

Hydrofilní vitamíny a jejich enkapsulace

Aneta Vyvadilová

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Aneta Vyvadilová
Osobní číslo: T21156
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace: Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Hydrofilní vitamíny a jejich enkapsulace

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

V teoretické části zpracujte rešerši věnovanou ve vodě rozpustným vitamínům, jejich klasifikaci, významu pro lidský organismus a důsledkům způsobeným jejich nadbytkem či nedostatkem.

II. Praktická část:

V praktické části připravte nosiče s inkorporovanými vybranými hydrofilními vitamíny a pomocí dostupných metod charakterizujte jejich fyzikálně-chemické vlastnosti.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Zempleni, J., Suttie, J. W. a kol. *Handbook of Vitamins*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group 2007. ISBN 0-8493-4022-5.
- [2] Coelho, S. C., Estevinho, B. N., Rocha, F. Recent advances in water-soluble vitamins delivery systems prepared by mechanical process (Electrospinning and spray-drying techniques) for food and nutraceuticals applications-a review. *Foods* 2022, 11, 1271. doi: 10.1007/s11947-021-02586-2.
- [3] Ali, A. Iqbal, S. a kol. Anti-pollution cosmetic-based one-step formation of w/o/w multiple emulsion containing D-biotin for skin protection: fabrication and in vitro and in vivo evaluation. *Drug Delivery and Translational Research* 2019, 9, 1117-1132. doi: 10.1007/s13346-019-00655-w.
- [4] Saffarionpour, S., Diosady, L. L. Multiple emulsions for enhanced delivery of vitamins and iron micronutrients and their application for food fortification. *Food and Bioprocess Technology* 2021, 14, 587-625. doi: 10.1007/s11947-021-02586-2.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Jana Sedlářiková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem 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.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky: Aneta Vyvadilová

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce je zaměřena na možnosti enkapsulace hydrofilních vitamínů, konkrétně vitamínu C a B7, známého pod pojmem biotin. V teoretické části jsou vitamíny klasifikovány, s důrazem na význam pro lidský organismus a důsledky způsobené jejich nedostatkem či nadbytkem. V praktické části byly připraveny nosiče na bázi chitosanu s enkapsulovanými hydrofilními vitamíny, jak ve formě roztoků, tak inkorporované do matrice biopolymerního filmu, u nichž byly následně charakterizovány jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, antioxidační aktivita a podmínky uvolňování do prostředí.

Klíčová slova: antioxidační aktivita, B7, biotin, chitosan, enkapsulace, hydrofilní, uvolňování, vitamín C

ABSTRACT

This bachelor's thesis was focused on the encapsulation options of hydrophilic vitamins, specifically on vitamin C and B7, known as biotin. In the theoretical part, the water-soluble vitamins are classified with an emphasis on their importance for the human organism and the consequences caused by their deficiency or excess. The practical part is devoted to the preparation of chitosan-based carriers with encapsulated water-soluble vitamins in the form of solutions and also incorporated into the biopolymer film matrix. This part also describes physical-chemical properties of prepared carriers, antioxidant activity and conditions of release into the environment.

Keywords: antioxidant, B7, biotin, chitosan, encapsulation, hydrophilic, release, vitamin C

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Janě Sedlaříkové, Ph.D. za cenné rady, trpělivost, odborný dohled, vedení a pomoc při zpracování bakalářské práce. Zároveň patří velké poděkování paním laborantkám z Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky za pomoc a odbornou asistenci v laboratořích. Ráda bych zde poděkovala i své rodině a blízkým přátelům, kteří mi byli po celou dobu studia velkou oporou a podporovali mě při mé práci.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VITAMÍNY OBECNĚ	12
1.1 HISTORIE VITAMÍNŮ	12
1.2 ROZDĚLENÍ VITAMÍNŮ	13
1.2.1 Hydrofilní vitamíny	13
1.2.2 Lipofilní vitamíny	13
2 CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH VITAMÍNŮ	14
2.1 VITAMÍN C (Kyselina askorbová)	14
2.1.1 Historie	14
2.1.2 Názvosloví a struktura	14
2.1.3 Přírodní zdroje	15
2.1.4 Avitaminóza	16
2.1.5 Hypervitaminóza	16
2.2 VITAMÍN B1 (TIAMIN)	16
2.2.1 Historie	16
2.2.2 Názvosloví a struktura	17
2.2.3 Přírodní zdroje	17
2.2.4 Avitaminóza	18
2.2.5 Hypervitaminóza	18
2.3 VITAMÍN B2 (RIBOFLAVIN)	18
2.3.1 Historie	18
2.3.2 Názvosloví a struktura	18
2.3.3 Přírodní zdroje	19
2.3.4 Avitaminóza	20
2.3.5 Hypervitaminóza	20
2.4 VITAMÍN B3 (NIACIN)	20
2.4.1 Historie	20
2.4.2 Názvosloví a struktura	21
2.4.3 Přírodní zdroje	21
2.4.4 Avitaminóza	21
2.4.5 Hypervitaminóza	22
2.5 VITAMÍN B5 (Kyselina pantoténová)	22
2.5.1 Historie	22
2.5.2 Názvosloví a struktura	23
2.5.3 Přírodní zdroje	23
2.5.4 Avitaminóza	24
2.5.5 Hypervitaminóza	24
2.6 VITAMÍN B6 (PYRIDOXIN)	24
2.6.1 Historie	24

2.6.2	Názvosloví a struktura	24
2.6.3	Přírodní zdroje.....	25
2.6.4	Avitaminóza	25
2.6.5	Hypervitaminóza	25
2.7	VITAMÍN B7 (BIOTIN; VITAMÍN H).....	25
2.7.1	Historie.....	25
2.7.2	Názvosloví a struktura	25
2.7.3	Přírodní zdroje.....	26
2.7.4	Avitaminóza	26
2.7.5	Hypervitaminóza	26
2.8	VITAMÍN B9 (Kyselina listová).....	26
2.8.1	Historie.....	26
2.8.2	Názvosloví a struktura	27
2.8.3	Přírodní zdroje.....	27
2.8.4	Avitaminóza	27
2.8.5	Hypervitaminóza	28
2.9	VITAMÍN B12 (Kobalamin).....	28
2.9.1	Historie.....	28
2.9.2	Názvosloví a struktura	28
2.9.3	Přírodní zdroje.....	29
2.9.4	Avitaminóza	29
2.9.5	Hypervitaminóza	29
3	ENKAPSULACE VITAMÍNŮ	30
3.1	PROCES ENKAPSULACE	30
3.2	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY ENKAPSULACE HYDROFILNÍCH VITAMÍNŮ DO POLYMERNÍCH NOSIČŮ.....	31
II	PRAKTICKÁ ČÁST.....	35
4	CÍLE PRÁCE.....	36
5	MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ.....	37
5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	37
5.2	POUŽITÉ ZAŘÍZENÍ.....	37
6	METODIKA.....	38
6.1	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	38
6.1.1	Příprava zásobního roztoku chitosanu	38
6.1.2	Příprava roztoků vitamínů C a B7	38
6.1.3	Příprava roztoku sodium tripolyfosfátu	38
6.2	PŘÍPRAVA ČÁSTIC.....	38
6.3	MĚŘENÍ PH	39
6.4	MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC A ZETA POTENCIÁLU.....	39
6.5	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY.....	40
6.6	PŘÍPRAVA FILMŮ	40

6.7	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY FILMŮ	41
6.8	TEST UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍ LÁTKY	41
6.8.1	Stanovení kalibrační přímky	41
6.8.2	Test uvolňování	41
6.9	STANOVENÍ VLHKOSTI FILMŮ.....	42
6.10	STANOVENÍ PROPUSTNOSTI FILMŮ PRO VODNÍ PÁRY	43
6.11	STANOVENÍ ROZPUSTNOSTI FILMŮ VE VODĚ	44
6.12	TAHOVÉ ZKOUŠKY	45
6.13	MĚŘENÍ SMÁČIVOSTI FILMŮ.....	45
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
7.1	CHARAKTERISTIKA ČÁSTIC	46
7.1.1	Měření velikosti částic a zeta potenciál	46
7.1.2	Antioxidační aktivita částic.....	49
7.2	CHARAKTERISTIKA FILMŮ	50
7.2.1	Antioxidační aktivita filmů	50
7.2.2	Test uvolňování aktivních látek	51
7.2.3	Vlhkost, rozpustnost a propustnost filmů	54
7.2.4	Tahové zkoušky.....	55
7.2.5	Měření kontaktního úhlu.....	59
	ZÁVĚR	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	70
	SEZNAM OBRÁZKŮ	71
	SEZNAM TABULEK	73

ÚVOD

Vitamíny patří mezi základní organické mikronutrienty s bioaktivními vlastnostmi, které jsou nezbytné pro zachování normálních funkcí lidského organismu. Vitamíny se do našeho těla dostávají prostřednictvím přijímané výživy, dále například ve formě různých tablet či léků, ale mnohé z nich se dnes vyskytují i v různých pleťových sérech, či jiných kosmetických přípravcích. Je známo, že tyto látky vykazují horší stabilitu a mohou snadno podléhat degradaci. Z toho důvodu jsou v posledních letech hledány různé možnosti, jak tyto nevýhody překonat a zajistit tak co největší profit vitamínů pro lidský organismus.

Předložená práce se zaměřuje na možnosti enkapsulace hydrofilních vitamínů, konkrétně vitamínů C a B7 do chitosanových nosičů, ze kterých by se následně mohly uvolňovat cíleně na určené místo a našly by uplatnění právě ve zmiňované kosmetice či ve farmacii a biomedicíně. V teoretické části bakalářské práce byly klasifikovány a charakterizovány jednotlivé skupiny ve vodě rozpustných vitamínů. Zároveň byly zmíněny důsledky, které má na lidský organismus jejich nedostatek či nadbytek. Závěr teoretické části se věnuje potenciálním metodám enkapsulace do různých typů nosných systémů, například na bázi polymerů, amfifilních molekul či lipidů. Důraz byl, s ohledem na experimentální část práce, kladen na aktuální studie využívající biopolymer chitosan.

Praktická část práce se soustředila na přípravu nosičů na bázi chitosanu s enkapsulovanými hydrofilními vitamíny C a B7, které byly ve formě částic, případně byly využity pro inkorporaci do matrice chitosanového filmu. U částic byla následně hodnocena fyzikální stabilita a antioxidační aktivita. U vzorků ve formě filmů byla stanovena smáčivost, vlhkost, rozpustnost a propustnost pro vodní páry, což jsou parametry klíčové pro praktické aplikace. V neposlední řadě byly sledovány podmínky uvolňování vitamínů do modelového prostředí fosfátového pufru.

Lze předpokládat, že připravené systémy s hydrofilními vitamíny by mohly nalézt uplatnění v systémech řízeného uvolňování, aplikovatelných jak v kosmetických přípravcích pro péči o pleť, či vlasy, tak v oblasti biomedicíny, například pro výrobu materiálů na krytí ran.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMÍNY OBECNĚ

Vitamíny jsou nízkomolekulární organické látky, potřebné pro správné fungování našeho organismu. Tvoří nepostradatelnou, tzv. esenciální část naší výživy. Jsou tím pádem součástí živin, které naše tělo potřebuje pro správný chod organismu, ačkoliv však nejsou zdrojem energie. Jsou ovšem velice důležitou složkou energetické látkové výměny lidského těla. Naše tělo si vitamíny neumí samo syntetizovat, a právě z tohoto důvodu je nutné, vitamíny přijímat ve stravě. Výjimkou je vitamín D3, který si naše tělo umí vytvářet samo, a to konkrétně z UV záření vyzařujícího ze slunce. V naší kůži se totiž nachází 7-dehydrocholesterol, který se právě UV zářením mění na cholekalciferol, což je pouze jiné pojmenování pro vitamín D3. Cholekalciferol se následně postupně hydroxyluje v játrech a v ledvinách na kalcidiol [1, 2, 3, 4].

Pokud má naše tělo vitamínů nedostatek, hovoříme o takzvané avitaminóze. V opačném případě, jestliže má náš organismus vitamínů nadbytek, mluvíme o hypervitaminóze. S hypervitaminózou si naše tělo umí chytře poradit a to tak, že přebytek vitamínu je schopné vyloučit spolu s močí. V této době se v běžném vyváženém jídelníčku vyskytuje vitamínů dostatek, a proto se již avitaminózy či hypervitaminózy běžně nevyskytují. V některých případech je ale nutné příjem vitamínů zvýšit. Například pokud náš organismus trpí nějakým onemocněním, v dětství, při těhotenství, či při kojení. V těchto případech bychom se měli snažit hladinu vitamínů v našem těle zvýšit, aby náš organismus mohl zase správně fungovat [1, 2, 3].

1.1 Historie vitamínů

Již od pradávných dob se lidstvo potýkalo s nemocemi jako například beri-beri nebo skorbut, k jejichž léčení byly využívány látky vyvinuté na základě nejrůznějších pozorování či pokusů. Vědcem, který zkoumal a v konečném důsledku jako první shrnul příčiny těchto nemocí, byl polský chemik Casimir Funk. Roku 1912 dal látkám název „vitamíny“. Toto pojmenování vychází z latinského slova „vita“, čímž mělo být zdůrazněno, jak moc jsou tyto sloučeniny důležité pro lidský život. Casimir Funk také vyslovil svůj názor (hypotézu) o vitamínech: „*Nemoci typu beri-beri a skorbutu nemají svůj původ v infekci nebo intoxikaci, nýbrž v nedostatku určitých neznámých látek ve výživě, které jsou nezbytné pro život a působí již v nesmírně malých koncentracích*“. [1, str. 9] Funk také stojí za pojmem „avitaminóza“. Toto pojmenování dodnes shrnuje celou řadu syndromů, které jsou důsledkem nedostatku vitamínů v stravě. Za objevem a důkladnějším zkoumáním vitamínů ale nestojí pouze jediný

člověk. Zásahu zde má celá řada dalších velice důležitých osobností. Jelikož vitamíny jsou organické látky, které se v přírodě vyskytují pouze v malých koncentracích, bylo pro vědce v dřívějších dobách poměrně náročné tyto minoritní přírodní látky analyzovat a zkoumat. Bylo tomu tak z důvodu, protože obor analytické chemie v té době nebyl ještě zcela vyvinutý a tehdejší techniky ke studiu tak malých koncentrací zatím ještě nestačily. Prvním izolovaným vitamínem byl vitamín B1, kterému se jinak říká tiamin. Byl izolován v čisté krystalické formě roku 1926 nizozemskými chemiky Jansen a Donath z rýžových slupek [1].

1.2 Rozdělení vitamínů

Vitamíny lze rozdělit do dvou skupin, a to na základě jejich rozpustnosti, na vitamíny hydrofilní, a vitamíny lipofilní (Tabulka 1).

Tabulka 1 Rozdělení vitamínů

Hydrofilní vitamíny	Lipofilní vitamíny
C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12	A, D, E, K

1.2.1 Hydrofilní vitamíny

Hydrofilní vitamíny jsou ve vodě rozpustné. Právě z tohoto důvodu se vyskytují například v buněčných tekutinách. Můžeme zde zahrnout vitamín C (kyselina askorbová) a vitamíny skupiny B. Do skupiny vitamínu B řadíme vitamín B1 (tiamin), vitamín B2 (riboflavin), vitamín B3 (niacin), vitamín B5 (kyselina pantothenová), vitamín B6 (pyridoxin), B7 (biotin), B9 (kyselina listová) a vitamín B12 (kobalamin). Jedná se o látky, které ve vyšším množství v organismu nesetrvávají, tudíž je nutné zajistit jejich každodenní příjem v našem jídelníčku [2, 3].

1.2.2 Lipofilní vitamíny

Lipofilní neboli hydrofobní vitamíny jsou sloučeniny, které jsou rozpustné v tucích. Proto se v našem těle nachází především v buněčných membránách, jejichž stavebním prvkem jsou právě tuky. Řadíme sem vitamín A, vitamín D, vitamín E a vitamín K. Na rozdíl od hydrofilních vitamínů se lipofilní vitamíny v organismu ukládají, čímž může v některých případech dojít k vyvolání nežádoucích účinků [2, 3].

2 CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH VITAMÍNŮ

V této kapitole budou klasifikovány a charakterizovány konkrétní ve vodě rozpustné vitamíny, které jsou hlavním tématem předložené bakalářské práce.

2.1 Vitamín C (kyselina askorbová)

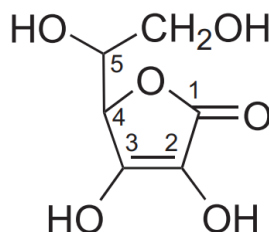
Vitamín C, též známý jako kyselina askorbová, je jedním z nejznámějších a nejdůležitějších vitamínů, které náš organismus potřebuje pro zajištění správného fungování.

2.1.1 Historie

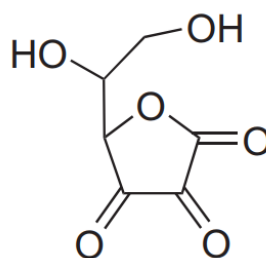
Vitamín C získal své jméno, díky účinkům při léčbě a prevenci nemoci zvané kurděje. Název kurděje pochází z anglického termínu „scurvy“ nebo ze skandinávského slova „skjoerberg“, resp. „skorbjugg“. Jedná se o onemocnění způsobené právě dlouhodobým nedostatkem vitamínu C ve stravě. Kurděje se vyskytovaly v různých zemích převážně v období 17. až 19. století, což bylo způsobeno důsledkem nedostatečného příjmu ovoce a zeleniny v té době. Touto nemocí trpěli zejména námořníci v období, které bylo pojmenováno jako „Age of sail“. Problém kurdějí vyřešil až přídavek limetkového džusu do potravinových přídelů námořníků, jelikož právě citrusy jsou bohatým zdrojem vitamínu C [5, 6].

2.1.2 Názvosloví a struktura

Z chemického hlediska se jedná 2,3-didehydro-1-threohexano-1,4-lacton, což je téměř planární pětičlenný kruh s 2 chirálními centry, obsahující 4 stereoizomery (Obrázek 1). Kyselina askorbová může mít i oxidovanou formu, tzv. l-dehydroaskorbovou nebo dehydroaskorbovou kyselinu (Obrázek 2) [5, 6].



Obrázek 1 Chemická struktura kyseliny askorbové [6]



Obrázek 2 Chemická struktura kyseliny dehydroaskorbové [6]

2.1.3 Přírodní zdroje

Kyselina askorbová se přirozeně vyskytuje v různém ovoci a zelenině. Hojně je obsažena například v citrusech, jako je citrón, pomeranč nebo již zmiňovaná limetka, ale také v kiwi, šípčích, černém a červeném rybízu. Poměrně velké množství lze také nalézt například v růžičkové kapustě, květáku, brokolici nebo ve špenátu. Kyselina askorbová může být získána i z živočišných zdrojů, jako jsou zvířecí játra, ledviny nebo také mozek. V Tabulkách 2 a 3 lze vidět zastoupení vitamínu C ve vybraném ovoci a zelenině [5, 6].

Tabulka 2 Množství vitamínu C ve vybraném ovoci [5]

Zdroj	Množství vitamínu C [mg/100 g]
kiwi	80 – 90
citrón	40 – 50
šípek	250 – 800
černý rybíz	150 – 200
červený rybíz	20 – 50
ananas	15 – 25
grapefruit	30 – 70
jahody	40 – 70
pomeranč	30 – 50
třešně	15 – 30

Tabulka 3 Množství vitamínu C ve vybrané zelenině [5]

Zdroj	Množství vitamínu C [mg/100 g]
růžičková kapusta	100 – 120
květák	50 – 70
brokolice	80 – 90
špenát	35 – 40
pažitka	40 – 50
zelí	30 – 70
dýně	15
ředkev	25
chřest	15 – 30
lilek	15 – 25

2.1.4 Avitaminóza

Nedostatek vitamínu C se projevuje již dříve zmíněnou nemocí zvanou kurděje, která propuká při výrazném poklesu hladiny vitamínu C pod 300 mg. Toto onemocnění se projevuje drobnými krvácivými ránami, které se špatně hojí. Dalším viditelným projevem tohoto onemocnění může být poškození dásní nebo také zubního lůžka. V dnešní době není tato nemoc již častá, jelikož naše generace přijímá vitamínu C oproti dřívějším dobám dostatek. Tento fakt ale nic nemění na tom, že i tak, je převelice důležité dbát na dostatečný příjem vitamínu C ve stravě či doplňcích stravy, a to zejména v období nachlazení či infekčních onemocnění, dále pak při rekonvalescenci nebo v těhotenství [1, 2].

2.1.5 Hypervitaminóza

Nadbytek vitamínu C může při dlouhodobém užívání zvýšit riziko vzniku urolitiázy neboli močových kamenů, které se mohou tvořit v ledvinách nebo v močovém měchýři [2].

2.2 Vitamín B1 (tiamin)

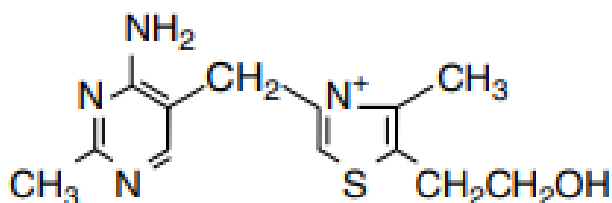
2.2.1 Historie

Vitamín B1, neboli tiamin, byl objeven díky jeho účinkům při léčbě nemoci zvané beri-beri, která je způsobena jeho nedostatkem. Tato nemoc byla velice běžná v 19. století v oblastech Dálného východu závislých na rýži, kterou předci před konzumací zbavovali slupky za pomoci parních mlýnků. Je známo, že právě slupka je nejbohatší na vitamín B1.

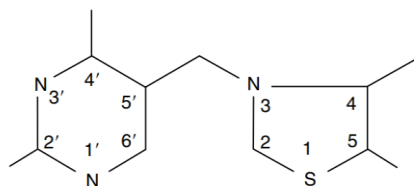
V dřívějších dobách, převážně ve Spojeném království, se vitamínu B1 říkalo aneurin. Důvodem byl fakt, že vitamín má antiuretické vlastnosti, což znamená, že snižuje objem vyloučené moči. Dnes se vitamínu říká vitamín B1, někdy též tiamin [5].

2.2.2 Názvosloví a struktura

Chemický název tiaminu je 3-(4'-amino-2'-methyl-pyrimidin-5'-ylmethyl)-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chlorid hydrochlorid. Struktura tiaminu se skládá ze 2 spojených cyklických derivátů uhlovodíků, a to konkrétně z pyrimidinu a thiazolu. Na 5. uhlíku thiazolu je navázaný hydroxyethylový uhlíkatý řetězec, který se fosforyluje v buňce (Obrázek 3 a Obrázek 4) [5].



Obrázek 3 Chemická struktura tiamin [5]



Obrázek 4 Číslování uhlíků struktury tiaminu [5]

2.2.3 Přírodní zdroje

Přírodním zdrojem tiaminu jsou především různé pšeničné klíčky, otruby, kukuřičné a ovesné vločky. Dále to může být například vepřové maso nebo různé luštěniny. Tiamin se vyskytuje ale i ve vejcích, a to konkrétně především ve žloutku, zatímco v bílku je koncentrace tohoto vitamínu minimální. Dalším významným zdrojem tiaminu jsou různá semínka a ořechy, jako například arašidy. U těchto plodů je ovšem známo, že tepelnou úpravou ztrácí velké množství tiaminu, který se vařením z ořechů uvolňuje a ničí. Tiamin je také obsažen, jak již bylo zmíněno, ve slupkách rýže. Mechanickým odstraňováním slupek, mletím, je obsah tiaminu výrazně snížen, a to konkrétně na množství 0,02 mg/100 g vařené rýže. Pokud se ale zrnka rýže před loupáním slupek předvaří, vitamíny mohou difundovat

do endospermu, čímž se sníží ztráty velkého množství tiaminu při frézování rýže, při kterém dochází k lámání rýžových zrn [5].

2.2.4 Avitaminóza

Pokud v našem jídelníčku nebude dostatečné množství tiaminu, může se lidský organismus potýkat s problémy kardiovaskulárního aparátu. Což může být doprovázeno například otokem nebo pocitem svírajícího se hrudníku. Dalším problémem mohou být neurologické potíže, jako třeba poruchy koordinace, psychické problémy nebo svalová bolest a slabost [1].

2.2.5 Hypervitaminóza

Při nadměrném příjmu tiaminu může dojít k žaludečním potížím, nepříjemnému pocení či bolestem hlavy [1].

2.3 Vitamín B2 (riboflavin)

2.3.1 Historie

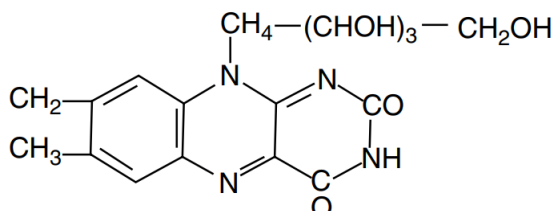
O výzkum vitamínu B2, tzv. riboflavinu, se zasloužili americký biochemik McCollum a americký chemik Kennedy, kteří zkoumali právě účinnost této sloučeniny proti tzv. pelagře, tj. onemocnění, způsobené nedostatkem riboflavinu. Během následujících výzkumů byly odhaleny tepelně stabilní a tepelně labilní frakce. V tepelně stabilní frakci byl nalezen fluoreskující žlutý růstový faktor, který byl následně pojmenován riboflavin, jehož fyziologickou funkci následně popsal německý lékař a biochemik Warburg a Christian. Tato frakce obsahovala ale i řadu dalších velmi důležitých živin, jako například vitamín B3 nebo vitamín B6 [5].

První syntézu riboflavinu provedl německý chemik Kuhn a švýcarský chemik Karrer. Syntéza flavin-mononukleotidu z riboflavinu, konkrétně z riboflavin-5'-fosfátu byla zkoumána švédským biochemikem Theorellem. Z flavin-mononukleotidu byl následně syntetizován flavin-adenin-dinukleotid německým lékařem a biochemikem Warburgem a Christianem [5].

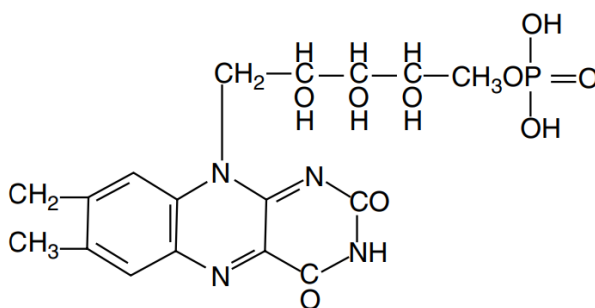
2.3.2 Názvosloví a struktura

Chemický název riboflavinu je 6,7-dimetyl-9-(D-1'-ribityl)izoalloxazin (Obrázek 5). Jedná se o žlutě zbarvenou látku, při jejíž analýze je možné využít významné fluorescenční

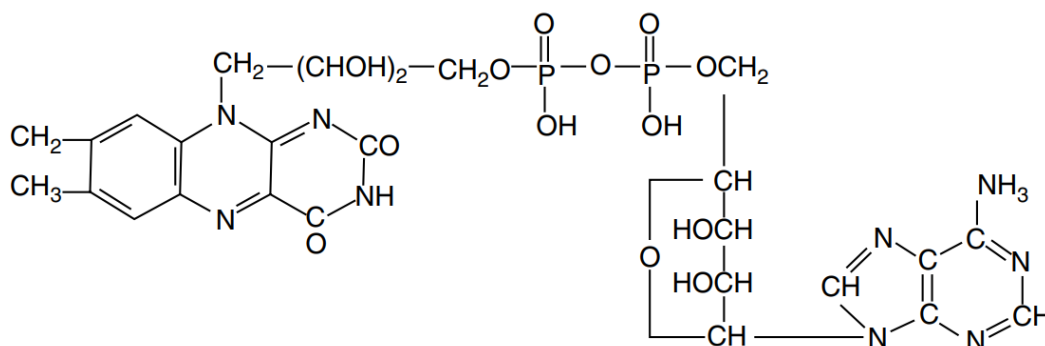
vlastnosti projevující se při vybuzení UV zářením. Riboflavin vykazuje významné fyziologické funkce a existuje jako koenzym ve dvou formách. Prvním z nich je flavin-mononukleotid, někdy označovaný jako FMN (Obrázek 6). Druhým typem je flavin-adenin-dinukleotid, označovaný jako FAD (Obrázek 7) [1, 5].



Obrázek 5 Chemická struktura riboflavinu [5]



Obrázek 6 Chemická struktura flavin-mononukleotidu (FMN) [5]



Obrázek 7 Chemická struktura flavin-adenin-dinukleotidu (FAD) [5]

2.3.3 Přírodní zdroje

Riboflavin je obsažen například v mléce, rybách, drůbeži, vejcích, sýrech, ale nalezneme jej také v zelenině, jako například v brokolici. Problémem při zpracování těchto potravin, může být vystavení UV záření, v jehož důsledku dochází ke ztrátě vitamínu riboflavin. To může být problém například při skladování mléka, které proto není příliš vhodné uchovávat a dodávat v průhledných obalech. Produkt je tedy třeba chránit před světlem, aby bylo

zamezeno nežádoucímú úbytku množství riboflavinu a zhoršení chuťových vlastností samotného mléka. Zajímavostí ohledně zdrojů riboflavinu je to, že některé střevní bakterie v lidském organismu jsou schopny riboflavin syntetizovat, avšak není dokázáno, že se tato forma vitamínu B2 umí v našem těle absorbovat [1, 5].

2.3.4 Avitaminóza

Nedostatečný příjem vitamínu B2 u nás v Evropě není příliš běžný. Objevuje se ale například v zemích třetího světa, jako jsou oblasti Afriky, Jižní Ameriky nebo Asie. Jedním z pozorovatelných projevů, značících nedostatek tohoto vitamínu, jsou problémy vyskytující se v oblasti očí, jako například ztluštění víček, zánět rohovky nebo prorůstání cév k rohovce. Problémy lze pozorovat i v oblastech úst, kde dochází k zánětlivým stavům sliznice dutiny ústní. Na kůži se v důsledku nedostatku vitamínu B2 může objevit akné, dermatitida či seborea. Možný je také zpomalený vývoj myšlení či snížení duševní síly [1].

2.3.5 Hypervitaminóza

V případě nadměrného přísunu vitamínu B2 doposud nebyly pozorovány žádné negativní důsledky pro lidské zdraví [7].

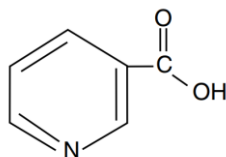
2.4 Vitamín B3 (niacin)

2.4.1 Historie

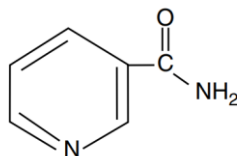
Za objevem niacinu stojí nemoc zvaná pelagra, která se objevuje právě v důsledku nedostačeného množství této látky v přijímané potravě. Poprvé byla popsána roku 1735 španělským lékařem Casalem. Jedním z možných projevů nemoci je vyrážka kolem krku, což je důvod proč se jí dříve přezdívalo „Casalův náhrdelník“. Casal nemoc pojmenoval španělským výrazem „Mal de la Rosa“, který lze přeložit do českého jazyka jako „nemoc růže“. S postupem času došlo k rozšíření tohoto onemocnění do zemí Egypta, Jižní Afriky, Indie a Spojených států. Významným faktorem, který stojí za rozšířením pelagry i do ostatních zemí světa, byla zvýšená produkce kukuřice, která se stala jednou z hlavních surovin každodenního jídelníčku místních obyvatel. Ovšem jelikož kukuřice není zdrojem využitelné formy vitamínu B3, zejména chudší lidé začali trpět jeho nedostatkem. Vliv nedostatečného množství niacinu na rozvoj onemocnění pelagra byl prokázán v roce 1937 [2, 5].

2.4.2 Názvosloví a struktura

Niacin, vitamín B3, se také někdy objevuje pod názvem kyselina nikotinová. Z chemického hlediska se jedná o 3-pyridinkarboxylovou kyselinu (Obrázek 8). Zajímavý je jeho amid, nikotinamid, chemicky 3-pyridinkarboxamid (Obrázek 9), který je důležitou součástí velmi podstatných koenzymů nikotinamidadenindinukleotidu (zkratkou NAD) a nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (zkratkou NADP) [3, 5].



Obrázek 8 Chemická struktura niacinu [5]



Obrázek 9 Chemická struktura nikotinamidu [5]

2.4.3 Přírodní zdroje

Nejvýznamnějším zdrojem jsou kvasnice, s obsahem niacinu 12,3 mg/100 g, dále hovězí, kuřecí, vepřové nebo krůtí maso (obsah až 9,6 mg/100 g). Nalezneme jej také v rybách, například v tuňákově, který obsahuje 10,1 až 10,5 mg/100 g niacinu. V menším množství se vyskytuje i v ovoci a zelenině. Jako příklad lze uvést chřest (1,08 mg/100 g) nebo brambory (1,4 mg/100 g). Z ovoce můžeme zmínit například jablka (0,9 mg/100 g) nebo banány (0,7 mg/100 g) [6].

2.4.4 Avitaminóza

Nedostatek příjmu vitamínu niacinu způsobuje již zmíněnou nemoc zvanou pelagra, které se někdy přezdívá nemoc tří D, jelikož ji doprovází charakteristické příznaky začínající na písmeno „d“, a to dermatitida, diarrhea a demence. Nejčastějším znakem, který lze při onemocnění pozorovat, jsou viditelné změny na kůži. Dochází ke změnám na částech pokožky, která je nejvíce vystavována slunečnímu záření nebo otěru, jako je krk, obličej a ruce. Jako důsledek se objevují zánětlivá onemocnění kůže, hyperpigmentace, kdy vznikají na pokožce tmavé skvrny, častá je také hyperkeratóza, což je ztlustění rohové vrstvy kůže.

Tento příznak lze vidět na Obrázku 10. Dále může dojít k poruše nervového systému, co má za následek deprese, úzkosti, bolesti hlavy a závratě. Problém může vyústit až do stádia demence. Další potíže jsou spojeny s poruchami trávicí soustavy, jelikož zmíněné onemocnění může být doprovázeno silnými průjmy, vedoucími k podvýživě a snížené imunoschopnosti jedince. Nyní se již pelagra vyskytuje spíše v zemích 3. světa, kde lidé nemají dostatek kvalitních potravin, které obsahují všechny potřebné živiny [1, 5, 6, 8].



Obrázek 10 Projev
onemocnění pelagra

[6]

2.4.5 Hypervitaminóza

Nadměrným příjmem niacinu může docházet k rozšíření cév, známému jako vazodilatace, která se projevuje zarudlými flíčky na kůži, zároveň pak pocitem svědění či brnění [6].

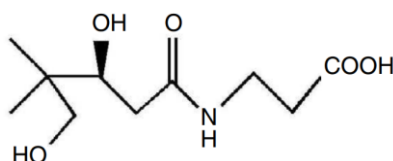
2.5 Vitamín B5 (kyselina pantotenová)

2.5.1 Historie

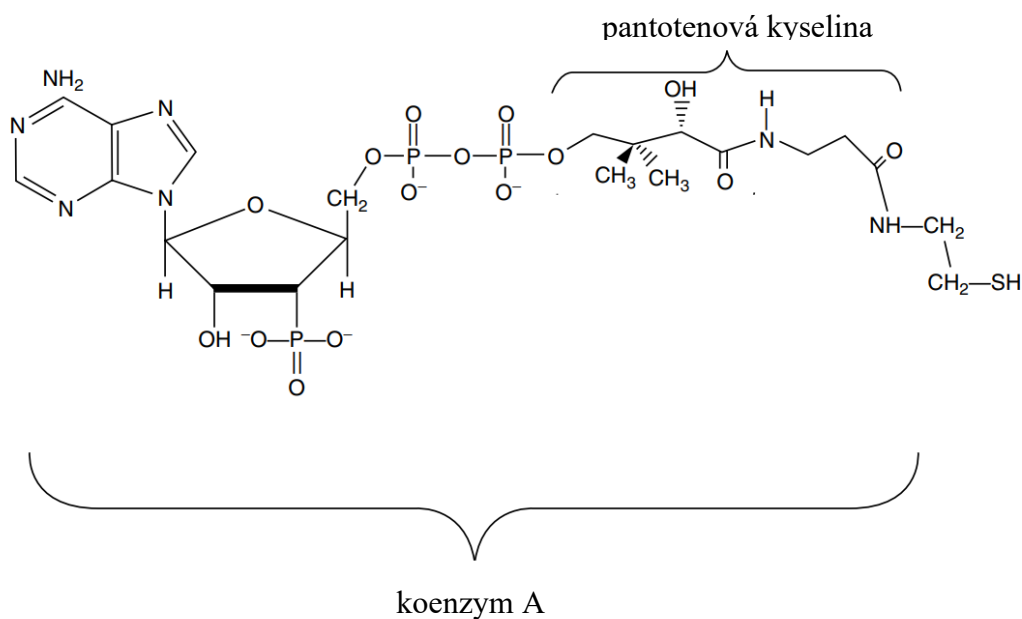
Výzkum kyseliny pantotenové sahá do začátku 20. století, kdy se vědci pokoušeli zjistit informace o faktoru, který podporoval růst některých mikroorganismů, především však kvasinek. Jedním z dalších pozitivních účinků tohoto faktoru bylo zjištění, že působí obrannou formou proti dermatitidě u kuřat. Tento faktor byl obsažen ve filtrátu jaterního extraktu a přezdívalo se mu Filtrate Factor. V roce 1939 byl úspěšně izolován a pojmenován jako kyselina pantotenová, někdy též vitamín B5 [1].

2.5.2 Názvosloví a struktura

Název kyseliny pantotenové byl odvozen z řeckého výrazu „pantos“, což lze do českého jazyka přeložit jako „všudypřítomný“. Důvodem je výskyt tohoto vitamínu téměř ve všech potravinách. Z chemického hlediska se jedná o D-(+)- α,γ -dihydroxy- β -dimetyl-butyryl- β' -alanin (Obrázek 11). Zajímavé je, že pokud by byl β' -alanin nahrazen jinou aminokyselinou, došlo by k deaktivaci molekuly. Pantotenová kyselina je významnou součástí koenzymu A (Obrázek 12), který má schopnost přenášet acylové skupiny [1, 5].



Obrázek 11 Chemická struktura kyseliny pantotenové [5]



Obrázek 12 Chemická struktura koenzymu A obsahující pantotenovou kyselinu [5]

2.5.3 Přírodní zdroje

Jak již bylo zmíněno, kyselina pantotenová se vyskytuje skoro ve všech potravinách, a to jak živočišného, tak rostlinného původu. Především se nachází ve vepřovém a hovězím mase, játrech, ledvinách, ale i ve vaječném žloutku, sýrech, kvasnicích, luštěninách nebo například v houbách. Ve vepřových játrech její koncentrace dosahuje až 5900 – 7300 $\mu\text{g}/100$ g. Oproti tomu například v sýrech, je její obsah podstatně nižší, a to 350 až 960 $\mu\text{g}/100$ g [1].

2.5.4 Avitaminóza

Nedostatek kyseliny pantotenové je z výše uvedeného důvodu ojedinělý, lze jej výjimečně sledovat u podvyživených jedinců, kteří trpí nedostatkem příjmu potravy. U těchto lidí byla pozorována slabost, únava, vyčerpání a silné bolesti spojené s pálením nohou (ozn. „syndrom pálení nohou“) [1].

2.5.5 Hypervitaminóza

Při nadměrných dávkách vitamínu zatím nebyly popsány žádné nepříznivé účinky na lidský organismus [1].

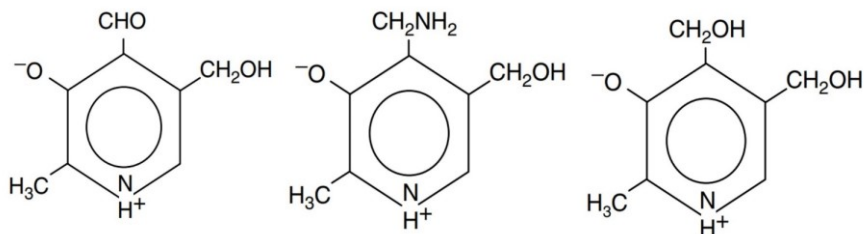
2.6 Vitamín B6 (pyridoxin)

2.6.1 Historie

Za objevem vitamínu B6 stojí maďarský lékař Paul György. V historii byl tento vitamín součástí léčiva Thalidomid, jehož účelem bylo snížit nevolnost u těhotných žen. Po několika letech se ovšem zjistilo, že léčivo má negativní účinky na plod matky, jelikož docházelo k samovolným potratům. U narozených dětí se objevovaly vrozené vady, novorozenci měli často deformované končetiny a potýkali se i s očními či srdečními problémy [9, 10].

2.6.2 Názvosloví a struktura

Vitamín B6 je z chemického hlediska 3-hydroxy-4,5-hydroxymethyl-2-methyl pyridin. Tato sloučenina byla nejdříve pojmenována jako pyridoxin, avšak později bylo zjištěno, že existují deriváty vitamínu B6, které se označují jako „pyridoxinová triáda“. Do této skupiny lze zařadit alkohol pyridoxin (PN), aldehyd pyridoxal (PL) a pyridoxamin (PM). Chemickou strukturu těchto látek můžeme vidět na Obrázku 13 [1, 2, 5, 6].



Obrázek 13 Chemická struktura látek: pyridoxal (vlevo), pyridoxamin (uprostřed), pyridoxin (vpravo) [5]

2.6.3 Přírodní zdroje

Vitamín B6 se hojně vyskytuje v kuřecím, hovězím, jehněčím a vepřovém mase. Velké množství vitamínu se nachází i v pšenici, která obsahuje 1,30 mg/100 g. Důležitým zdrojem jsou také různé oříšky, jako například mandle, pekanové nebo vlašské ořechy. Najdeme jej ale i v zelenině, jako třeba ve špenátu, bramborách, hrášku nebo v mrkvi [6].

2.6.4 Avitaminóza

Nedostatek vitamínu B6 v těle se projevuje neobvyklými změnami na kůži. K problémům dochází především v oblasti nosu a úst, kde se vyskytuje seboreická dermatitida. V oblasti úst se můžeme setkat s nepříjemnými záněty. Dalším důležitým ukazatelem avitaminózy je zesílení neuromuskulární dráždivosti, což může vést až ke vzniku křečí [1, 2, 3].

2.6.5 Hypervitaminóza

Při nadměrných dávkách vitamínu B6 dochází k poruchám sensorických receptorů, mezi něž lze zařadit například nerv čichový a zrakový [1].

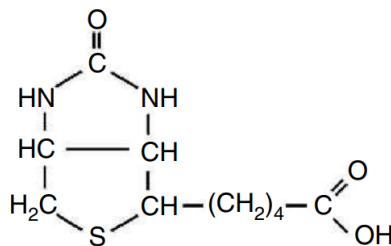
2.7 Vitamín B7 (biotin; vitamín H)

2.7.1 Historie

Výzkum biotinu souvisel především se studii sloučeniny avidinu, na kterou se biotin váže ve vaječném bílku. Tato sloučenina totiž způsobovala vážné dermatologické problémy v podobě seboreické dermatitidy provázené alopecií, tj. vypadáváním chlupů a vlasů. Poprvé byl biotin izolován v letech 1940 až 1942 [1, 5, 6].

2.7.2 Názvosloví a struktura

Vitamín B7, jinak známý jako biotin, či vitamín H, je také někdy označován „vitamín krásy“, jelikož podporuje zdravý vzhled vlasů a nehtů. Název biotin byl odvozen z řeckého pojmu „bios“, což v překladu znamená žít. Chemickým názvem je to (+)-cis-2-(4-karboxybutyl)-3,4-(2-oxo-3,4-imidazolidino)thiofan (Obrázek 14). Jedná se o sloučeninu, která má celkem 8 stereoizomerů, avšak pouze jeden z nich (d-biotin) vykazuje biologickou aktivitu [1, 6].



Obrázek 14 Chemická struktura biotinu [5]

2.7.3 Přírodní zdroje

Biotin se hojně vyskytuje v mateří kašičce, mléku, játrech, kvasnicích a ve vejcích, konkrétně ve vaječném žloutku. Biotin se zde může navázat na obsažené bílkoviny nebo se vyskytuje ve volné formě. Konkrétně velké množství biotinu, a to až 100 µg/100 g, se nachází například v telecích ledvinách. Velké zastoupení je ale i v hovězích játrech, a to 94 až 100 µg/100 g [1, 6].

2.7.4 Avitaminóza

Nedostatek biotinu se projevuje například potenciálním poškozením některých nervů, dalším projevem avitaminózy může být nárůst množství kyseliny 3-hydroxy isovalerové v moči [1, 3].

2.7.5 Hypervitaminóza

Nežádoucí účinky při nadměrném příjmu biotinu nejsou známy [1].

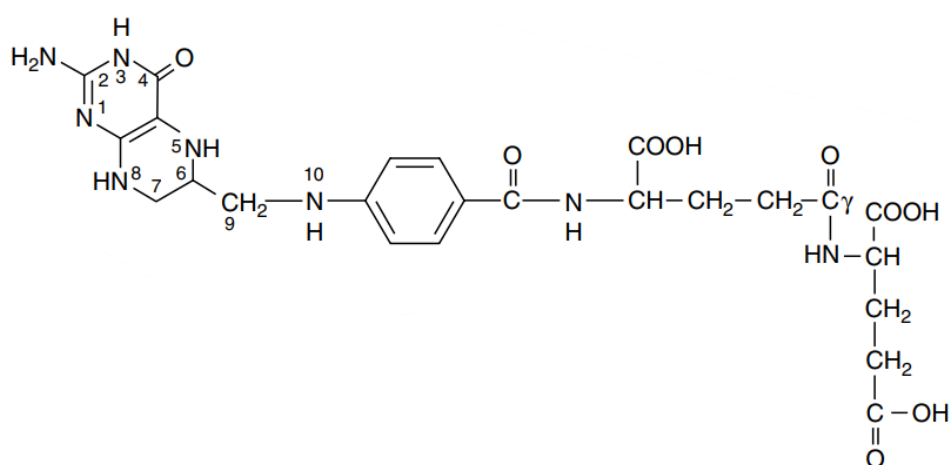
2.8 Vitamín B9 (kyselina listová)

2.8.1 Historie

Kyselina listová byla objevena ve 40. letech 20. století, kdy byla izolována z listů špenátu, jakožto faktor velice důležitý pro správný růst bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus casei*. Tento faktor byl studován z důvodu předpokladu léčby anémie megaloblastického typu, jelikož bylo zjištěno, že tuto chorobu lze léčit za pomoci kvasnic. Důvodem byl obsah, do té doby neznámé antianemické látky, která je schopna zvyšovat krvetvorbu, a tak přispívat k léčbě megaloblastické anémie. Tato látka byla později pojmenována jako nyní dobře známá kyselina listová [1, 5, 11].

2.8.2 Názvosloví a struktura

Vitamín B9 je z chemického hlediska N-(2-amino-4-hydroxy-6-pteridylmetyl)-p-aminobenzoylglutamová kyselina. Jeho struktura se skládá z paraaminobenzoové kyseliny, pteridinového kruhu a kyseliny glutamové, která se váže na karboxylovou skupinu kyseliny paraaminobenzoové (Obrázek 15). Důležitým pojmem, spojovaným s tímto vitamínem, je označení pro souhrn derivátů kyseliny listové. Kyselina listová se liší od folátů vyšší biologickou účinností a tím, že obsahuje pouze 1 zbytek kyseliny glutamové, zatímco foláty obsahují ve své molekule až 6 zbytků kyseliny glutamové [1, 5].



Obrázek 15 Chemická struktura kyseliny listové [5]

2.8.3 Přírodní zdroje

Kyselinu listovou můžeme přijímat například ze zelené zeleniny, jako je brokolice, chřest, květák nebo špenát. Největší zastoupení vitamínu B9 se nachází v chřestu, který obsahuje 89 až 142 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$, dále ve špenátu s obsahem 48 až 115 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$. Kyselina listová je obsažena také v ovoci, avšak zde se vyskytuje ve výrazně nižší míře. Najdeme ji v třešních, jahodách, či pomerančích. Dalším významným zdrojem jsou játra. Například taková vepřová játra obsahují 221 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ nebo játra hovězí s obsahem vitamínu 290 až 294 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ [1, 5].

2.8.4 Avitaminóza

Možné problémy spojené s nedostatečným příjmem kyseliny listové jsou poměrně časté, vzhledem k tomu, že se v běžné stravě vyskytuje v relativně malém množství. Problémy souvisejí s poruchami tvorby krve, dalším negativním dopadem na lidský organismus mohou být poruchy zažívacího traktu nebo záněty dutiny ústní [1].

2.8.5 Hypervitaminóza

Nadměrný příjem kyseliny listové má pozitivní dopad, jelikož se tak snižuje zvýšené riziko karcinomu plic [1].

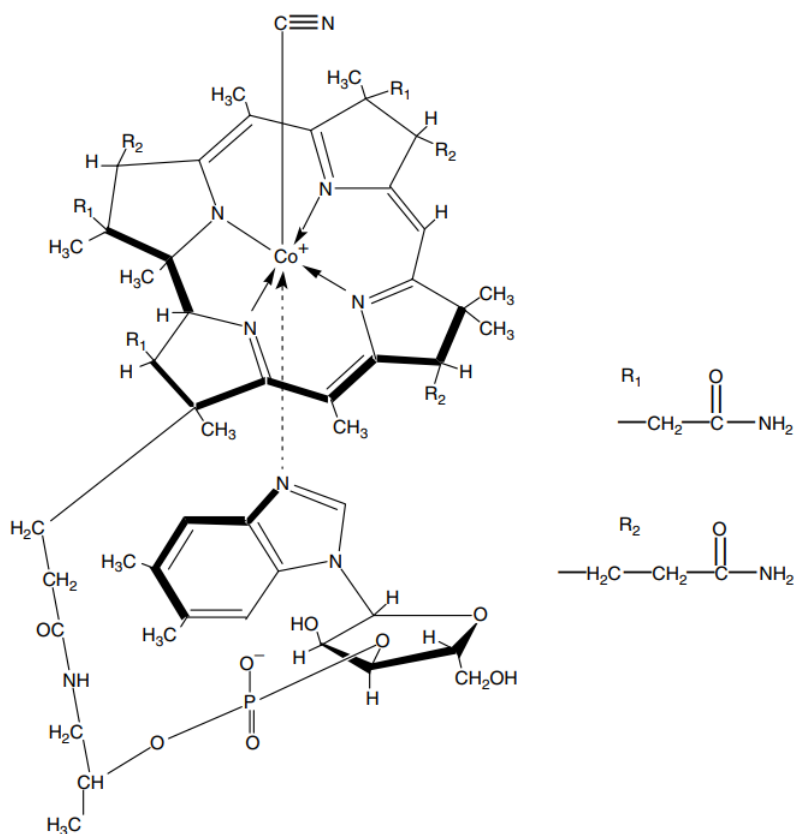
2.9 Vitamín B12 (kobalamin)

2.9.1 Historie

Výzkum kobalaminu souvisí se studii závažného onemocnění perniciózní anémie, které souvisí se snižováním počtu erytrocytů. Bylo prokázáno, že tato choroba se dá léčit za pomoci podávání syrových jater. Tato dieta umožňovala novotvorbu erytrocytů, čímž přispívala k uzdravení nemocných pacientů. Zodpovědnou aktivní látkou, obsaženou v játrech, byl právě kobalamin [1, 12].

2.9.2 Názvosloví a struktura

Vitamín B12 má nejsložitější chemickou strukturu ze všech vitamínů a podobá se hemovému systému hemoglobinu. Kobalamin obsahuje porfyrinový skelet, v jehož středu se nachází atom kobaltu (Obrázek 16) [1, 5].



Obrázek 16 Chemická struktura kobalaminu [5]

2.9.3 Přírodní zdroje

Jak již bylo zmíněno výše, kobalamin se nachází především v játrech. Dalším důležitým zdrojem je rybí maso, ledviny, vejce, mléko nebo sýry. Jelikož se vitamín nachází v mnoha živočišných produktech, mohou mít s jeho příjmem problém vegetariáni. Zajímavým zdrojem je první mateřské mléko, tzv. kolostrum [1, 6].

2.9.4 Avitaminóza

Při nedostatečném příjmu kobalaminu dochází v organismu k poškození souvisejícím se stavbou a zrání erytrocytů. Tomuto stavu se odborně říká perniciózní anémie, při níž lze pozorovat změny na kůži, kdy kůže a sliznice získávají „nezdravou“ bledou barvu. Dalším možným projevem mohou být závratě a celková únava. Problémy s nedostatečným příjmem nastávají u striktních vegetariánů, kdy je příjem kobalaminu minimální [1, 2, 3].

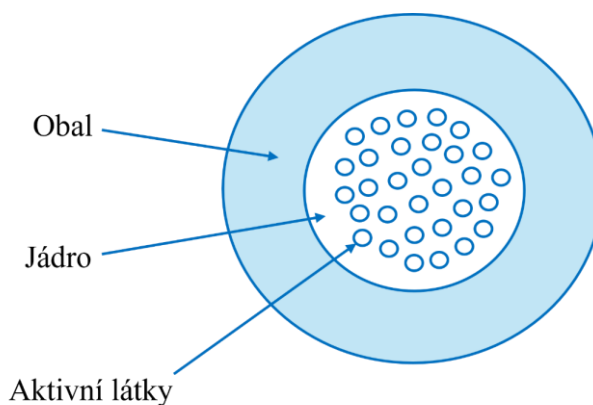
2.9.5 Hypervitaminóza

Nadměrná konzumace kobalaminu může vést k autoimunitnímu onemocnění kůže, tzv. psoriáze [1].

3 ENKAPSULACE VITAMINŮ

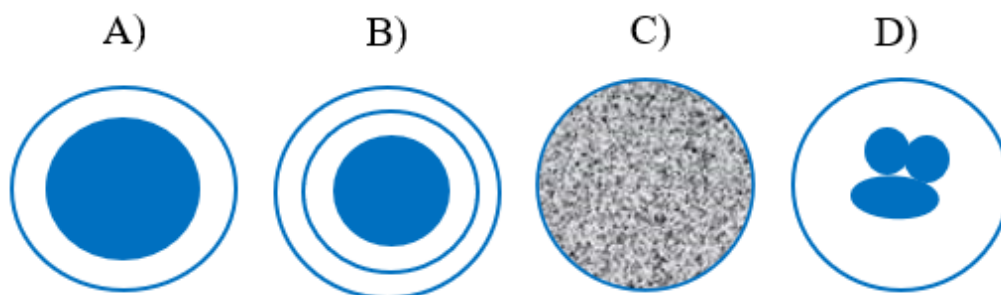
3.1 Proces enkapsulace

Enkapsulace je velice důležitý technologický proces, který se využívá v řadě různých oblastí, jako je kosmetický, farmaceutický, či potravinářský průmysl. Během enkapsulačního procesu dochází k zapouzdření aktivní látky do pouzdra (též kapsle, matrice, obal), které zde slouží jako ochrana vůči vnějšímu prostředí. Pro látku, která se nachází uvnitř pouzdra, existuje spousta různých pojmenování, mezi které řadíme například náplň, jádro nebo interní fáze. Strukturu enkapsulované částice lze vidět na Obrázku 17 [13, 14].



Obrázek 17 Struktura enkapsulované částice

Z morfologického hlediska lze enkapsulované systémy rozdělit na 4 typy (Obrázek 18). V případě rezervoáru (A) je aktivní látka potažena polymerem, který zde slouží jako jakési ochranné pouzdro. Ve druhém případě dvojvrstvého systému (B) jde o velmi podobný princip, avšak namísto jedné vrstvy jsou zde vrstvy dvě. V systému matrix (C) jde buď o rozpuštění účinné látky v polymerní síti, nebo o rovnoměrné dispergování aktivní látky do nosného systému. V případě polynukleárního systému (D), systém obsahuje opět jádro s účinnou látkou a ochranný obal, avšak na rozdíl od předchozích typů je zde jádro rozděleno na více částí [15].



Obrázek 18 Morfologie enkapsulovaných systému A) rezervoár, B) dvojrstvá, C) matrix, D) polynukleární [upraveno dle 13]

Propustnost a celkový charakter ochranného pouzdra či matrix je zásadní pro fyzikální stabilitu a odolnost účinných látek v nosném systému, jejich rozpustnost i podmínky následného uvolňování [13].

3.2 Současný stav problematiky enkapsulace hydrofilních vitamínů do polymerních nosičů

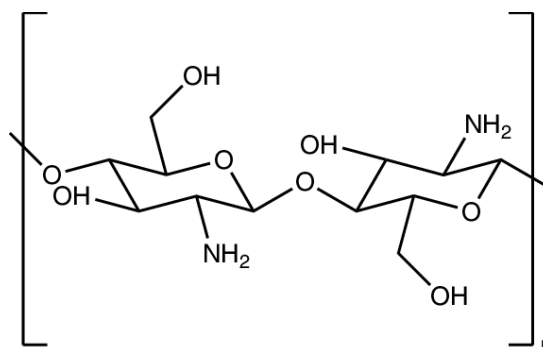
Proces enkapsulace hydrofilních vitamínů je v dnešní době hojně využíván v nejrůznějších odvětvích průmyslu. A to zejména z důvodu zvýšení stability dané aktivní látky a ochrany proti degradaci způsobené interakcí s vnějším prostředím. Ve farmacii jde hlavně o snahu řízeného uvolňování vitamínu na určené místo. V potravinářském průmyslu je cílem zlepšit zpracování aktivní látky organismem, zvýšit její absorpci a následně ji efektivněji využít. Je známo, že vitamín C má tendenci v potravinách chemicky degradovat, čímž dochází ke snížení jeho biologické aktivity. Východiskem tohoto problému, může být právě jeho enkapsulace [16].

Dle aktuálních studií lze hydrofilní vitamíny enkapsulovat do nosičů na bázi polymerů, lipidů a amfifilních struktur. Co se týká polymerů, ty mohou být ve formě nanovláken, kapsulí a inkluzní komplexů. Příprava těchto systémů probíhá různými procesy, mezi které řadíme například jednoduché míchání, elektrospinning, sušení mrazem, sušení rozprašováním nebo iontovou gelací [16].

Chitosan patří mezi bioaktivní polymery a lze jej vyrobit deacetylací polysacharidu chitinu. Chitosan je tvořen jednotkami d-glukosaminu a N-acetyl-d-glukosaminu, spojenými β -1,4 glykosidickými vazbami (Obrázek 19). Díky svým jedinečným vlastnostem se chitosan nachází v žebříčku důležitosti hned vedle polysacharidu celulózy. V současnosti se jedná o druhý nejvyužívanější polysacharid. Mezi jeho významné vlastnosti řadíme jeho

biokompatibilitu, biologickou odbouratelnost a to, že není významně toxický. Díky těmto atributům se s jeho využitím setkáme v oblastech farmacie, kosmetiky či potravinářství. Například ve studii Ishihary a kol. [17] byl využit chitosanový hydrogel jako účinná látka pro rychlejší zacelení a následné lepší hojení ran [17].

Z důvodu obsahu volných aminokyselin nese kladný náboj, díky čemuž může interagovat se záporně nabitými povrchy. Chitosan se v dnešní době využívá k přípravě různých nosných systémů pro řízené uvolňování aktivních látek, především léčiv v oblasti farmacie [18].



Obrázek 19 Chemická struktura chitosanu [19]

Chitosanové nosiče mohou být ve formě lyofilizátů, elektrostaticky zvlákněných membrán, filmů, částic, nebo také porézních scaffoldů, které lze využít v oblasti vývoje biomateriálů pro tkáňové inženýrství [20].

To lze sledovat například ve studii Ishihara a kol. [17], kde chitosanový hydrogel našel využití jako účinná látka pro hojení ran. V rámci jeho testování na myších bylo zjištěno, že hydrogel má významný vliv na uzavření a následně zrychlené zhojení ran. Díky tomu studie uvádí chitosanový hydrogel jako vhodné chirurgické řešení pro naléhavé zastavení krvácení ran. Lze ho tedy využít jako tzv. tkáňové lepidlo [17].

Významnou skupinou ve vodě rozpustných vitamínů představují zástupci skupiny B. Mikročástice na bázi alginátu a chitosanu byly využity pro enkapsulaci vitamínu B2 a β -karotenu ve studii [21] za účelem zvýšení jejich biologické dostupnosti. Bylo zjištěno, že vyšší rychlost uvolňování aktivních látek nastala v případě jednovrstvých gelových mikrokuliček, na rozdíl od vícevrstvých, kde bylo uvolňování zpožděné. Koncentrace alginátu a množství vrstev nosiče tedy výrazně ovlivnily mechanické vlastnosti, velikost připravených částic a následně tedy i kinetiku uvolňování [21].

Studie Duchi a kol. [22] se zabývala přípravou nových mikrokapslí WS Biotin na bázi polyvinylpyrrolidonu s cílem zlepšit rozpustnost tohoto vitamínu ve vodném prostředí a následně zvýšit jeho účinnost a využitelnost, například v kosmetických přípravcích. Výsledky studie potvrdily 20krát vyšší rozpustnost připraveného WS Biotinu, na rozdíl od volného biotinu. Zároveň byla potvrzena účinnost WS Biotinu pro zpevnění a podporu růstu vlasů a jeho prokazatelně dobrý účinek na pokožku [22].

Kromě aplikace vitamínu B7 přímo jako aktivní látky, bývá biotin často využíván pro modifikaci nosné matrice. Jako příklad lze uvést studii Lu Zhu a spol. [23], zabývající se modifikací konjugátu na bázi oligochitosanu-F127 právě biotinem, za účelem enkapsulace polyfenolu honokiolu do micel. Díky biotinu byla zvýšena absorpce tohoto chemoterapeutika do nádorových buněk.

Enkapsulace vitamínu B12 prostřednictvím komplexní koacervace pšeničného proteinu a pektinu byla studována autory Akbari a kol. [24], za účelem ochrany proti zpracovatelským a okolním vlivům v potravinářských procesech. Výsledky prokázaly významný vliv pH na enkapsulační účinnost.

Co se týká vitamínu C, bylo zjištěno, že v případě enkapsulace do částic chitosanu vykazuje zvýšenou biologickou dostupnost, což znamená, že je v těle lépe absorbovatelný a následně efektivněji využitelný. Dle aktuálních studií je také dokázáno, že tyto částice vykazují po enkapsulaci zvýšenou stabilitu během skladování, a v prostředí žaludečních šťáv se vyznačují prodlouženou dobou uvolňování [16].

Potenciál systémů na bázi modifikované nanokrystalické celulózy a chitosanu pro enkapsulaci vitamínu C byl studován v práci Baeka a kol. [25], kdy byla zjištěna vysoká enkapsulační účinnosti (90 %) a pozvolné uvolňování aktivní látky (během více jak 14 dní). Bylo také prokázáno, že stabilita vitamínu C v systému je závislá na pH, světle a množství kyslíku v prostředí. Stabilita vitamínu zde byla zvýšena za pomoci fosforylovaných celulóзовých nanokrystalů, což lze následně využít v potravinářství, při dlouhodobém skladování vitamínu C [25].

Autoři Alishahi a kol. [26] vyvinuli chitosanové nanočástice s enkapsulovaným vitamínem C pro průchod gastrointestinálním traktem za účelem zvýšení imunitního systému pstruha duhového. Vytvořené chitosanové nanočástice byly kulovitěho tvaru s velikostí 185 nm. Částice vykazovaly kladný náboj a *in vivo* řízené uvolňování vitamínu C do 48 hodin.

Enkapsulace vitamínu C do dvojvrstvé struktury na bázi zein/chitosanu byla studována autory Dong a kol. [27] Výsledné sférické částice o průměrné velikosti od 700 do 1000 nm vykazovaly, na rozdíl od částic tvořených pouze jednou vrstvou chitosanu, zpomalené a kontrolované uvolňování do prostředí simulované žaludeční tekutiny.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

- Příprava nosičů na bázi chitosanu s enkapsulovanými hydrofilními vitamíny ve formě částic, jak samotných, tak inkorporovaných do matrice biopolymerního filmu.
- Charakterizace fyzikálně-chemických vlastností připravených nosičů.
- Stanovení antioxidační aktivity připravených nosičů.
- Zhodnocení vlivu enkapsulace na podmínky uvolňování hydrofilních vitamínů do prostředí.

5 MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ

5.1 Použité chemikálie

- Vitamín C – Penta
- Vitamín H – Biotin na nosiči – Dr. Hoffmann
- Chitosan – Sigma-Aldrich, nízká molekulová hmotnost
- Sodium tripolyfosfát – Acros Organics, 85 % pure
- Glycerin – PENTA Chemicals
- Kyselina octová – IPL – Petr Lukeš, Uherský Brod
- Ethanol

5.2 Použité zařízení

- Magnetické míchadlo MR Hei-Standard
- Analytické váhy Sartorius Basic
- Sušárna Memmert
- pH metr Heidolph MR 1000
- Zetasizer Malvern Nano series
- UV-VIS spektrofotometr Jasco V-750
- Texturometr AMETEK test TECTRA a.s.
- Analyzátor kontaktního úhlu Theta Biolin Scientific
- Digitální mikrometr (přesnost 0,001 mm, rozsah 25 mm)
- Centrifuga Hettich
- Exsikátor ČSN SIMAX
- Testovací kelímky pro stanovení propustnosti páry

6 METODIKA

6.1 Příprava roztoků

6.1.1 Příprava zásobního roztoku chitosanu

V prvním kroku bylo odpipetováno vypočítané množství kyseliny octové (0,95 ml) do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku destilovanou vodou tak, aby výsledná koncentrace činila 1 obj. %. Dále byl připraven roztok chitosanu (CH) o koncentraci 0,2 hm. %, a to navážením vypočítaného množství na analytických vahách s přesností na 0,0001 g, které bylo následně rozpuštěno ve 100 ml připraveného roztoku kyseliny octové.

6.1.2 Příprava roztoků vitamínů C a B7

Na analytických vahách bylo naváženo vypočítané množství vitamínu C, resp. B7 s přesností na 0,0001 g a rozpuštěno v 10 ml destilované vody za pomoci magnetického míchadla (1000 otáček/min, teplota 25 ± 1 °C). Následně byla směs převedena do 10 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku, tak aby výsledná koncentrace roztoků byla 10 mg/ml.

6.1.3 Příprava roztoku sodium tripolyfosfátu

Vypočítané množství sodium tripolyfosfátu (STPP) bylo naváženo (analytické váhy s přesností na 0,0001 g) do kádinky a následně rozpuštěno v 10 ml destilované vody za pomoci magnetického míchadla (1000 otáček/min, 25 ± 1 °C). Směs byla poté převedena do 10 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku, tak aby výsledná koncentrace roztoku byla 1 mg/ml.

6.2 Příprava částic

Do kádinky bylo odpipetováno 17 ml připraveného zásobního roztoku chitosanu (0,2 hm. %) a postupně po jednotlivých kapkách za pomoci pipety byly přidány 2 ml roztoku vitamínu (C nebo B7) o koncentraci 10 mg/ml. Tato směs byla míchána 30 minut při laboratorní teplotě při 1000 otáček/min. Poté byl postupně po jednotlivých kapkách za pomoci pipety přidán 1 ml roztoku STPP a směs byla následně opět míchána (30 minut, 1000 otáček/min, 25 ± 1 °C). Výsledná koncentrace roztoků vitamínů byla 1 mg/ml (Obrázek 20). Podobným způsobem byly připraveny i prázdné částice chitosanu bez vitamínu. Opět bylo napipetováno

do kádinky 10 ml zásobního roztoku chitosanu (0,2 hm. %) a následně postupně přikapáván 1 ml roztoku STPP za pomoci pipety po jednotlivých kapkách. Poté byla směs míchána na magnetického míchadle (30 minut, 1000 otáček/min, 25 ± 1 °C).



Obrázek 20 Vzorke vitamínu C (vlevo) a B7 (vpravo)

6.3 Měření pH

Po kalibraci přístroje byla elektroda pH metru ponořena do připravených vzorků a odečtena hodnota pH (25 ± 1 °C).

6.4 Měření velikosti částic a zeta potenciálu

Velikost částic a zeta potenciál vzorků byly měřeny na přístroji Zetasizer Malvern. Pro měření velikosti částic byl vzorek naředěn pomocí destilované vody, dvakrát přefiltrované přes stříkačkový mikrofiltr s póry o velikosti 1,2 μm . Pro stanovení zeta potenciálu bylo použito ředění 500krát pomocí destilované vody, dvakrát přefiltrované přes stříkačkový mikrofiltr s póry o velikosti 1,2 μm . Pro měření zeta potenciálu byly použity plastové kyvety DTS1070 a pro měření velikosti částic následně použity klasické plastové kyvety o průměru 1 cm. Pro měření velikosti částic bylo použito zředění 0,5 ml vitamínu C, popř. B7 do 1 ml vody. Následně pro stanovení zeta potenciálu bylo použité zředění 6 μl vitamínu C, popř. B7 do 3 ml vody. Všechny vzorky byly proměřeny ihned po přípravě, a následně po 45 dnech skladování na tmavém místě při 4 °C.

6.5 Stanovení antioxidační aktivity

Vzorek o objemu 200 μl byl smíchán s 2 ml 0,1 mM ethanolického roztoku DPPH. Směs byla ponechána 30 minut ve tmě při teplotě 25 ± 1 °C. V dalším kroku byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 517 nm proti ethanolu. Dle Rovnice 1 byl následně vypočítán procentuální úbytek absorbance:

$$\%A = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{blank}}} \cdot 100 \quad (1)$$

Kde $\%A$ je úbytek absorbance [%]

A_{blank} je absorbance 0,1 mM ethanolického roztoku DPPH

A_{vzorek} je absorbance vzorku

6.6 Příprava filmů

Pro přípravu filmů bylo naváženo 2,5 g nízkomolekulárního chitosanu do kádinky, k němuž byl přidán 1%ní roztok kyseliny octové. Směs se poté nechala míchat na magnetickém míchadle (24 hodin, 1000 otáček/min, teplota 25 ± 1 °C). Po dané době byla směs převedena do 250 ml do odměrné baňky a doplněna roztokem kyseliny octové po rysku (výsledná koncentrace byla 10 mg/ml). V další fázi bylo smícháno 10 ml roztoku chitosanu o koncentraci 10 mg/ml (CH) a 1 ml roztoku částic s enkapsulovaným vitamínem C, resp. B7, připravených v Kapitole 6.2. Dále byl ke směsi přidán glycerol, jako plastifikátor, a to v různém množství (0,01; 0,05; 0,1 g) (označení vzorků je patrné z Tabulky 4). Směs byla homogenizována po dobu 5 minut při 1000 otáček/min. Následně byly připravené aktivní roztoky odlity na Petriho misky, které byly vloženy do sušárny na dobu 24 hodin při teplotě 35 °C.

Tabulka 4 Složení roztoků pro přípravu filmů

Označení vzorku	Objem [ml]			Hmotnost [g]
	CH (10 mg/ml)	C (1 mg/ml)	B7 (1 mg/ml)	GL
CH/C/GL 0 až 0,1	10	10	-	0 až 0,1
CH/B7/GL 0 až 0,1	10	-	10	0 až 0,1

6.7 Stanovení antioxidační aktivity filmů

Z připravených filmů byly nastříhány čtverečky o rozměrech 1x1 cm, které byly následně zváženy na analytických vahách s přesností 0,0001 g. Čtverečky byly poté vloženy do předem popsaných skleněných vialek, do nichž byly přidány 2 ml 0,1 mM DPPH. Posléze byly vzorky inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě (25 ± 1 °C) nebo při teplotě 70 °C po dobu 30 minut a následně proměřeny na UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 517 nm proti ethanolu. K výpočtu úbytku absorbance byl využit výše uvedený vzorec (viz Rovnice 1).

6.8 Test uvolňování aktivní látky

6.8.1 Stanovení kalibrační přímky

Byl připraven zásobní roztok vitamínu C o koncentraci 1 mg/ml, a to navážením vypočítaného množství vitamínu C (s přesností 0,0001 g) do kádinky, rozpuštěním v destilované vodě a následným převedením do 25 ml odměrné baňky, kde byl doplněn po rysku destilovanou vodou.

Na spektrofotometru byla stanovena maximální vlnová délka (289 nm), při níž byly následně proměřeny jednotlivé kalibrační roztoky o koncentracích od 0,01 do 0,7 mg/ml, které byly připraveny ze zásobního roztoku dle zředovací rovnice (viz Rovnice 2). Z naměřených hodnot absorbancí byla následně sestrojena kalibrační přímka.

$$V_1 \cdot c_1 = V_2 \cdot c_2 \quad (2)$$

Kde	c_1	koncentrace zásobního roztoku [mg/ml]
	V_1	objem zásobního roztoku [l]
	c_2	koncentrace pracovního roztoku [mg/ml]
	V_2	objem pracovního roztoku [l]

6.8.2 Test uvolňování

V první fázi byl připraven fosfátový pufr, a to navážením 8 g chloridu sodného, 0,2 g chloridu draselného, 1,44 g hydrogenufosforečnanu sodného a 0,245 g dihydrogenufosforečnanu draselného. Tyto chemikálie byly následně rozpuštěny v 1 l destilované vody. Posléze bylo změřeno pH, které bylo třeba upravit na hodnotu $7,4 \pm 0,1$.

Z připravených vzorků filmů byly vystřiženy čtverečky o rozměrech 2x2 cm, které byly následně zváženy s přesností na 0,0001 g a umístěny do skleněných reagenčních lahví (Obrázek 21).



Obrázek 21 Vzorky filmů připravené pro test uvolňování

Poté bylo ke vzorkům přidáno 20 ml připraveného pufru a lahve byly umístěny na třepačku s nastavenou rychlostí 160 otáček/min (25 ± 1 °C). Dále byly v definovaných časových intervalech (0,5 h; 1 h; 2 h; 3 h; 4 h; 5 h; 8 h až 241 h) odebírány vzorky o objemu 2 ml do mikrozku mávek Eppendorf a současně byly přidány vždy 2 ml čerstvého pufru. U odebraných vzorků byla proměřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru při fixní vlnové délce 289 nm.

6.9 Stanovení vlhkosti filmů

Do předem vysušených váženek byly vloženy vzorky filmů (čtverečky o rozměrech 2x2 cm), které byly sušeny při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Z počátečních a výsledných hmotností byla vypočítána vlhkost filmů (viz Rovnice 3).

$$V (\%) = \left(\frac{M_0 - M_f}{M_0} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

Kde M_0 je počáteční hmotnost vzorku [g]

M_f je výsledná hmotnost vzorku [g]

6.10 Stanovení propustnosti filmů pro vodní páry

Pro stanovení propustnosti vzorků pro vodní páry byl využit postup dle normy *Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials: ASTM E96-95* [28].

Z připravených vzorků filmů s enkapsulovanými vitamíny byla vystřižena kolečka o průměru 36 mm. Do testovacích kelímků (Obrázek 22) bylo nalito 20 ml destilované vody a mezi těsnění ve vrchní části byl upevněn kruhový vzorek filmu. Takto připravené testovací kelímky byly následně zváženy a vloženy do exsikátoru při definované relativní vlhkosti a teplotě (Obrázek 23). V daných časových intervalech byly vzorky váženy s přesností na 0,0001 g a změna hmotnosti v závislosti na čase byla následně využita pro výpočet propustnosti pro vodní páry. Pro výpočet propustnosti byly následně využity Rovnice 4 a Rovnice 5.

$$WVT = \frac{k}{A} \quad (4)$$

$$WVP = \frac{WVT}{\Delta p} = \frac{WVT}{S \cdot (R_1 - R_2)} \quad (5)$$

Kde WVT je rychlost přenosu vodní páry [$\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$]

WVP propustnost pro vodní páry [$\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$]

k je ztráta hmotnosti v čase [$\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$]

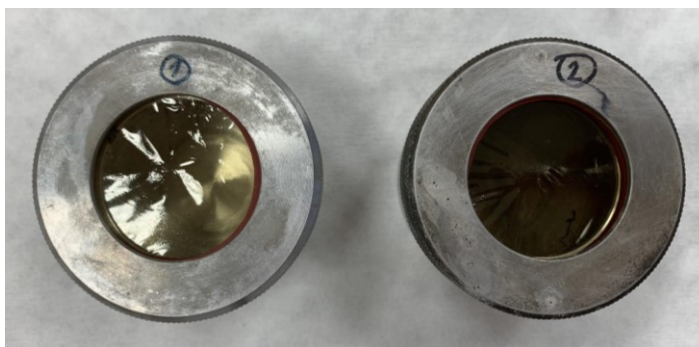
A je plocha vzorku [m^2]

Δp je rozdíl tlaku vodní páry [Pa]

S je tlak nasycené vodní páry [Pa]

R_1 je vlhkost v testovacím kelímku [%]

R_2 je vlhkost prostředí [%]



Obrázek 22 Testovací kelímek se vzorkem filmu s vitamínem C



Obrázek 23 Exsikátor s testovacím kelímkem se vzorkem

6.11 Stanovení rozpustnosti filmů ve vodě

V této části úlohy byly použity vysušené vzorky filmů, které byly v předchozí úloze stanovení vlhkosti filmů vysušeny do konstantní hmotnosti. Tyto vzorky byly vloženy do Erlenmayerových baněk s 20 ml destilované vody. Takto připravené vzorky byly následně vloženy na třepačku při rychlosti 150 otáček/min po dobu 24 hodin (Obrázek 24). Po 24 hodinách byly vzorky usušeny v sušárně při 105 °C do konstantní hmotnosti, která byla zaznamenána. Pro výpočet rozpustnosti byla následně použita Rovnice 6.

$$S (\%) = \left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

Kde M_i ...počáteční hmotnost vzorku před vložením na třepačku [g]

M_f ...hmotnost vzorku po třepání a vysušení [g]



Obrázek 24 Test rozpustnosti

6.12 Tahové zkoušky

Z připravených filmů byly nastříhány proužky o velikosti 1x6 cm, u nichž byla změřena tloušťka pomocí digitálního mikrometru (přesnost 0,001 mm, rozsah 25 mm). Tyto proužky byly následně vloženy do čelistí přístroje Textuometr, na kterém byla poté za pomoci softwaru NexygenPlus vyhodnocena tahová síla [MPa] a prodloužení při přetržení [%]. Každý vzorek byl změřen nejméně třikrát.

6.13 Měření smáčivosti filmů

Smáčivost připravených vzorků byla hodnocena metodou přisedlé kapky pomocí analyzátoru kontaktního úhlu Theta. Z filmů byly vystříženy obdélníčky, na něž byla nanášena kapka destilované vody (3 μ l). Pomocí softwaru OneAttension byl vyhodnocen kontaktní úhel, který byl hodnocen z 5. až 6. vteřiny měření. Výsledné hodnoty byly průměrem ze tří měření.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Charakteristika částic

7.1.1 Měření velikosti částic a zeta potenciál

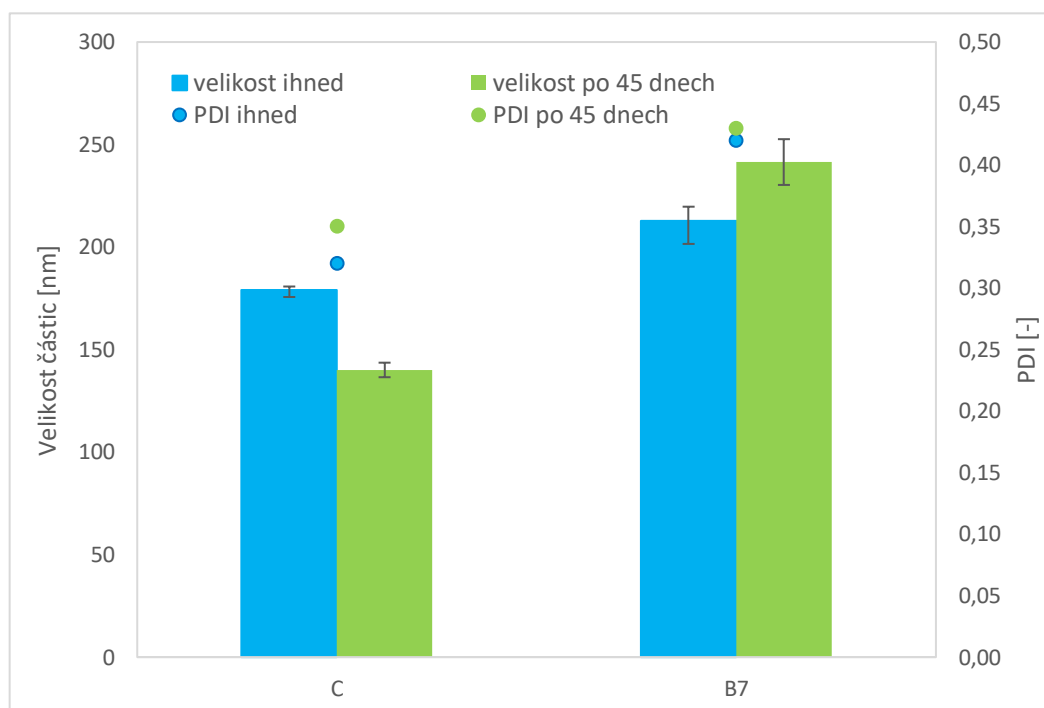
Velikost a náboj částic vypovídají o fyzikální stabilitě disperzních soustav. Pokud částice koloidního roztoku nesou významně kladný, či záporný náboj, budou mezi nimi působit silné odpudivé elektrostatické síly a lze předpokládat, že částice nebudou mít tendenci se k sobě přibližovat, a tím pádem ani tvořit nežádoucí aglomeráty. Měření zeta potenciálu lze tedy získat informace o potenciální elektrostatické stabilitě připravené disperze. Velikost zeta potenciálu výrazně ovlivňuje například pH měřeného roztoku, přičemž se zvyšujícím se pH většinou dochází k posunu kladného náboje na záporný. V případě hodnoty pH, ve kterém je zeta potenciál nulový, se jedná o takzvaný izoelektrický bod. V tomto bodě je elektrická dvojvrstva v podstatě neutralizována a v roztoku lze očekávat flokulaci či aglomeraci koloidních částic [29, 30].

Výsledky měření velikosti částic s enkapsulovanými vitamíny z přístroje Zetasizer jsou shrnuty na Obrázku 25. Ze získaných dat je patrné, že částice s vitamínem C dosahují velikosti necelých 180 nm, zatímco vzorek s vitamínem B7 vykazoval částice větší (přes 200 nm), což může být důsledkem odlišných molekulárních hmotností a struktur daných vitamínů (Obrázek 1 a Obrázek 14). Přeměření částic po 45 dnech byl prokázán pokles velikosti u vitamínu C (o 22 %), zatímco v případě vzorků s biotinem došlo ke zvětšení částic asi o 11 %. Částice chitosanu s enkapsulovaným vitamínem C o velikosti 240 nm byly získány autory studie Dong a kol. [27]. Odchyly od našich výsledků mohly být způsobeny modifikací metody, kdy autoři zmíněné studie využili navíc ultracentrifugaci a lyofilizaci.

Současně s měření velikosti částic byly vyhodnoceny i hodnoty indexu polydisperzity (PDI), který je definován jako poměr hmotnostní a číselné průměrné molekulové hmotnosti M_w a M_n a indikuje úroveň uniformity velikostí částic [27]. Z naměřených hodnot PDI (Obrázek 25), lze usoudit, že index polydisperzity se pohyboval v rozmezí 0,3 až 0,4 a po následném přeměření (po 45 dnech) se jeho hodnota zvýšila jen nepatrně.

Dle studie Desai a kol. [18] bylo prokázáno, že na velikost částic a zeta potenciál má zásadní vliv molekulová hmotnost chitosanu. Autoři studie zjistili, že se zvyšující se molekulovou

hmotností chitosanu rostla i velikost mikrokuliček TPP-chitosanu s enkapsulovaným vitamínem C [18].

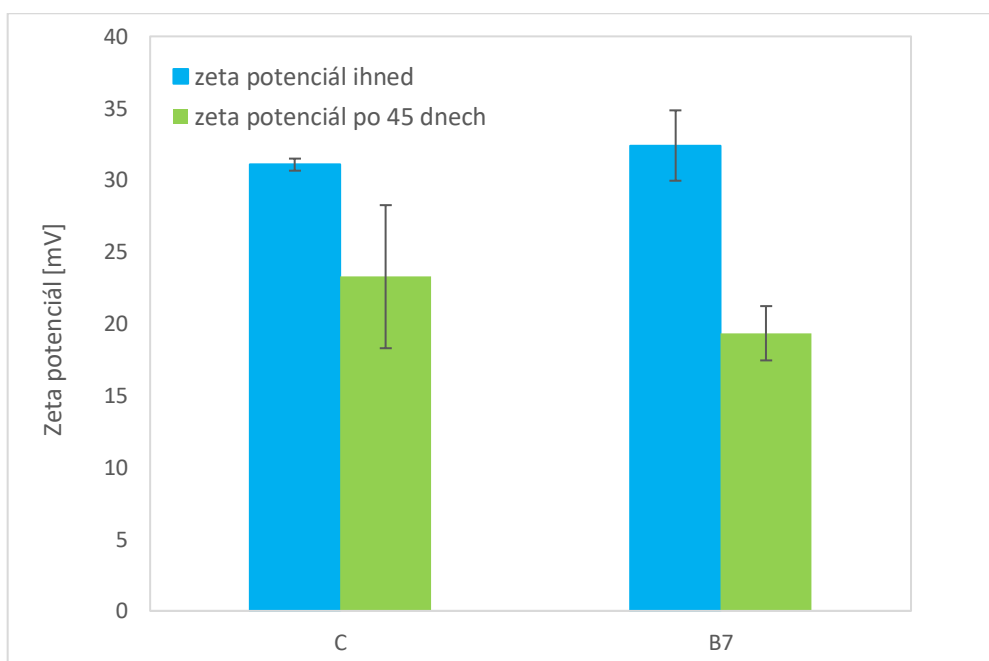


Obrázek 25 Naměřené hodnoty velikosti částic

Na Obrázku 26 lze vidět, že náboj připravených částic dosahoval kladných hodnot (+31 až +32 mV), bez ohledu na typ vitamínu využitého k enkapsulaci. Lze tedy potvrdit prioritní význam nosné matrice, chitosanu, který v kyselém prostředí (kyselina octová) běžně vykazuje kladný náboj. Jelikož připravené částice vykazovaly hodnoty zeta potenciálu vyšší, než je hranice pro elektrostatickou stabilitu systému (± 30 mV), lze konstatovat, že náboj bude dostatečný k prevenci případného shlukování a tvorbě agregátů. Primární význam nosné matrice byl prokázán i ve studii Hamadou a kol. [31], v níž byly charakterizovány nanolipozomy na bázi mořských fosfolipidů s enkapsulovaným vitamínem C. Hodnoty zeta potenciálu připravených částic byly srovnatelné (v rozsahu od -38 až -34 mV, bez výrazných změn mezi jednotlivými formulacemi, lišícími se poměrem použitého fosfolipidu a vitamínu [31]. Ve studii [32] autoři Aresta a kol. charakterizovali nanočástice chitosanu s enkapsulovanými vitamíny C a E připravené pomocí metody iontové gelace s využitím síťovacího činidla sulfobutylether- β -cyklodextrinu pro následné využití v potravinářském průmyslu. Hodnoty zeta potenciálu pro chitosanové nanočástice se pohybovaly v rozmezí od +16 mV do +27 mV, v závislosti na konkrétním typu vitamínu [32].

V souvislosti s nábojem částic je třeba zmínit, že pH připravených roztoků bylo u obou systémů mírně kyselé, konkrétně 3,5 pro vzorek vitamínu C a 3,6 částice s vitamínem B7. Pokud by částice měly být aplikovány do produktů určených pro kontakt s pokožkou, například v kosmetických přípravcích, bylo by vhodné pH navýšit na hodnoty pH pokožky v rozmezí 4,5 až 5,5.

Po době skladování (45 dní) byl sledován pokles zeta potenciálu na hodnoty okolo + 20 mV, což může souviset se změnou velikosti částic a vzájemného uspořádání nosiče a aktivní látky. Ve studii [31] se autoři zabývali potenciálem nosičů na bázi lipozomů pro enkapsulaci vitamínu C. V rámci stabilitní studie byl hodnocen zeta potenciál částic po určité době skladování, konkrétně po 49 dnech při teplotě 4 °C. Podobně jako v naší studii došlo k poklesu hodnot zeta potenciálu, a to v některých případech dokonce až o 20 mV. [31].



Obrázek 26 Naměřené hodnoty zeta potenciálu

V Tabulce 5 lze vidět naměřené hodnoty z přístroje Zetasizer pro prázdné chitosanové částice. Je patrné, že v porovnání se vzorky s obsahem vitamínů byly všechny sledované parametry vyšší. Velikost částic činila 464,50 nm a index polydisperzity 0,56. Samotné chitosanové částice vykazovaly i vyšší zeta potenciál, konkrétně $44,60 \pm 1,99$ mV.

Tabulka 5 Naměřené hodnoty velikosti částic, PDI a zeta potenciálu pro prázdné částice

Vzorek	Velikost částic [nm]	PDI [-]	Zeta potenciál [mV]
CH/STTP	$464,50 \pm 0,07$	$0,56 \pm 0,07$	$44,60 \pm 1,99$

7.1.2 Antioxidační aktivita částic

Antioxidační aktivita připravených částic byla hodnocena na základě barevné změny testovaných roztoků po dané době inkubace 30 minut s roztokem DPPH. Na Obrázku 27 lze vidět vzhled roztoků po inkubaci. V obou případech došlo k zesvětlení barvy roztoků, ovšem u vzorku s obsahem vitamínu C byla změna mnohem výraznější, až na světle žluté zbarvení. Tento fakt se také projevil v naměřených hodnotách úbytku absorbance (Tabulka 6).



Obrázek 27 Vzorek vitamínu B7 (vlevo) a vitamínu C (vpravo) po 30 minutách inkubace

Tabulka 6 Procentuální úbytek absorbance

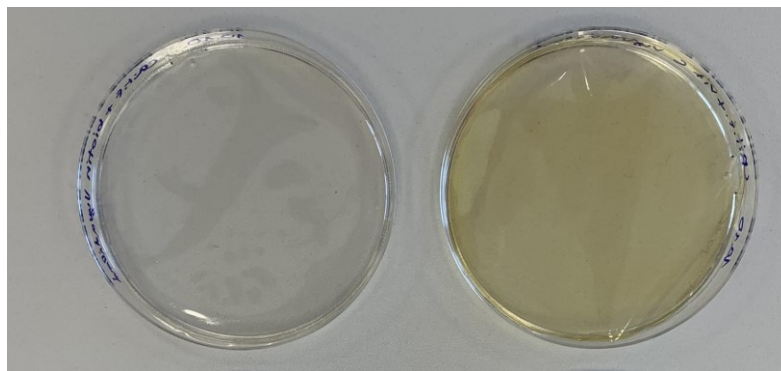
Vzorek	Úbytek absorbance [%]
C	81,68 ± 0,00
B7	46,34 ± 0,01

Z výsledků je patrné, že oba systémy vykazují antioxidační aktivitu, přičemž v případě vitamínu C byla hodnota skoro dvakrát vyšší (82 %), v porovnání se vzorkem s biotinem (46 %). Ve studii Liu a kol. [33] byla sledována antioxidační aktivita lipozomů obsahující vitamín C a β -karoten. Zatímco v případě částic s obsahem vitamínu C byla antioxidační aktivita 38,08 %, pro β -karoten byla stanovena hodnota nižší, konkrétně 18,34 %. Pro srovnání byly také hodnoceny vzorky obsahující obě aktivní látky, které vykazovaly antioxidační aktivitu 41,37 %. Vitamín C zde jednoznačně prokázal větší vliv na výsledné antioxidační účinky. V další studii Hamadou a kol. [31] byly připraveny nanolipozomy na bázi mořských fosfolipidů s enkapsulovaným vitamínem C. Výsledná antioxidační aktivita částic se pohybovala v rozmezí od zhruba 60 do 80 %, v závislosti na konkrétním složení dané formulace.

7.2 Charakteristika filmů

Za účelem zhodnocení dalších možností enkapsulace hydrofilních vitamínů byly připravené aktivní nosiče s antioxidanty inkorporovány do matrice na bázi chitosanu, z níž byly následně připraveny pevné vzorky filmů.

Jak je patrné z Obrázku 28, film s biotinem byl světlý pouze s jemným nažloutlým nádechem, zatímco vzorek s přidávkem nosiče s enkapsulovaným vitamínem C byl tmavší.



Obrázek 28 Film CH/B7 (vlevo), CH/C (vpravo)

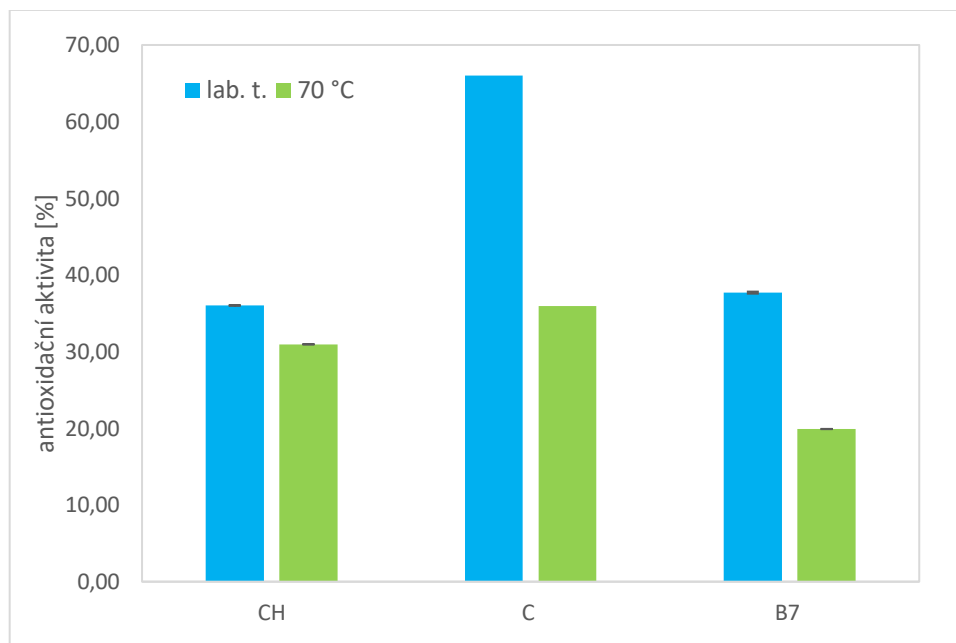
7.2.1 Antioxidační aktivita filmů

Hodnocení antioxidační aktivity připravených filmů proběhlo na základě sledování aktivity vychytávání volných radikálů DPPH. To bylo monitorováno na základě úbytku absorbance vzorku za pomoci spektrofotometrie [34].

Na následujícím Obrázku 29 lze vidět výsledky měření úbytků absorbancí jak vzorků chitosanového filmu bez aktivní látky, tak filmů s enkapsulovanými vitamíny. Podobně jako v případě částic byla vyšší antioxidační aktivita (a to o více jak 40 %) zaznamenána u filmů s obsahem vitamínu C. Lze si také všimnout, že filmy, které byly inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě 25 °C, měly antioxidační aktivitu skoro dvakrát vyšší než ty, které byly inkubovány při 70 °C. Co se týká kontrolního chitosanového filmu, vykazoval vzorek inkubovaný při nižší teplotě srovnatelnou aktivitu jako film s obsahem biotinu, zatímco při vyšší teplotě byla zjištěná antioxidační aktivita chitosanového filmu v porovnání s vitamínem B dokonce vyšší. To mohlo být způsobeno například degradací vitamínu B7 při vyšší teplotě.

Ve studii [34] autoři zjistili, že enkapsulací vitamínu C a E do nosiče na bázi sójového proteinu a pektinu došlo k výraznému zvýšení antioxidační aktivity. Lze předpokládat, že se jedná o důsledek faktu, že antioxidanty přítomné ve vitamínu C mohou reagovat spolu s O_2^- ,

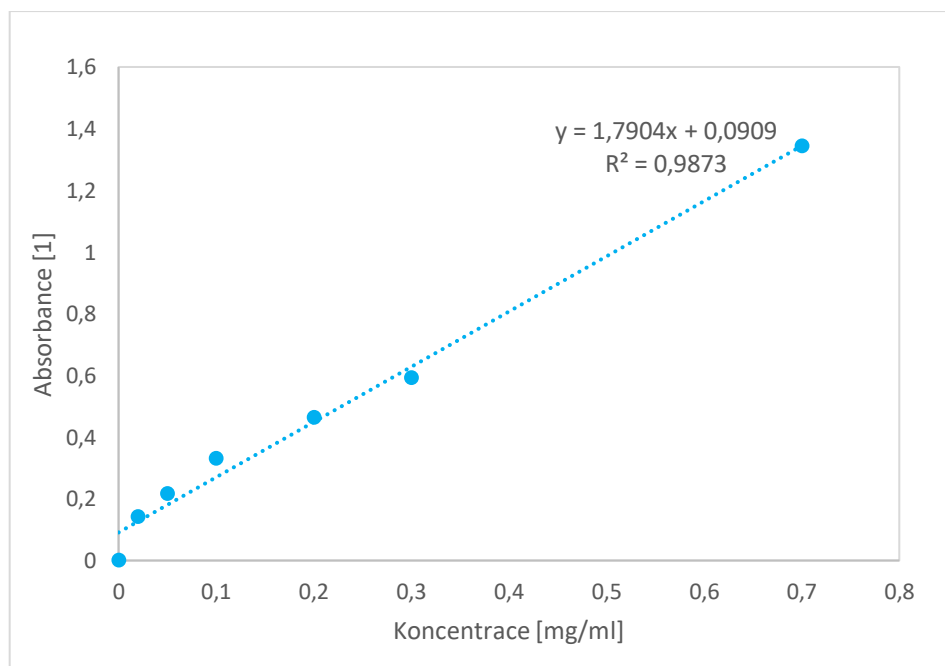
HOO^- a OH^- . Touto reakcí by následně vznikala semi dehydroaskorbová kyselina. Dále také autoři předpokládají synergický účinek kombinace vitamínu C a E [34].



Obrázek 29 Antioxidační aktivita filmů

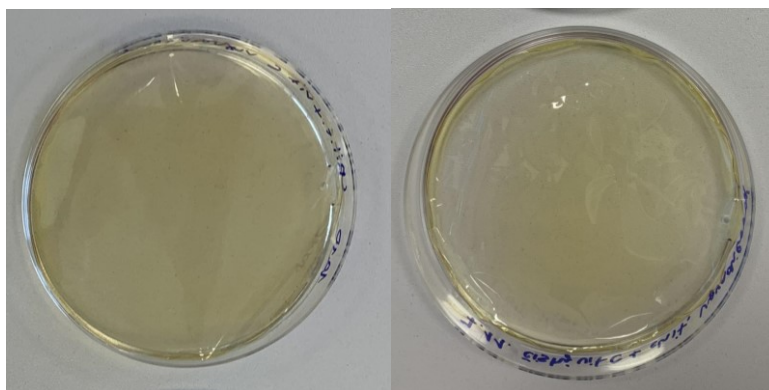
7.2.2 Test uvolňování aktivních látek

V první řadě byla sestrojena kalibrační přímka (Obrázek 30), z jejíž rovnice ($y = 1,7904x + 0,0909$) byly následně vypočítány koncentrace uvolněného vitamínu C ze vzorků filmů.



Obrázek 30 Kalibrační přímka vitamínu C

V rámci studie uvolňování antioxidantu z polymerní matrice byl proveden test jak na filmu připraveném inkorporací nosiče s enkapsulovaným vitamínem C, tak na vzorku vyrobeném pouhým smícháním roztoku polymeru a vitamínu, který byl také nažloutlý, ale méně homogenní (viz Obrázek 31).



Obrázek 31 Srovnání vzorků filmů s vitamínem C:
enkapsulovaným (vlevo) a neenkapsulovaným (vpravo)

Na následujícím Obrázku 32, lze vidět vzorky filmů po testu uvolňování, přičemž je zřejmé, že vzorky s enkapsulovaným vitamínem C měly po provedeném testu stále intenzivnější žlutou barvu, v porovnání se vzorky, připravenými bez předchozí enkapsulace, které byly výrazně světlejší.



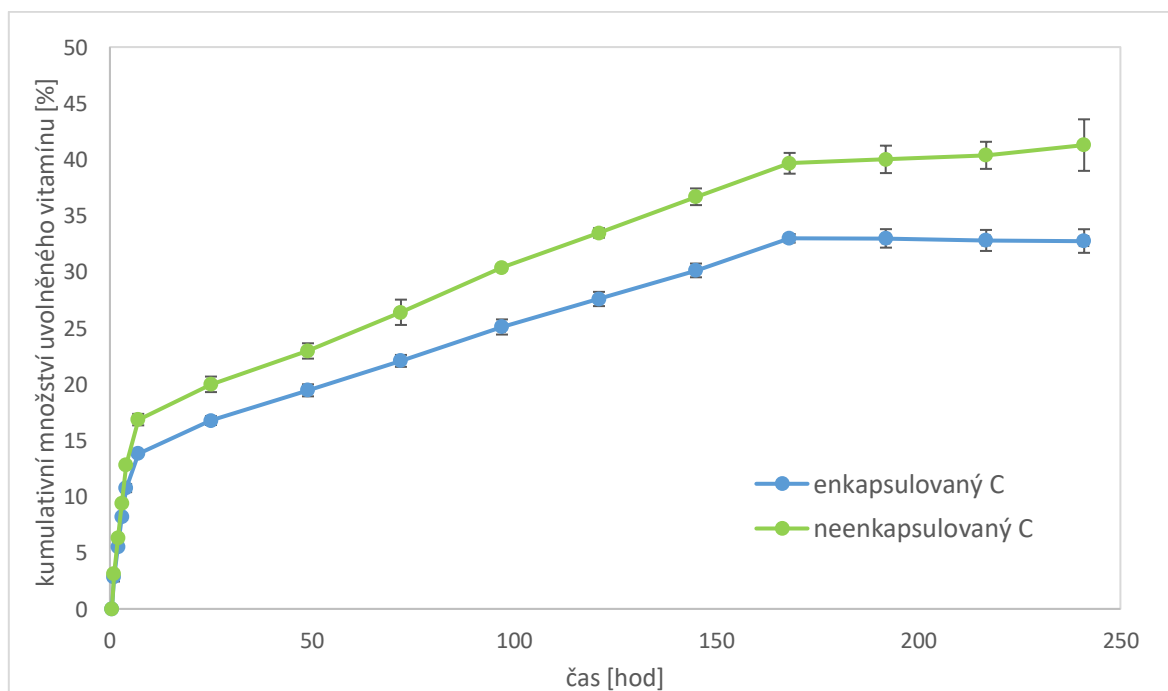
Obrázek 32 Vzorky filmů po testu uvolňování:
enkapsulovaný vitamín C (vlevo), neenkapsulovaný
vitamín C (vpravo)

Na Obrázku 33 lze vidět závislost kumulativní koncentrace vitamínu na čase. Obě křivky vykazovaly podobný trend, s razantnějším uvolněním v prvních zhruba 8 hodinách (strmá část křivky). Poté následovalo zpomalení rychlosti uvolnění, do ustálení po cca 150 hodinách testování. Na konci testu bylo v případě neenkapsulovaného vitamínu uvolněno větší

množství, a to konkrétně 4,11 mg/ml (odpovídající 41 %). V případě enkapsulovaného vitamínu bylo uvolněné množství o něco nižší, konkrétně 3,24 mg/ml (odpovídající 33 %). Je ovšem zcela zřejmé, že systém obsahující nosiče s enkapsulovaným vitamínem prokázal nižší detekovaná množství aktivní látky, což je v souladu s naším teoretickým předpokladem, kdy enkapsulace přispívá k pozvolnějšímu průběhu procesu uvolňování do prostředí.

Ve studii [35] se autoři Azevedo zabývali přípravou a charakterizací alginát/chitosanových částic s enkapsulovaným vitamínem B2 metodou ionotropní gelace. Studium kinetiky uvolnění, prováděné za různých podmínek (pH a teplota), prokázalo, že připravený systém je stabilní po dobu 5 měsíců a může sloužit pro dlouhodobé uvolňování v potravinářském průmyslu.

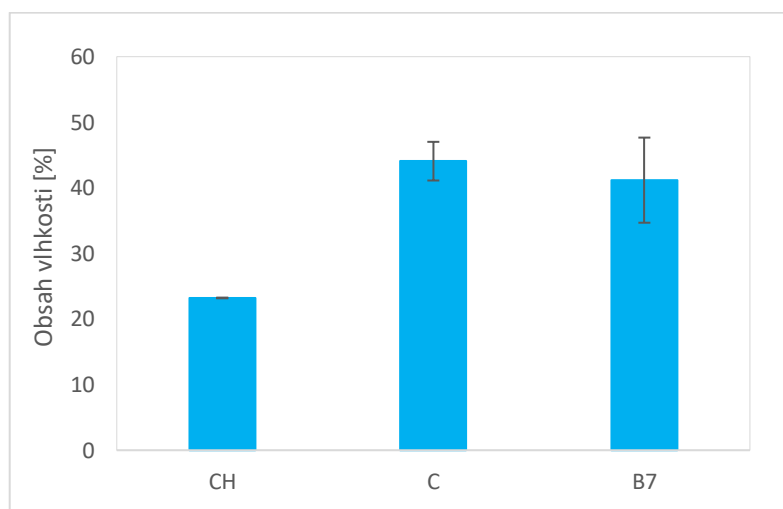
Podmínky uvolňování vitamínu C z chitosanových nanočástic byly zkoumány i ve studii Alishahi a kol. [36]. Jako médium zde byly použity roztoky HCl (0,1 M) a PBS, jako vhodné roztoky pro simulaci prostředí žaludku (1,1 M HCl) a střev (PBS). Pro vyhodnocení množství uvolněného vitamínu byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Výsledky studie potvrdily, že rychlejší uvolňování aktivní látky bylo zaznamenáno při použití média PBS, kdy bylo na konci uvolněno více jak 75 % vitamínu, zatímco v případě média HCl (0,1 M), bylo uvolněné detekované množství téměř o polovinu menší.



Obrázek 33 Závislost kumulativního množství uvolněného vitamínu C na čase

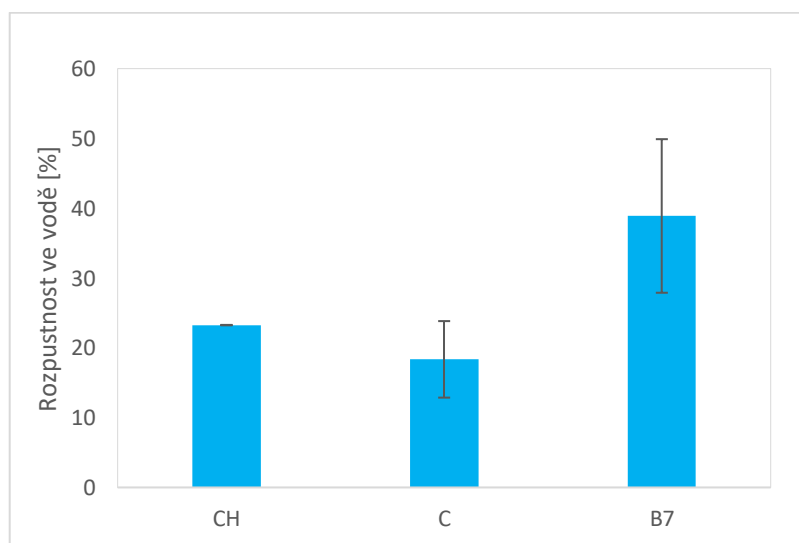
7.2.3 Vlhkost, rozpustnost a propustnost filmů

Vlhkost, rozpustnost i bariérové vlastnosti polymerních filmů mají zásadní význam pro další praktické aplikace, zejména pokud má daný materiál přijít do kontaktu s lidskou pokožkou, jako je to v případě obvazů na hojení ran, nebo i různých kosmetických masek. Na Obrázcích 34 až 36 jsou shrnuty výsledky měření vlhkosti, rozpustnosti ve vodě a bariérových vlastností filmů. Obsah vlhkosti kontrolního chitosanového filmu činil 23 %. Z Obrázku 34 je zřejmé, že po enkapsulaci vitamínů došlo k nárůstu hodnot, a to o 48 % (vitamín C) a 44 % (vitamín B7).



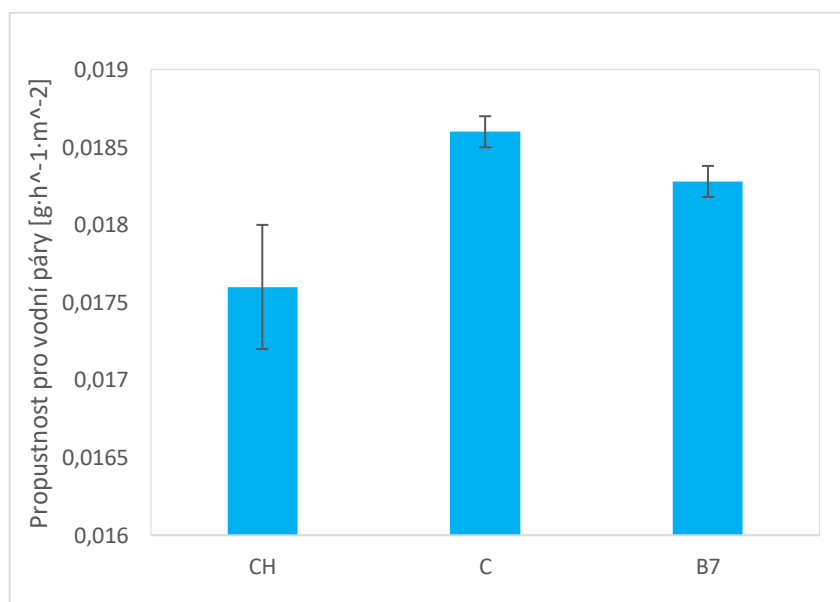
Obrázek 34 Vlhkost filmů

Na Obrázku 35, lze vidět zpracované hodnoty rozpustnosti filmů ve vodě. Je jednoznačné, že nejvyšší rozpustnosti ve vodě (témě 40 %) dosáhl film s obsahem vitamínu B7. Naopak nejmenší rozpustnost (18 %) byla zaznamenána u vzorku s obsahem vitamínu C.



Obrázek 35 Rozpustnost filmů ve vodě

Propustnost pro vodní páry (viz Obrázek 36) byla nejnižší u vzorku samotného chitosanového filmu s hodnotou $0,0176 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Inkorporací enkapsulovaných hydrofilních vitamínů došlo ke zvýšení propustnosti, kdy nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u vzorku s obsahem vitamínu C ($0,0186 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$).



Obrázek 36 Propustnost filmů pro vodní páry

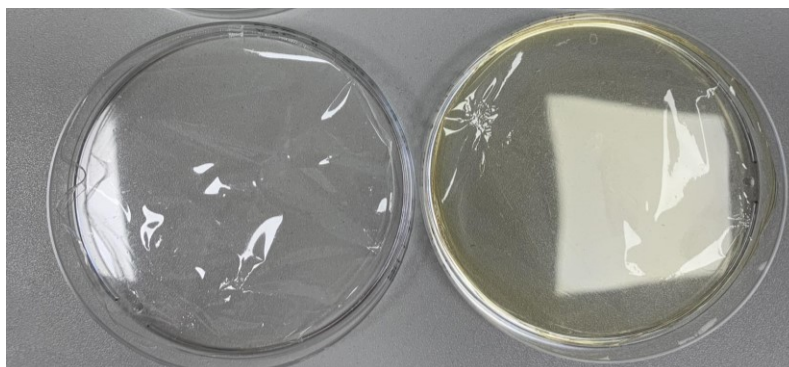
Na základě výsledků měření vlhkosti, rozpustnosti a propustnosti pro vodní páry lze potvrdit, že enkapsulace hydrofilních vitamínů měla vliv na nárůst všech parametrů, což lze, vzhledem k podstatě aktivních látek, očekávat.

Afonso a kol. [37] studovali chitosanové filmy modifikované prostřednictvím různých přírodních antioxidantů a vitamínu C s potenciálem využití pro přípravu kosmetických masek na pleť působících proti známkám stárnutí pleti. Pro chitosanový film byl stanoven obsah vlhkosti 20,36 %, což je srovnatelný výsledek, jako v našem případě (23,22 %). Co se týká propustnosti pro vodní páry, došlo, podobně jako u našich vzorků, k nárůstu tohoto parametru po inkorporaci aktivních látek.

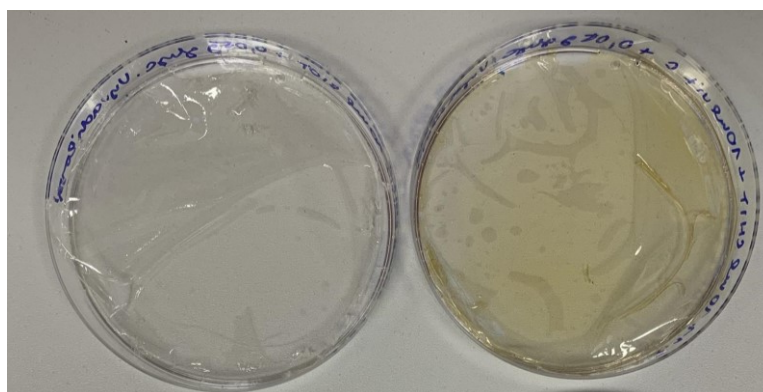
7.2.4 Tahové zkoušky

Mechanické vlastnosti filmů jsou velmi důležité pro praktické aplikace, jelikož udávají odolnost materiálu vůči deformaci vyvolané působením vnějších sil, a tedy i trvanlivost. Při tahových zkouškách lze vyhodnotit maximální zatížení materiálu, které odolá vyvolanému napětí. Za účelem zhodnocení mechanických vlastností našich vzorků byly otestovány filmy bez a s obsahem různého množství glycerolu (0,01 g, 0,05 g a 0,1 g) jako potenciálního plastifikátoru (Obrázek 37 až 39).

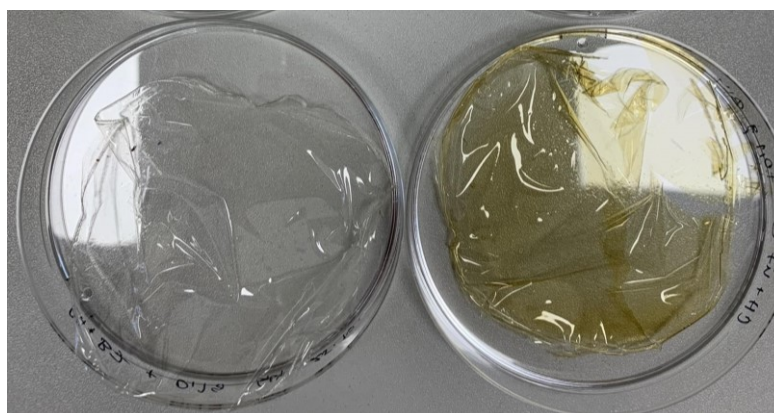
Jak lze vidět z přiložených obrázků, vzorky byly v porovnání s formulací bez obsahu glycerolu (Obrázek 28) lesklejší, měkčí, pružnější, s menší tendencí se trhat. V rámci experimentu byly připraveny i filmy s 0,2 g glycerolu, které ale již byly velmi tažné lepkavé, což znemožnilo provedení mechanických zkoušek, proto nebyly do dalších testů zařazeny.



Obrázek 37 Film CH/B7/GL 0,01 (vlevo); CH/C/GL 0,01 (vpravo)



Obrázek 38 Film CH/B7/GL 0,05 (vlevo), CH/C/GL 0,05 (vpravo)



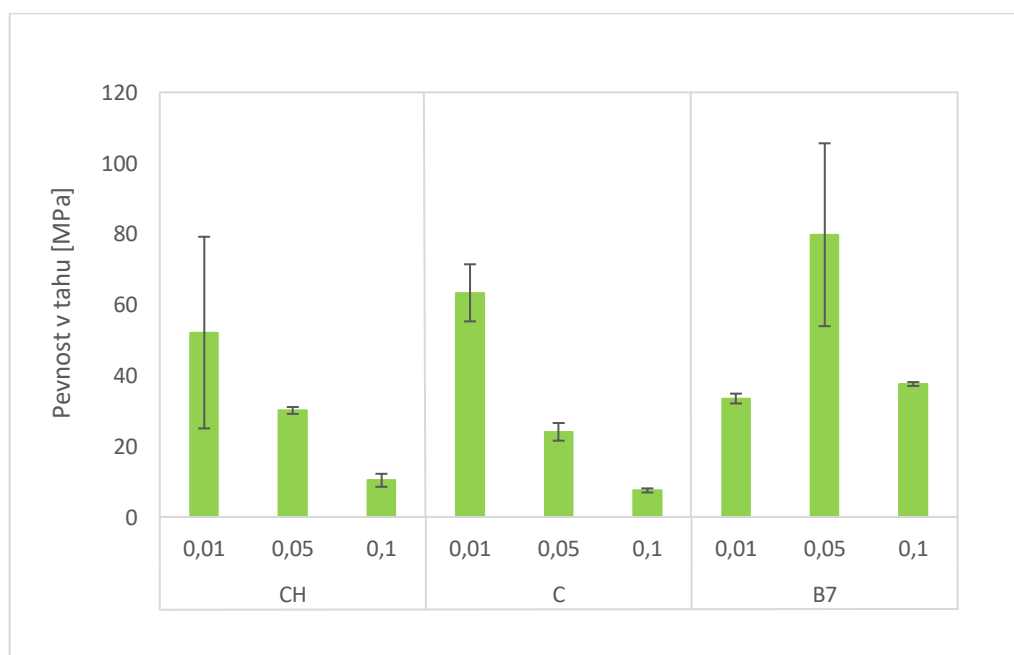
Obrázek 39 Film CH/B7/GL 0,1 (vlevo), CH/C/GL 0,1 (vpravo)

Důležitou roli zde hraje i tloušťka filmů, která je ovlivněna mnoha faktory, jako jsou například fyzikálně-chemické vlastnosti filmotvorného roztoku (velikost částic, hustota, povrchové napětí) [30, 38]. Z Tabulky 7 je patrné, že hodnoty tloušťky se pohybovaly v rozmezí od 0,016 (pro samotný chitosanový film) do 0,041 mm pro vzorek chitosanu s 0,1 g glycerolu bez enkapsulovaného vitamínu. Je také patrné, že tloušťka se zvyšovala s rostoucím přídatkem glycerolu. Podobně ve studii [29], s došlo po inkorporaci vitamínu (konkrétně tokoferol acetátu) do chitosanového filmu ke zvýšení naměřené hodnoty tloušťky, a to o zhruba 40 % [29].

Tabulka 7 Naměřené tloušťky filmů v mm

GL	CH	C	B7
0	0,016 ± 0,003	0,017 ± 0,001	0,017 ± 0,001
0,01	0,033 ± 0,001	0,018 ± 0,003	0,017 ± 0,000
0,05	0,036 ± 0,002	0,019 ± 0,001	0,018 ± 0,001
0,1	0,041 ± 0,001	0,029 ± 0,001	0,026 ± 0,004

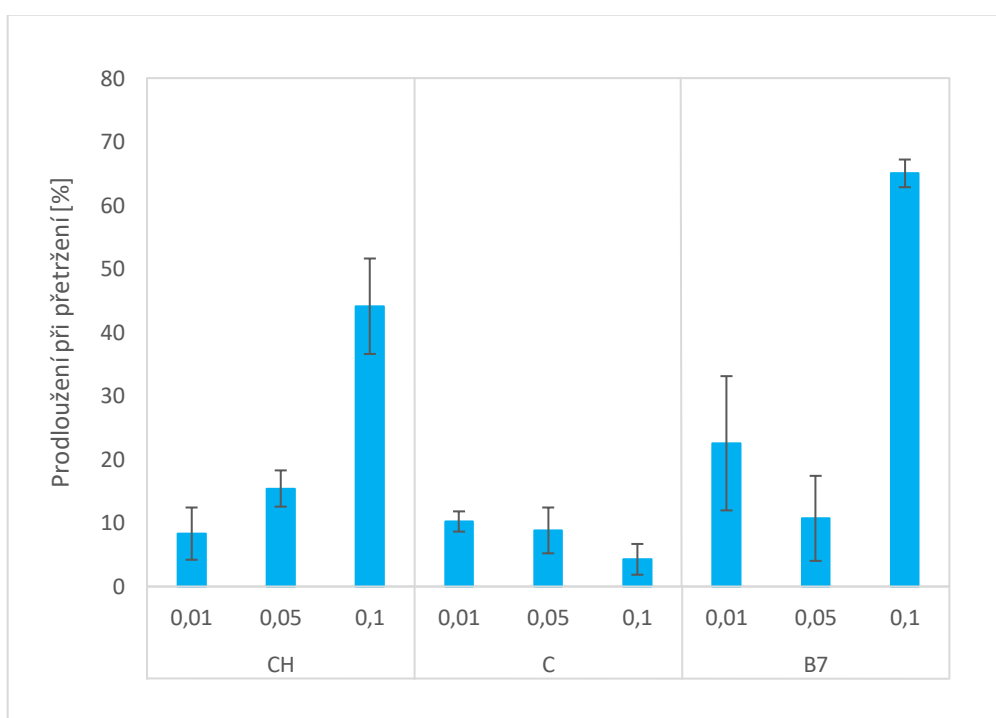
Výsledky měření pevnosti v tahu jednotlivých filmů lze vidět na Obrázku 40. Nejvyšší pevnost (téměř 80 MPa) byla zaznamenána u filmu s vitamínem B7 s obsahem glycerolu 0,05 g. Na druhou stranu nejnižší pevnost 7,49 MPa byla naměřena u vzorku s obsahem vitamínu C a glycerolu 0,1 g. Kromě filmů s obsahem biotinu, lze z výsledků pozorovat snižující se pevnost v tahu se zvyšující se koncentrací glycerolu. Tento trend lze, vzhledem k plastifikačním účinkům glycerolu, očekávat.



Obrázek 40 Naměřené hodnoty pevnosti v tahu filmů

Z Obrázku 41 je zřejmé, že nejvyšších hodnot prodloužení při přetržení bylo dosaženo u filmů s obsahem 0,1 g glycerolu, což bylo možné očekávat, jelikož vyšší množství glycerolu zajistilo filmu větší pružnost a elasticitu. Nejvyšší prodloužení při přetržení (65 %) vykazoval film s obsahem vitamínu B7 a glycerolu 0,1 g. Naopak nejnižší míru elasticity (4 %) vykazoval film s obsahem vitamínu C a glycerolu 0,1 g. Z výsledků je patrné, že přídavek glycerolu měl rozdílný vliv na jednotlivé vzorky. Zatímco v případě kontrolního chitosanového filmu a vzorku s biotinem došlo přidavkem 0,1 g glycerolu ke značnému zvýšení elasticity, tak u filmů s obsahem vitamínu C se tento trend nepotvrdil, a právě naopak zde došlo ke snížení elasticity.

Pokud bychom se zaměřili na vliv konkrétního vitamínu na elasticitu filmu ve srovnání s kontrolním chitosanovým filmem, lze potvrdit vyšší nárůst hodnot v případě biotinu. Výjimkou je vzorek CH/B7/GL 0,05, kde byla naměřena nižší hodnota (necelých 11 %) oproti CH/GL 0,05 (15 %), což je v souladu s výsledky pevnosti v tahu (Obrázek 40).



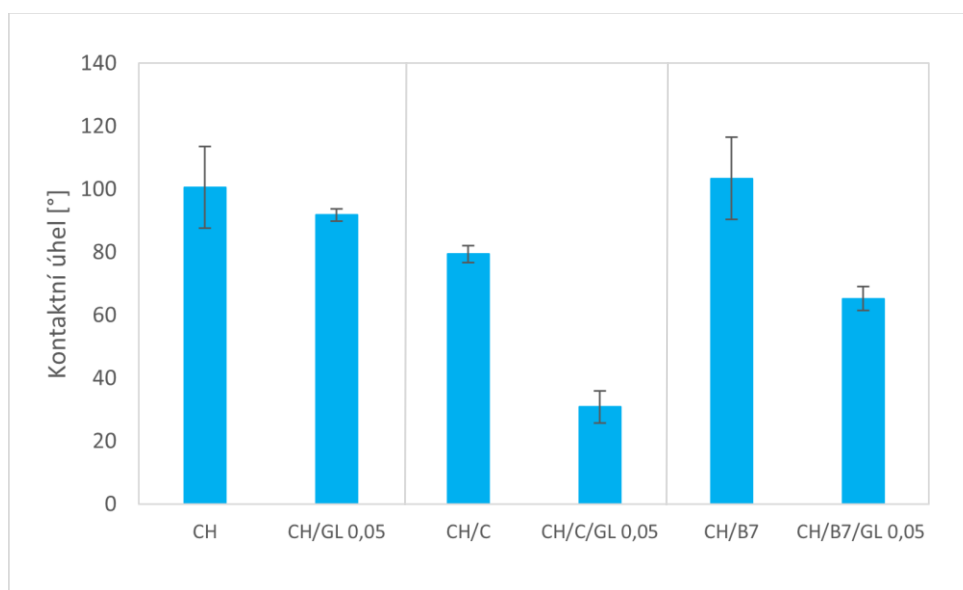
Obrázek 41 Naměřené hodnoty prodloužení při přetržení filmů

V rámci studie Su-il Park a Yanyun Zhao [29], která se zabývala inkorporací vitamínu E či minerálů do chitosanových filmů, byla stanovena jak pevnost filmů, tak prodloužení při přetržení. Hodnoty pevnosti klesaly se zvyšující se koncentrací vitamínu z 8 MPa (pro kontrolní chitosanový film) až na 3,6 MPa. Prodloužení při přetržení se naopak po enkapsulaci mírně zvýšilo (z 81 % na 92 %), v závislosti na konkrétní formulaci. Důvodem může být plastifikační účinek některých malých molekul, které pak snižují kohezní síly ve

struktury filmu. Srovnáním těchto hodnot s výsledky naší práce lze konstatovat, že naše vzorky byly významně pevnější (s nejvyšší naměřenou hodnotou až 80 MPa pro film s obsahem vitamínu B7).

7.2.5 Měření kontaktního úhlu

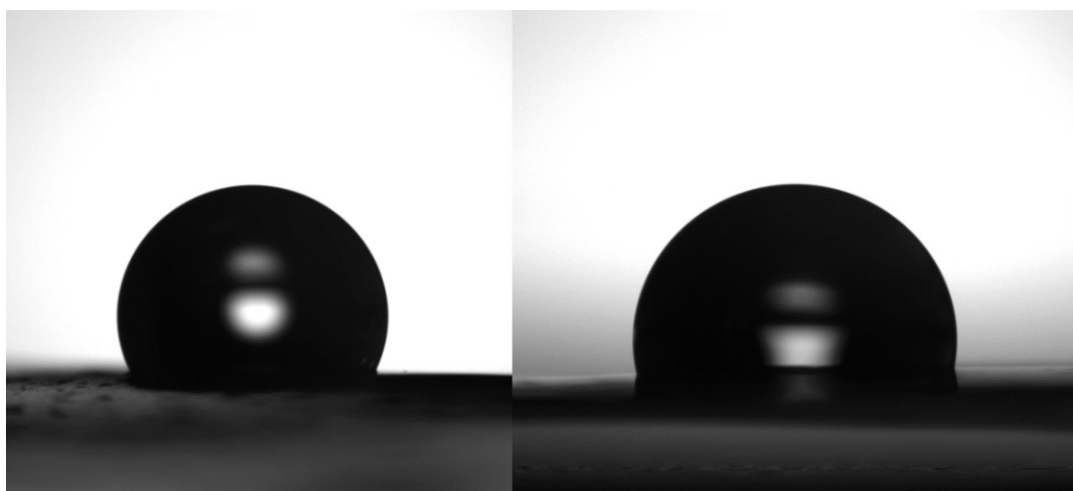
Smáčivost materiálu je důležitým parametrem, souvisejícím s případnou hydrofilitou, resp. hydrofobicitou povrchu. Tyto vlastnosti indikují následné chování materiálu v různých prostředích, či v kontaktu s dalšími látkami. Na Obrázku 42 lze vidět výsledky měření smáčivosti vybraných vzorků filmů, a to bez a s obsahem 0,05 g glycerolu. Na první pohled je patrné, že přidavek glycerolu způsobil významné snížení kontaktního úhlu, tj. zvýšení smáčivosti, přičemž nejvýraznější pokles (o více jak 60 %) byl zaznamenán v případě vzorku s obsahem vitamínu C. Ze získaných výsledků lze usuzovat, že vzorky bez glycerolu vykazují hraniční hodnoty smáčivosti, zatímco přidaný glycerol způsobil posun do oblasti vyšší hydrofility, kdy kontaktní úhly byly menší než 90 °.



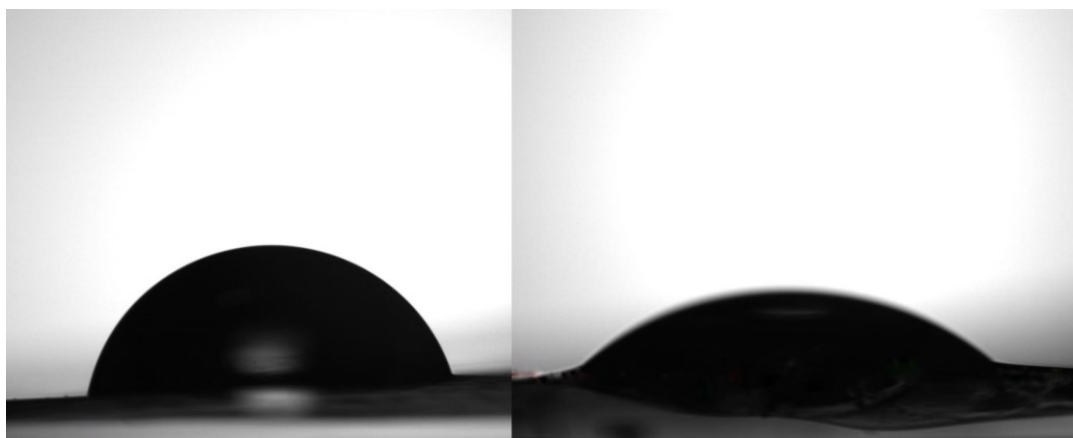
Obrázek 42 Naměřené hodnoty kontaktních úhlů

Získané výsledky jsou doloženy fotografiemi kapek pořízených prostřednictvím analyzátoru kontaktního úhlu Theta (Obrázky 43 až 45). Je známo, že pokud se kapka destilované vody na povrchu filmu spíše rozestře ($\theta < 90$), jedná se o dobrou smáčivost povrchu a povrch filmu je hydrofilní. Druhou variantou je, že se na vzorku vytvoří kapka ($\theta > 90$), která nemá tendenci se roztékat. V tomto případě se jedná o horší smáčivost a film má hydrofobní povahu. Je patrné, že samotný chitosanový film je hůře smáčen, v porovnání s modifikovanými vzorky, jelikož kapka destilované vody na povrchu vzorku drží svůj tvar

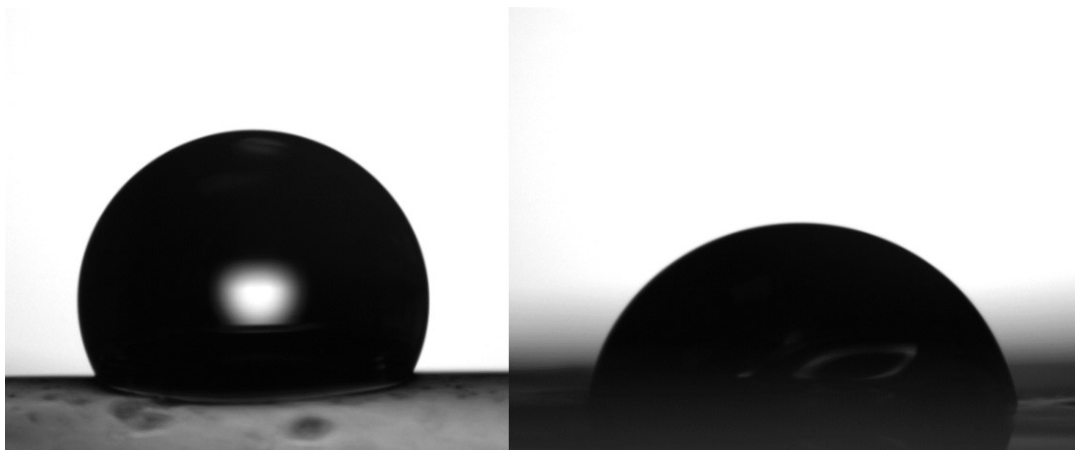
a nemá tendenci se na testovaném povrchu rozprostírat. Z fotografií je také zřejmý vliv glycerolu na větší rozestření kapky na povrchu filmu, a tedy zvýšení hydrofility. V rámci studie [39] byl stanoven kontaktní úhel samotného chitosanového filmu 96,20 °. V našem případě byla hodnota kontrolního chitosanového filmu ještě o něco vyšší. To mohlo být zapříčiněno vyšší (2 hm. %) koncentrací chitosanového roztoku použitého pro přípravu filmu. Ve studii Jiang a kol. [40] byl pro film vyrobený z 1,5%ního roztoku chitosanu stanoven úhel smáčení 61 °. Hodnota úhlu smáčení může být ovlivněna řadou faktorů, kromě zmíněné koncentrace polymerního roztoku i molekulovou hmotností polymeru použitého pro přípravu filmotvorného roztoku.



Obrázek 43 Kapka na vzorku filmu CH (vlevo), CH/GL 0,05 (vpravo)



Obrázek 44 Kapka na vzorku filmu CH/C (vlevo), CH/C/GL 0,05 (vpravo)



Obrázek 45 Kapka na vzorku filmu CH/B7 (vlevo), CH/B7/GL 0,05 (vpravo)

ZÁVĚR

Cílem předložené bakalářské práce bylo ověřit možnosti enkapsulace hydrofilních vitamínů C a B7 do nosičů na bázi chitosanu. Tyto částice byly připraveny ve formě roztoků a následně byly také inkorporovány do matrice biopolymerního filmu.

Částice byly charakterizovány prostřednictvím stanovení průměrné velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu. Větší částice (213 nm) byly prokázány u roztoků s obsahem vitamínu B7. Stanovené pH roztoků obou vitamínů bylo mírně kyselé (3,5) a na základě hodnot zeta potenciálu (okolo +30 mV) lze usuzovat, že se jedná o elektrostaticky stabilní systém s dostatečným nábojem k prevenci agregace částic. U obou systémů byla prokázána antioxidační aktivita s konkrétním úbytkem absorbance 82 % u vzorku s obsahem vitamínu C a 46 % u částic s obsahem biotinu.

Připravené částice s enkapsulovanými vitamíny byly následně inkorporovány do chitosanových filmů. Podobně, jako v případě částic, byla vyšší antioxidační aktivita zjištěna u filmů s enkapsulovaným vitamínem C (66 %), zatímco částice s biotinem prokázaly úbytek absorbance okolo 38 %. Úbytek absorbance u vzorků filmů byl změřen také po inkubaci při vyšší teplotě 70 °C, kdy byl stanovený antioxidační účinek nižší. V testu uvolňování aktivních látek byl potvrzen předpoklad pozvolnějšího uvolňování ze systému s obsahem enkapsulované formy vitamínu C. Konkrétně se na konci testu po 240 hodinách uvolnilo 32 % aktivní látky, zatímco v případě neenkapsulovaného vitamínu C bylo nejvyšší zaznamenané množství na konci testu 41 %.

Dalšími sledovanými vlastnostmi filmů byly vlhkost, rozpustnost a propustnost, přičemž výsledky odhalily celkem očekávaný nárůst všech sledovaných parametrů vlivem enkapsulace hydrofilních vitamínů. Nejvyšší hodnoty vlhkosti byly zaznamenány u filmu s obsahem vitamínu C, a to konkrétně 44 %. Tento vzorek byl také nejvíce propustný pro vodní páry.

Vzorky filmů byly také charakterizovány z hlediska mechanických vlastností. Pro tyto účely byly připraveny i formulace s různým obsahem glycerolu, jako potenciálního plastifikačního činidla. Tahové zkoušky prokázaly nejvyšší pevnost v tahu (téměř 80 MPa) chitosanového filmu s vitamínem B7 a přísadkou glycerolu 0,05 g. Měřením prodloužení filmů při přetržení byl potvrzen nárůst elasticity se zvyšujícím se množstvím glycerolu. Maximální hodnota, konkrétně 65 %, byla naměřena u chitosanového filmu s obsahem vitamínu B7 a přísadkou glycerolu 0,1 g.

Nakonec byl stanoven kontaktní úhel pro destilovanou vodu, za účelem ověření hydrofilicity, respektive hydrofobicity filmů. Vzorky bez obsahu glycerolu vykazovaly poměrně vysoký úhel smáčení, okolo 100°. Na druhou stranu, s přidavkem 0,05 g glycerolu se kontaktní úhel zmenšil až na 31°, v případě filmu s vitamínem C, a došlo tak ke zvýšení smáčivosti.

Závěrem lze říct, že se nám podařilo připravit a charakterizovat nosiče s obsahem hydrofilních vitamínů. Díky jejich enkapsulaci do chitosanových částic bylo dosaženo pomalejšího a postupného uvolňování do prostředí. Potenciální využití by tyto systémy mohly nalézt v oblasti vývoje biomateriálů, aplikovaných například pro rychlejší a snazší hojení ran, případně jako složka kosmetických přípravků pro zpomalení projevů stárnutí pokožky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HLÚBIK, Pavol a OPLTOVÁ, Libuše. *Vitaminy*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0373-4.
- [2] HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie*. 2. přeprac. vyd. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0416-7.
- [3] GROSSHAUSER, Mareike. *Sportovní výživa pro vegetariány a vegany*. Fitness, síla, kondice. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 9788024755274.
- [4] ŠTEFÁNEK, MUDr. Jiří. *Medicína, nemoci, studium na I. LF UK*. Online. ŠTEFÁNEK, MUDr. Jiří. Metabolismus vitamínu D. 2011. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/>. [cit. 2024-03-25].
- [5] ZEMPLENI, Janos. *Handbook of vitamins*. 4th ed. Boca Raton: Taylor & Francis, c2007. ISBN 0-8493-4022-5.
- [6] COMBS, Gerald F. a MCCLUNG, James P. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. Fifth edition. Boston: Elsevier/AP, [2017]. ISBN :978-0-12-802965-7.
- [7] PRAHA: MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR A ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR. *Národní zdravotnický informační portál*. Online. Vitamin B2 (riboflavin). 2024. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/>. [cit. 2024-03-25].
- [8] FAJFROVÁ, Mudr. Jana. Interní medicína. In: FAJFROVÁ, MUDr. Jana. *Vitaminy a jejich funkce v organismu* [online]. 2011 [cit. 2024-03-25]. Dostupné z: <https://internimedica.cz/pdfs/int/2011/12/02.pdf>
- [9] KRAJÍČEK, PharmDr. Milan. *K2 pharm technology*. Online. KRAJÍČEK, PharmDr. Milan. K2 PHARM TECHNOLOGY. Vitamin B6 opět jako léčivo? Dostupné z: <https://www.k2pharm.cz/index.html>. [cit. 2024-03-25].
- [10] SEDLÁČEK, Jindřich. *Vesmír*. Online. SEDLÁČEK, Jindřich. Jak thalidomid působil vrozené vady? 2022. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/>. [cit. 2024-03-25].
- [11] *Informační centrum bezpečnosti potravin*. Online. Kyselina listová. 2024. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/>. [cit. 2024-03-06].
- [12] PRAHA: MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR A ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR. *Národní zdravotnický informační portál*. Online. Perniciózní anémie. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/>. [cit. 2024-03-26].

- [13] MARTINS, Isabel M.; BARREIRO, Maria F.; COELHO, Manuel a RODRIGUES, Alírio E. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. Online. *Chemical Engineering Journal*. 2014, roč. 2014, č. 245, s. 191-200. ISSN 1385-8947. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1385894714001703?via%3Dihub>. [cit. 2024-03-31].
- [14] NEDOVIC, Viktor; KALUSEVIC, Ana; MANOJLOVIC, Verica; LEVIC, Steva a BUGARSKI, Branko. An overview of encapsulation technologies for food applications. Online. *Procedia Food Science*. 2011, roč. 2011, č. 1, s. 1806-1815. ISSN 2211-601X. Dostupné z: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=f9697986013e1f526c274c6f9bb00b6ee2763e80>. [cit. 2024-03-31].
- [15] *SciELO Brazil*. Online. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. 2003. Dostupné z: <https://www.scielo.br/>. [cit. 2024-05-01].
- [16] *Frontiers*. Online. In: MAURYA, Vaibhav Kumar; SHAKYA, Amita; MCCLEMENTS, David Julian; SRINIVASAN, Ramachandran; BASHIR, Khalid et al. Vitamin C fortification: need and recent trends in encapsulation technologies. 2023. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/>. [cit. 2024-04-16].
- [17] ISHIHARA, Masayuki; NAKANISHI, Kuniaki; ONO, Katsuaki; SATO, Masato; KIKUCHI, Makoto et al. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. Online. *Biomaterials*. 2002, roč. 2002, č. 23, s. 833-840. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961201001892?via%3Dihub>. [cit. 2024-05-14].
- [18] DESAI, K. G.; LIU, C. a PARK, H. J. Characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres as affected by chitosan molecular weight. Online. *Journal of Microencapsulation*. 2006, roč. 2006, č. 23(1), s. 79-90. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/02652040500435360?needAccess=true>. [cit. 2024-04-23].
- [19] *Chemical structure of chitosan*. Online. In: ResearchGate. 2021. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-chitosan_fig1_349599098. [cit. 2024-04-23].

- [20] AHSAN, Saad M.; THOMAS, Mathai; REDDY, Kranthi K.; SOORAPARAJU, Sujata Gopal; ASTHANA, Amit et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, roč. 2018, č. 110, s. 97-109. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017318846?via%3Dihub>. [cit. 2024-05-10].
- [21] LIAO, Peilong; DAI, Shicheng; LIAN, Ziteng; TONG, Xiaohong; YANG, Sai et al. The Layered Encapsulation of Vitamin B2 and β -Carotene in Multilayer Alginate/Chitosan Gel Microspheres: Improving the Bioaccessibility of Vitamin B2 and β -Carotene. Online. *Foods*. 2022, roč. 2022, č. 11(1). Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/1/20>. [cit. 2024-05-08].
- [22] DUCHI, Shaheer; TORREGROSA, Paloma Rebollo; HAJUJ, Akram; MOLHO, Danit; SHKOOR, Rawya et al. The formulation and in vitro evaluation of WS Biotin, a novel encapsulated form of D-Biotin with improved water solubility for hair and skin treatment applications. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. 2023, roč. 2023, č. 46, s. 119-129. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ics.12914>. [cit. 2024-05-08].
- [23] ZHU, Li; SONG, Zhimei; FENG, Sijia; XU, Hongmei; CHEN, Shiyu et al. Biotin-modified oligochitosan-F127 micelles for honokiol's encapsulation. Online. *Journal of Nanoparticle Research*. 2021, roč. 2021, č. 23(116). Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-021-05229-x>. [cit. 2024-05-06].
- [24] AKBARI, Neda; ASSADPOUR, Elham; KHARAZMI, Mohammad Saeed a JAFARI, Seid Mahdi. SettingsOrder Article Reprints Open AccessArticle Encapsulation of Vitamin B12 by Complex Coacervation of Whey Protein Concentrate–Pectin; Optimization and Characterization. Online. *Molecules*. 2022, roč. 2022, č. 27(18). Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/18/6130>. [cit. 2024-05-06].
- [25] BAEK, Jiyoo; RAMASAMY, Mohankandhasamy; WILLIS, Natasha Carly; KIM, Dae Sung; ANDERSON, William A. et al. Encapsulation and controlled release of vitamin C in modified cellulose nanocrystal/chitosan nanocapsules. Online. *Current Research in Food Science*. 2021, roč. 2021, č. 4, s. 215-223. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S266592712100023X>. [cit. 2024-05-06].

- [26] ALISHAHI, Alireza; MIRVAGHEFI, Alireza; RAFIEE-TEHRANI, Morteza; FARAHMAND, Hamid; KOSHIO, S. et al. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of tainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Online. *Carbohydrate Polymers*. 2011, roč. 2011, č. 86(1), s. 143-146. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/233923577_Chitosan_nanoparticle_to_carry_vitamin_C_through_the_gastrointestinal_tract_and_induce_the_non-specific_immunity_system_of_tainbow_trout_Oncorhynchus_mykiss. [cit. 2024-05-12].
- [27] DONG, Fangyuan a WANG, Yi. *SciForschen: Encapsulation of Vitamin C by A Double Layer Zein/Chitosan Structure with Improved Stability and Controlled Release*. Online. In: *SciForschen*. 2016. Dostupné z: <https://sciforschenonline.org/index.php>. [cit. 2024-04-15].
- [28] *Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials: ASTM E96 - 95*. -. West Conshohocken, USA: ASTM International, 2016.
- [29] SU-IL, Park a YANYUN, Zhao. Incorporation of a High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, roč. 2004, č. 52, s. 1933 - 1939. ISSN 00218561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf034612p>. [cit. 2024-04-22].
- [30] *Microtrac*. Online. MĚŘENÍ ZETA POTENCIÁLU. Dostupné z: <https://www.microtrac.cz/>. [cit. 2024-04-23].
- [31] HAMADOU, Alkassoumi Hassane; HUANG, Wen-Can; XUE, Changhu a MAO, Xiangzhao. Formulation of vitamin C encapsulation in marine phospholipids nanoliposomes: Characterization and stability evaluation during long term storage. Online. *LWT - Food Science and Technology*. 2020, roč. 2020, č. 127. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364382030428X?casa_to_ken=7lNrBdEgTNsAAAAA:N9ZQ-IDd3ttPOhatvgfK185xAv5Qjk-Tj8k36_fdQ0JCHgRRrE6jP1ul3OwAUWx2dqImXUgnFiHm. [cit. 2024-04-24].
- [32] ARESTA, Antonella; CALVANO, Cosima Damiana; TRAPANI, Adriana; CELLAMARE, Saverio; ZAMBONIN, Carlo Giorgio et al. Development and analytical characterization of vitamin(s)-loaded chitosan nanoparticles for potential food packaging applications. Online. *Journal of Nanoparticle Research*. 2013, roč. 2013, č. 15. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-013-1592-7>. [cit. 2024-05-02].

- [33] LIU, Xin; WANG, Peng; ZOU, Xu-Xiao; LUO, Zhi-Gang a TAMER, Tamer Mahmoud. Co-encapsulation of Vitamin C and β -Carotene in liposomes: Storage stability, antioxidant activity, and in vitro gastrointestinal digestion. Online. *Food Research International*. 2020, roč. 2020, č. 136. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920306128?via%3Dihub>. [cit. 2024-05-02].
- [34] GENG, Mengjie; FENG, Xumei; WU, Xixi; TAN, Xiangyun; LIU, Zengnan et al. Encapsulating vitamins C and E using food-grade soy protein isolate and pectin particles as carrier: Insights on the vitamin additive antioxidant effects. Online. *Food Chemistry*. 2023, roč. 2023, č. 418. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814623005721?casa_token=Ycz5Zh_t9v0AAAAA:5TFXsYKkI-s274g_erYjDnkDSNbTeuNWEnZ23Nt0rgjyFgy-sHz7fjkn7vkmV2J0EJKTa4EDJuCZ. [cit. 2024-04-24].
- [35] AZEVEDO, Maria A.; BOURBON, Ana I.; VICENTE, António A. a CERQUEIRA, Muguel A. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, roč. 2014, č. 71, s. 141-146. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813014003328?casa_token=vzAcfPPWrhAAAAA:P-eVuSsohSpNMuUqU0G3kUZSy8zgZr_PUIkspVx4ny2XyrRtny_GKXXgITHesJnQVckUpqz5RDbt. [cit. 2024-04-24].
- [36] ALISHAHI, A.; MIRVAGHEFI, A.; TEHRANI, M. R.; FARAHMAND, H.; SHOJAOSADATI, S. A. et al. Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. Online. *Food Chemistry*. 2011, roč. 2011, č. 126(3), s. 935-940. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610015049?casa_token=0Vr1FFd4MRwAAAAA:vRSqHkyQm2siXLLmugYU6oNUoC_lgmmpER7rqv0bJQXDVIjlaaCCHrxMqURoyXZfZ84USULqvUHI. [cit. 2024-04-24].
- [37] AFONSO, C. R.; HIRANO, R. S.; GASPAR, A. L.; CHAGAS, E. G. L.; CARVALHO, R. A. et al. Biodegradable antioxidant chitosan films useful as an anti-aging skin mask. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, roč. 2019, č. 132, s. 1262-1273. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018365693?casa_token

- en=wWKTJt_oodAAAAAA:LBuNsiNTIC_h5QCGXmz7IQ5MIu42Npm-H-8J0Cw7cyXvfubluNDqXuesZP_LrJHKS1BmHYAkPStt. [cit. 2024-05-05].
- [38] MIRZAEI-MOHKAM, Ali; GARAVAND, Farhad; DEHNAD, Danial; KERAMAT, Javad a NASIRPOUR, Ali. Physical, mechanical, thermal and structural characteristics of nanoencapsulated vitamin E loaded carboxymethyl cellulose films. Online. *Progress in Organic Coatings*. 2020, roč. 2020, č. 138. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300944019308860?casa_token=1jE19MQ0SB8AAAAA:aXOB_XQ1-Ewv4Az6uG4USL_1Mzta3_u6TPhrhFQ92IguIcP2GuHr_v26Soz-61TqXBgDDTW9vN2o. [cit. 2024-05-14].
- [39] LUO, Yuqiong; PAN, Xingqiang; LING, Yunzhi; WANG, Xiaoying a SUN, Runcang. Facile fabrication of chitosan active film with xylan via direct immersion. Online. *Cellulose*. 2014, roč. 2014, č. 21, s. 1873–1883. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-013-0156-4>. [cit. 2024-05-14].
- [40] JIANG, Yongli; YIN, Hao; ZHOU, Xuefu; WANG, Danfeng; ZHONG, Yu et al. Antimicrobial, antioxidant and physical properties of chitosan film containing Akebia trifoliata (Thunb.) Koidz. peel extract/montmorillonite and its application. Online. *Food Chemistry*. 2021, roč. 2021, č. 361. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621011171?casa_token=npvh2nr3MLcAAAAA:IUudr8Z_VeMLDl2X7I6mNxv3hVjnLB8jZIJgzvOxM MH7ewB3RIISqzHBqWH0OkGeNb2ZFUQnpCqf. [cit. 2024-05-14].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

B7 Vitamín B7, Biotin

C Vitamín C

CH Chitosan

DPPH 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

FAD Flavin-adenin-dinukleotid

FMN Flavin-mononukleotid

GL Glycerol

M_n Číselný průměr molekulové hmotnosti

M_w Hmotnostní průměr molekulové hmotnosti

NAD Nikotinamidadenindinukleotid

NADP Nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NC Neenkapsulovaný vitamín C

PDI Index polydisperzity

STTP Sodium Tripolyfosfát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Chemická struktura kyseliny askorbové [6]	14
Obrázek 2 Chemická struktura kyseliny dehydroaskorbové [6].....	15
Obrázek 3 Chemická struktura tiamin [5]	17
Obrázek 4 Číslování uhlíků struktury tiaminu [5]	17
Obrázek 5 Chemická struktura riboflavinu [5]	19
Obrázek 6 Chemická struktura flavin-mononukleotidu (FMN) [5].....	19
Obrázek 7 Chemická struktura flavin-adenin-dinukleotidu (FAD) [5].....	19
Obrázek 8 Chemická struktura niacinu [5].....	21
Obrázek 9 Chemická struktura nikotinamidu [5].....	21
Obrázek 10 Projev onemocnění pelagra [6]	22
Obrázek 11 Chemická struktura kyseliny pantotenové [5]	23
Obrázek 12 Chemická struktura koenzymu A obsahující pantotenovou kyselinu [5].....	23
Obrázek 13 Chemická struktura látek: pyridoxal (vlevo), pyridoxamin (uprostřed), pyridoxin (vpravo) [5]	24
Obrázek 14 Chemická struktura biotinu [5]	26
Obrázek 15 Chemická struktura kyseliny listové [5]	27
Obrázek 16 Chemická struktura kobalaminu [5]	28
Obrázek 17 Struktura enkapsulované částice	30
Obrázek 18 Morfologie enkapsulovaných systému A) rezervoár, B) dvojvrstvá, C) matrix, D) polynukleární [upraveno dle 13].....	31
Obrázek 19 Chemická struktura chitosanu [19].....	32
Obrázek 20 Vzorky vitamínu C (vlevo) a B7 (vpravo).....	39
Obrázek 21 Vzorky filmů připravené pro test uvolňování	42
Obrázek 22 Testovací kelímek se vzorkem filmu s vitamínem C	43
Obrázek 23 Exsikátor s testovacím kelímkem se vzorkem	44
Obrázek 24 Test rozpustnosti.....	45
Obrázek 25 Naměřené hodnoty velikosti částic.....	47
Obrázek 26 Naměřené hodnoty zeta potenciálu	48
Obrázek 27 Vzorek vitamínu B7 (vlevo) a vitamínu C (vpravo) po 30 minutách inkubace	49
Obrázek 28 Film CH/B7 (vlevo), CH/C (vpravo).....	50
Obrázek 29 Antioxidační aktivita filmů	51
Obrázek 30 Kalibrační přímka vitamínu C.....	51
Obrázek 31 Srovnání vzorků filmů s vitamínem C: enkapsulovaným (vlevo) a neenkapsulovaným (vpravo).....	52

Obrázek 32 Vzorčky filmů po testu uvolňování: enkapsulovaný vitamín C (vlevo), neenkapsulovaný vitamín C (vpravo).....	52
Obrázek 33 Závislost kumulativního množství uvolněného vitamínu C na čase	53
Obrázek 34 Vlhkost filmů	54
Obrázek 35 Rozpustnost filmů ve vodě.....	54
Obrázek 36 Propustnost filmů pro vodní páry	55
Obrázek 37 Film CH/B7/GL 0,01 (vlevo); CH/C/GL 0,01 (vpravo).....	56
Obrázek 38 Film CH/B7/GL 0,05 (vlevo), CH/C/GL 0,05 (vpravo).....	56
Obrázek 39 Film CH/B7/GL 0,1 (vlevo), CH/C/GL 0,1 (vpravo).....	56
Obrázek 40 Naměřené hodnoty pevnosti v tahu filmů.....	57
Obrázek 41 Naměřené hodnoty prodloužení při přetržení filmů	58
Obrázek 42 Naměřené hodnoty kontaktních úhlů.....	59
Obrázek 43 Kapka na vzorku filmu CH (vlevo), CH/GL 0,05 (vpravo).....	60
Obrázek 44 Kapka na vzorku filmu CH/C (vlevo), CH/C/GL 0,05 (vpravo)	60
Obrázek 45 Kapka na vzorku filmu CH/B7 (vlevo), CH/B7/GL 0,05 (vpravo)	61

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Rozdělení vitamínů.....	13
Tabulka 2 Množství vitamínu C ve vybraném ovoci [5].....	15
Tabulka 3 Množství vitamínu C ve vybrané zelenině [5]	16
Tabulka 4 Složení roztoků pro přípravu filmů.....	40
Tabulka 5 Naměřené hodnoty velikosti částic, PDI a zeta potenciálu pro prázdné částice	48
Tabulka 6 Procentuální úbytek absorbance	49
Tabulka 7 Naměřené tloušťky filmů v mm	57

