplements* [online]. 2015, vol. 7, s. 21-28. ISSN 1179-1489.
- [22] OLIVEIRA FERREIRA DA MATA, Ana Maria et al. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. *Revista Da Associacao Medica Brasileira* [online]. 2016, vol. 62, no. 7, s. 680-686. ISSN 0104-4230.
- [23] PULLAR, Juliet M., Anitra C. CARR a Margreet C. M. VISSERS. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients* [online]. 2017, vol. 9, no. 8, s. 866. ISSN 2072-6643.
- [24] MOSER, Melissa A. a Ock K. CHUN. Vitamin C and Heart Health: A Review Based on Findings from Epidemiologic Studies. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, vol. 17, no. 8, s. UNSP 1328. ISSN 1422-0067.
- [25] TEWARI, Somya et al. Preservation effect of high pressure processing on ascorbic acid of fruits and vegetables: A review. *Journal of Food Biochemistry* [online]. 2017, vol. 41, no. 1, s. e12319. ISSN 0145-8884
- [26] DESAI, KGH a H. J. PARK. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* [online]. 2005, vol. 23, no. 7, s. 1361-1394. ISSN 0737-3937
- [27] KALMANOVICH, Svetlana A. et al. The Use of Fractionated Sunflower Lecithins for Encapsulation of Micronutrients. *Asian Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, vol. 10, no. 3, s. S393. ISSN 0973-8398.
- [28] DE VOS, Paul, Marijke M. FAAS, Milica SPASOJEVIC a Jan SIKKEMA. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food

- components. *International Dairy Journal*. 2010, roč. 20, č. 4, s. 292-302. ISSN 09586946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.11.008.
- [29] FANG, Zhongxiang a Bhesh BHANDARI. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*[online]. 2010, vol. 21, no. 10, s. 510-523. ISSN 0924-2244.
- [30] ESPOSITO, E. et al. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2002, vol. 242, no. 1-2, s. 329-334. ISSN 0378-5173.
- [31] MASKOVA, E., K. KUBOVA a D. VETCHY. The Use of (Meth)acrylic Copolymers in the Production of Matrix Tablets with Controlled Drug Release. *Chemicke Listy* [online]. 2015, vol. 109, no. 1, s. 14-20. ISSN 0009-2770.
- [32] COMUNIAN, Talita A. et al. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. *Food Research International* [online]. 2013, vol. 52, no. 1, s. 373-379. ISSN 0963-9969.
- [33] KOUPANTISIS, T., E. PAVLIDOU a A. PARASKEVOPOULOU. Glycerol and tannic acid as applied in the preparation of milk proteins - CMC complex coagulates for flavour encapsulation. *Food Hydrocolloids* [online]. 2016, vol. 57, s. 62-71. ISSN 0268-005X.
- [34] KHALID, Nauman et al. Monodisperse W/O/W emulsions encapsulating L-ascorbic acid: Insights on their formulation using microchannel emulsification and stability studies. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2014, vol. 458, s. 69-77. ISSN 0927-7757.
- [35] KHALID, Nauman et al. Preparation and Characterization of Water-in-Oil-in-Water Emulsions Containing a High Concentration of L-Ascorbic Acid. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* [online]. 2013, vol. 77, no. 6, s. 1171-1178. ISSN 0916-8451.
- [36] PATEL, Ashok R. a Bhesh BHANDARI. *Nano- and Microencapsulation of Vitamins* [online]. . H. S. KWAK. OXFORD; OSNEY MEAD, OXFORD OX2 0EL, ENGLAND: BLACKWELL SCIENCE PUBL, 2014. 248 s. ISBN 978-1-118-29232-7.

- [37] MUFAMADI Maluta S., Viness PILLAY, Yahya E. CHOONARA et al.. A Review on Composite Liposomal Technologies for Specialized Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery*, vol. 2011, Article ID 939851, 19 pages, 2011. doi:10.1155/2011/939851
- [38] TORCHILIN V a V. WEISSING (2003): Liposomes: A Practical Approach. The Practical Approach Series, 264, Oxford University Press.
- [39] WECHTERSACH, Luka, Natasa Poklar ULRIH a Blaz CIGIC. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. *Lwt-Food Science and Technology* [online]. 2012, vol. 45, no. 1, s. 43-49. ISSN 0023-6438.
- [40] AKBARZADEH, Abolfazl et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, vol. 8, s. 102. ISSN 1556-276X.
- [41] ELOY, Josimar Oliveira, De Souza MARINA CLARO a Raquel PETRILLI. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, roč. 123, s. 345–363, ISSN 0927-7765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.029
- [42] ALBERTS et al. (2001): *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, Ústí nad Labem
- [43] DAVIS, Janelle L. et al. Liposomal-encapsulated Ascorbic Acid: Influence on Vitamin C Bioavailability and Capacity to Protect Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Nutrition and Metabolic Insights* [online]. 2016, vol. 9, s. 25-30. ISSN 1178-6388.
- [44] MCCLEMENTS, David Julian. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2015, vol. 219, s. 27-53. ISSN 0001-8686.
- [45] WONG, Ho Lun et al. A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharmaceutical Research* [online]. 2006, vol. 23, no. 7, s. 1574-1585. ISSN 0724-8741.

- [46] PUSHPAMALAR, Janarthanan et al. Biodegradable Polysaccharides for Controlled Drug Delivery. *Chempluschem* [online]. 2016, vol. 81, no. 6, s. 504-514. ISSN 2192-6506.
- [47] CHUNG, Cheryl et al. Formulation of food emulsions using natural emulsifiers: Utilization of quillaja saponin and soy lecithin to fabricate liquid coffee whiteners. *Journal of Food Engineering* [online]. 2017, vol. 209, s. 1-11. ISSN 0260-8774.
- [48] JOSHY, K. S. et al. Core-shell nanoparticles of carboxy methyl cellulose and compritol-PEG for antiretroviral drug delivery. *Cellulose* [online]. 2017, vol. 24, no. 11, s. 4759-4771. ISSN 0969-0239.
- [49] KOUPANTISIS, T., E. PAVLIDOU a A. PARASKEVOPOULOU. Flavour encapsulation in milk proteins - CMC coacervate-type complexes. *Food Hydrocolloids* [online]. 2014, vol. 37, s. 134-142. ISSN 0268-005X.
- [50] KVÍTEK Libor a A. PANÁČEK: *Základy koloidní chemie*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2007
- [51] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ a Pavlína VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy* [online]. 2014, vol. 108, iss. 5, s. 479-482. [cit. 2018-04-15]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue_5-volume_108-year_2014.html.
- [52] DELGADO, A. V. et al. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of Colloid and Interface Science*[online]. 2007, vol. 309, no. 2, s. 194-224. ISSN 0021-9797.
- [53] KLOUŽKOVÁ, A., P. ZEMENOVÁ, J. KLOUŽEK a W. PABST: *Termická analýza*, VŠCHT PRAHA 2012. [online]. Copyright © [cit. 10.04.2018]. Dostupné z: <http://tresen.vscht.cz/sil/sites/default/files/Termick%C3%A1%20anal%C3%BDza.pdf>
- [54] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*. Ostrava: Key Publishing, 2013. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-163-4.

- [55] KARLÍK M.: *Transmisní elektronová mikroskopie: pohled do nitra materiálů*, Československý časopis pro fyziku, Vol. 55, p. 457 – 464, 2005
- [56] MARSANASCO, Marina et al. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International* [online]. 2011, vol. 44, no. 9, s. 3039-3046. ISSN 0963-9969.
- [57] CHEN C, et al. (2013) Analytical techniques for single-liposome characterization. *Anal. Methods* 5(9):2150–2157. doi:10.1039/C3AY40219C
- [58] CHEMAGAZÍN - *Časopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi - CHEMAGAZÍN s.r.o.* [online]. Copyright © [cit. 10.04.2018]. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_4_c13.pdf
- [59] MOHAN, Aishwarya, David Julian MCCLEMENTS a Chibuike C. UDENIGWE. Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. *Food Chemistry* [online]. 2016, vol. 213, s. 143-148. ISSN 0308-8146.
- [60] RADI, Mohsen a Sedigheh AMIRI. Comparison of the Rheological Behavior of Solutions and Formulated Oil-in-Water Emulsions Containing Carboxymethylcellulose (CMC). *Journal of Dispersion Science and Technology* [online]. 2013, vol. 34, no. 4, s. 582-589. ISSN 0193-2691.
- [61] YANG, Pine a Patrick T. MATHER, Thermal Analysis to Determine Various Forms of Water Present in Hydrogels, Syracuse Biomaterials Institute and Biomedical and Chemical Engineering Department, Syracuse University, Syracuse, NY 13244
- [62] LASIC, D. D. Liposomes in gene delivery. CRC-Press, 1997. 320 p. Boca Raton. New York. ISBN 978-0849331091
- [63] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [64] VOCETKOVÁ, K., A. MÍČKOVÁ, T.JAROŠÍKOVÁ, J. ROSINA, M.HANDL a E. EMLER. Lipozomy, jejich charakterizace, příprava a inkorporace do nanovláken-

ných nosičů. Vocetková | Lékař a technika - Clinician and Technology. [online]. Dostupné z: <https://ojs.cvut.cz/ojs/index.php/CTJ/article/view/4350/4210>

- [65] Vydavatelství VŠCHT Praha [online]. Copyright © [cit. 10.04.2018]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pdf/166.pdf

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CMC	karboxymethylcelulóza.
DSC	Diferenciační skenovací kalorimetrie
LD	Lipozomální disperze
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
V/O/V	Emulze typu voda v oleji ve vodě
GIT	Gastrointestinální trakt

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Biologicky aktivní formy vitamínu C (L-askorbová kyselina, anion askorbylradikálu, L-dehydroaskorbová kyselina) [3]	13
Obr. 2 Proces enkapsulace vitamínu C pomocí chytosanu metodou sprejového sušení a fotografie mikrokapsle enkapsulovaného vitamínu C pořízená elektronovou skenovací mikroskopií [26].....	22
Obr. 3 Proces enkapsulace vitamínu C emulsifikací typu V/O/V. [35].....	24
Obr. 4 Obrázky čerstvě připravených liposomů se zabudovanou kyselinou askorbovou získanou transmisním elektronovým mikroskopem. [39].....	25
Obr. 5 Stealth lipozom, Targeted lipozom [37]	31
Obr. 6 Příprava vzorků	41
Obr. 7 Závislost průměru částic micelární emulze vitamínu C a lecitinu na přídavku CMC a na teplotě skladování disperze.....	46
Obr. 8 Závislost ζ -potenciálu micelární emulze vitamínu C a lecitinu na přídavku CMC a na teplotě skladování disperze.....	48
Obr. 9 Závislost smykového napětí na smykové rychlosti (toková křivka) micelární emulze vitamínu C a lecitinu na přídavku CMC při teplotě disperze 25 a 40 °C.	52
Obr. 10 Závislost smykového napětí na smykové rychlosti (toková křivka) micelární emulze vitamínu C a lecitinu na přídavku CMC při teplotě disperze 50 a 60 °C.	52
Obr. 11 TEM analýza vzorku koloidní disperze zapouzdřeného C vitamínu v lipozomálním micelárním systému.	53
Obr. 12 Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové při zahřevu od -40 do + 210 °C.	54
Obr. 13 Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové při chlazení od +25 do - 210 °C.	55

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Metody enkapsulace [26]	21
Tab. 2 Složení jednotlivých vzorků v ml.	38
Tab. 3 Průměrná velikost částic – průměr d [nm].	45
Tab. 4 Průměrná velikost zeta potenciálu lipozomálních disperzí.	47
Tab. 5 Indexu toku (n) a koeficientu (k) pro disperzi skladovanou při 25 °C	49
Tab. 6 Indexu toku (n) a koeficientu (k) pro disperzi skladovanou při 40 °C.	49
Tab. 7 Indexu toku (n) a koeficientu (k) pro disperzi skladovanou při 50 °C.	50
Tab. 8 Indexu toku (n) a koeficientu (k) pro disperzi skladovanou při 60 °C	50
Tab. 9 Naměřené hodnoty smykového napětí a zdánlivé viskozity na smykové rychlosti RPM [min ⁻¹]	51
Tab. 10 Intenzity jednotlivých píků v závislosti na množství CMC skladované při 25 °C.....	53

SEZNAM PŘÍLOH

P I Tabulka naměřených hodnot: průměr částic [nm].....	72
P II Tabulka naměřených hodnot: Zeta potenciál [mV].....	72
P III Tabulka naměřených hodnot: reologické vlastnosti disperzí.....	73
P IV Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové vzorku 2A.....	76
P V Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové vzorku 3A.....	77
P VI Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové vzorku 4A.....	78
P VII Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové vzorku 5A.....	79

PŘÍLOHY

P I Tabulka naměřených hodnot: průměr částic [nm]

	Průměr částic d [nm]				
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
25 °C	296,1	346	303	276,9	291,7
	355,5	299,6	344,6	305,3	307,7
	355,5	291,1	409,3	292,1	294,3
	296,5	278,3	309,2	291,6	373,3
40 °C	319,1	530,8	556,9	542,4	634,2
	458,2	445,8	481,3	540,3	522,5
	384,3	412,8	473,2	490,3	750,3
	444,8	522,6	564,9	759,6	505,4
50 °C	476,9	732,8	824,6	1632,9	4314,7
	439	672,1	830,5	1436,8	2147,9
	444,3	767,9	1097,6	1443	1563,1
	466,1	652,8	1009	1646,5	2274,9
60 °C	523	1044,6	1873	1568,1	3062
	542,6	654,3	644,4	1688,9	3674,9
	789,7	658,4	2194,5	1378,9	1104,6
	571,7	596,9	760,3	1399,4	988,9

P II Tabulka naměřených hodnot: Zeta potenciál [mV]

	Zeta potenciál d [mV]				
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
25 °C	-23,42	-26,11	-24,69	-18,14	-30,05
	-25,26	-24,24	-21,96	-27,96	-30,32
	-24,02	-22,74	-24,76	-23,29	-21,78
	-29,16	-23,01	-25,77	-29,59	-26,65
40 °C	-20,2	-20,2	-21,31	-15,34	-20,62
	-20,34	-20,34	-21,95	-22,08	-22,76
	-24,41	-24,41	-16,95	-24,61	-11,93
	-17,86	-17,86	-23,11	-19,88	-23,74
50 °C	-17,05	-15,86	-15,3	-20,06	-13,17
	-20,21	-20,72	-17,06	-16,87	-15,56
	-20,05	-21,03	-17,31	-17,59	-12,03
	-20,95	-22,65	-20,89	-16,83	-20,16
60 °C	-13,72	-15,69	-15,7	-15,39	-17,81
	-28,55	-16,53	-13,74	-15,49	-7,12
	-17,5	-23,17	-20,28	-17,81	-6,66
	-19,46	-19,34	-20,99	-15,41	-11,65

P III Tabulka naměřených hodnot: reologické vlastnosti disperzí

25 °C	vzorek 1				vzorek 2				vzorek 3				
	rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.		
	RPM	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]
0,5	0,036	0,072	0,066	0,066									
0,6	0,036	0,072	0,066	0,066									
1	0,048	0,08	0,09	0,06	1,2	1,2	2,4	2,4	4,2	4,2	3,6	3,6	
1,5	0,084	0,056	0,132	0,066	2,4	1,6	3	2	4,2	2,8	4,2	2,8	
2	0,132	0,066	0,162	0,0648	3	1,2	3,6	1,8	4,8	2,4	4,2	2,1	
3	0,192	0,064	0,162	0,054	3	1	3	1	5,5	1,8	4,8	1,6	
4	0,222	0,055	0,192	0,048	3,6	0,75	4,2	1,05	5,4	1,35	6	1,5	
6	0,306	0,051	0,276	0,046	3,6	0,6	6,6	1,1	6	1	9,6	1,6	
10	0,444	0,0444	0,432	0,0432	7,8	0,78	13,2	1,32	10,2	1,02	16,8	1,62	
12	0,558	0,0465	0,528	0,044	8,4	0,7	16,2	1,35	11,4	0,92	19,2	1,6	
20	0,729	0,0396	0,768	0,0384	11,4	0,57	20,4	1,02	16,2	0,81	23,4	1,17	
30	1,176	0,0329	1,104	0,0366	18	0,6	25,2	0,84	23,4	0,8	26,4	0,88	
50	1,824	0,03648	1,722	0,0347	24	0,48	31,2	0,624	31,2	0,624	33	0,66	
60	2,142	0,0357	2,07	0,0344	30,6	0,5	33	0,55	38,4	0,63	37,8	0,61	
100	3,366	0,03366	3,366	0,03366	40,8	0,408	42	0,42	48	0,48	45	0,45	
200					60	0,3	60	0,3	61,8	0,309	61,8	0,309	

25 °C	vzorek 4				vzorek 5			
	rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.	
	RPM	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]
0,5					7,2	14,4	13,8	27,6
0,6					5,4	9	15,6	26
1	6,6	6,6	6,6	6,6	6	6	18	18
1,5	9,6	6,4	8,4	5,6	16,2	10,8	19,8	13,2
2	10,8	5,4	9	4,5	17,4	9,3	20,4	10,2
3	9,6	3,2	11,4	3,8	22,8	7,6	22,8	7,6
4	10,2	2,55	13,8	3,45	24,6	6,3	24,6	6,15
6	12,6	2,1	19,2	3,2	28,8	4,8	25,2	4,2
10	18,6	1,86	25,2	2,52	34,8	3,54	31,2	3,12
12	24	2	27	2,25	36,6	3,05	31,2	2,6
20	30	1,5	31,8	1,59	43,2	2,16	25,2	1,92
30	36,6	1,22	37,8	1,26	50,4	1,7	48	1,6
50	45	0,9	43,8	0,876	64,2	1,28	57	1,14
60	49,2	0,82	48,6	0,81	70,2	1,15	70,2	1,12
100	60,6	0,606	60	0,6	84	0,84	84	0,84
200	79,8	0,399	79,8	0,399	114	0,57	114	0,57

40 °C	vzorek 4				vzorek 5			
	rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.	
	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]
RPM								
0,6	3,6	6			7,2	12	3	5
1	7,2	7,2	4,8	4,8	10,2	10,2	6,6	6,6
1,5	13,8	9,2	6	4	11,4	7,6	10,2	6,8
2	15	7,5	6	3	15	7,5	12,6	6,3
2,5	13,8	5,52	7,2	2,88	17,4	6,96	13,8	5,52
3	15,6	5,2	7,2	2,4	18	6	14,4	4,8
4	18	4,5	8,4	2,1	22,8	5,7	16,8	4,2
5	19,2	3,72	10,2	2,04	21,6	4,32	20,4	4,08
6	19,8	3,2	12,6	2,1	21,6	3,6	23,4	3,9
10	28,2	2,82	19,2	1,92	31,2	3,12	34,2	3,42
12	28,8	2,35	22,8	1,85	27	2,25	36	3
20	36	1,8	37,2	1,86	35,4	1,77	39,6	1,98
30	46,8	1,56	50,4	1,68	45	1,5	44,4	1,48
50	60	1,2	58,8	1,176	57	1,14	49,8	0,996
60	64,8	1,08	63	1,06	63	1,05	54,6	0,91
100	81	0,81	78	0,78	78,6	0,78	69	0,69
200	108	0,54	108	0,54	96	0,48	96	0,48

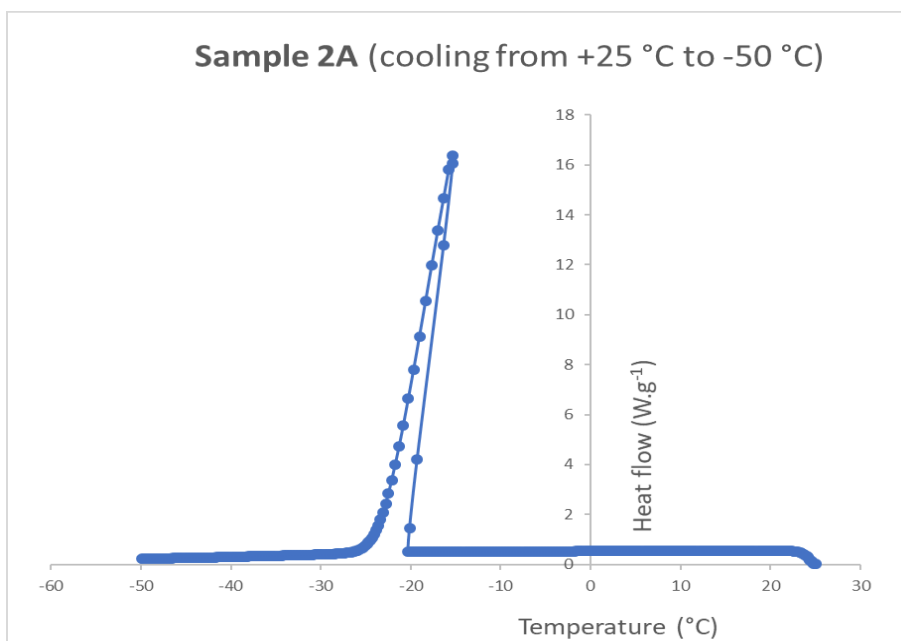
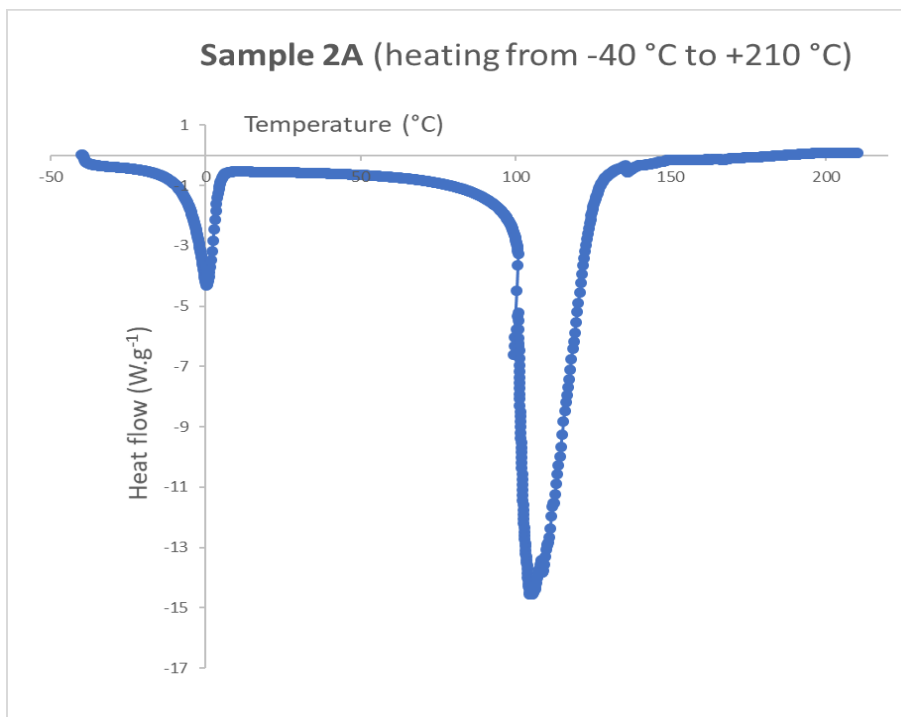
50 °C	vzorek 1				vzorek 2				vzorek 3			
	rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.	
	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]
RPM												
0,6					3,6	6	11,4	19				
1	1,8	1,8	25,8	25,8	4,8	4,8	16,2	16,2	1,20	1,2	12,6	12,6
1,5	10,2	6,8	31,8	21,2	6	4	19,2	12,8	1,80	1,2	14,4	9,6
2	11,4	5,7	34,8	17,4	6,6	3,3	22,8	11,4	3,00	1,5	18	9
2,5	18,6	7,44	39	15,6	5,4	2,16	25,2	10,08	4,80	1,92	20,4	8,16
3	20,4	6,8	42,6	14,2	5,4	1,8	27	9	6,00	2	23,4	7,8
4	22,2	5,55	45,6	11,4	6	1,5	30	7,5	7,20	1,8	28,8	7,2
5	26,4	5,28	49,8	9,96	7,8	1,56	34,8	6,84	9,60	1,92	31,2	6,24
6	30	5	51	8,5	9	1,5	37,8	6,3	11,40	1,9	33	5,5
10	37,2	3,78	61,8	6,18	14,4	1,56	44,4	4,44	22,20	2,22	37,8	3,78
12	40,2	3,35	61,8	5,15	21,2	1,85	44,4	3,8	26,40	2,25	42	3,5
20	52,2	2,61	76,2	3,81	28,8	1,44	51,6	2,67	31,20	1,5	45	2,25
30	64,8	2,16	90	3	36,6	1,24	58,8	2	36,00	1,2	48,6	1,68
50	81	1,62	111	2,22	46,8	0,936	66	0,132	45,00	0,9	58,8	1,176
60	97,2	1,62	115,2	1,91	52,8	0,88	65,4	1,11	49,20	0,82	60	1
100	120	1,2	141	1,41	72	0,72	78	0,78	60,00	0,6	66	0,63
200	168	0,84	168	0,84	102	0,51	102	0,51	73,80	0,369	73,8	0,369

50 °C	vzorek 4				vzorek 5			
	rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.	
	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]
RPM								
0,6								
1	6	6	4,8	4,8	4,2	4,2	3,6	3,6
1,5	11,4	8	4,8	3,2	4,8	3,2	4,8	3,2
2	13,8	6,9	6,6	3,3	4,8	2,4	4,8	2,4
2,5	15	6	6,6	2,64	4,8	1,92	5,4	2,16
3	16,8	5,6	7,2	2,4	4,2	1,4	5,4	1,8
4	16,8	4,2	8,4	2,1	4,8	1,2	6	1,5
5	17,4	3,48	10,8	2,04	6	1,2	7,2	1,44
6	18	3	13,2	2,2	6	1	7,2	1,2
10	24,6	2,46	18,6	1,86	11,4	1,14	11,4	1,44
12	28,8	2,4	21	1,75	12	1	12	1
20	34,2	1,71	24,6	1,23	14,4	0,72	10,8	0,54
30	45	1,5	31,8	1,06	18	0,6	12,6	0,42
50	54	1,08	42	0,804	21	0,42	15	0,3
60	56,4	0,93	46,8	0,78	24	0,4	16,8	0,28
100	60,6	0,606	57,6	0,576	30	0,3	24,6	0,246
200	78	0,399	78	0,399	42	0,21	42	0,21

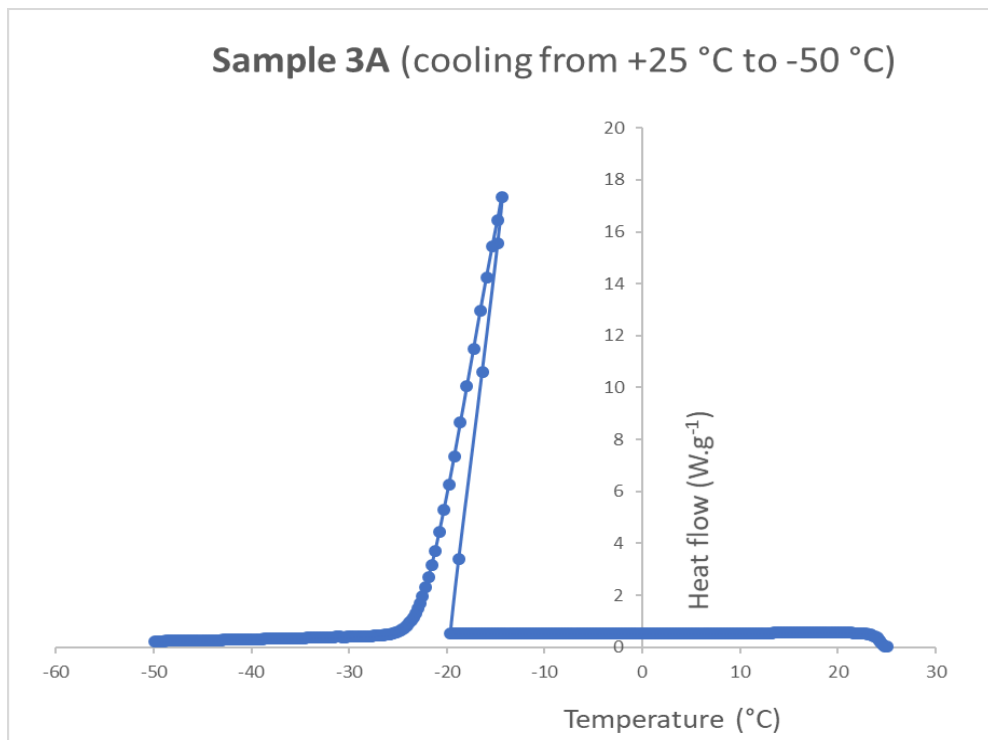
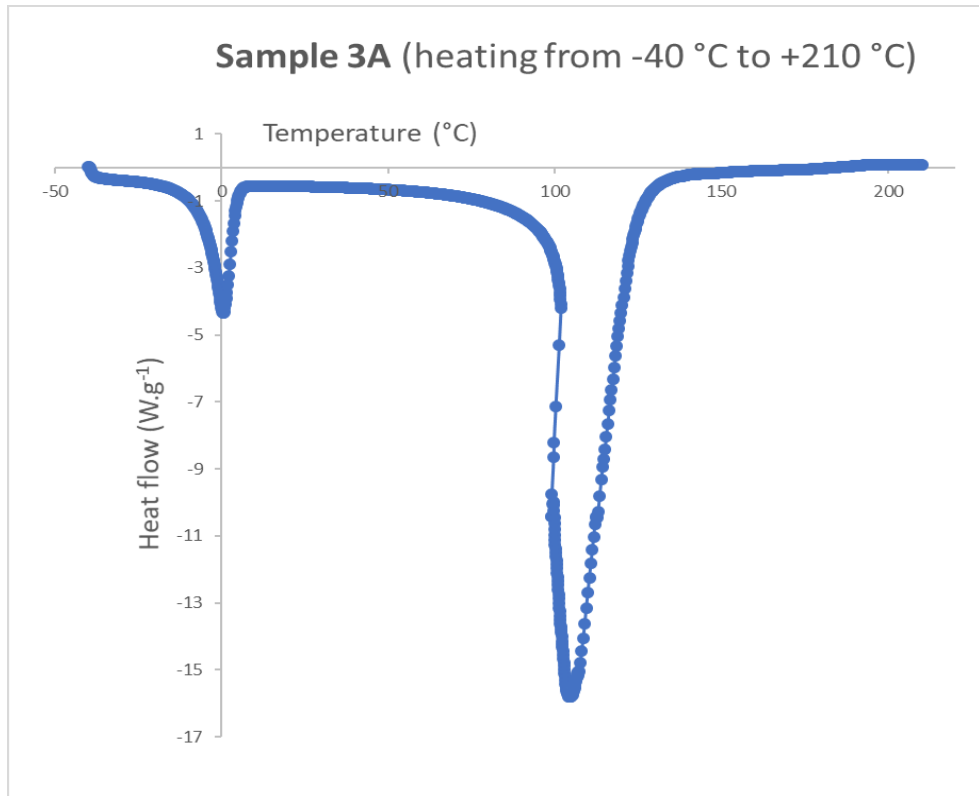
60°C	vzorek 1				vzorek 2				vzorek 3				
	rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.		
	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	
RPM													
0,6													
1	4,2	4,2	4,8	4,8					7,80	7,8	4,8	4,8	
1,5	4,8	3,2	7,8	5,2	1,2	0,8	4,2	2,8	11,40	7,6	7,8	5,2	
2	6	3	9,6	4,8	2,4	1,2	4,8	2,4	8,40	4,2	9	4,5	
2,5	6	2,4	10,2	4,08	3,6	1,44	4,8	1,92	7,80	3,12	9,6	3,84	
3	6	2	10,8	3,6	7,2	2,4	5,4	1,8	8,40	2,8	10,2	3,4	
4	6,6	1,68	12,6	3,15	7,8	1,95	6,6	1,65	9,60	2,4	12	3	
5	8,4	1,65	13,8	2,76	9,6	1,92	9	1,8	11,40	2,28	11,4	2,28	
6	9	1,5	14,4	2,4	10,8	1,8	9,6	1,6	11,40	1,9	12,6	2,1	
10	14,4	1,44	19,8	1,98	15	1,5	13,8	1,38	16,20	1,62	18	1,8	
12	16,2	1,35	19,8	1,65	16,2	1,35	13,2	1,1	18,00	1,5	19,2	1,6	
20	18,6	0,93	23,4	1,17	21,6	1,05	17,4	0,87	22,80	1,14	21	1,05	
30	22,8	0,76	28,8	0,96	22,8	0,76	21	0,7	27,60	0,92	25,2	0,84	
50	30	0,6	33	0,66	27	0,528	25,2	0,504	34,80	0,696	30	0,6	
60	34,2	0,57	37,8	0,63	29,4	0,49	32,4	0,54	38,40	0,63	36	0,6	
100	45,6	0,456	42,6	0,426	39,6	0,396	45	0,45	51,60	0,516	45	0,45	
200	66	0,33	66	0,33	60	0,3	60	0,3	67,80	0,339	67,8	0,339	

60°C	vzorek 4				vzorek 5			
	rostoucí ot.		klesající ot.		rostoucí ot.		klesající ot.	
	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]	τ [Pa]	η [Pa.s]
RPM								
0,6								
1	4,2	4,2	4,2	4,2	5,4	5,4	19,2	19,2
1,5	5,4	3,6	6	4	7,8	5,2	24,6	16,4
2	6	3	7,2	3,60	10,8	5,4	28,8	14,4
2,5	6	2,4	7,2	2,88	12,6	5,04	29,4	11,76
3	5,4	1,8	7,8	2,6	13,8	4,6	31,2	10,4
4	6,6	1,65	9	2,25	15	3,75	33,6	8,55
5	7,2	1,44	9,6	1,92	16,8	3,36	37,2	7,44
6	7,2	1,2	10,8	1,8	18	3	34,2	5,7
10	11,4	1,14	14,4	1,44	23,4	2,34	40,8	4,08
12	13,2	1,1	15,6	1,3	25,2	2,1	43,2	3,6
20	16,8	0,84	17,4	0,87	30,6	1,53	48,6	2,43
30	21,6	0,72	21	0,7	39	1,3	54	1,8
50	27	0,54	24	0,48	48	0,96	60	1,2
60	33	0,55	26,4	0,44	54,6	0,91	64,8	1,08
100	39	0,39	36,6	0,366	63,6	0,636	69	0,69
200	54	0,27	54	0,27	90	0,45	90	0,45

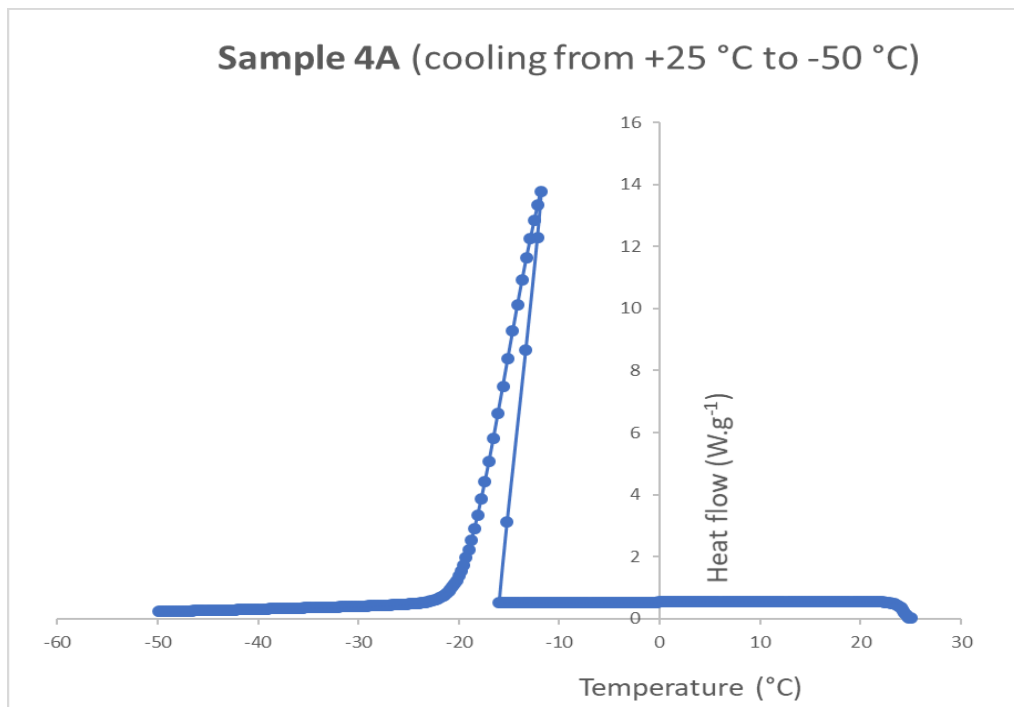
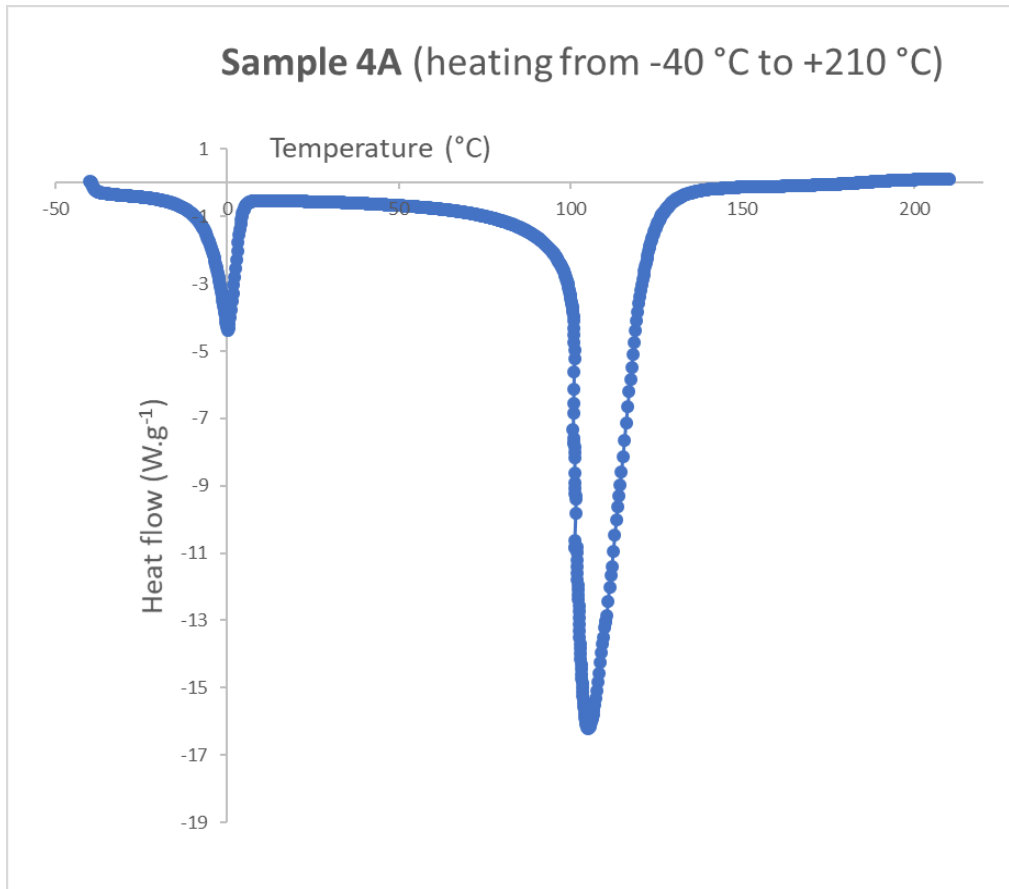
P IV Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové vzorku 2A



P V Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové vzorku 3A



P VI Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové vzorku 4A



P VII Termogram zapouzdřené kyseliny askorbové vzorku 5A

