



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE POTRAVIN A DOPLŇKŮ STRAVY S OBSAHEM VYBRANÝCH VITAMÍNŮ

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF FOODS AND FOOD SUPPLEMENTS CONTAINING
SELECTED VITAMINS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucie Krupičková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1646/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Lucie Krupičková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Příprava a charakterizace potravin a doplňků stravy s obsahem vybraných vitamínů

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Optimalizace metod pro stanovení vybraných vitamínů a aktivních látek
- 3) Příprava a charakterizace funkčních potravin a doplňků stravy s obsahem vybraných vitamínů
- 4) Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Lucie Krupičková
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Předložená bakalářská práce se zabývá přípravou vhodné chráněné formy vitamínů k aplikaci do potravin a doplňků stravy. Teoretická část je nejprve zaměřena na charakteristiku vitamínů a jejich důležitost v lidském organismu. Jsou zde také shrnuty různé metody stanovení vitamínů rozpustných ve vodě a problematika enkapsulace do liposomů. Poslední kapitoly se věnují funkčním potravinám a doplňkům stravy dostupným na českém trhu.

V rámci experimentální části byla provedena optimalizace metody stanovení vitamínů. Byly charakterizovány připravené liposomy z hlediska jejich velikosti, stability a enkapsulační účinnosti. Byla sledována také dlouhodobá stabilita a enkapsulační účinnost připravených částic v období 14 dnů. Všechny připravené liposomy byly v těchto ohledech shledány za dostatečně stabilní. Dále byly provedeny experimenty modelového trávení, kterým byly podrobeny roztoky vitamínů, liposomy a lyofilizované liposomy. V průběhu trávení došlo k degradaci nechráněných forem vitamínů. Připravené liposomy a lyofilizované částice vykazovaly postupné uvolňování aktivních látek do trávicích šťáv. Byla provedena také analýza funkčních potravin a potravinových doplňků na základě obsahu vitamínů deklarovaných výrobcem. Na závěr byly z dosažených výsledků vytvořeny aplikace chráněné formy vitamínů do potravin a doplňků stravy.

Klíčová slova

vitamíny, liposomy, funkční potraviny, doplňky stravy, enkapsulace, lyofilizace

Abstract

The thesis is focused on preparation of protected form of vitamins for application to food and dietary supplements. The theoretical part characterizes vitamins and describes their role in human organism. Furthermore, this chapter summarizes different methods of determination vitamins soluble in water and encapsulation of substances into liposomes. The last sections are focused on functional foods and dietary supplements.

In experimental part, an optimization of determination method was made. Selected vitamins were encapsulated into liposomes. Size, stability, encapsulation efficiency, long-term stability and long-term encapsulation efficiency after two weeks was determined there. All prepared liposomes were found to be stable enough. Furthermore, the vitamin solutions, liposomes and lyophilized particles were analyzed during the process of model digestion. The active forms of vitamins were degraded during the model digestion of vitamin solutions. Vitamins were gradually released from the liposomes and lyophilized particles into the digestive juice. The analysis of content declared by producer was executed for functional foods and dietary supplements. Finally, applications of protected form of vitamins into the food and dietary supplements were created.

Key words

vitamins, liposomes, functional foods, dietary supplements, encapsulation, lyophilization

KRUPÍČKOVÁ, Lucie. *Příprava a charakterizace potravin a doplňků stravy s obsahem vybraných vitamínů* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-12]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131451>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petra Matoušková.

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Stejně tak i konzultantce Ing. Agátě Bendové za trpělivost, vstřícnost a příjemnou atmosféru v laboratoři.

Dále bych ráda poděkovala své rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia. V neposlední řadě patří dík mému příteli Petrovi, který mi byl velkou oporou.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část	9
2.1	Vitamíny a jejich biologická funkce.....	9
2.1.1	Vitamíny rozpustné v tucích	10
2.1.2	Vitamíny rozpustné ve vodě	13
2.2	Enkapsulace	21
2.2.1	Využití liposomů.....	22
2.3	Metody stanovení vitamínů	22
2.3.1	Spektrofotometrické stanovení	22
2.3.2	Chromatografické stanovení (GC, LC, HPLC).....	23
2.3.3	Elektroforetické stanovení	23
2.3.4	Mikrobiologické stanovení	24
2.3.5	Titrační stanovení.....	24
2.3.6	Elektrochemické stanovení	24
2.4	Fortifikované potraviny	24
2.4.1	Historie fortifikace	25
2.4.2	Metoda food-to-food fortifikace	26
2.4.3	Fortifikace kyselinou listovou.....	26
2.4.4	Fortifikace vitamínem B ₁₂	26
2.4.5	Fortifikace tiaminem, riboflavinem, niacinem a vitamínem B ₆	26
2.4.6	Fortifikace vitamínem C	26
2.5	Doplňky stravy.....	26
2.6	Fortifikované potraviny a doplňky stravy dostupné na českém trhu	28
3	Cíle práce	30
4	Experimentální část.....	31
4.1	Použité přístroje a pomůcky	31
4.2	Použité chemikálie.....	31
4.3	Použité funkční potraviny a doplňky stravy	32
4.3.1	Nestlé CINI MINIS ®.....	32
4.3.2	ManaPowder™ Origin	32
4.3.3	Generica ® B-komplex forte.....	33

4.4	Příprava kalibračních roztoků.....	33
4.5	Nastavení parametrů HPLC při stanovení vybraných vitamínů	33
4.6	Příprava liposomů.....	33
4.7	Charakterizace připravených liposomů	33
4.7.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	33
4.7.2	Stanovení velikosti a distribuce liposomů	34
4.7.3	Stanovení stability liposomů.....	35
4.7.4	Sledování dlouhodobé stability částic.....	35
4.7.5	Sledování dlouhodobé enkapsulační účinnosti	35
4.8	Příprava lyofilizovaných liposomů.....	35
4.9	Modelové trávení	35
4.9.1	Žaludeční šťáva.....	35
4.9.2	Pankreatická šťáva	36
4.9.3	Žlučová šťáva.....	36
4.10	Charakterizace funkčních potravin	36
4.11	Charakterizace vitamínových doplňků stravy	36
5	Výsledky a diskuze	37
5.1	Optimalizace metody HPLC pro vybrané vitamíny	37
5.2	Stanovení koncentrace vitamínů ve vzorcích	42
5.3	Charakterizace připravených liposomů	42
5.3.1	Stanovení velikosti částic.....	42
5.3.2	Sledování stability liposomů.....	45
5.3.3	Stanovení průměrné enkapsulační účinnosti liposomů.....	47
5.3.4	Sledování dlouhodobé enkapsulační účinnosti	48
5.4	Modelové trávení	49
5.5	Charakterizace funkčních potravin a doplňků stravy s obsahem přidaných vitamínů 53	
5.6	Aplikace chráněné formy vitamínů do potravin a doplňků stravy.....	53
6	Závěr	54
7	Zdroje	55
8	Seznam použitých zkratk.....	60
9	Přílohy	61

1 ÚVOD

V dnešní uspěchané době se často léčí příznaky nemocí namísto jejich příčin. Velké řadě chorob by se však lidé mohli vyvarovat, kdyby jejich strava byla vyvážená a obsahovala všechny potřebné prvky. Absence životně důležitých složek, které si lidský organismus neumí sám obstarat, může vyvolat určité nemoci. Mezi takovéto látky patří vitamíny, které musejí být přijímány v přirozené stravě. Přestože jsou tyto složky nepostradatelné pro správnou funkci organismu, množství doporučené denní dávky se pohybuje v řádech μg . Jedná se o velice citlivé látky, které mohou být lehce degradovány nesprávným skladováním nebo úpravou během přípravy pokrmů. Jejich velká část patří mezi antioxidanty, které se vyznačují působením proti volným kyslíkovým radikálům, které pro nás mohou být toxické.

Ve společnosti se ovšem vyskytují jedinci, kteří například ze zdravotních či jiných důvodů nemohou přijímat celou škálu důležitých látek. Například vitamín B₁₂ je obsažen převážně v živočišných potravinách, a to je problém pro vegetariány a vegany, kteří tuto složku ve svých jídelnících nemají. Aby ale byla zajištěna správná funkce organismu je možné v těchto případech užívat doplňky stravy. Proto bývají výrobky určeny pro vegetariány obohaceny o vitamín B₁₂ nebo D. Na trhu jsou běžně dostupné produkty určené dětem i dospělým. Je však třeba brát v potaz, že vitamínové doplňky jsou tvořeny ze synteticky připravovaných živin, které se svým složením nikdy nebudou rovnat látkám obsaženým v reálných potravinách.

Cílem této práce je připravit doplňky stravy a funkční potraviny obohacené o tyto lehce degradovatelné složky. V rámci přípravy stabilnější formy vitamínů jsou využity liposomy a metody lyofilizace, což vede k ochraně vitamínů před nepříznivými vlivy okolí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vitamíny a jejich biologická funkce

Vitamíny jsou organické sloučeniny, které si naše tělo nedokáže vytvořit (kromě vitamínů D a B₃), a proto mu musejí být dodávány. Mají řadu důležitých funkcí, kterými zabezpečují správný chod organismu. Při představě, že naše tělo funguje jako spalovací motor, by se vitamíny daly chápat jako zapalovací svíčka. Mezi jejich významné vlastnosti patří katalytický účinek při látkových přeměnách nebo antioxidační působení. Antioxidanty jsou látky, které chrání tělo před volnými radikály, které by mohly vyvolat nekontrolovatelnou oxidaci a poškodit tak rozmnožování buněk. Radikály vznikají jako vedlejší nežádoucí produkt metabolismu v důsledku stresových situací, pylovým nebo toxickým znečištěním vzduchu, kouřením, alkoholem, přirozenými pochody spojenými se stárnutím nebo i vyčerpávající tělesnou prací. Sloučeniny, ze kterých se vitamíny tvoří, se nazývají provitamíny [1] [2]. Látky patřící mezi vitamíny se liší v závislosti na organismu. Vypovídá o tom například kyselina askorbová, která je esenciální pouze pro člověka, primáty a morče [2].

Chemické struktury vitamínů jsou velice různorodé, proto se nedá říct, že by v tomto ohledu mezi nimi byla nějaká spojitost. Lze je ovšem klasifikovat podle prostředí, ve kterém jsou rozpustné tedy na lipofilní a hydrofilní [2].

Při nedostatečném příjmu vitamínů může dojít k hypovitaminóze nebo k avitaminóze. Hypovitaminóza je chápána jako částečný nedostatek vitamínu. Avitaminóza představuje jejich absolutní nedostatek. Takovéto stavy se projevují poruchami funkcí organismu a mohou vést až k závažným onemocněním. Mezi nejčastější příčiny patří nedostatečný příjem vitamínu v potravě. K hypovitaminóze může také dojít v důsledku poškozené resorpce zažívacího traktu. Účinky vitamínů snižují antivitamíny, které působí proti jejich základním funkcím. Příznaky, které jsou vyvolány přítomností těchto antinutričních faktorů, jsou velice podobné těm, kterými trpíme při nedostatečném příjmu daných esenciálních látek [3].

Vitamíny jsou velice citlivé na fyzikální i chemické vlivy. Vyznačují se tím, že žádný z nich není v potravě kompletně stabilní. Faktory, které ovlivňují jejich stabilitu, se liší v závislosti na druhu vitamínu. Mezi nejdůležitější faktory patří teplota, kyslík, pH, světlo a vlhkost. K poškození může dojít přirozeně během skladování ovoce a zeleniny. Ke ztrátám biologické funkce dochází často při zpracování potravin, především jedná-li se o tepelnou úpravu. Faktory ovlivňující stabilitu jsou stejné jak pro vitamíny, které se v potravinách vyskytují přirozeně, tak pro vitamíny, které jsou do potravin přidány uměle. Ovlivnit můžeme formu, ve které látky do jídla přidáváme. Například estery vitamínu E jsou více stabilní než jeho tokoferolová forma. Zároveň lze využít enkapsulaci, která dané složky chrání před jejich poškozením [4].

Na konci 19. století byly mezi základní prvky výživy zahrnuty pouze sacharidy, tuky, bílkoviny a minerály. Za původce onemocnění byly tenkrát pokládány infekční organismy nebo toxiny, které byly těmito organismy produkovány. Výzkumy dokázaly identifikovat organismy, které byly zodpovědné za malárii, tuberkulózu, cholera a malomocenství, ale původci nemocí jako kurděje, beriberi nebo křivice byli stále záhadou. Gerrit Grijns a Christiaan Eijkman jako první zaznamenali u kuřat výskyt obdobné nemoci beriberi. Společně tedy dospěli k závěru, že nemoc je způsobena nedostatkem důležité složky ve stravě. Tyto vědecké příspěvky byly ovšem širší veřejností přehlíženy pravděpodobně z toho důvodu, že byly publikovány v holandštině. V roce 1906 Frederick Gowland Hopkins zformuloval dnes známou „vitamínovou teorii“, kde

tvrdil, že žádný člověk nebo zvíře nemůže žít na směsi čistých proteinů, tuků a sacharidů. V roce 1912 Hopkins dokázal, že mladé krysy, které byly krmeny bazální dávkou bílkovin, škrobu, třetinového cukru, sádla a minerálů, nerostly správně. Po přidání malého množství mléka, už ale měly růst normální. Neznámé faktory, které byly obsaženy v mléce, se zde vyskytovaly v neuvěřitelně malém množství a byly Hopkinsem označeny jako doplňkové faktory. V roce 1912 navrhl Casimir Funk nový termín a to „vitamíny“ [5].

2.1.1 Vitamíny rozpustné v tucích

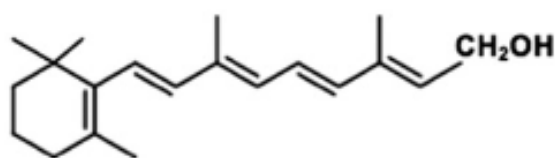
Do této skupiny patří látky nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v tucích a olejích. Mezi vitamíny rozpustné v tucích se řadí A, D, E a K. Vitamíny A, K a E jsou terpeny a vitamín D je steroid. Ukládají se v játrech a tukových tkáních. Z tohoto důvodu může mít několikanásobné překročení doporučené denní dávky i toxické účinky. V takovém případě se hovoří o hypervitaminóze [6] [7].

2.1.1.1 Vitamín A

Je pokládán za první objevený vitamín známý také pod jménem retinol. Z potravy je získáván přímo nebo jako provitamin β -karoten, ze kterého pak ve střevech působením hydrolyzy vznikají dvě molekuly retinolu. Nejvíce je obsažen v rybím tuku, vnitřnostech, másle, sýrech a v mléce. Provitamíny se vyskytují převážně v rostlinných materiálech, ale jsou obsaženy také v materiálech živočišných. Najdeme je třeba v mrkvi, paprice, rajčatech, špenátu, meruňkách a broskvích [1] [2] [8].

Je nepostradatelný pro diferenciaci a růst pohlavních buněk a pro vývoj plodu. Podílí se také na syntéze bílkovin, nukleových kyselin a lipoproteinů. Sloučenina 11-cis-retinal je součástí očního purpuru a umožňuje adaptaci vidění za šera. Při nedostatečném příjmu vitamínu dochází ke ztrátě vidění za tmy. Dlouhodobý nedostatek může vést až k úplnému oslepnutí [2] [8].

Hypervitaminóza se projevuje žloutnutím kůže, ztrátou vlasů, šupinatíci se kůží, bolestmi hlavy, poruchami zraku, zvracením a průjmy. Při předávkování dětí dochází k uzavření epifýzy, což vede k zastavení růstu [2] [8].



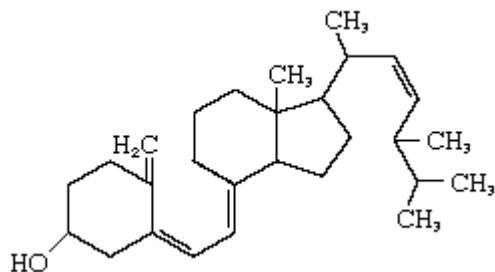
Obrázek 1: Chemická struktura vitamínu A

2.1.1.2 Vitamín D

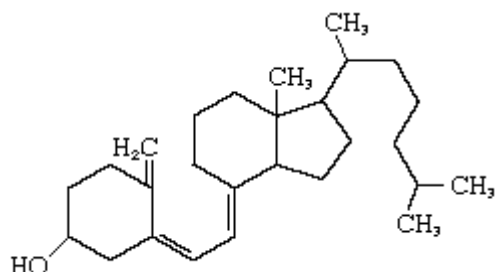
Jedná se o skupinu steroidních látek, mezi které patří ergokalciferol – D₂ a cholekalciferol – D₃. Je obsažen v játrech, rybím tuku, vaječných žloutcích, kokosovém másle a houbách. Lidské tělo je schopno samo syntetizovat vitamín D z jeho provitaminu ergosterolu a 7-dehydrocholesterolu po ozáření ultrafialovým světlem. Jeho nejdůležitější funkcí je udržení homeostázy vápníku a fosforu v těle [1] [2] [8].

Nedostatek vede k rachitidě rostoucích organismů, lámavosti kostí, poruchám chrupu a snížené obranyschopnosti. Se zvyšujícím se věkem se snižuje schopnost syntézy vitamínu D ze světla a dochází tak k degradaci kostí [2] [8].

K předávkování nemůže dojít přílišným pobytem na slunci, ale vysokým příjmem z potravy nebo z výživových doplňků. Hypervitaminózu doprovází zvracení, bolesti hlavy, zmatenost, křeče a žíznivost. Zvýšené množství vitamínu D v těle vede k zvýšené absorpci vápníku, což může mít za následek porušení orgánů [1] [2] [8].



Obrázek 2: Chemická struktura vitamínu D₂ [9]



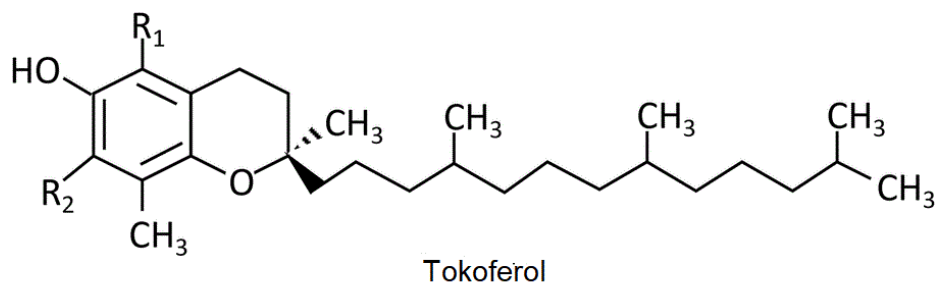
Obrázek 3: Chemická struktura vitamínu D₃ [9]

2.1.1.3 Vitamín E

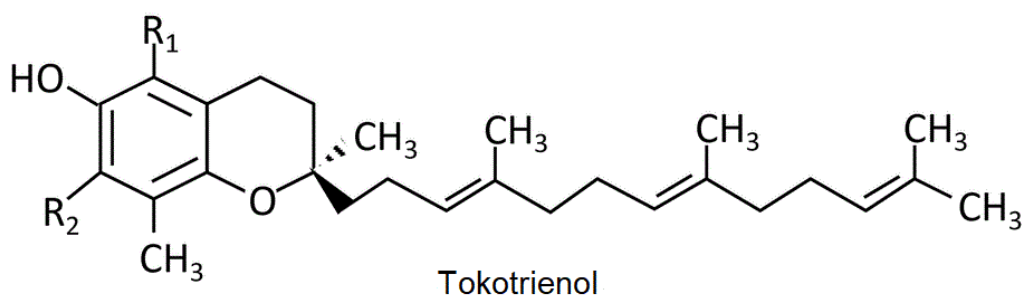
Do této skupiny patří tokoferoly a tokotrienoly. V těle jsou skladovány v játrech, svalích, varlatech, děloze, krvi a nadledvinách. Jde o důležité přírodní antioxidanty, které jsou obsaženy v rostlinných lipidech. Tokoferoly najdeme v rostlinných olejích, kukuřici, hrášku, obilných výrobcích a v jádrech ořechů. Z živočišných produktů jsou na vitamín E nejbohatší vejce, játra, vepřové a králičí maso [1] [2] [8].

Tento vitamín snižuje srážlivost krve a riziko infarktu, podílí se na proliferaci buněk hladké svaloviny a brání oxidaci LDL cholesterolu. Dále posiluje činnost pohlavních orgánů a předchází předčasným potratům a těžkým porodům [2] [8].

Při nedostatku dochází k poruchám nervů, svalů a kapilární permeability. U dětí se může objevit anémie. Hypovitaminóza se projevuje stařeckými skvrnami na rukou, špatným hojením ran, ochablou a suchou kůží, snadnou tvorbou modřin, mastnými vlasy, pocitem mravenčení, neplodností, únavou a sníženou výkonností [1] [2] [8].



Obrázek 4: Chemická struktura tokoferolů [10]

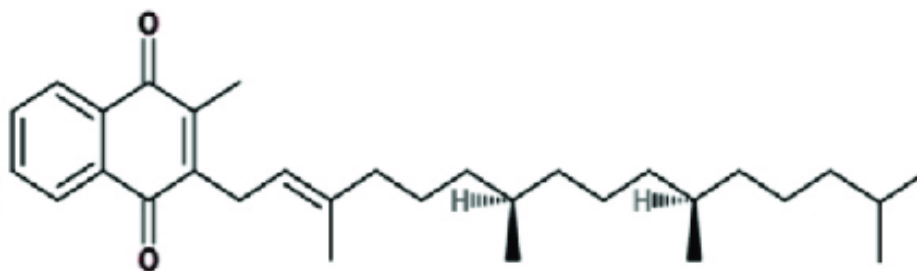


Obrázek 5: Chemická struktura tokotrienolů [10]

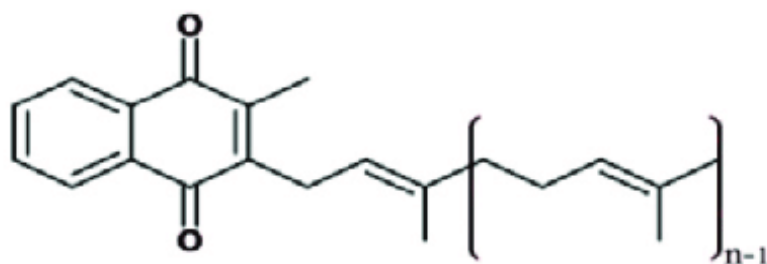
2.1.1.4 Vitamín K

Jde o dvojici látek – K₁ (fylochinon) a K₂ (menachinon). Vitamín K₂ je produkován střevními bakteriemi. Je obsažen v listové zelenině jako je špenát, zelí, květák, brokolice, růžičková kapusta, brukev, hlávkový salát a také v luštěninách. Z živočišných produktů je obsažen v játrech, vejcích, mase a mléčných výrobcích [1] [2] [8].

Je skladován v játrech. Účastní se aktivace protrombinu na trombin a na dalších procesech srážení krve. V důsledku hypovitaminózy dochází k snížené srážlivosti krve, častému krvácení z nosu, snížení kostní denzity a tedy k větší náchylnosti ke zlomeninám. Jedná se o netoxické látky, které mohou velmi výjimečně vyvolat alergické kožní reakce [1] [2] [8].



Obrázek 6: Chemická struktura vitamínu K₁ [11]



Obrázek 7: Chemická struktura vitamínu K₂ [11]

2.1.2 Vitamíny rozpustné ve vodě

Do této skupiny patří vitamín C a komplexy vitamínu B. Tyto látky nemají kromě typu rozpouštědla moc společného. Při hypovitaminóze může dojít k rozvinutí těžkých nemocí, jako je beriberi, seborrea, fotofobie, kurděje, pelagra a další. Protože se jedná o ve vodě rozpustné sloučeniny, je jejich přebytek vylučován močí a k hypervitaminóze tak dochází jen velmi vzácně. Tělo si nevytváří jejich zásoby, a proto musí být neustále doplňovány. Do komplexu vitamínu B patří: vitamín B₁, vitamín B₂, niacin, kyselina pantothenová, vitamín B₆, biotin, vitamín B₁₂ a kyselina listová [2] [5].

2.1.2.1 Vitamín B₁ – tiamin

Původně byl označován názvem aneurin. Jednalo se o první vitamín B, který byl objeven. Poprvé byl izolován v krystalické formě v roce 1926. Mezi jeho nejvýznamnější formu patří tiamindifosfát. Jeho chemický vzorec je 3-(4-amino-2-methylpyrimidyl-5-methyl)-4-methyl-5-(β-hydroxyethyl)thiazolium chlorid [12].

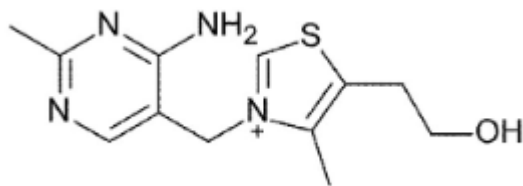
Nachází se v živočišných i rostlinných potravinách. V rostlinných složkách jej můžeme nalézt volně a v živočišných ve formě tiamindifosfátu. Některé mikroorganismy mají schopnost biosyntézy tiaminu, a proto se vyskytuje třeba v pivovarských kvasnicích, luštěninách, vaječném žloutku, arašidech, vepřovém masu a masných výrobcích (šunka, párky) [2].

V organismu je přítomen ve dvou formách: tiamindifosfát (TDP) a tiamin trifosfát (TTP). TDP se podílí na klíčových reakcích energetického metabolismu během procesu uvolňování energie ze substrátu. Jako koenzym má významnou roli v citrátovém cyklu, metabolismu sacharidů a metabolismu rozvětvených aminokyselin. Zabraňuje také růstu krevního tlaku, který je způsobený nikotinem. TTP se projevuje při aktivaci chloridových iontů ve svalech a nervech [2].

Nedostatek vitamínu může mít za následek poruchy kardiovaskulárního systému. Dochází k snížení pružnosti srdeční tkáně a k nepravidelnému, pomalému tepu, což může zapříčinit srdeční zástavu. Ovlivňuje také nervový systém a jeho nedostatek tak může mít negativní vliv na duševní stav jedince [8]. Tato onemocnění se projevují svíráním na hrudníku, tachykardií, změnami EKG a snížením krevního tlaku, pálením na chodidlech, bolestmi, křečemi a paralýzou, poruchami koordinace, pocitu napětí, depresi, podrážděností a strachem [2].

Avitaminóza způsobuje nemoc beriberi, pro kterou je typické snížení neurologických funkcí, úbytek kosterního svalstva, slabost srdečních svalů a edém [2].

Vykazuje velmi nízkou toxicitu, ale může se vyskytnout při stonásobném překročení denní dávky. Při dlouhodobém zvýšeném příjmu se mohou objevit poruchy žaludeční funkce, otoky, opary, bolesti hlavy, pocení, tachykardie a kožní alergie [1] [2].



Obrázek 8: Chemická struktura vitamínu tiaminu [13]

2.1.2.2 Vitamín B₂ – riboflavin

Bývá označován také jako laktoflavin. Jeho chemický vzorec je 6,7-dimethyl-9-(D-1'-ribityl)-isoxazin [12]. Poprvé byl objeven v roce 1879, kdy byla při mikroskopickém rozboru objevena fluoreskující žlutozelená látka. Identifikován byl ale až v roce 1933 Paulem Gyorgyem [8].

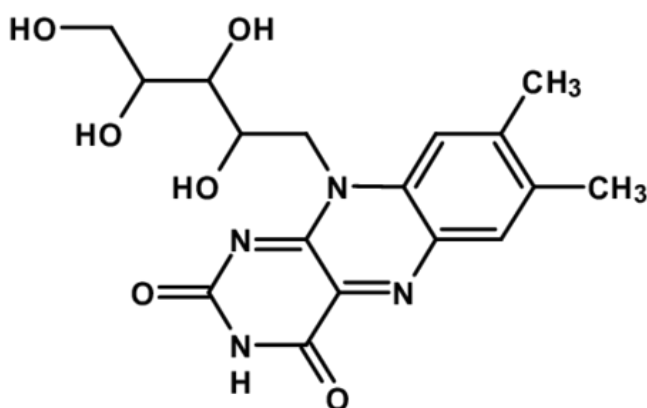
Je zařazen do skupiny flavinů a je tvořen heterocyklickým isoalloxzinovým jádrem, které je připojeno na alkohol ribitol. Jak již bylo řečeno, jedná se o fluoreskující látku, která je ovšem rozkládána světlem. Jeho nejběžnější formy jsou flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD) známé též jako flavoproteiny [2] [14].

Volně se nachází v sítnici, syrovátce a moči. Mnohem častěji se vyskytuje vázaný ve formě FMN a FAD v droždí a v obilných klíčcích. Je přítomen také v játrech, ledvinách, masu, vejcích, cereáliích, mléce a v některých houbách [2].

Podílí se na přenosu atomů vodíku v oxidativních procesech uvnitř buňky, na metabolismu bílkovin, tuků a sacharidů a také na vytváření energie skrz ATP. Převodem krátkovlnných paprsků na žlutozelené umožňuje vidění za šera. Hraje také roli při oxidačních pochodech a metabolismu aminokyselin v rohovce a oční čočce [2] [15].

Hypovitaminóza se projevuje poruchami ústní sliznice a sliznice pohlavních orgánů, dále také citlivostí na světlo, ztluštěním víček, zánětu dutiny ústní, dermatitidou, seborou a akné. Může vést k neurologickým poruchám jako neuropatie, pálení chodidel a parestezii na dolních končetinách. U dětí může zapříčinit zpomalení vývoje intelektu a u dospělých pokles duševní výkonnosti. Jeho nedostatek ovšem nevyvolává fatální následky [2] [15].

Vitamín nevykazuje žádné známky toxicity [1].



Obrázek 9: Chemická struktura vitamínu B₂ [16]

2.1.2.3 Vitamín B₆ – pyridoxin

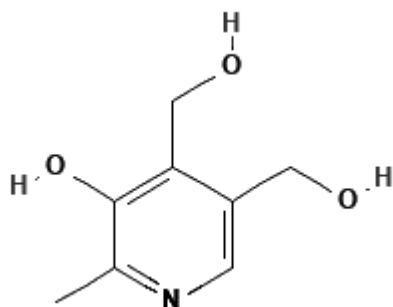
V minulosti býval uváděn pod názvem adermin a poprvé byl izolován v roce 1934. Pojem vitamín B₆ označuje tři fyziologicky účinné formy a to pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin. Chemické názvy těchto látek jsou 3-hydroxy-4,5-dihydroxymethyl-2-methylpyridin, 3-hydroxy-4-formyl-5-hydroxymethyl-2-methylpyridin, a 3-hydroxy-4-aminomethyl-5-hydroxymethyl-2-methylpyridin [12].

Je obsažen v živočišných i v rostlinných materiálech jako jsou droždí, vnitřnosti, vepřové a drůbeží maso, pšeničné klíčky, cereálie, celozrnné produkty, sójové boby, brambory, zelí, kukuřice, mrkev, zelené fazolky a hrách. V malém množství ho lze nalézt také v pasterizovaném mléce [2].

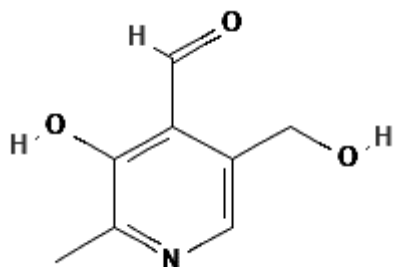
Pyridoxalfosfát společně s pyridoxaminfosfátem hrají významnou roli jako koenzymy v metabolismu aminokyselin, homocysteinu, při syntéze biogenních aminů a při přeměně tryptofanu na niacin. Jsou také nezbytné pro štěpení glykogenu a podílí se na syntéze hemoglobinu, biosyntéze porfyrinu a na různých funkcích imunitního a nervového systému [2] [14].

Nedostatek vitamínu může být způsoben nevyváženou dietou, poruchami zažívacího traktu a metabolickými poruchami nebo dlouhodobým alkoholismem. Hypovitaminóza se projevuje seboreou v oblasti nosu, očí a rtů, záněty v ústech a na rtech, anémií, která se po podání železa nelepší, nespavostí, přecitlivělostí a tvorbou močových kamenů [1] [2].

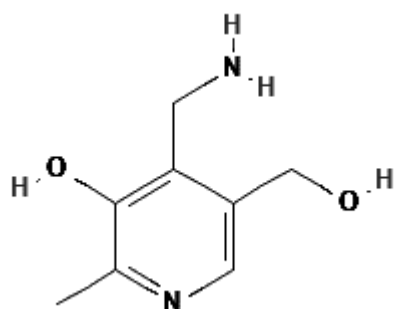
Při výrazném překročení doporučené denní dávky pyridoxinu dochází k poruchám sensorických nervů [1].



Obrázek 10: Chemická struktura pyridoxolu [17]



Obrázek 11: Chemická struktura pyridoxalu [18]



Obrázek 12: Chemická struktura pyridoxaminu [19]

2.1.2.4 Vitamín B₁₂ – kyanokobalamin

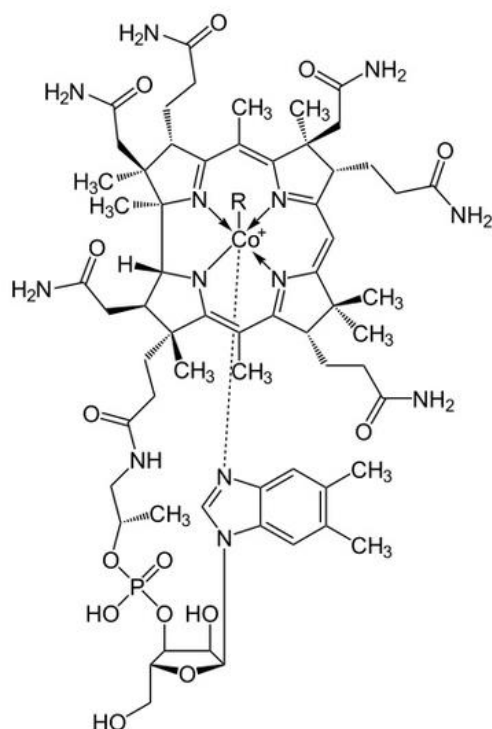
Patří do skupiny látek nazývajících se korinoidy [2]. Má komplexní kruhovou strukturu, do které je zapojen kobaltový ion [14]. Jeho velmi složitá struktura je obdobná hemovému systému. Mezi nejvýznamnější zástupce patří kyanokobalamin. Poprvé byl v krystalické podobě izolován v roce 1948 [2].

Nachází se pouze v živočišné potravě jako jsou játra, maso, vejce, mléko a sýr. V rostlinné potravě je obsažen pouze stopově. Vegetariáni a vegani proto musí dbát na doplnění této látky skrz vitamínové doplňky [2] [15].

Na rozdíl od předchozích vitamínů B je kyanokobalamin navázán na transkobalamin I a skladován v játrech. Pro správné vstřebávání je důležitá přítomnost specifického glykoproteinu, na který se vitamín B₁₂ v ileu naváže [14]. V organismu je přeměňován na aktivní formy koenzymu adenosylkobalaminu a koenzymu methylkobalaminu. Methylkobalamin se podílí na transmetalaci během syntézy methioninu a homocysteinu a na metabolismu mastných kyselin a aminokyselin. Je významný pro správný růst bakterií, zvířat i lidí. Účastní se na transportních a zásobních procesech kyseliny listové [2] [14].

Vzhledem k možnosti tvoření zásob není hypovitaminóza příliš častá a projevuje se tak až po několika letech. K příznakům patří porucha tvorby buněk kostní dřeně, anémie, bledost kůže a sliznic, záněty jazyka, únava, špatná pohyblivost a závratě. Dále mohou také nastat neurologické potíže, degenerace míchy, pocit jehličkovitého píchání v rukou a chodidlech, zmatenost, ztráta pohybových reflexů, halucinace a psychóza [2] [15].

Kyanokobalamin nejeví známky toxicity. Ve výjimečných případech může dojít k alergickým reakcím a vzniku akné. Při mnohonásobném překročení denní dávky může mít negativní dopad na lupénku [2].



Obrázek 13: Chemická struktura vitamínu B₁₂ [20]

2.1.2.5 Kyselina listová

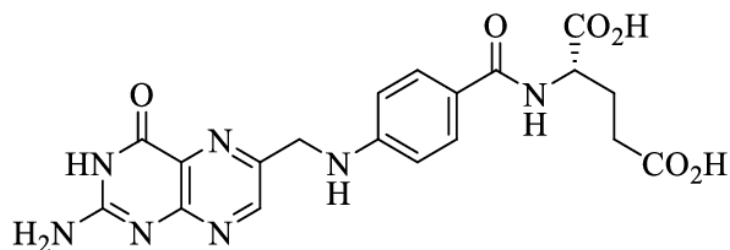
Je známá také pod názvem folacin. Poprvé byla izolována v roce 1941 z listů špenátu. Její chemický vzorec je N-(2-amino-4hydroxy-6-pteridylmethyl)-p-aminobenzoylglutamová kyselina. Molekula je složena z pteridinového kruhu a kyseliny paraaminobenzoové, kde je na karboxylové skupině navázána kyselina glutamová. Látky od ní odvozené se řadí do skupiny folátů, ale nemají tak vysokou biologickou aktivitu jako kyselina listová [2] [12] [14].

V potravě se vyskytuje ve formě pteroyl-monoglutamátu a pteroyl-polyglutamátu. Je obsažena v zelenině, ovoci, mléce, masu a v játrech. Jedná se o termolabilní látku, která je rozkládána světlem a podléhá oxidaci [1] [2].

Je nepostradatelná při tvorbě enzymů účastnících se syntézy purinu a pyrimidinu a regenerace methioninu. Podílí se také na tvorbě červených krvinek a na syntéze histidinu, cholinu a serinu [1] [2].

V důsledku úpravy potravy, může dojít ke ztrátě její biologické aktivity. Deficit se projevuje anémií, poruchami růstu, záněty dutiny ústní, nemocemi trávicího traktu, slabostí a únavou. Nedostatek také způsobuje zvýšenou hladinu homocysteinu v krevní plazmě, což vede k ateroskleróze. Hypovitaminóza během prvních týdnů těhotenství může zapříčinit deformaci plodu [2] [15].

Nejedná se o toxickou látku, ale při výrazném překročení denní dávky se mohou objevit alergické kožní reakce, dýchací potíže, nechutenství a zvracení [2].



Obrázek 14: Chemická struktura kyseliny listové [21]

2.1.2.6 Niacin

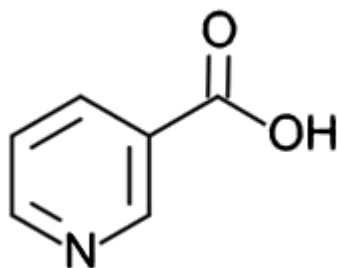
Je znám též jako vitamín P-P nebo vitamín B₃ a poprvé byl identifikován v roce 1937. Pod pojmem niacin se skrývá kyselina nikotinová a nikotinamid. Obě látky mají stejnou biologickou aktivitu. Jejich chemické vzorce jsou 3-pyridinkarboxylová kyselina a 3-pyridinkarboxylamid [2] [12].

Je obsažen v kvasnicích, mase, vnitřnostech, kávě a v obalových vrstvách zrna a klíčku. V rostlinné potravě je obsažena kyselina nikotinová a v živočišné potravě je obsažen její amid [1] [2].

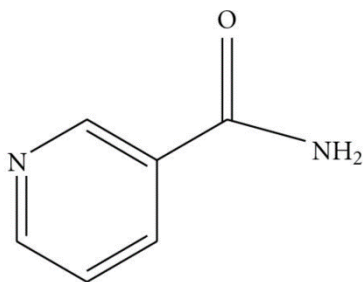
Niacin může být syntetizován z aminokyseliny tryptofanu. Biochemicky aktivní se vyskytuje ve formě nikotinamidadeninukleotidu (NAD) a nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP). Účastní se oxidačně-redukčních reakcí jako donor, nebo akceptor elektronu. Obě aktivované formy se podílí na syntéze a odbourávání cukrů, mastných kyselin a aminokyselin. Působí jako koenzymy hydrogenáz. NAD se účastní také na reparacích během replikace DNA [2] [15].

Protože je lidský organismus schopný syntetizovat niacin z tryptofanu, je hypovitaminóza neobvyklá. Může k ní dojít během velmi nevyvážené diety, kdy není přijímán ani tryptofan ani niacin. Projevuje se dermatitidou, průjmem, změnami na ústní a gastrointestinální sliznici, depresivní psychózou, bolestmi hlavy, únavou a zmateností až demencí. Může dojít také k snížení sekrece kyseliny solné v žaludku. Dostatek této kyseliny je jeden z předpokladů správného vstřebávání vitamínu B₁₂. Avitaminóza niacinu způsobuje pelagru [2] [8].

Nadměrné dávky se projevují kopřivkou, zčervenáním obličeje, závratí, zvracením, pocity horka a záněty žaludeční sliznice. Extrémně vysoký příjem může poškodit játra, způsobit dnu a vředovou chorobu gastroduodenu [1] [2].



Obrázek 15: Chemická struktura kyseliny nikotinové [22]



Obrázek 16: Chemická struktura nikotinamidu [23]

2.1.2.7 Kyselina pantotenová

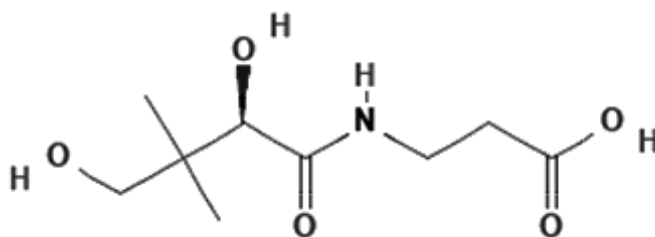
Poprvé byla izolována v roce 1939. Je složena z β -alaninu a kyseliny pantoové. Její chemický vzorec je D-(+)- α,γ -dihydroxy- β,β -dimethylbutyryl- β -alanin. V organismu se vyskytuje jako součást koenzymu A. Savci nejsou schopni tuto látku sami syntetizovat, ale mohou ji přenášet do molekuly koenzymu A. Jedná se o opticky aktivní látku, ale biologicky aktivní je pouze její D(+) forma [2] [14] [15].

Je obsažena převážně v živočišných potravinách, ale v malém množství ji můžeme nalézt i v rostlinných. Jejím zdrojem jsou luštěniny, játra, ledviny, maso, ryby, kvasnice, sýry, vaječný žloutek, rýže, houby, cereální produkty a zelenina se zelenými listy [1] [2].

Je nepostradatelná pro správný růst a reprodukci. Podílí se na metabolismu aminokyselin, tuků a sacharidů. Při degradaci tuků má speciální funkci, kdy acetylkoenzym A aktivuje mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Snižuje ukládání LDL cholesterolu. Zabraňuje infekci sliznice, účastní se na regeneraci kůže při hojení ran a na epitelizaci. Podílí se také na růstu a pigmentaci vlasů [2] [12].

Deficit může být vyvolán podáním kyseliny methylpantotenové, která působí protichůdně. Dochází pak k poruchám funkce nadledvin, ztrátě koordinace, degeneraci nervových vláken, poškození kůže, vlasů a nehtů, poruchám reprodukce, hypoglykémii, zástavě růstu, ztrátě hmotnosti, odumírání jaterních buněk a snížení imunity. Jedná-li se o podvyživené jedince, projevuje se také vyčerpanost, únava, slabost, nespavost, deprese a pálení nohou [1] [2] [14].

Jde o netoxickou látku, která nevyvolává nepříznivé syndromy ani při vysokém překročení denní dávky [1].



Obrázek 17: Chemická struktura kyseliny pantotenové [24]

2.1.2.8 Biotin

Poprvé byl izolován v letech 1940–1942. Byl zkoumán pro jeho schopnost blokovat toxický účinek avidinu, který je obsažen v syrovém bílku. Biologicky aktivní je pouze jeden z jeho osmi stereoizomerů a to D-biotin. Je produkován střevními bakteriemi. Může být nazýván také jako vitamín H. Jedná se o derivát imidazolu a jeho chemický název je (+)-cis-2-(4-karboxybutyl)-3,4-(2-oxo-3,4-imidazolidino)thiofan [1] [2] [14].

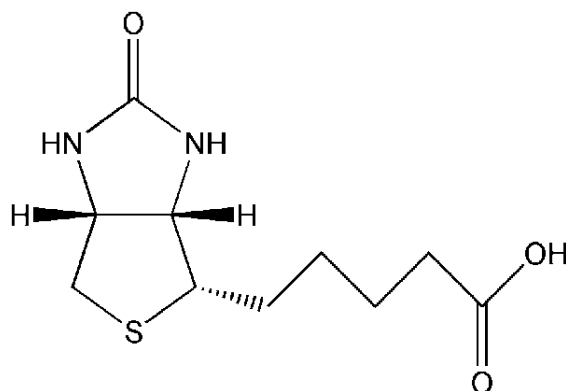
V potravinách se vyskytuje volně nebo vázán na bílkoviny například ve formě biocytinu. Je obsažen v živočišných i rostlinných materiálech, a to v mase, játrech, mléce, sýru, vejcích, čokoládě, jahodách, luštěninách, arašídech, sušeném hrachu a kvěťáku [1] [2].

Funguje jako koenzym enzymů účastnících se karboxylačních reakcí. Podílí se také na glukoneogenezi, syntéze a prodlužování mastných kyselin, metabolismu aminokyselin a propionové kyseliny [2] [14].

Vázaná forma biotinu je uvolňována pomocí enzymu biotinidázy. Při blokování avidinu se na jednu jeho molekulu navážou tři molekuly biotinu. Avidin je obsažen například v syrovém vaječném bílku, a proto při časté konzumaci syrových vajec může dojít k deficitu biotinu [14].

Hypovitaminóza se projevuje slabostí, anorexií, nauzeou, zvracením, mentální retardací, křečemi a kožními lézemi. Nedostatek může být zapříčiněn genetickou poruchou. Způsobuje seboreickou dermatitidu, ztrátu vlasů a Leinerovu nemoc. Snížená hodnota biotinu u těhotných žen může zapříčinit malformaci plodu [1] [2].

Nevykazuje žádné projevy toxicity ani při velkém překročení doporučené denní dávky [1].



Obrázek 18: Chemická struktura biotinu [25]

2.1.2.9 Vitamín C

Je znám také jako kyselina askorbová. Lidé, primáti a morčata v důsledku mutace genetického kódu L-gulonolaktonoxidázy ztratili schopnost tento vitamín syntetizovat. Jedná se o oxidačně-redukční systém, pro který je typický reverzibilní přenos dvou elektronů. Chemický název je γ -lakton kyseliny 2-keto-L(-)-gulonové [2] [12] [14].

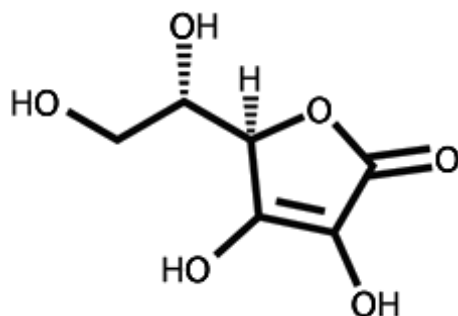
Je obsažen ve všech živých organismech (především v zelenině a ovoci, zejména citrusech). Při skladování, vaření a dalších potravinářských úpravách snadno dojde k jeho poničení. Hojně je obsažen také v bramborách a křenu [1] [2].

Působí jako redukční činidlo a kofaktor nebo kosubstrát enzymů. Zvyšuje absorpci železa a podílí se na biosyntéze kolagenu, karnitinu a katecholaminů. Hraje také důležitou roli během amidace peptidů a při metabolismu tyrosinu, cholesterolu a steroidů. Jedná se o významný

antioxidant a podporuje imunitu organismu. To je zapříčiněno askorbátem, který zvyšuje aktivitu fagocytů, jejichž membrány chrání před oxidací [2] [14].

Při dlouhodobém nedostatku může u dětí způsobit Moeller-Barlowu chorobu a u dospělých kurděje. Dále se projevuje poruchami pojivových tkání, špatným hojením ran, omezením syntézy kolagenu, únavou, letargií, depresi, hypochondrií, změnami nálad, oslabením imunity a zpomalením rekonvalescence [2] [14].

Při vyšším příjmu dochází ke snížení jeho absorpce, a proto není za normálních podmínek hypervitaminóza běžná. Při extrémně velkém překročení denní dávky (10–20 g) může způsobit nespavost a tvorbu ledvinových kamenů [1] [2].



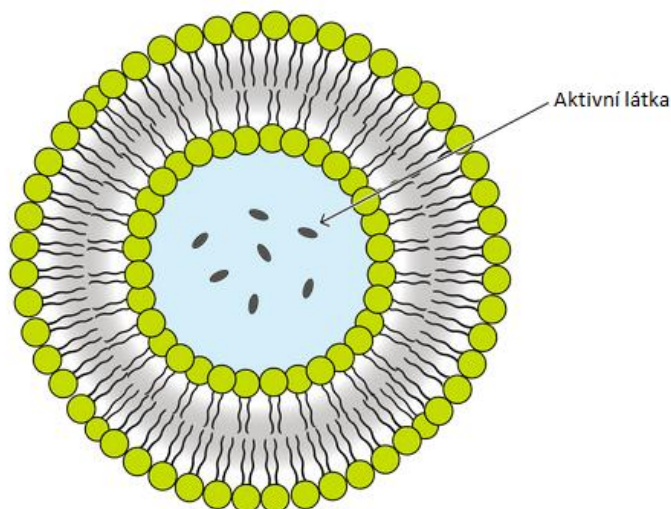
Obrázek 19: Chemická struktura vitamínu C [26]

2.2 Enkapsulace

Enkapsulace je proces, který umožňuje zapouzdření bioaktivní složky tak, aby byla plně zachována její funkčnost a nedošlo k chemické degradaci. Ta může být způsobena oxidací nebo hydrolyzou. Bioaktivní složky jsou označovány jako jádro nebo výplň a patří mezi ně lipidy, vitamíny, peptidy, mastné kyseliny, antioxidanty, minerály a také živé buňky jako například probiotika. Enkapsulační látka může být nazývána jako obalový materiál, schránka, kapsule, nosičový materiál, matrix nebo vnější fáze. Po zapouzdření uvolňují obalové látky za specifických podmínek kontrolované dávky aktivní složky. Ta je chráněna po celou dobu trávení, skladování a transportu, dokud nedorazí na požadované místo. Metoda je využívána ve farmaceutickém i potravinářském průmyslu, kde je vyžadováno zařazení funkční složky do jídla. Velká část biologicky aktivních látek v jídle podléhá rychlé inaktivaci. Zapouzdření takovýchto složek napomáhá snížení jejich degradačního procesu, díky čemuž jsou látky plně funkční. Vhodný obal by mělo být možné bez obtíží začlenit do jídla, měl by být biodegradabilní a bez výrazné chuti a textury. Zároveň je také důležité, aby došlo k uvolnění látky ve správném úseku trávicího traktu. Enkapsulaci lze také využít k úpravě fyzikálních vlastností za účelem snazší manipulace, napomáhání oddělení složek ve směsi, které by spolu jinak reagovali a poskytnutí optimální koncentrace a rovnoměrné disperze aktivní látky. K enkapsulaci lze využít následujících metod: sprejové chlazení, sprejové sušení, extruze, emulgace, využití liposomů, koacervace, inkluze. Enkapsulovaná látka nejčastěji vyskytuje v kapalné formě, proto je většina technik založena na sušení [27] [28] [29].

2.2.1 Využití liposomů

Liposomy obsahují vodnou fázi, která je obklopena fosfolipidovou membránou. Jsou-li fosfolipidy dispergovány ve vodném prostředí, liposomy se spontánně zformují. Mohou obsahovat jak látky rozpustné ve vodě, tak i látky rozpustné v tucích. Tuto metodu nelze využít, pokud je složka rozpustná ve vodě i v tucích zároveň. Technika může být použita například při enkapsulaci vitamínu C. Mezi způsoby přípravy liposomů patří odpařování na tenké vrstvě, odpařování na reverzní fázi, využití ultrazvuku nebo střídavé zmrazování a rozmrazování [29] [30].



Obrázek 20: Struktura liposomu [31]

2.3 Metody stanovení vitamínů

Vitamíny jsou velice citlivé látky, u kterých může snadno dojít k degradaci. Ta je způsobena tepelnou úpravou při vaření, jejich rozpuštěním ve vodě, působením světla nebo oxidací. Proto musí být během analýzy věnována pozornost jak skladování vzorků, tak i technikám jejich předúpravy [4].

Ke stanovení vitamínů je využívána velká řada procesů, mezi které patří metody chromatografické, elektroforetické, mikrobiologické, a další. Extrakce a čištění vzorku jsou velice důležité kroky předúpravy. Umožňují nám izolovat vybrané látky, což může významně zlepšit analytický výkon [32].

2.3.1 Spektrofotometrické stanovení

Při interakci hmoty a záření dochází k výměně energie, což je zapříčiněno schopností atomů a molekul měnit svůj energetický stav. Podle počtu energetických hladin absorbuje každá molekula určité frekvence elektromagnetického záření. Absorpční spektrum měří množství absorbovaného světla v závislosti na vlnové délce. Absorbance A představuje množství absorbovaného záření dané vlnové délky a je popsána pomocí Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

kde c ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) představuje koncentraci dané látky ve vzorku, l (cm) je délka absorbujícího prostředí a ε ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) je molární absorpční koeficient. Absorbance je závislá na všech látkách obsažených ve vzorku [33].

Pokud je látce dodána energie a dochází k její excitaci, tak po určité době přechází na svůj nižší nebo základní energetický stav. Během tohoto přechodu se daná látka musí zbavit přijaté energie, a to buď ve formě elektromagnetického záření, tepla nebo obojího. Emisní spektrum vyjadřuje závislost emitovaného záření na vlnové délce. Pokud látka po excitaci nejprve ztrácí část své energie ve formě tepla a teprve poté dochází k emisi záření, jedná se o fluorescenci. To je zapříčiněno kolizemi s ostatními částicemi ve vzorku [33].

Pomocí detektorů spektrofotometrických přístrojů je energie záření převedena na měřitelnou formu, čímž získáváme analyzovaný signál [33].

2.3.2 Chromatografické stanovení (GC, LC, HPLC)

Při této metodě dochází k rozdělení složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. V okamžiku, kdy se mobilní fáze pohybuje prostorem a unáší s sebou vzorek, se stacionární fáze systémem nijak nepohybuje, ale zadržuje na sobě jednotlivé složky. Komponenty vzorku s nejvyšší afinitou ke stacionární fázi jsou zdrženy mnohem déle než komponenty s afinitou nižší. Separace složek směsi je způsobena právě jejich rozdílnou rychlostí průchodu chromatografickým systémem. Distribuce složky X mezi mobilní fázi je popsána distribuční konstantou K_D :

$$K_D = \frac{[X]_s}{[X]_m} \quad (2)$$

kde $[X]_s$ je koncentrace složky X ve stacionární fázi a $[X]_m$ je koncentrace složky X ve fázi mobilní [34].

Chromatografické metody rozdělujeme podle skupenství použité mobilní fáze. Jedná se o plynovou (GC) a kapalinovou chromatografii (LC). Speciální případ je superkritická fluidní chromatografie (SFC), kdy dochází k použití páry při nadkritické teplotě a tlaku jako mobilní fáze [34].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je moderní forma kapalinové chromatografie, která dokáže ve směsi rozlišit velké množství podobných analytů. Výsledný chromatogram nám poskytuje jak kvalitativní i kvantitativní informaci. Systém se skládá ze zásobníku rozpouštědla, čerpadla, injektoru vzorků, kolony, detektoru a vyhodnocovacího systému. Rozpouštědlo je čerpadlem dodáváno za vysokého tlaku a při konstantní rychlosti. Na mobilní fázi je injektorem vstřikován analyt, který je dále unášen na kolonu, kde probíhá separace látek. Každá složka ve směsi má při daných podmínkách svůj vlastní eluční čas (chvíle, ve které se objeví signál). V detekční cele je registrován čas a množství látek eluovaných z kolony. Detektor zaznamenává změnu složení mobilní fáze a převádí tuto informaci na signál měřitelný počítačem. V praxi jsou využity refraktometrické, UV/VIS, elektrochemické nebo fluorescenční detektory [35] [36].

2.3.3 Elektroforetické stanovení

Jedná se o metodu, která je využívána, pokud je k dispozici pouze malé množství vzorku. Jde o vysoce účinný rychlý a nenáročný proces, při kterém se částice rozdělují podle své velikosti a náboje [37].

Elektroforetický systém obsahuje dvě elektrody – každou s opačným nábojem (katoda, anoda), které jsou připojeny k elektrolytu. K separaci dochází v důsledku odlišné rychlosti částic (v), která je závislá na mobilitě částic (m) a intenzitě pole (E):

$$v = mE \quad (3)$$

Mobilita je veličina charakterizována teplotou během probíhající separace a vlastnostmi částic jako je jejich velikost, tvar a náboj. Elektroforetické podmínky jsou popsány pomocí proudu, napětí a výkonu a jsou závislé na iontové síle, pH, viskozitě, velikosti pórů a dalších faktorech popisujícím médium, ve kterém se pohybují částice [37].

2.3.4 Mikrobiologické stanovení

Tato technika je používána pro detekci vitamínů skupiny B. Tyto látky (s výjimkou vitamínu B₆) lze stanovit pomocí bakterií mléčného kvašení. Stanovení je provedeno měřením vyprodukované mléčné kyseliny po 72 hodinách, nebo měřením růstu organismu (turbidimetrická metoda). Vše je založeno na podmínce nepostradatelnosti daného vitamínu pro množení organismu [38].

Také je možno použít metodu založenou na měření ¹⁴CO₂, který je generován jako produkt metabolismu. Tímto způsobem lze stanovit vitamín B₁, B₆ a B₁₂, niacin, kyselinu pantotenovou a biotin [38].

2.3.5 Titrační stanovení

Využívá se k určení množství vitamínů C v potravinách. Trijodid reaguje s kyselinou askorbovou za vzniku kyseliny dehydroaskorbové. Je-li ve vzorku přítomen vitamín C, přemění se trijodid na jodidový ion. Ve chvíli, kdy je veškerý vitamín oxidován, reaguje volný jód a trijodid se škrobem, který je použit jako indikátor, za vzniku modro-černého zbarvení [39].

2.3.6 Elektrochemické stanovení

Voltarimetrie a polarografie jsou elektrochemické metody, které využívají k analýze měření proudu protékajícího článkem v závislosti na potenciálu pracovní elektrody. Pokud v roztoku nejsou přítomny látky, které by se mohly redukovat či oxidovat, dochází k zpolarizování pracovní elektrody a k zastavení průtoku proudu. Naopak přítomnost těchto látek způsobuje depolarizaci a průtok proudu. Dle velikosti anodického či katodického proudu lze určit koncentraci analytu ve vzorku. Elektrochemické články se skládají z polarizovatelné pracovní elektrody a nepolarizovatelné pracovní elektrody. Při využití kapající rtuťové elektrody se jedná o polarografii [40] [41].

2.4 Fortifikované potraviny

Fortifikace je proces přidání živin do potravin, které je před tím neobsahovaly, nebo jich obsahovaly velice málo. Existuje spousta látek, které si naše tělo neumí vyrobit, ale jsou potřeba pro kvalitní život. Takovéto látky je nutné přijímat v potravě, ale lidská strava bohužel ne vždy obsahuje všechny důležité složky. Proto vznikají fortifikovaná jídla umožňující snížit rizika výskytu chorob, ke kterým dochází v důsledku nedostatku mikroživin [42].

Fortifikované potraviny patří do skupiny tzv. funkčních potravin. Jedná se o potraviny obsahující látky s pozitivním vlivem na zdraví a celkovou vyrovnanost spotřebitele. Složky

mohou být přidávány, odebírány a upravovány tak, aby při pravidelné konzumaci poskytovaly zdravotní výhody [43].

Rozvojové země často disponují řadou programů zabývajících se obohacením široce konzumovaných základních potravin, mezi které patří například obilná mouka, cukr, sůl nebo sójová omáčka. Tato dlouhodobá strategie je považována za nákladově nejefektivnější. Fortifikace je běžná také ve vyspělých zemích, kde bývá často cílená na jídla, která konzumují populační skupiny nejvíce ohrožené nedostatkem mikroživin. Mezi tyto potraviny patří kojenecká výživa, snídaňové cereálie nebo čokoládové nápoje [44].

Aby byla fortifikační strategie co nejefektivnější, musí se nejprve identifikovat, kterých živin je v populaci nedostatek. Poté je třeba zvolit nejvhodnější metodu fortifikace v závislosti na stravovacích návycích daného obyvatelstva. Podle Organizace výživy a zemědělství (FAO) by měly potravinové prostředky splňovat 4 hlavní rysy:

- a) spotřeba daného prostředku musí být běžná pro velkou část populace, zahrnující také nejzranitelnější skupiny
- b) spotřeba potravin musí být pravidelná a musí obsahovat konstantní množství živin
- c) potraviny musí být zpracovávány centrálně
- d) musí docházet ke snadnému a nízkonákladovému přidávání výživné směsi [45].

Fortifikované potraviny mohou také nahradit jiná jídla, která daný jedinec kvůli dietě nebo jiným zdravotním důvodům není schopen přirozeně přijímat. V mnohých zemích je drahé máslo nahrazeno levnější variantou margarínem. Ten ovšem přirozeně neobsahuje vitamín A, který je do něj přidáván [42].

Při přípravě obohacených jídel se musí dávat pozor na to, aby výsledek neměl nepříznivou chuť, vzhled a aby nedošlo k snížení jeho stability. Přídavky určitých minerálů (železo, zinek) mohou vést k degradaci vitamínů, které by jinak byly přítomny [42]. Mouka představuje snadný prostředek k fortifikaci, protože živiny vyskytující se v práškové formě do ní mohou být jednoduše vmíchány [45].

2.4.1 Historie fortifikace

Fortifikace nepředstavuje žádnou novou metodu obohacování stravy. Už ve středověku matky nechávaly přes noc v jablcích zapíchnuté hřebíky. Poté co je vytáhly, podávaly jablka s přidaným obsahem železa svým nemocným nebo apatickým dcerám. Jsou dostupné také záznamy, že při výrobě tradičních mexických tortill byla kukuřice nejdříve namočena ve vápenné vodě. Špetka pomletého vápence byla přidána i do hotového jídla, čímž došlo k jeho obohacení o vápník. První návrh o fortifikaci potravin byl zaznamenán v roce 1831. Návrh se snažil zajistit přidání jodu ke kuchyňské soli, což mělo mít za účinek snížení výskytu onemocnění zvané struma. Oficiální přidání jodu k soli bylo poprvé provedeno v roce 1900 ve Švýcarsku. Během druhé světové války schválilo Spojené království předpisy, které nařizovaly přidání tiaminu, niacinu a železa do veškeré mouky, která se používala k vaření a pečení [42].

2.4.2 Metoda food-to-food fortifikace

Tato metoda využívá lokální zdroj mikroživin k obohacení jiné potraviny. Často bývá problém najít dostupný zdroj živin, který by zároveň nepříznivě neovlivňoval sensorické vlastnosti výsledného obohaceného produktu. Proto je nejvhodnější používat potravinářské prostředky, které jsou centrálně zpracovávány a docílit tak podpory potravinářského průmyslu. V Nigérii je *ogi* (fermentované obilné těsto vyrobené převážně z kukuřice) fortifikováno prachem z ovoce baobabu [45].

2.4.3 Fortifikace kyselinou listovou

Roku 1998 vyzval americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv, aby producenti chleba, cereálií, mouky, kukuřice, těstovin, rýže a dalších cereálních produktů přidávali do svých výrobků kyselinu listovou. Cereálie, které patří v USA mezi hlavní složku snídaně, jsou zároveň významným zdrojem kyseliny listové. Program byl navržen tak, aby se příjem zvýšil na hodnotu zhruba 100 µg/den, ve skutečnosti ale došlo ke zvýšení dávky až na hodnotu 190 µg/den. V roce 1998 požadovala fortifikaci cereálií, pšeničné mouky, těstovin a kukuřičné mouky také Kanada. Mezi země, která svá jídla obohacují o kyselinu listovou patří také Kostarika, Chile a Jihoafrická republika [46].

2.4.4 Fortifikace vitamínem B₁₂

Obecně není vitamín B₁₂ přítomen v rostlinné stravě. Proto jsou na trhu dostupné cereálie pro vegetariány, které jsou o něj obohaceny. Mimo cereálie může být tato látka přidávána také do různých výživových produktů z kvasnic [46].

2.4.5 Fortifikace tiaminem, riboflavinem, niacinem a vitamínem B₆

Komplexy vitamínu B jsou velice důležité pro energetický metabolismus. Podílejí se na dekarboxylaci, transaminaci, acylaci, oxidaci a redukci substrátů. Obohacování živin o komplexy vitamínu B je efektivní pro základní potraviny a koření, mezi které patří pšeničná mouka, rybí omáčka a rýže [46].

2.4.6 Fortifikace vitamínem C

Vitamín C je hojně zastoupen v potravinách živočišného a rostlinného původu. Je ale velice citlivý a působením světla, kyslíku a tepla může být lehce degradován. Při špatném vaření nebo skladování tak může dojít ke značným ztrátám. Vitamínem C bývají obohaceny ovocné šťávy, želé, bonbóny, mléko a dětská výživa [46].

2.5 Doplnky stravy

Doplnky stravy jsou produkty, které obsahují jednu nebo více z následujících látek: vitamíny, minerály, byliny, aminokyseliny, nebo jakoukoliv jinou látku sloužící k doplnění stravy spotřebitele za účelem příznivého ovlivnění jeho zdravotního stavu. Spadají do speciální kategorie potravin a nejsou tedy považovány za léky. Měly by být užívány pouze orálně, a proto jsou dostupné ve formě kapslí, tablet, tekutin, prášků, granulí a pastilek [47].

Většina takovýchto výživových doplňků obsahuje synteticky připravované živiny. Zatímco se přírodní živiny vyskytují volně v potravinách, ty syntetické jsou uměle vyráběné chemické izoláty. I přesto že mají syntetické a přírodní látky shodnou chemickou strukturu, panují mezi

nimi značné rozdíly. V přírodě se živiny nevyskytují v izolované podobě, většinou jsou přítomny v podobě komplexu s jinými prospěšnými složkami, jako jsou vitamíny, aminokyseliny, antioxidanty, minerály apod. Synteticky připravované vitamíny mají většinou krystalickou strukturu, ale v přírodě tomu tak není. Rozdílná může být také jejich fyziologická forma. Všechny tyto aspekty ovlivňují vstřebávání a využívání těchto látek v lidském těle [48].

Na trhu je dostupné velké množství různých vitamínových doplňků stravy, které rozhodně nemají nouzi o odbyt. Patří mezi ně například multivitaminové produkty, které ve svém složení mohou obsahovat směsi různých vitamínů často i ve spojení s minerálními látkami. Studie ovšem dokazují, že v rámci prevence před chronickými chorobami (jako například rakovina nebo kardiovaskulární nemoci) nepotřebují zdraví jedinci s vyváženou stravou přijímat další vitamínové doplňky. Pokud ovšem uživatel trpí určitou chorobou, může ke své léčbě tyto produkty potřebovat. Vitamínové doplňky stravy mohou mít příznivý vliv například v těhotenství. Doplnění folátů podstatně snižuje riziko defektu neurální trubice a doplnění železa snižuje u matek riziko anémie a následných komplikací. Slepá víra ve vitamínové doplňky může být v lidech zakořeněna hned z několika důvodů. První vychází z historických zkušeností, kdy vitamíny značně blahodárně ovlivnily prevenci před kurdějemi, pelagrou a křivicí v období, kdy lidé trpěli nevyváženou stravou a jejich nedostatečným příjmem. Dalším důvodem, mohou být například klamavé reklamy, které často uvádí sice pravdivé ale ne celé informace [49], [50], [51].

Jedná-li se o zdravého jedince, je lidské tělo stvořeno k tomu, aby bylo schopné čerpat potřebné živiny z přirozené stravy. Na rozdíl od syntetických doplňků, které obsahují izoláty určitých živin, obsahuje přirozená strava komplexy zdravých prospěšných látek, které jsou našim tělem lépe vstřebávány a využívány. Syntetizované doplňky stravy ovšem mají ve zdravotnictví významnou roli, kdy mohou pomoci lidem, kteří trpí zdravotními problémy, jsou na specifické dietě, která jim neumožňuje přijímat všechny důležité živiny skrz potravu nebo mají jiné zdravotní specifikace [48], [49], [52].

2.6 Fortifikované potraviny a doplňky stravy dostupné na českém trhu

V následujících tabulkách jsou uvedeny dostupné fortifikované potraviny a doplňky stravy, které byly vyhledány v rámci průzkumu trhu:

Tabulka 1: Fortifikované potraviny dostupné na českém trhu [53], [54], [55], [56], [57]

Název produktu	Výrobce	Obsažené vitamíny
Chocapic	Nestlé	Vitamín D, Tiamin (B ₁), Riboflavin (B ₂), Niacin, Pyridoxin (B ₆) Kyselina listová, Kyselina pantotenová
Delicious Vegan Protein – krémový rostlinný proteinový shake	Nutrend	Riboflavin (B ₂), Kyanokobalamin (B ₁₂)
Active Crispy jahoda	Inkospor	Vitamín E, Kyselina pantotenová, Pyridoxin (B ₆), Riboflavin (B ₂), Tiamin (B ₁), Kyanokobalamin (B ₁₂)
Ovocná kašička s cereáliemi mix ovoce	Sunar	Vitamín C, Niacin, Vitamín E, Tiamin (B ₁) Vitamín B ₆ , Kyselina listová
Proteinová kaše s čokoládovou příchutí	KetoMix	Vitamín C, Vitamín A, Vitamín E, Vitamín K, Vitamín D, Tiamin (B ₁), Riboflavin (B ₂), Niacin, Kyselina pantotenová (B ₅), Pyridoxin (B ₆), Kyanokobalamin (B ₁₂), Kyselina listová

Tabulka 2: Vitamínové doplňky dostupné na českém trhu [58], [59], [60], [61], [62]

Název produktu	Výrobce	Obsažené vitamíny
Mart'anci Gummy s echinaceou	Walmark Stada Group	Vitamín C, Niacin, Kyselina listová, Kyanokobalamin (B ₁₂), Biotin, Vitamín D ₃ , Vitamín E, Vitamín K
Vibovit Farma a Dino želé	Teva	Vitamín C, Niacin, Kyselina listová, Kyanokobalamin (B ₁₂), Biotin, Vitamín D, Vitamín E, Vitamín K, Vitamín A
Centrum Silver 50+ pro ženy	GlaxoSmithKline	Vitamín K, Vitamín D, Tiamin (B ₁), Riboflavin (B ₂), Pyridoxin (B ₆), Kyanokobalamin (B ₁₂), Kyselina listová, Kyselina pantotenová
Lipozomální dětský multivitamin	Bornature	Vitamín C, Vitamín A, Vitamín E, Vitamín K, Vitamín D, Vitamín D ₃ , Tiamin (B ₁), Riboflavin (B ₂), Niacin, Kyselina pantotenová (B ₅), Pyridoxin (B ₆), Biotin (B ₇), Kyselina listová, Kyanokobalamin (B ₁₂)
Alpha Men Multivitamin	MyProtein	Vitamín C, Vitamín A, Vitamín E, Vitamín K, Vitamín D, Tiamin (B ₁), Riboflavin (B ₂), Niacin, Kyselina pantotenová (B ₅), Pyridoxin (B ₆), Biotin (B ₇), Kyanokobalamin (B ₁₂), Kyselina listová

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je příprava a charakterizace funkčních potravin a moderních doplňků stravy s obsahem vybraných vitamínů. V rámci této práce byly plněny následující úkoly:

1. Zpracování rešerše na dané téma.
2. Optimalizace metod pro stanovení vybraných vitamínů a aktivních látek.
3. Příprava a charakterizace funkčních potravin a doplňků stravy s obsahem vybraných vitamínů.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Ohaus (USA)
Analytické váhy, Boeco (GE)
Automatické pipety, Discovery (DE)
Centrifuga – U-32 R, Boeco (GE)
Centrifuga – MiniSpin® plus, Eppendorf (GE)
HPLC – UltiMate 3000 HPLC and UHPLC Systems, Thermo Fisher Scientific (USA)
Koloidní DLS analyzátor – ZetaSizer Nano ZS, Malvern (UK)
Kolona – Kinetex Polar C18, Phenomenex (USA)
Lyofilizátor – Freeze dry system / freezone® 4,5, Labconco (USA)
pH metr – pH 50 VioLab benchtop, XS Instruments (IT)
Předvážky – CS200, Ohaus (USA)
Temperovaná třepačka – Heidolph Inkubator 1000 (GE)
Ultrazvukový homogenizátor – Bandelin Sonoplus HS3200, Sonorex Technik (DE)
Vortex – Fixed speed vortex mixer, Ohaus (USA)

4.2 Použité chemikálie

Cholesterol – směs 5-Cholesten-3 β -olu a 3 β -Hydroxy-5-cholestenu, Sigma Aldrich (DE)
Acetonitril, Carl Roth (SRN)
Bile salts – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma Aldrich (DE)
Celuláza – směs enzymů, Sigma Aldrich (DE)
Dihydrogenfosforečnan disodný, Serva (SRN)
Hemiceluláza z Kropidláku černého, Sigma Aldrich (DE)
Hydrogenfosrečnan sodný p.a., Lachema (ČR)
Hydroxid sodný, Lach:NER (ČR)
Kyselina chlorovodíková 35% p.a., Lach:NER (ČR)
Kyselina listová $\geq 97\%$, Sigma Aldrich (DE)
Kyselina nikotinová 99,5%, Sigma Aldrich (DE)
Kyselina sírová 96%, Penta (ČR)
L-askorbová kyselina $\geq 99\%$, Sigma Aldrich (DE)
L- α -Fosfatidylcholin ze sóje, Sigma Aldrich (DE)
Octan sodný p.a., Penta (ČR)
Pankreatin z vepřové slinivky, Sigma Aldrich (DE)
Pepsin z vepřové žaludeční sliznice, Sigma Aldrich (DE)
Pyridoxin $\geq 98\%$, Sigma Aldrich (DE)
Riboflavin z Eremothecium ashbyii $\geq 98\%$, Sigma Aldrich (DE)
Tiamin hydrochlorid $\geq 99\%$, Sigma Aldrich (DE)
Vitamín B₁₂ $\geq 98,5\%$, Sigma Aldrich (DE)

4.3 Použité funkční potraviny a doplňky stravy

4.3.1 Nestlé CINI MINIS®

Tabulka 3: Charakteristika produktu cini minis

Vitamíny a minerální látky	Obsah v 1 porci (30 g)
Vit. D	0,93 µg
Vit. B ₁	0,59 mg
Niacin	4,20 mg
Vit. B ₆	0,43 mg
Kyselina listová	53,8 µg
Kyselina pantothenová	1,92 mg
Vápník	321,00 mg
Železo	2,19 mg

4.3.2 ManaPowder™ | Origin

Tabulka 4: Charakteristika produktu ManaPowder™

Vitamíny a minerální látky	Obsah v 1 porci (86 g)
Vit. A	160 µg
Vit. B ₁	0,3 mg
Vit. B ₂	0,3 mg
Niacin	4 mg
Vit. B ₆	0,31 mg
Biotin	11 µg
Kyselina listová	80 µg
Kyselina pantothenová	2,1 mg
Vit. B ₁₂	2,2 µg
Vit. C	20 mg
Vit. D	1,3 µg
Vit. E	4 mg
Vit. K	15 µg
Draslík	700 mg
Jod	36 µg
Hořčík	75 mg
Vápník	200 mg
Zinek	2,8 mg

4.3.3 Generica ® B-komplex forte

Tabulka 5: Charakterizace produktu B-komplex

Vitamíny	Obsah v 1 tabletě
Vit. B ₁	10 mg
Vit. B ₂	10 mg
Niacin	50 mg
Vit. B ₆	10 mg
Vit. B ₁₂	10 µg
Biotin	0,5 mg
Kyselina listová	1,0 mg
Kyselina pantothenová	50 mg

4.4 Příprava kalibračních roztoků

Bylo naváženo 10 mg jednotlivých standardů vitamínů C, B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ a B₁₂. Poté byly navážky kvantitativně převedeny do 10ml odměrné baňky a doplněny destilovanou vodou s výjimkou vitamínu B₉, který byl doplněn 50 mM octanem sodným. Takto připravené roztoky byly naředěny do vhodné koncentrační řady.

4.5 Nastavení parametrů HPLC při stanovení vybraných vitamínů

V rámci metody identifikace vybraných vitamínů byly parametry vysokoúčinného kapalinového chromatografu nastaveny podle tabulky 6.

4.6 Příprava liposomů

V 50ml kádince bylo smícháno 10 mg cholesterolu, 90 mg lecitinu, 10 mg standardu vitamínu, a 10 ml destilované vody. Kádinka byla umístěna do Petriho misky, která byla naplněna studenou vodou. Směs byla následně míchána tyčovým ultrazvukem po dobu 1 minuty. Vždy po 15 s byl proces míchání přerušen, aby nedošlo k intenzivnímu zahřátí vzorku.

4.7 Charakterizace připravených liposomů

Po připravení liposomů byla okamžitě stanovena jejich enkapsulační účinnost, stabilita částic a velikost částic. Byla sledována také dlouhodobá stabilita liposomů při skladování po dobu dvou týdnů při teplotě 8 °C.

4.7.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Připravený roztok liposomů byl centrifugován 60 minut při 14 000 ot/min. Poté byl odebrán 1 ml supernatantu, ve kterém byla stanovena koncentrace daného vitamínu. Stanovení koncentrace bylo provedeno nastříknutím vzorku na HPLC. Enkapsulační účinnost byla určena z rozdílu koncentrace vitamínu v roztoku před a po enkapsulaci.

Tabulka 6: Parametry nastavení HPLC

Objem nástřiku:	0,1 ml	
Typ eluce:	Gradientová	
Složení MF:	Čas	Složení
	3 min.	100:0 octan sodný:acetonitril
	6 min.	90:10 octan sodný:acetonitril
	12 min.	30:70 octan sodný:acetonitril
	15 min.	30:70 octan sodný:acetonitril
	16 min.	100:0 octan sodný:acetonitril
	20 min.	100:0 octan sodný:acetonitril
Průtok MF:	1 ml/min	
Teplota termostatu:	35 °C	
Celkový čas analýzy:	20 min.	
Název a typ kolony:	Kinetex® 2.6 µm Polar C18 100 Å (150 x 4,6 mm)	
Detektor:	spektrofotometrický s UV-VIS detekcí	
Detekce:	267 nm	

4.7.2 Stanovení velikosti a distribuce liposomů

K určení velikosti vzniklých částic byl využíván dynamický rozptyl světla (DLS). Podstata měření je založena na principu Brownova pohybu, který závisí na velikosti částic. Tato metoda umožňuje určit distribuce velikostí nanočástic v roztoku. Liposomové částice byly studovány na koloidním analyzátoru Malvern Zetasizer Nano ZS, s jehož pomocí byly změřeny následující hodnoty: index polydisperzity, průměrná velikost částic a zeta potenciál.

K analýze byly použity 3 různě připravené vzorky:

- Dané liposomy byly 1000x zředěny destilovanou vodou.
- 1 ml daných liposomů byl centrifugován 60 minut při 14 000 ot/min. Poté byl odebrán supernatant a usazené liposomy byly rozsuspendovány v 1 ml destilované vody.
- 1 ml daných liposomů byl centrifugován 5 minut při 14 000 ot/min. Následně byl slit supernatant, který byl dále centrifugován 60 minut při 14 000 ot/min. Supernatant byl poté odebrán a zcentrifugované liposomy, byly rozsuspendovány v 1 ml destilované vody.

4.7.3 Stanovení stability liposomů

Stabilita částic byla stanovena na základě velikosti zeta potenciálu (zkráceně ZP). Částice, které vykazují vysoce pozitivní nebo negativní ZP, mají tendence se navzájem odpuzovat. Naopak u částic s nízkou hodnotou ZP dochází ke shlukování. Částice s hodnotou ZP nižší než -30 mV nebo vyšší než +30 mV jsou považovány za vysoce stabilní. K měření ZP byl využit přístroj Malvern Zetasizer Nano ZS a dip cela. Analyzované vzorky byly připraveny podle bodů a) a b) uvedených v předešlé kapitole 4.7.2.

4.7.4 Sledování dlouhodobé stability částic

Připravené liposomy, byly uchovávány ve vodném prostředí po dobu 14 dnů při teplotě 8 °C. Po této době byl opět změřen ZP. Následující kroky byly shodné s postupem uvedeným v kapitole 4.7.3.

4.7.5 Sledování dlouhodobé enkapsulační účinnosti

Připravené liposomy, byly uchovávány ve vodném prostředí po dobu 14 dnů při teplotě 8 °C. Po této době byla změřena jejich enkapsulační účinnost. 1 ml daných liposomů byl centrifugován 60 minut při 14 000 ot/min. Následně byla změřena koncentrace vitamínu v supernatantu pomocí metody HPLC.

4.8 Příprava lyofilizovaných liposomů

Vitamíny C, B₁, B₆, B₉ a B₁₂ byly využity k přípravě roztoků liposomů podle postupu uvedeného v kapitole 4.4. Poté byly připravené liposomy centrifugovány po dobu 60 minut při 14 000 ot/min. Po této době byl odlit supernatant a stočené liposomy byly umístěny do mrazáku s teplotou -80 °C. Následující den byly zmražené liposomy vloženy do lyofilizátoru, kde byly zbaveny veškeré vody. Lyofilizace probíhala při teplotě -50 °C až -52 °C a při tlaku $98 \cdot 10^{-3}$ Pa.

4.9 Modelové trávení

Tomuto experimentu byly podrobeny roztoky liposomů připravené podle kapitoly 4.4, lyofilizované liposomy připravené podle kapitoly 4.6 a roztoky vitamínů s koncentrací 1 mg/ml. Byly připraveny 3 fyziologické šťávy: žaludeční, pankreatická a žlučová. Připravené vzorky byly nejprve smíchány se žaludeční šťávou v poměru 1:1 za vzniku směsi A, která byla ponechána na temperované třepačce při 37 °C po dobu 30 minut. Směs B byla připravena smícháním pankreatické a žlučové šťávy v poměru 1:1. Následně byla smíchána směs A se směsí B v poměru 1:1. Takto připravený roztok trávicích šťáv a vzorku byl ponechán na temperované třepačce po dobu 2 hodin při 37 °C. 1 ml vzorku směsi A byl odebrán v čase 0 min a 30 min. 1 ml vzorku směsi A:B byl odebrán v čase 0 h, 1 h a 2 h. Odebrané vzorky šťáv s obsahem liposomů byly nejprve centrifugovány po dobu 60 minut při 14 000 ot/min. Nakonec byly veškeré vzorky přefiltrovány přes nylonové filtry a analyzovány pomocí HPLC.

4.9.1 Žaludeční šťáva

0,25 g pepsinu bylo doplněno na 100 ml v odměrné baňce destilovanou vodou. Poté bylo přidáno 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. Hodnota pH roztoku byla upravena na 0,9.

4.9.2 Pankreatická šťáva

0,25 g pankreatinu a 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného bylo doplněno na 100 ml v odměrné baňce destilovanou vodou. Hodnota pH roztoku byla upravena na 8,9.

4.9.3 Žlučová šťáva

0,4 g žlučových solí bylo doplněno na 100 ml v odměrné baňce fosfátovým pufrům. Hodnota pH roztoku byla upravena na 8.

4.10 Charakterizace funkčních potravin

K charakterizaci vybraných produktů bylo potřeba nejprve upravit jednotlivé vzorky.

Ke kyselé hydrolyze bylo použito 5 g produktu mana nebo cini minis. Produkty byly rozdrobeny a smíchány s 45 ml 0,05 M H₂SO₄. Tato směs byla ponechána v ultrazvukové lázni po dobu 60 minut.

K enzymatické hydrolyze bylo použito 12,5 g produktu mana nebo cini minis, 200 mg hemicelulázy, 200 µl celulózy a 50 ml destilované vody. Směs byla ponechána na temperované třepačce při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byl odebrán 1 ml směsi, který byl 60 minut centrifugován při 14 000 ot/min. Odebraný vzorek byl přefiltrován přes nylonový filtr a analyzován pomocí HPLC.

1 g produktu mana byl smíchán s 10 ml destilované vody. Roztok byl ponechán 60 minut na temperované třepačce při 37 °C. Po této době byl odebrán 1 ml vzorku, který byl 60 minut centrifugován při 14 000 ot/min. Odebraný vzorek byl následně zfiltrován přes nylonový filtr a analyzován pomocí HPLC.

4.11 Charakterizace vitamínových doplňků stravy

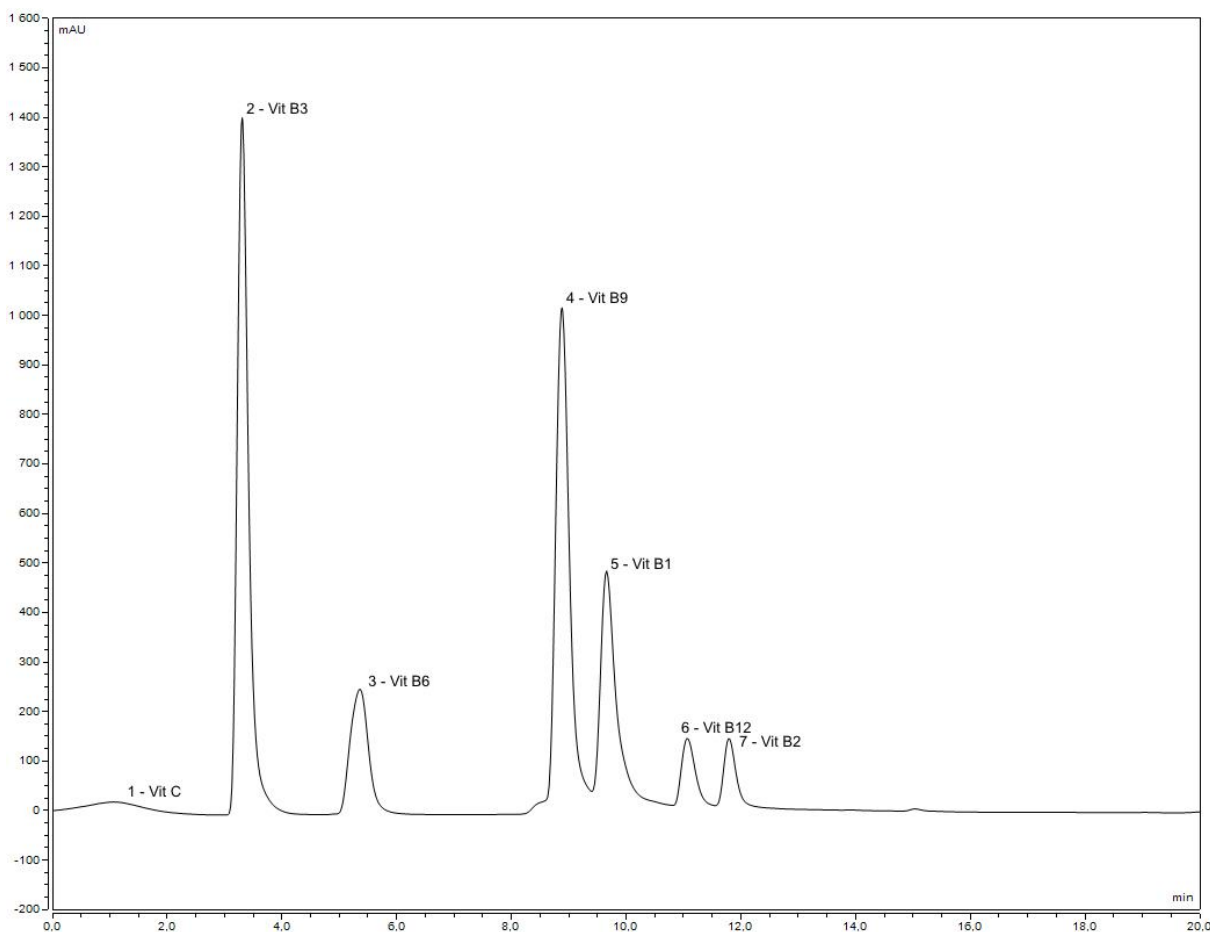
4 tablety produktu B-komplex (s vahou jedné tablety 0,685 g) byly rozdrobeny a smíchány s 50 ml destilované vody. Dále byla směs ponechána na temperované třepačce při 37 °C po dobu 60 minut. Po této době byl odebrán 1 ml vzorku, který byl 60 minut centrifugován při 14 000 ot/min. Supernatant byl zfiltrován přes nylonový filtr a analyzován pomocí HPLC.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato bakalářská práce se zabývá studiem vybraných vitamínů rozpustných ve vodě. V praktické části byly připraveny liposomy a lyofilizované liposomy vybraných vitamínů, které byly následně podrobeny testu modelového trávení. Cílem bylo navrhnout produkt s postupným uvolňováním v trávicí soustavě. Poté byly charakterizovány vybrané fortifikované potraviny a doplňky stravy. Na závěr byly navrženy reálné potraviny a potravinové doplňky s obsahem přidaných vitamínů.

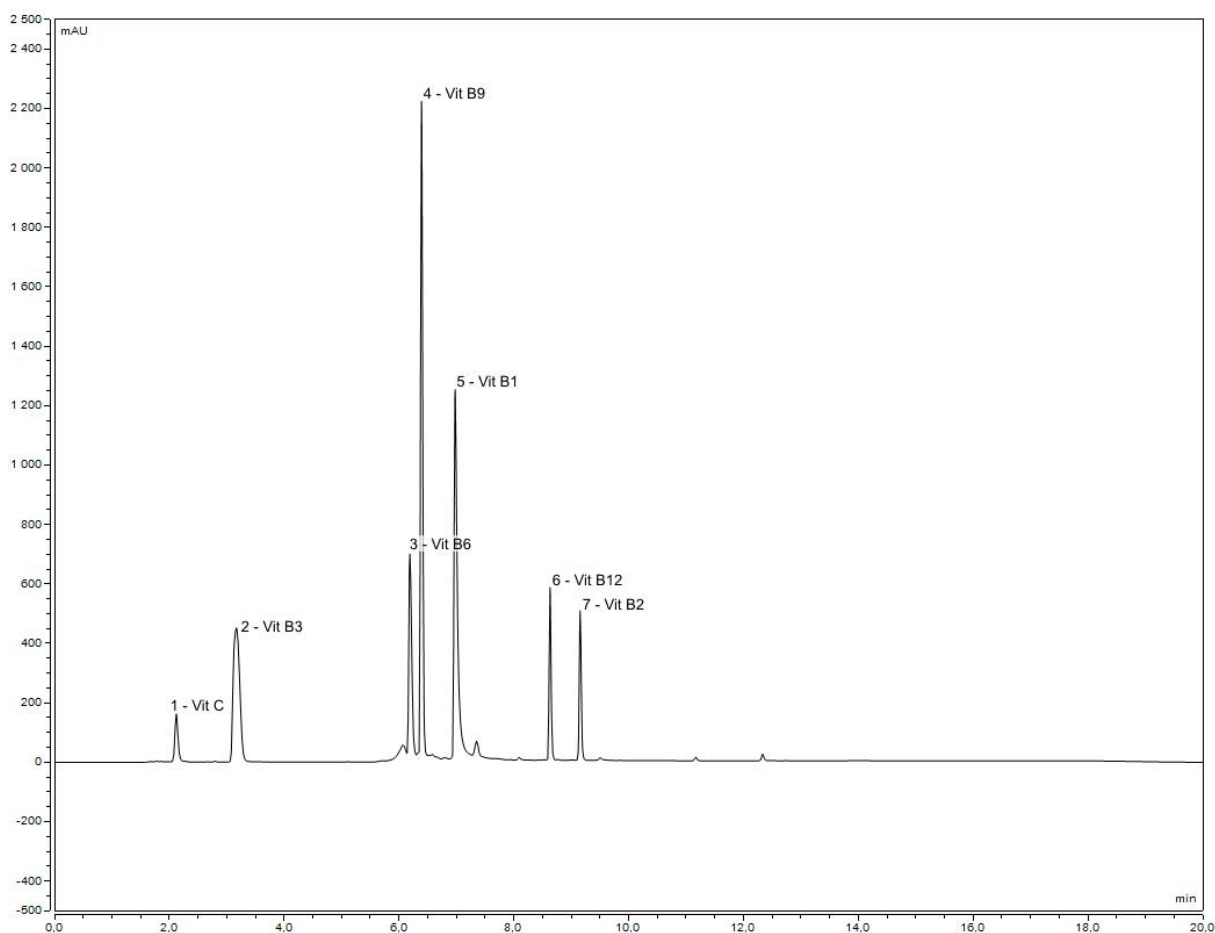
5.1 Optimalizace metody HPLC pro vybrané vitamíny

V rámci optimalizace metody stanovení vitamínů, byly měněny parametry HPLC, mezi které patří složení mobilní fáze, typ eluce a průtok mobilní fáze (zkráceně MF). Směs vybraných vitamínů byla analyzována pomocí 6 různých metod nastavení HPLC. Na obrázku 21 je znázorněn chromatogram analyzované směsi vitamínů s využitím 1. metody. Pro tuto metodu byla nastavena izokratická eluce s octanem sodným jakožto mobilní fází s průtokem 0,5 ml/min.



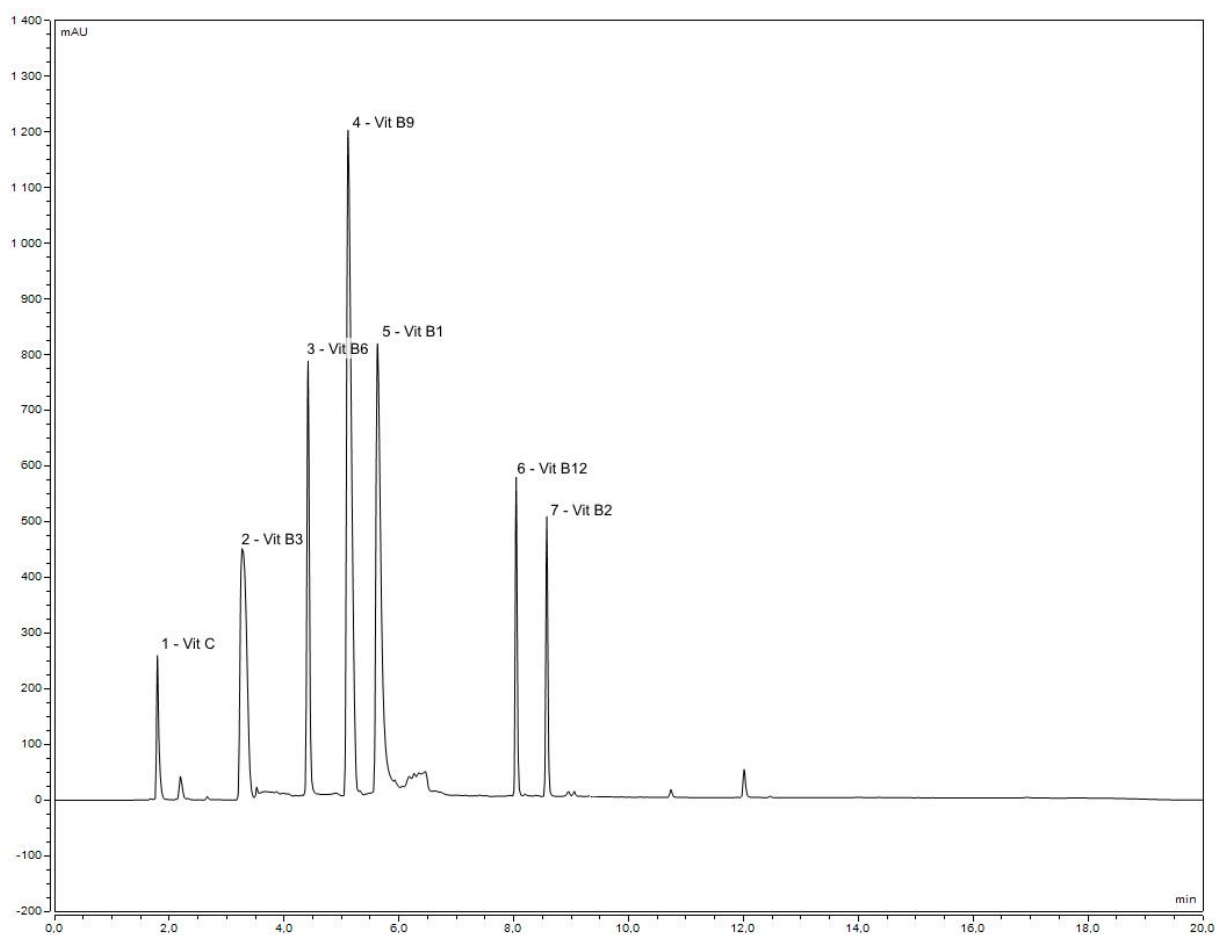
Obrázek 21: Analýza směsi vybraných vitamínů 1. metodou

Z uvedeného chromatogramu jsou patrné nedostatky, které tento způsob nastavení vykazoval. U vitamínů B₉ a B₁ nedošlo k dostatečnému oddělení píků a u vitamínu C byla zaznamenaná hodnota signálu příliš nízká. Z těchto důvodů bylo nutné pokračovat v optimalizaci metody. Pro následující nastavení parametrů došlo ke zvýšení průtoku MF na 0,8 ml/min. To mělo za následek zvýšení intenzity signálu vitamínu C a rozdělení píků B₉ a B₁, ale došlo ke splývání píků B₆ a B₉. Chromatogram s těmito parametry je zobrazen na obrázku 22.



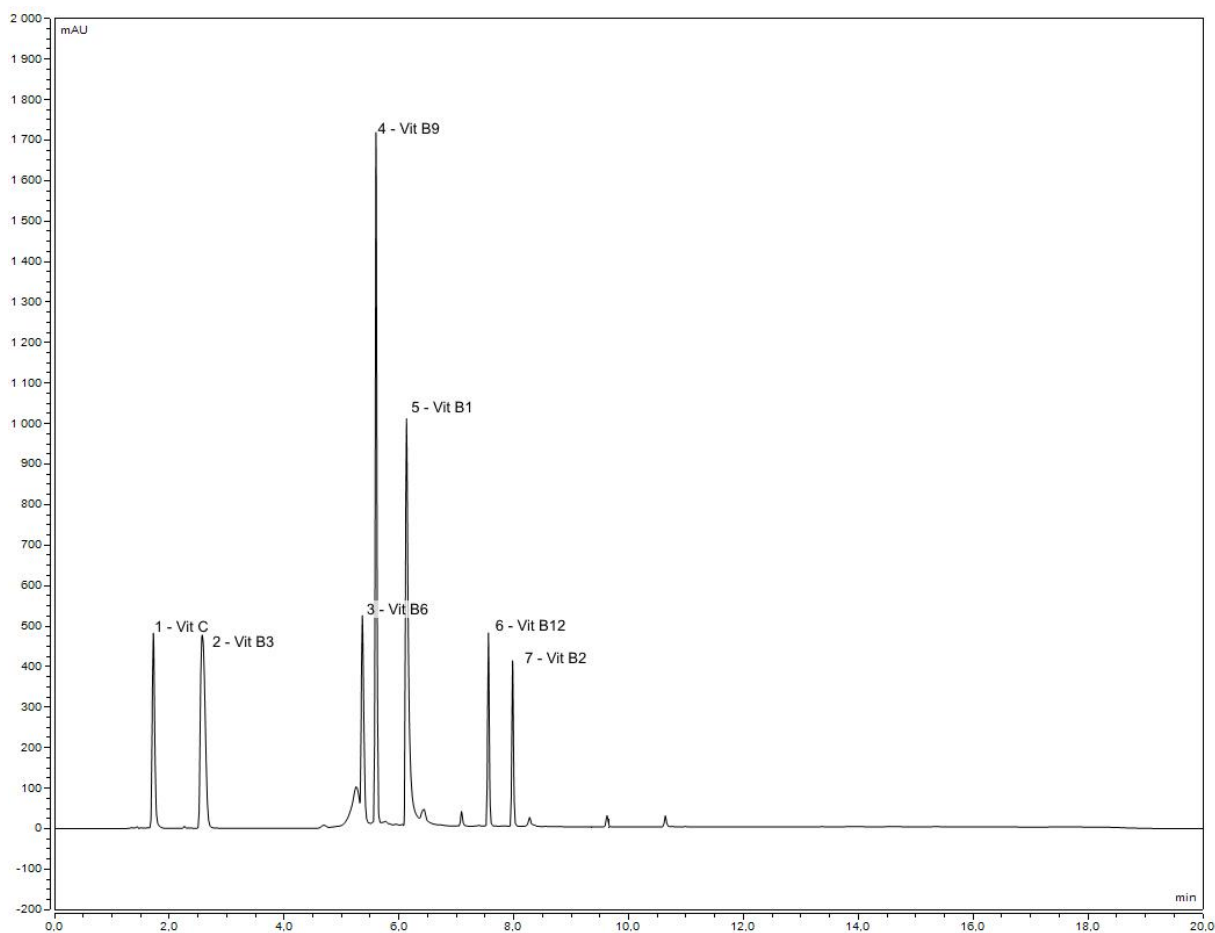
Obrázek 22: Analýza směsi vybraných vitamínů 2. metodou

Došlo tedy ke změně složení MF na směs octanu sodného a acetonitrilu v poměru 95:5. V tomto případě se zlepšilo rozdělení jednotlivých píků, ale také se zvýšil šum signálu. Chromatogram s těmito parametry je uveden na obrázku 23.



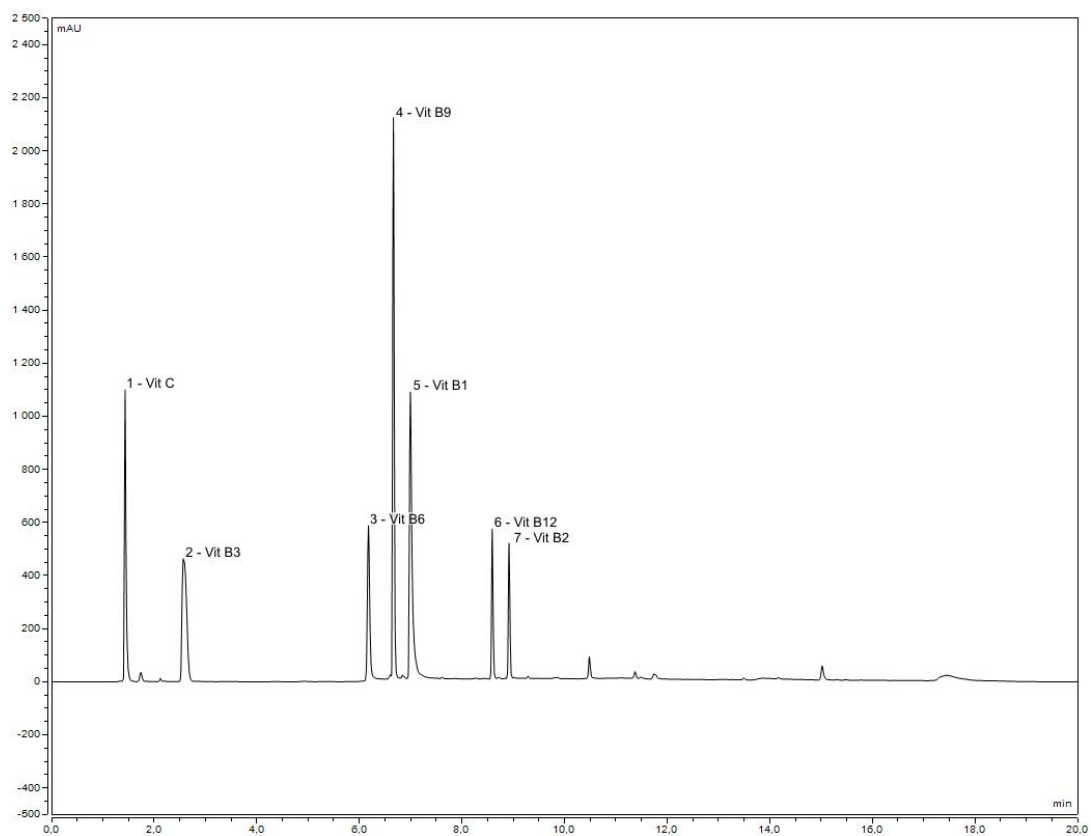
Obrázek 23: Analýza směsi vybraných vitamínů 3. metodou

Izokratická eluce byla nahrazena gradientovou. Na začátku byla MF tvořena pouze octanem sodným s náběhem acetonitrilu do 12. minuty v poměru octan sodný:acetonitril 30:70. Byla změněna také hodnota průtoku MF na 1 ml/min. Došlo k dobrému rozdělení píků i k snížení hodnoty šumu. Problém ale nastal u vitamínu B₆, který vykazoval zdvojení signálu. Chromatogram zaznamenaného signálu je uveden na obrázku 24.

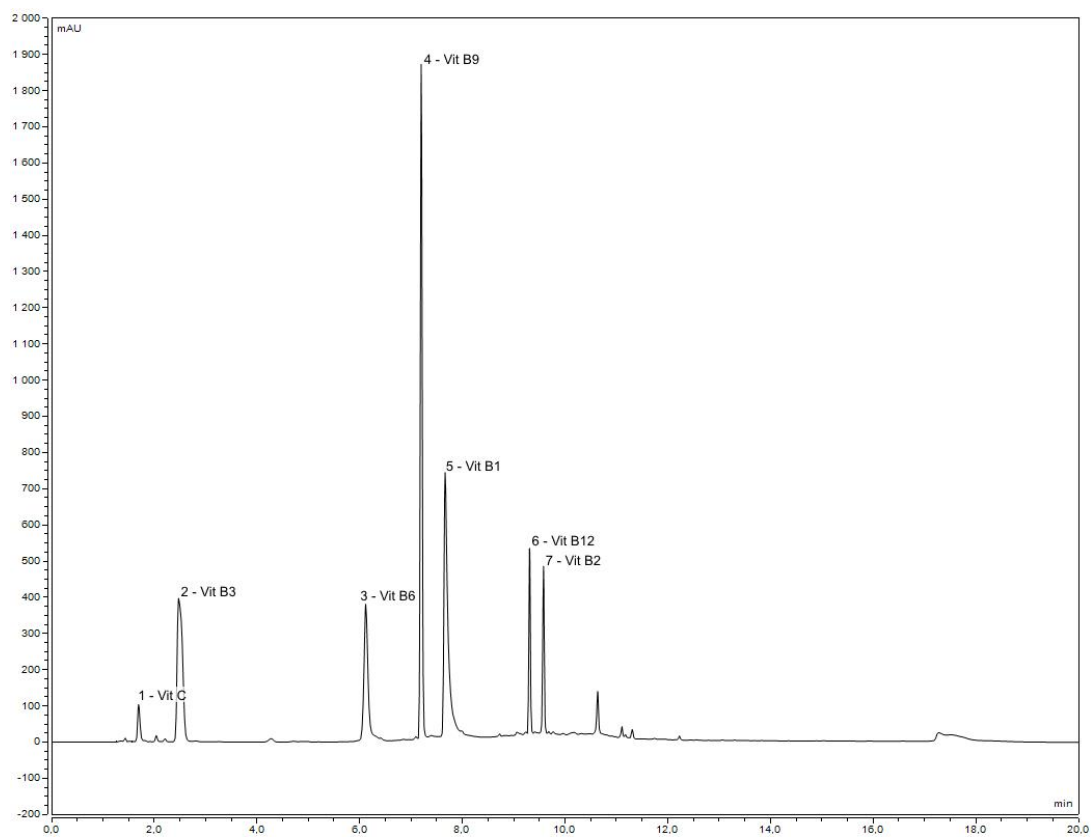


Obrázek 24: Analýza směsi vybraných vitamínů 4. metodou

Došlo tedy ke změně parametrů gradientové eluce. Acetonitril byl přidáván k MF od 3. do 12. minuty v poměru octan sodný:acetonitril 30:70. Nejlepší záznam signálu ale poskytovala 6. metoda jejíž nastavení je uvedeno v tabulce 6. Tato metoda byla nadále využívána k analýze dalších vzorků. Chromatogramy analyzované směsi s využitím 5. a 6. metody nastavení jsou zobrazeny na následujících obrázcích.



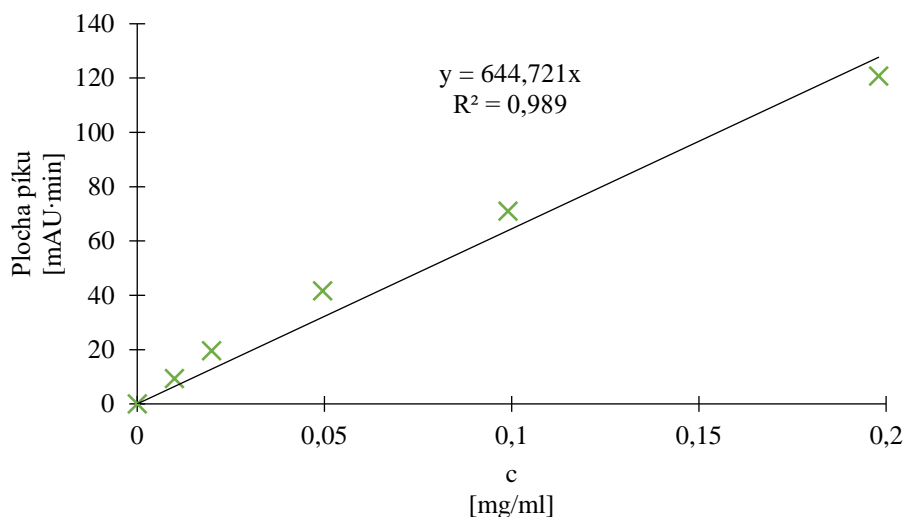
Obrázek 25: Analýza směsi vybraných vitamínů 5. metodou



Obrázek 26: Analýza směsi vybraných vitamínů 6. metodou

5.2 Stanovení koncentrace vitamínů ve vzorcích

Při parametrech 6. metody byly proměřeny koncentrační řady kalibračních roztoků vitamínů, které byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.4. Z rovnic lineární regrese kalibračních závislostí byly dopočítány neznámé koncentrace vitamínů ve vzorcích. Na obrázku 27 je uveden graf kalibrační závislosti vitamínu B₁.



Obrázek 27: Kalibrační závislost vitamínu B₁

Rovnice lineární regrese jednotlivých vitamínů jsou zobrazeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Rovnice lineární regrese vitamínů

Vitamín	Rovnice lineární regrese
C	$y = 15348,184x$ (4)
B ₁	$y = 644,721x$ (5)
B ₂	$y = 1579,294x$ (6)
B ₃	$y = 452,341x$ (7)
B ₆	$y = 598,852x$ (8)
B ₉	$y = 1,663,267x$ (9)
B ₁₂	$y = 378,364x$ (10)

5.3 Charakterizace připravených liposomů

Příprava liposomů se řídila postupem uvedeným v kapitole 4.6. Celkově bylo připraveno 6 různých druhů liposomů, které byly nadále charakterizovány metodami uvedenými v kapitole 4.7.

5.3.1 Stanovení velikosti částic

Připravené liposomy byly zpracovány podle kapitoly 4.7.2. Pro každý vzorek byly změřeny tři hodnoty, ze kterých byla vypočítána průměrná hodnota včetně směrodatné odchylky. V následujících tabulkách jsou uvedeny průměrné hodnoty velikosti částic a polydisperzity. Zaznamenané výsledky přehledněji zobrazuje graf uvedený na obrázku 28.

Tabulka 8: Velikost částic a index polydisperzity liposomů připravených zředěním

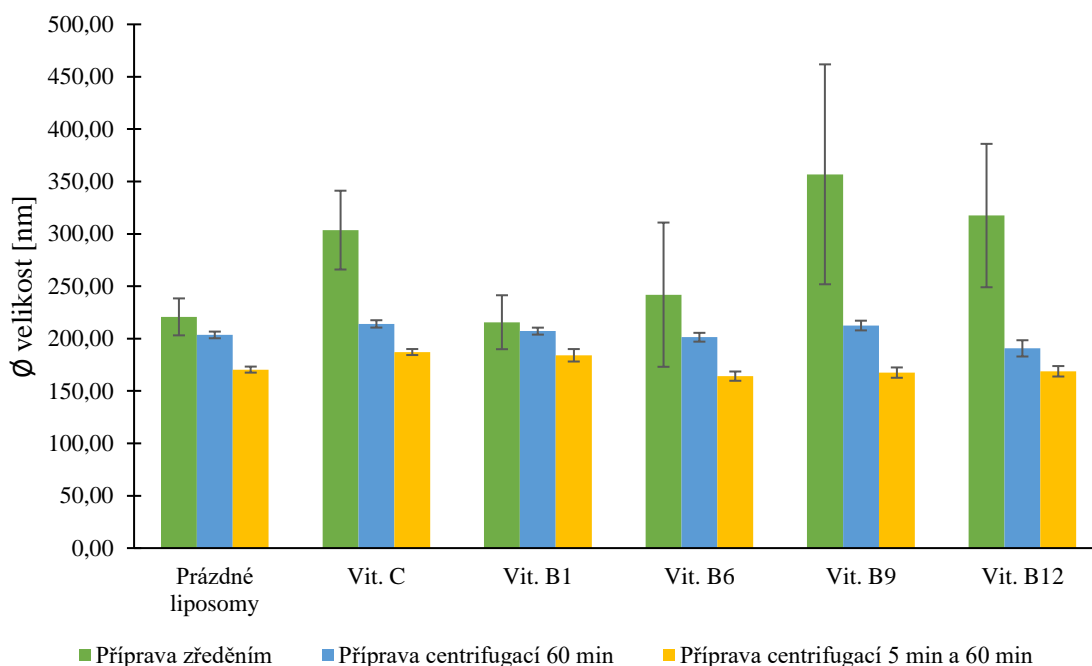
Vzorek	Velikost [nm]	PdI
Prázdné liposomy	220,73 ± 17,64	0,464 ± 0,011
Vit. C	303,57 ± 37,62	0,604 ± 0,056
Vit. B ₁	215,63 ± 25,74	0,471 ± 0,107
Vit. B ₆	241,93 ± 68,85	0,434 ± 0,048
Vit. B ₉	356,83 ± 104,96	0,559 ± 0,062
Vit. B ₁₂	317,47 ± 68,45	0,487 ± 0,055

Tabulka 9: Velikost částic a index polydisperzity liposomů připravených centrifugací 60 min

Vzorek	Velikost [nm]	PdI
Prázdné liposomy	203,50 ± 3,18	0,239 ± 0,025
Vit. C	214,03 ± 3,52	0,299 ± 0,029
Vit. B ₁	207,13 ± 3,33	0,251 ± 0,020
Vit. B ₆	201,30 ± 4,21	0,280 ± 0,031
Vit. B ₉	212,47 ± 4,63	0,344 ± 0,024
Vit. B ₁₂	190,67 ± 7,76	0,311 ± 0,034

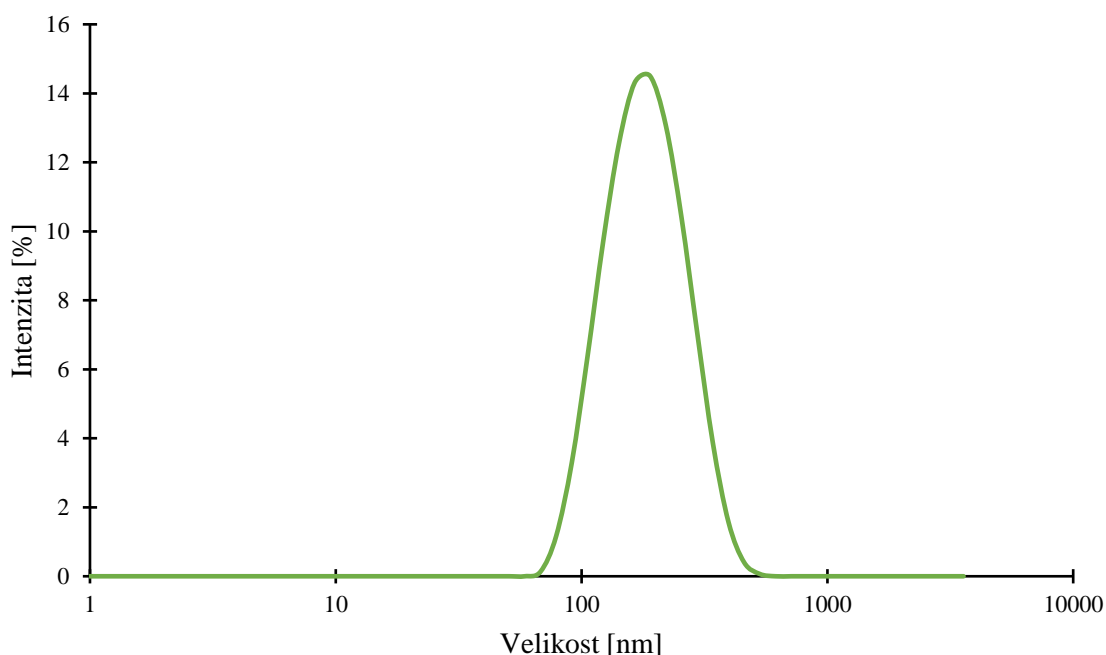
Tabulka 10: Velikost částic a index polydisperzity liposomů připravených centrifugací 5 min a 60 min

Vzorek	Velikost [nm]	PdI [-]
Prázdné liposomy	170,40 ± 2,89	0,179 ± 0,018
Vit. C	187,17 ± 2,86	0,215 ± 0,009
Vit. B ₁	184,07 ± 5,94	0,214 ± 0,012
Vit. B ₆	164,17 ± 4,43	0,164 ± 0,006
Vit. B ₉	167,53 ± 4,93	0,189 ± 0,003
Vit. B ₁₂	168,80 ± 4,99	0,180 ± 0,006



Obrázek 28: Průměrná velikost připravených liposomů

Velikost částic se pohybovala v rozmezí 164,17–356,83 nm. Největší velikost liposomů (356,83 nm) byla detekována u tisíckrát zředěného vzorku se zapouzdřeným vitamínem B₉. Lze říct, že tisíckrát zředěné vzorky vykazovaly průměrně největší velikosti částic. To bylo pravděpodobně způsobeno agregací částic, protože nedošlo k jejich rozsuspendování pomocí přístroje vortex. Nejmenší velikost liposomů (164,17 ± 4,43 nm) byla zaznamenána u vzorku vitamínu B₆, který byl centrifugován 5 min a 60 min. Právě takto připravené vzorky vykazovaly průměrně nejmenší velikosti částic, a to z toho důvodu že při první 5min centrifugaci došlo k odstranění největších částic z roztoku. U vzorků připravených centrifugací se index polydisperzity držel pod hodnotou 0,4. Naopak u vzorků připravených zředěním byla tato hodnota překročena. Překročení hodnoty 0,4 PdI značí, že se přestává jednat o systém s uniformními částicemi. Nejen z tohoto důvodu bylo v následujících experimentech pracováno s částicemi připravenými centrifugací 60 min. Na obrázku 29 je znázorněna závislost rozptylu světla na velikosti a distribuci částic.



Obrázek 29: Závislost rozptylu světla na velikosti a distribuci částic vitamínu B₁₂ připraveného centrifugací 60 min

5.3.2 Sledování stability liposomů

V rámci experimentální části byla měřena stabilita částic pomocí ZP. Vzorky liposomů byly k analýze připraveny dvěma postupy uvedenými v kapitole 4.7.3. Pro každý vzorek byly naměřeny a zprůměrovány tři hodnoty. Dlouhodobá stabilita liposomů byla sledována po 14 dnech skladování při podmínkách uvedených v kapitole 4.7.3. Dosažené výsledky absolutních hodnot ZP liposomů po přípravě a po 14 dnech jsou uvedeny v tabulce 11.

Při prvním měření byly vzorky připravené zředěním průměrně stabilnější než vzorky připravené centrifugací 60 min. Měření vzorků připravených zředěním ukázalo, že největší stabilitu ($-39,43 \pm 0,12$ mV) vykazovaly liposomy s obsahem vitamínu B₆. Při měření vzorků připravených centrifugací 60 min se hodnoty ZP pohybovaly okolo $|30|$ mV. Liposomy lze považovat za dostatečně stabilní i přesto, že se hodnoty ZP několikrát dostaly pod hranici $|30|$ mV. Nejvyšší stabilitu ($-34,07 \pm 0,74$ mV) takto připravených vzorků měly liposomy s obsahem vitamínu B₁.

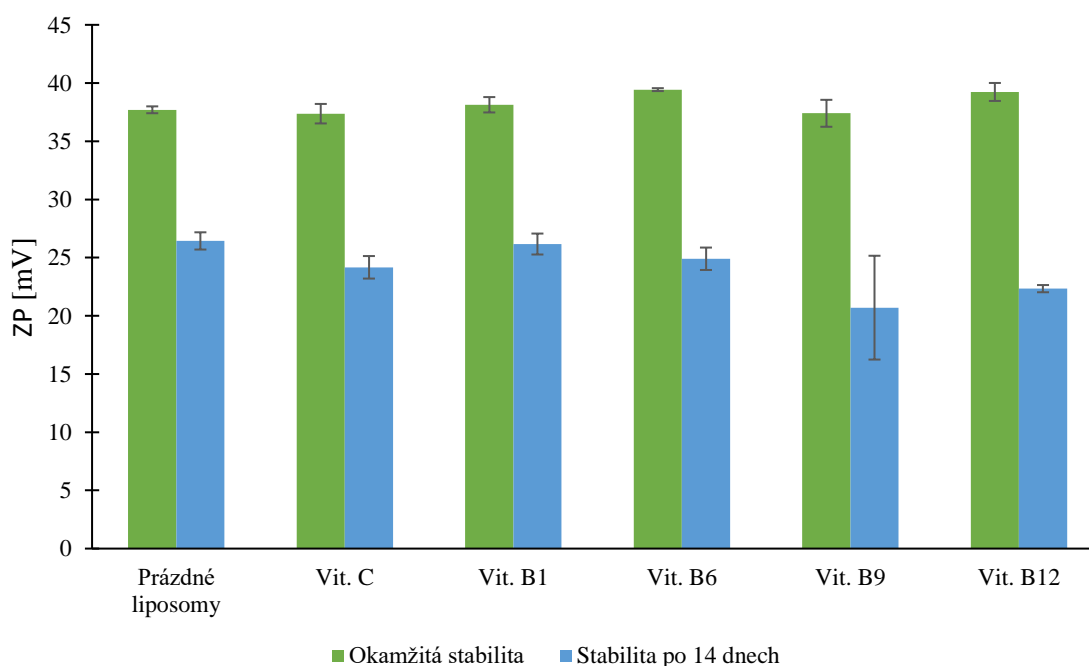
Z výsledků stability liposomů po 14 dnech je patrné, že zatímco u vzorků připravených zředěním došlo ke snížení hodnot ZP, tak u vzorků připravených centrifugací 60 min došlo k jejich zvýšení. Z toho lze usoudit, že metoda přípravy vzorků k analýze ovlivnila měřenou stabilitu. Nejvyšší stabilitu ($-26,17 \pm 0,90$ mV) u vzorků připravených zředěním měly liposomy s obsahem vitamínu B₁. U přípravy centrifugací 60 min vykazovaly nejvyšší stabilitu ($-46,87 \pm 0,38$ mV) liposomy s obsahem vitamínu B₁₂.

Tabulka 11: Absolutní hodnoty ZP připravených liposomů

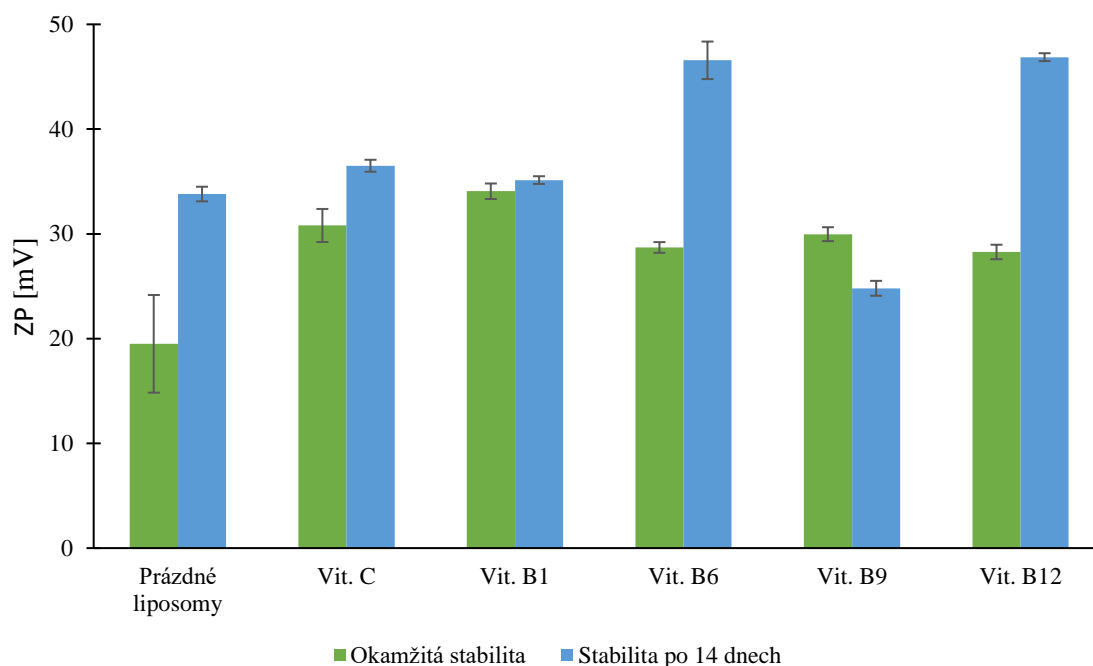
Vzorek	Příprava zředěním	Příprava zředěním po 14 dnech
	ZP [mV]	ZP [mV]
Prázdné	37,70 ± 0,29	26,43 ± 0,74
Vit. C	37,37 ± 0,84	24,17 ± 0,97
Vit. B ₁	38,13 ± 0,66	26,17 ± 0,90
Vit. B ₆	39,43 ± 0,12	24,90 ± 0,96
Vit. B ₉	37,40 ± 1,16	20,70 ± 4,46
Vit. B ₁₂	39,23 ± 0,77	22,33 ± 0,31
Vzorek	Příprava centrifugací 60 min	Příprava centrifugací 60 min po 14 dnech
	ZP [mV]	ZP [mV]
Prázdné	19,50 ± 4,66	33,80 ± 0,70
Vit. C	30,80 ± 1,58	36,50 ± 0,57
Vit. B ₁	34,07 ± 0,74	35,13 ± 0,37
Vit. B ₆	28,70 ± 0,51	46,57 ± 1,79
Vit. B ₉	29,97 ± 0,66	24,80 ± 0,71
Vit. B ₁₂	28,27 ± 0,69	46,87 ± 0,38
Prázdné	19,50 ± 4,66	33,80 ± 0,70

Na základě dosažených výsledků v této i předešlé kapitole byla příprava centrifugací 60 min vyhodnocena jakožto ideální metoda ke zpracování připravených liposomů při stanovení enkapsulační účinnosti či k následujícímu zpracování odebraných vzorků modelového trávení.

Pro přehlednější zobrazení byly z dosažených absolutních hodnot ZP sestrojeny následující grafy:



Obrázek 30: Absolutní hodnota ZP liposomů připravenými zředěním



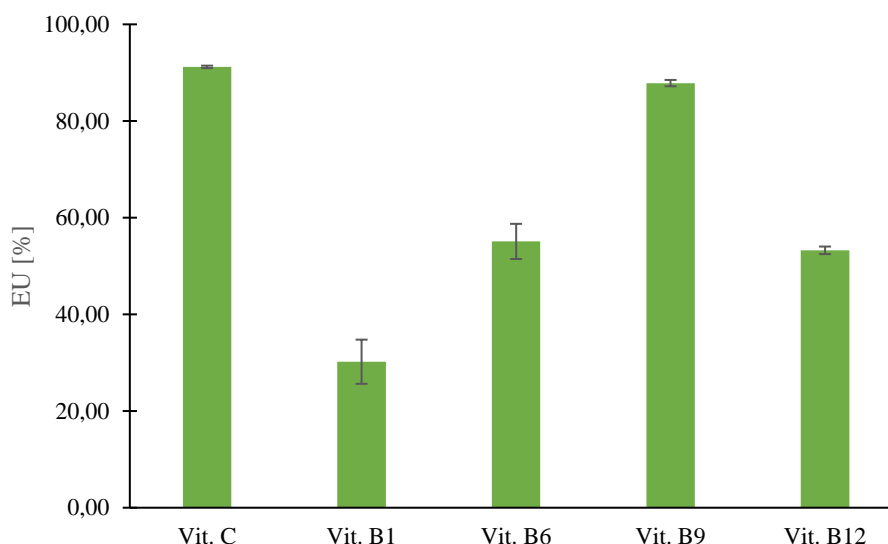
Obrázek 31: Absolutní hodnota ZP liposomů připravenými metodou centrifugací 60 min

5.3.3 Stanovení průměrné enkapsulační účinnosti liposomů

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.6 byly připraveny liposomy vitamínů. Takto připravené částice byly umístěny do centrifugy, kde byly ponechány po dobu 60 minut při 14 000 ot/min. Následně byla v supernatantu určena koncentrace vitamínů. Z rozdílu koncentrací vitamínů před a po enkapsulaci byla vyhodnocena jejich enkapsulační účinnost (zkráceně EU). Hodnoty koncentrací vitamínů včetně jejich směrodatných odchylek supernatantu a jejich enkapsulační účinnosti jsou uvedeny v tabulce 12 a v grafu na obrázku 32.

Tabulka 12: Hodnoty koncentrace v supernatantu a enkapsulační účinnost

Vzorek:	c [mg/ml]	EU [%]
Vit. C	0,088 ± 0,003	91,20
Vit. B ₁	0,698 ± 0,046	30,20
Vit. B ₆	0,449 ± 0,036	55,09
Vit. B ₉	0,122 ± 0,007	87,85
Vit. B ₁₂	0,467 ± 0,008	53,25



Obrázek 32: Graf enkapsulační účinnosti

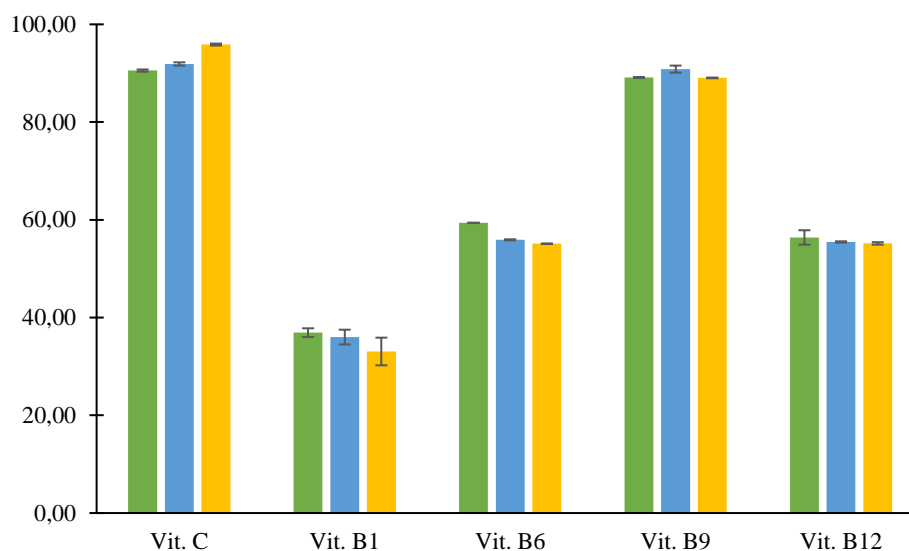
Nejvyšší průměrnou enkapsulační účinnost vykazovaly liposomy s obsahem vitamínu C (91,20 %). Naopak nejnižší enkapsulační účinnost měly liposomy vitamínu B₁ (30,20 %).

5.3.4 Sledování dlouhodobé enkapsulační účinnosti

Sledování dlouhodobé enkapsulační účinnosti se řídilo postupem uvedeným v kapitole 4.7.5. Vzorky byly analyzovány po 7 a 14 dnech od jejich přípravy. Po tuto dobu byly skladovány ve vodném prostředí při teplotě 8 °C. EU byla sledována z hlediska uvolněného množství vitamínu do vodného prostředí. Veškeré vzorky byly měřeny dvakrát a z těchto měření byla vypočítána průměrná hodnota. V tabulce 13 jsou uvedeny koncentrace vitamínů v roztoku včetně jejich směrodatných odchylek a procentuální zůstatek vitamínů v liposomech. Pro lepší přehlednost byl vytvořen také graf, který je zobrazen na obrázku 33.

Tabulka 13: Sledování dlouhodobé EU

Vzorek	okamžité stanovení		stanovení po týdnu		stanovení po 14 dnech	
	c _{vit.} [mg/ml]	zůstatek [%]	c _{vit.} [mg/ml]	zůstatek [%]	c _{vit.} [mg/ml]	zůstatek [%]
Vit. C	0,095 ± 0,0023	90,54	0,081 ± 0,0034	91,89	0,041 ± 0,0020	95,86
Vit. B ₁	0,631 ± 0,0089	36,91	0,640 ± 0,0151	36,01	0,669 ± 0,0283	33,06
Vit. B ₆	0,406 ± 0,0005	59,38	0,441 ± 0,0011	55,91	0,449 ± 0,0002	55,11
Vit. B ₉	0,109 ± 0,0005	89,12	0,092 ± 0,0072	90,84	0,110 ± 0,0007	89,04
Vit. B ₁₂	0,436 ± 0,0147	56,40	0,445 ± 0,0013	55,47	0,448 ± 0,0026	55,17



Obrázek 33: Graf dlouhodobé enkapsulační účinnosti

Na datech lze vidět, že postupem času došlo ke snížení koncentrace vitamínu C v roztoku. Tato skutečnost je způsobena tím, že ani po 14 dnech nedošlo k uvolnění vitamínu z liposomů. Množství vitamínu C, které nebylo zapouzdřeno, bylo postupem času degradováno, a tudíž nebylo vůbec detekováno. Stejná situace nastala také u liposomů vitamínu B₉ při měření EU po 7 dnech. V tomto případě ale došlo po 14 dnech k uvolnění vitamínu do roztoku, čímž se snížila jeho EU. Za nejstabilnější částice lze považovat liposomy s vitamínem C, které po 14 dnech dosahovaly EU minimálně 90 %. Nejméně stabilní částice byly liposomy s vitamínem B₁, kdy se EU po 14 dnech snížila o necelá 4 %. Všechny částice zkoumané v časovém období 14 dnů lze považovat za stabilní. Bylo by vhodné posoudit dlouhodobou stabilitu i po delším například tří měsíčním období.

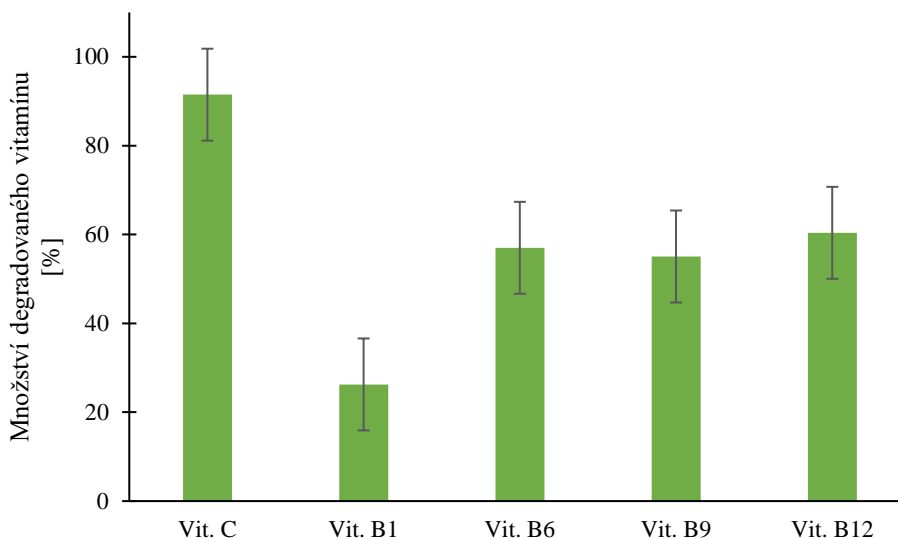
5.4 Modelové trávení

Roztoky neenkapsulovaných, enkapsulovaných a lyofilizovaných vitamínů byly podrobeny průchodu trávicí soustavou podle postupu uvedeného v kapitole 4.9. Při určení času trávení bylo vycházeno z předpokladu, že námi připravené liposomy a lyofilizované liposomy budou aplikovány k potravinám s vysokým obsahem polysacharidů. Proto bylo postupováno podle experimentu, kde byly tráveny obdobné matrice [63]. Nejprve byly modelovému trávení podrobeny čisté roztoky vitamínů bez jakékoliv ochrany. Dosažené výsledky jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14: Koncentrace neobalených vitamínů v průběhu trávení

Vzorek	C _{původní} [mg/ml]	čas a místo odběru					Procentuální množství degradovaného vitamínu [%]
		žaludek t = 0 h	žaludek t = 0,5 h	střevo t = 0 h	střevo t = 1 h	střevo t = 2 h	
		C ₁ [mg/ml]	C ₂ [mg/ml]	C ₃ [mg/ml]	C ₄ [mg/ml]	C ₅ [mg/ml]	
Vit. C	1,092	0,080	0,076	0,102	0,097	0,093	91,48
Vit. B ₁	1,260	1,012	0,730	0,941	0,935	0,929	26,26
Vit. B ₆	1,540	0,614	0,619	0,667	0,675	0,666	57,01
Vit. B ₉	0,881	0,024	0,012	0,437	0,391	0,396	55,06
Vit. B ₁₂	1,512	0,732	0,545	0,685	0,693	0,599	60,38

Dle očekávání došlo v průběhu experimentu ke snížení zaznamenané koncentrace v trávicích šťávách. To je způsobeno degradací nechráněných vitamínů během trávení. Ve výsledcích je především u vitamínu B₉ patrný prudký nárůst koncentrace při přechodu z žaludečních do střevních šťáv. To bylo pravděpodobně způsobeno vykrystalizováním vitamínu z roztoku žaludečních šťáv a vzniku heterogenního roztoku. Při smíchání žaludečních a střevních šťáv došlo opět k rozpuštění látky, a tak i k nárůstu koncentrace v analyzovaném vzorku. Největší degradované množství vykazoval vitamín C, jehož koncentrace se snížila až o 91,4 %. Nejméně degradovanou látkou byl vitamín B₁, jehož množství se oproti původní koncentraci snížilo o 26,26 %. Na obrázku 34 je zobrazen graf procentuálního množství degradovaných vitamínů.



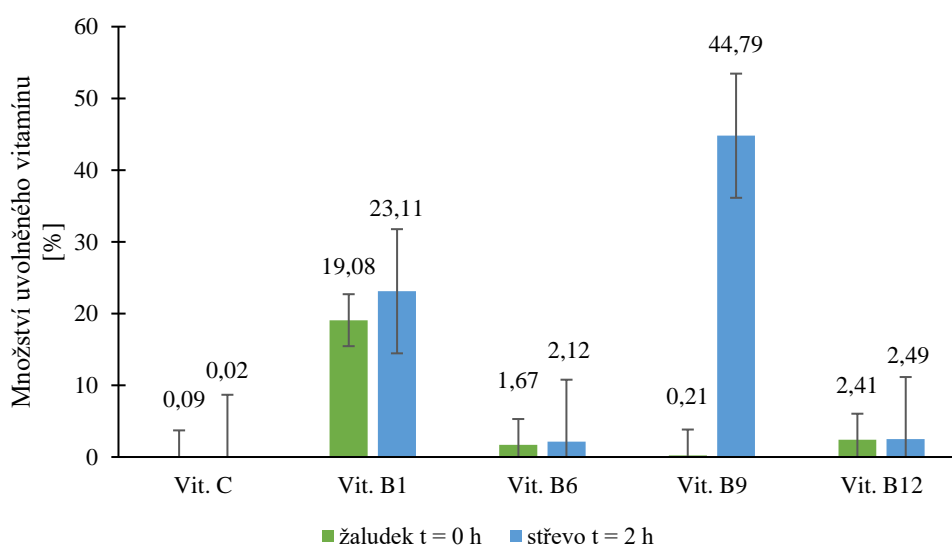
Obrázek 34: Graf degradovaného množství jednotlivých vitamínů

Na grafu lze vidět, že u většiny vitamínů došlo k degradaci okolo 50 % jejich aktivních forem. Z tohoto důvodu je potřeba dané složky během průchodu trávicí soustavou ochránit. Proto byly vybrané vitamíny enkapsulovány do liposomů a následně i lyofilizovány. Zaznamenané koncentrace vitamínů enkapsulovaných do liposomů v průběhu modelového trávení jsou uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15: Koncentrace vitamínů enkapsulovaných do liposomů v průběhu trávení

Vzorek	C _{původní} [mg/ml]	čas a místo odběru					Procentuální množství uvolněného vitamínu [%]
		žaludek t = 0 h	žaludek t = 0,5 h	střevo t = 0 h	střevo t = 1 h	střevo t = 2 h	
		c ₁ [mg/ml]	c ₂ [mg/ml]	c ₃ [mg/ml]	c ₄ [mg/ml]	c ₅ [mg/ml]	
Vit. C	5,460	0,005	0,005	0,002	0,001	0,001	0,02
Vit. B ₁	1,260	0,240	0,244	0,293	0,298	0,291	23,11
Vit. B ₆	4,127	0,069	0,067	0,087	0,087	0,088	2,12
Vit. B ₉	2,642	0,005	0,011	1,046	1,182	1,183	44,79
Vit. B ₁₂	4,032	0,097	0,060	0,094	0,107	0,101	2,50

Na obrázku 35 je zobrazen graf srovnávající procentuální množství uvolněných vitamínů na začátku a na konci trávení.



Obrázek 35: Procentuální množství uvolněných vitamínů z liposomů v žaludku v čase 0 h a ve střevě v čase 2 h

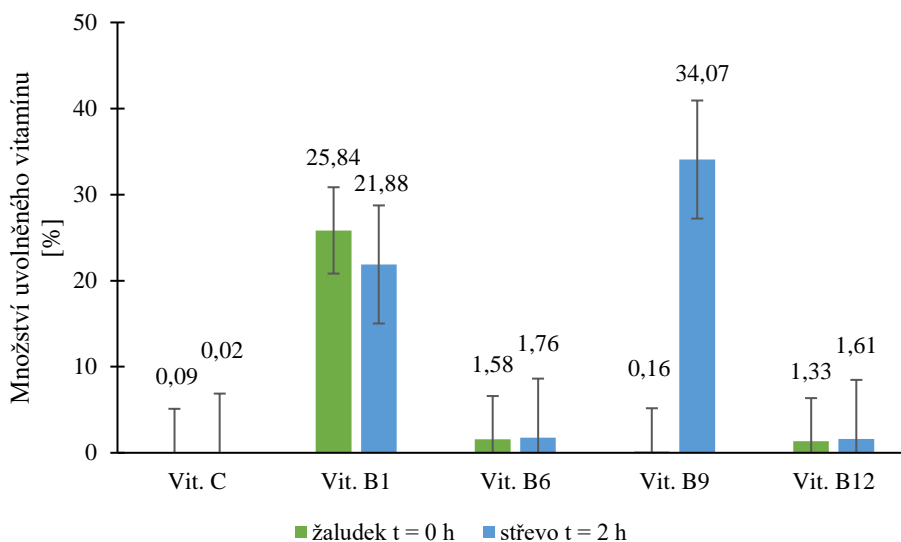
Podle předpokladu došlo v průběhu trávení k uvolnění vitamínů z liposomů, čímž se zvýšila jejich koncentrace v trávicích šťávách. U vitamínu B₉ bylo uvolněno až 44,79 %. Naproti tomu u vitamínu C byla zaznamenána koncentrace velice nízká. To bylo pravděpodobně způsobeno rychlou degradací aktivní formy vitamínu v roztoku.

Experimentu modelového trávení byly podrobeny také lyofilizované liposomy s obsahem vitamínů, které byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.8. Dosažené výsledky jsou zobrazeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Koncentrace vitamínů lyofilizovaných liposomů v průběhu trávení

		čas a místo odběru					Procentuální množství uvolněného vitamínu [%]
		žaludek t = 0 h	žaludek t = 0,5 h	střevo t = 0 h	střevo t = 1 h	střevo t = 2 h	
Vzorek	C _{původní} [mg/ml]	c ₁ [mg/ml]	c ₂ [mg/ml]	c ₃ [mg/ml]	c ₄ [mg/ml]	c ₅ [mg/ml]	
Vit. C	5,460	0,005	0,005	0,002	0,001	0,001	0,02
Vit. B ₁	1,260	0,326	0,252	0,270	0,271	0,276	21,88
Vit. B ₆	2,580	0,041	0,039	0,044	0,042	0,045	1,76
Vit. B ₉	3,521	0,006	0,009	1,292	1,008	1,200	34,07
Vit. B ₁₂	2,520	0,034	0,034	0,041	0,055	0,041	1,61

Na obrázku 36 můžeme vidět graf zobrazující množství uvolněných vitamínů z lyofilizovaných liposomů.



Obrázek 36: Procentuální množství uvolněných vitamínů z lyofilizovaných liposomů v žaludku v čase 0 h a ve střevě v čase 2 h

U vitamínu B₁ lze pozorovat snížení koncentrace v průběhu trávení. To bylo způsobeno uvolněním vitamínu pouze na začátku trávení a jeho následnou degradací. Nejvíce bylo uvolněno vitamínu B₉ a to 34,07 % z původní koncentrace látky obsažené v lyofilizovaných liposomech. Stejně jako v předešlém případě byla zaznamenána koncentrace vitamínu C příliš nízká. Tentokrát byla degradace vitamínu pravděpodobně způsobena také vlivem příliš nízké teploty při procesu lyofilizace liposomů.

5.5 Charakterizace funkčních potravin a doplňků stravy s obsahem přidaných vitamínů

K tomuto experimentu byly využity funkční potraviny a doplňky stravy uvedené v kapitole 4.3. Vybrané potraviny byly zpracovávány podle postupu v kapitole 4.10. U kyselé hydrolyzy nebyla získána průkazná data. Proto byla zkoušena hydrolyza enzymatická. V tomto případě došlo k detekování vitamínů deklarovaných výrobcem. Vzhledem ke komplexnosti matrice vzorku, která obsahovala mimo jiné i aminokyseliny a sacharidy, nebylo možné přesně kvantifikovat identifikované vitamíny. Z výsledků je patrné, že zvolený jednoduchý postup extrakce nebyl dostačující pro separaci těchto látek a je nutné jej optimalizovat.

Byla provedena také charakterizace doplňků stravy uvedených v kapitole 4.3. Seznam vitamínů, které se podařilo detekovat, je uveden v tabulce 17. Při provedené analýze byly ve výrobku identifikovány 3 vitamíny z 9. U ostatních vitamínů došlo k překrývání absorpčních spekter, což znemožnilo jejich identifikaci.

Tabulka 17: Analýza vitamínových doplňků stravy

Obsah vitamínů deklarovaných výrobcem	Detekce vitamínů
Vit. B ₁	✓
Vit. B ₂	✓
Vit. B ₃	×
Vit. B ₆	✓
Vit. B ₁₂	×
Biotin	×
Kyselina listová	×
Kyselina pantotenová	×

5.6 Aplikace chráněné formy vitamínů do potravin a doplňků stravy

Z informací uvedených v teoretické části vyplývá, že mezi potraviny vhodné k obohacení se řadí například snídanové cereálie. Jedná se o jídlo, které tvoří běžnou součást jídelníčku dospělých i dětí. Cereálie se sice vyrábějí z obilných zrn, která obsahují vitamíny, ale v průběhu zpracování dochází k jejich degradaci. To proto že se vitamíny vyskytují převážně v klíčcích a obalu obilných zrn, která jsou odstraňována z důvodu zlepšení struktury výsledného produktu [64].

Námi připravena lyofilizovaná podoba vitamínů by tak mohla být přidávána k cereáliím ve zvláštním obalu chránící je před oxidací a světlem.

Vitamíny enkapsulované do liposomů lze využít k přípravě alginátovo-agarových částic ve formě gumového medvídky. Obdobná aplikace probiotik do zmíněných částic byla uvedena v diplomové práci Ing. Hany Malčíkové [65].

Lyofilizovaná forma enkapsulovaných vitamínů může být aplikována v rámci doplňků stravy do celulózkové kapsle.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na optimalizaci metody stanovení vitamínů pomocí HPLC a na přípravu chráněné formy těchto látek. Cílem práce bylo připravit formu chráněných vitamínů s postupným uvolňováním během trávení ve střevech.

Teoretická část přibližuje charakteristiku jednotlivých vitamínů, metody enkapsulace a možnosti jejich stanovení. Zvláštní kapitoly jsou věnovány také funkčním potravinám a moderním doplňkům stravy, ve kterých jsou srovnávány syntetické a přírodní vitamíny. Je zde uveden také screening českého trhu funkčních potravin a potravinových doplňků.

První kapitoly experimentální části se zabývají optimalizací vhodné metody ke stanovení jednotlivých vitamínů. K analýze byly vybrány standardy vitamínů C, B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ a B₁₂. Ze získaných kalibračních závislostí byly vypočítány neznámé koncentrace vitamínů ve vzorcích.

Dále byly vitamíny C, B₁, B₆, B₉ a B₁₂ enkapsulovány do liposomů. U připravených částic byla stanovena jejich velikost, stabilita, dlouhodobá stabilita, průměrná enkapsulační účinnost a dlouhodobá enkapsulační účinnost. Velikost liposomů se průměrně pohybovala v rozmezí od 160 do 350 nm. Stabilita byla měřena pomocí zeta potenciálu. Analyzované vzorky byly připraveny buďto 1000x zředěním nebo centrifugací 60 min. Stabilita vzorků připravenými centrifugací 60 min postupem času vzrostla, což bylo zřejmě způsobeno stabilizací struktury liposomů během procesu přípravy vzorků. Okamžitá stabilita částic dosahovala průměrně hodnot |30| mV a lze je tedy považovat za dostatečně stabilní. Kromě vitamínu B₁ s EU 30,20 % se hodnoty pohybovaly nad hranicí 50 %. Nejlepší okamžitou EU (91,20 %) měl vitamín C. V průběhu 14 dnů se EU u většiny látek snižovala, ale kromě vitamínu B₁ se její hodnoty stále držely nad 50 %.

Poté byly provedeny experimenty modelového trávení, kterému byly podrobeny roztoky vitamínů, liposomy a lyofilizované liposomy. Při trávení nechráněných vitamínů došlo podle očekávání k jejich degradaci. Nejvyšší hodnoty degradace dosáhl vitamín C a to až 91,48 %. Během trávení liposomů bylo sledováno postupné uvolňování látek do trávicích šňáv. Liposomy s obsahem vitamínu C, B₆ a B₁₂ uvolnily pouze velmi malé množství těchto látek. To svědčí o faktu, že téměř neporušené liposomy by se dostaly až do tlustého střeva. Naopak vitamín B₉ vykazoval uvolnění až 44,79 % svého enkapsulovaného množství. Obdobných výsledků dosahovaly také lyofilizované liposomy. Ani u této formy nedošlo k uvolnění většího množství vitamínů C, B₆ a B₁₂. U těchto látek by byla vhodná optimalizace metody přípravy liposomů a lyofilizovaných liposomů, aby během trávení bylo uvolněno větší množství a nedošlo k degradaci vitamínů během procesu lyofilizace. Největší uvolněné množství (34,07 %) z původní navážky bylo zaznamenáno u vitamínu B₉.

Vybrané funkční potraviny a doplňky stravy byly vystaveny analýze, při které došlo k identifikaci vitamínů deklarovaných výrobcem. Nepodařilo se ovšem kvantifikovat množství stanovených vitamínů. Při analýze doplňků stravy byly rozpoznány 3 vitamíny z 9. Proto by byla potřeba optimalizovat metodu extrakce vitamínů z reálných vzorků.

Na závěr byla vypracována kapitola, navrhuje aplikace námi připravené chráněné formy vitamínů do potravin a potravinových doplňků.

7 ZDROJE

- [1] MINDELL, Earl. *Vitaminová bible pro 21. století: vše o vitamínech, které budete v tomto století potřebovat*. Praha: Knižní klub, 2000. ISBN 80-242-0406-1.
- [2] HLÚBIK, Pavol a Libuše OPLTOVÁ. *Vitaminy*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0373-4.
- [3] ZELDER, Felix, Marjorie SONNAY a Lucas PRIETO. Antivitamins for Medicinal Applications. *ChemBioChem*. 2015, **16**(9), 1264-1278. ISSN 14394227. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.201500072
- [4] BERRY OTTAWAY, P. Stability of vitamins during food processing and storage. *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages*. Elsevier, 2010, , 539-560. ISBN 9781845694951. Dostupné z: doi:10.1533/9781845699260.3.539
- [5] SEMBA, Richard D. The Discovery of the Vitamins. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2012, **82**(5), 310-315. ISSN 0300-9831. Dostupné z: doi:10.1024/0300-9831/a000124
- [6] HASHEMI, Seyed, Kiana POURMOHAMMADI, Aliakbar GHOLAMHOSSEINPOUR, Ismail ES, Daniela FERREIRA a Amin MOUSAVI KHANEGHAH. Fat-soluble vitamins. *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds*. Elsevier, 2019, , 267-289. ISBN 9780128141748. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814174-8.00009-3
- [7] REDDY, Priya a Ishwarlal JIALAL. *Biochemistry: Fat Soluble Vitamins*. StatPearls [Internet]: reasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534869/>
- [8] MANDŽUKOVÁ, Jarmila. *Léčivá síla vitaminů, minerálů a dalších látek: praktický domácí rádce*. Benešov: Start, 2005. ISBN 80-862-3136-4.
- [9] Vitamin D. *Britannica* [online]. [cit. 2021-04-01]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/vitamin-D>
- [10] NIKI, Etsuo a Kouichi ABE. CHAPTER 1. Vitamin E: Structure, Properties and Functions. *Vitamin E*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2019, , 1-11. Food Chemistry, Function and Analysis. ISBN 978-1-78801-240-9. Dostupné z: doi:10.1039/9781788016216-00001
- [11] EL ASMAR, Margueritta, Joseph NAOUM a Elias ARBID. Vitamin K Dependent Proteins and the Role of Vitamin K2 in the Modulation of Vascular Calcification: A Review. *Oman Medical Journal* [online]. 2014, **29**(3), 172-177 [cit. 2021-04-01]. ISSN 1999768X. Dostupné z: doi:10.5001/omj.2014.44
- [12] FRAGNER, Jiří. *Vitaminy jejich chemie a biochemie*. Praha: Československá akademie věd, 1961.

- [13] CROOK, Martin A. Methods for assessment of Thiamine (Vitamin B1). *Laboratory Assessment of Vitamin Status*. Elsevier, 2019, , 149-164. ISBN 9780128130506. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813050-6.00006-1
- [14] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. Praha, 1998. Lange medical book. ISBN 80-857-8738-5.
- [15] ŽAMBOCH, Jan. *Vitamíny*. Praha: Grada, 1996. ISBN 80-716-9322-7.
- [16] BARTZATT, Ronald. Detection and Assay of Riboflavin (Vitamin B2) Utilizing UV/VIS Spectrophotometer and Citric Acid Buffer. *Journal of Scientific Research and Reports*. 2014, **3**(6), 799-809. ISSN 23200227. Dostupné z: doi:10.9734/JSRR/2014/8598
- [17] *PubChem Compound Summary for CID 1054: Pyridoxine* [online]. [cit. 2021-04-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyridoxine>
- [18] *Compound Summary for CID 1050: Pyridoxal* [online]. [cit. 2021-05-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyridoxal>
- [19] *PubChem Compound Summary for CID 1052: Pyridoxamine* [online]. [cit. 2021-05-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyridoxamine>
- [20] *Vitamin B₁₂: Cobalamin* [online]. [cit. 2021-04-01]. Dostupné z: <https://chem.libretexts.org/@go/page/499>
- [21] SEMPOMBE, J, Vicky MANYANGA, Nelson MASOTA, E LUTTA, B NYAMWERU, Dr. KAALE a Thomas LAYLOFF. *A Thin Layer Chromatography Densitometric Method for Assay of Folic Acid in Tablets*. 2015, (18), 37-42.
- [22] CHU, Xiaogang, Richard SCHWARTZ, Michael DIAMOND a Raghavan RAJU. A Combination Treatment Strategy for Hemorrhagic Shock in a Rat Model Modulates Autophagy. *Frontiers in Medicine*. 2019, **6**. ISSN 2296-858X. Dostupné z: doi:10.3389/fmed.2019.00281
- [23] SURJANA, Devita, Gary HALLIDAY a Diona DAMIAN. Role of Nicotinamide in DNA Damage, Mutagenesis, and DNA Repair. *Journal of Nucleic Acids*. 2010, **2010**, 1-13. ISSN 2090-021X. Dostupné z: doi:10.4061/2010/157591
- [24] *PubChem Compound Summary for CID 6613: Pantothenic acid* [online]. [cit. 2021-04-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pantothenic-acid>
- [25] KELLER, Adrian, Janina KOPYRA, Kurt GOTHELF a Ilko BALD. Electron-induced damage of biotin studied in the gas phase and in the condensed phase at a single-molecule level. *New Journal of Physics*. 2013, **15**(8). ISSN 1367-2630. Dostupné z: doi:10.1088/1367-2630/15/8/083045
- [26] DEVAKI, Sudha a Reshma RAVEENDRAN. Vitamin C: Sources, Functions, Sensing and Analysis. *Vitamin C*. InTech, 2017. ISBN 978-953-51-3421-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.70162
- [27] TAVANO, Lorena, Rita MUZZALUPO, Nevio PICCI a Bruno DE CINDIO. Co-encapsulation of antioxidants into niosomal carriers: Gastrointestinal release studies for

- nutraceutical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, **114**, 82-88. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2013.09.058
- [28] DE VOS, Paul, Marijke FAAS, Milica SPASOJEVIC a Jan SIKKEMA. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 2010, **20**(4), 292-302. ISSN 09586946. Dostupné z: doi:10.1016/j.idairyj.2009.11.008
- [29] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. 2011, **1**, 1806-1815. ISSN 2211601X. Dostupné z: doi:10.1016/j.profoo.2011.09.265
- [30] FANG, Zhongxiang a Bhesh BHANDARI. *Encapsulation of polyphenols – a review*. 2010, **21**(10), 510-523. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2010.08.003
- [31] *Liposomes and Lipid Nanoparticles as Delivery Vehicles for Personalized Medicine* [online]. [cit. 2021-04-01]. Dostupné z: <https://www.exeleadbiopharma.com/news/liposomes-and-lipid-nanoparticles-as-delivery-vehicles-for-personalized-medicine>
- [32] ZHANG, Yuan, Wei-e ZHOU, Jia-qing YAN et al. A Review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to the Human Body: An Update from 2010. *Molecules* [online]. 2018, **23**(6) [cit. 2021-03-31]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23061484
- [33] SKOOG, Douglas, Donald WEST, F. HOLLER a Stanley CROUCH. *Fundamentals of analytical chemistry*. Ninth edition. Australia: Brooks/Cole Cengage Learning, 2014. ISBN 978-049-5558-286.
- [34] HAGE, David S. *Chromatography. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*. Elsevier, 2018, , 1-32. ISBN 9780128160633. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816063-3.00001-3
- [35] MEYER, Veronika R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Dostupné z: doi:10.1002/9780470688427
- [36] DONG, Michael W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Dostupné z: doi:10.1002/0471973106
- [37] FRITSCH, R.J. a I. KRAUSE. ELECTROPHORESIS. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, 2003, , 2055-2062. ISBN 9780122270550. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227055-X/01409-7
- [38] BALL, George F. M. *Vitamins in foods : analysis, bioavailability, and stability*. CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. ISBN 978-0-412-78090-5.
- [39] HELMENSTINE, Anne Marie. Vitamin C Determination by Iodine Titration. *ThoughtCo* [online]. [cit. 2021-03-31]. Dostupné z: [thoughtco.com/vitamin-c-determination-by-iodine-titration-606322](https://www.thoughtco.com/vitamin-c-determination-by-iodine-titration-606322)
- [40] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.

- [41] GÜNZLER, Helmut a Alex WILLIAMS. *Handbook of Analytical Techniques*. 2. Federal Republic of Germany: Wiley-VCH, 2002. ISBN 3-527-30165-8.
- [42] BERRY OTTAWAY, P. Principles of food fortification and supplementation. *Food Fortification and Supplementation*. Elsevier, 2008, , 1-10. ISBN 9781845691448. Dostupné z: doi:10.1533/9781845694265.1
- [43] TUR, J.A. a M.M. BIBILONI. Functional Foods. *Encyclopedia of Food and Health* [online]. Elsevier, 2016, s. 157-161 [cit. 2021-04-10]. ISBN 9780123849533. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00340-8
- [44] BIEBINGER, R. a R. HURRELL. *Food Fortification and Supplementation: Technological, Safety and Regulatory Aspects*. Cambridge, England: Woodhead Publishing, 2008. ISBN 9781845691448. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845691448500031>
- [45] CHADARE, Flora, Rodrigue IDOHOU, Eunice NAGO et al. *Conventional and food-to-food fortification: An appraisal of past practices and lessons learned*. 2019, **7**(9), 2781-2795. ISSN 2048-7177. Dostupné z: doi:10.1002/fsn3.1133
- [46] ROMINA ALINA, Vlaic, Mureşan CRINA CARMEN, Muste SEVASTITA, Mureşan ANDRUŢA, Muresan VLAD, Suharoschi RAMONA, Petruţ GEORGIANA a Mihai MIHAELA. Food Fortification through Innovative Technologies. *Food Engineering*. IntechOpen, 2019. ISBN 978-1-83881-975-0. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.82249
- [47] BARAN, K.P. Dietary Supplements. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, 2014, , 128-133. ISBN 9780123864550. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00838-1
- [48] THIEL, R.J. Natural vitamins may be superior to synthetic ones. *Medical Hypotheses*. 2000, **55**(6), 461-469. ISSN 03069877. Dostupné z: doi:10.1054/mehy.2000.1090
- [49] KAMANGAR, Farin a Ashkan EMADI. Vitamin and mineral supplements: do we really need them?. *International journal of preventive medicine*. 2012, **3**(3), 221-226.
- [50] LEE, I-Min, Nancy COOK, J. GAZIANO, David GORDON, Paul RIDKER, JoAnn MANSON, Charles HENNEKENS a Julie BURING. Vitamin E in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *JAMA*. 2005, **294**(1). ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.294.1.56
- [51] SESSO, Howard D. Vitamins E and C in the Prevention of Cardiovascular Disease in Men. *JAMA*. 2008, **300**(18). ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2008.600
- [52] VINSON, J a P BOSE. Comparative bioavailability to humans of ascorbic acid alone or in a citrus extract. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1988, **48**(3), 601-604. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/48.3.601
- [53] Nestlé CHOCAPIC®. *Nestle-cereals* [online]. [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: <https://www.nestle-cereals.com/cz/cs/produkty-kampane/znacky/znacka-chocapic/chocapic>
- [54] Nutrend Delicious Vegan Protein. *Aktin* [online]. [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: <https://aktin.cz/nutrend-delicious-vegan-protein/cokolada-liskovy-orech-450-g>

- 32900?gclid=CjwKCAjwhYOFBhBkEiwASF3KGaOZSdnISZ3KF0K5SDXjdFBU6tE8t7t4jQ_R5Jf9tOB0d50uJL5WRoC6y4QAvD_BwE
- [55] Active Crispy jahoda. *Inkospor* [online]. [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: <https://www.inkospor.cz/proteinove-tycinky/active-crispy-jahoda/>
- [56] Sunar Ovocná kašička s cereáliemi mix ovoce. *Dr. Max* [online]. [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: https://www.drmax.cz/sunarek-kasicka-mix-ovoce-120g?gclid=CjwKCAjwhYOFBhBkEiwASF3KGcqPIYQoiTGFXXKwhwUqLkP5qJ5cXg4JEnGCQ3Wyuwoo2dq9X4_G3pRoCI2kQAvD_BwE
- [57] *KetoMix* [online]. [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: <https://www.ketomix.cz/>
- [58] Mart'anci Gummy s echinaceou. *Mart'anci* [online]. [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: <https://www.martanci.cz/p/multivitaminy/martanci-gummy-s-echinaceou>
- [59] Želé produkty. *Vibovit* [online]. [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: <https://www.vibovit.cz/produkty/zele-produkty/zele-3/>
- [60] Centrum Silver 50+ pro ženy. *Centrum vitaminy* [online]. [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: <https://www.centrumvitaminy.cz/produkty/centrum-silver-50-pro-zeny/>
- [61] Lipozomální dětský multivitamin. *Lýsi* [online]. [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: https://www.rybitukylysi.cz/lipozomalni-detsky-multivitamin-300-ml/?gclid=CjwKCAjwhYOFBhBkEiwASF3KGWAbzjtX3FKWLJnhar5dPToDLGkDyACGkh1s6krCDrArBIYF29cQRoCwUMQAvD_BwE
- [62] Alpha Men Multivitamin. *MYPROTEIN* [online]. [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: <https://www.myprotein.cz/sports-nutrition/alpha-men-multivitamin/10530421.html>
- [63] ENGLYST, Klaus, Hans ENGLYST, Geoffrey HUDSON, Tim COLE a John CUMMINGS. Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycemic response. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1999, **69**(3), 448-454. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/69.3.448
- [64] MCKEVITH, Brigid. Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*. 2004, **29**(2), 111-142. ISSN 1471-9827. Dostupné z: doi:10.1111/j.1467-3010.2004.00418.x
- [65] MALČÍKOVÁ, Hana. *Enkapsulace aktivních látek a jejich aplikace v potravinářském průmyslu*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113486>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Petra Matoušková.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	–	adenosintrifosfát
DLS	–	dynamický rozptyl světla
DNA	–	deoxyribonukleová kyselina
EU	–	Enkapsulační účinnost
EKG	–	elektrokardiogram
FAD	–	flavinadenindinukleotid
FAO	–	Food and Agriculture Organization
FMN	–	flavinmononukleotid
GS	–	plynová chromatografie
HPLC	–	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	–	lipoprotein s nízkou hustotou
LC	–	kapalinová chromatografie
MF	–	mobilní fáze
NAD	–	nikotinamidadenindinukleotid
NADP	–	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PdI	–	index polydisperzity
SFC	–	superkritická kapalinová chromatografie
TDP	–	tiamindifosfát
TTP	–	tiamintrifosfát
UV-VIS	–	ultrafialovo-viditelná
ZP	–	zeta potenciál

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Chromatogram zastoupení vitamínů v potravinových doplňcích

