



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STUDIUM EXTRAKCE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK  
DO TUKOVÉHO ZÁKLADU**

STUDY OF EXTRACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES INTO FATTY BASE

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Šimon Komárek**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Jana Zemanová, Ph.D.**

**BRNO 2020**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1436/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Bc. Šimon Komárek**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **Ing. Jana Zemanová, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Studium extrakce biologicky aktivních látek do tukového základu

### Zadání diplomové práce:

- Literární rešerše na téma:
  - kostival lékařský
  - jeho podrobná charakteristika, s důrazem na hlavní biologicky aktivní látky a možnosti využití v potravinářství, farmacii, kosmetice
  - přehled tukových základů, vhodných pro přípravu bylinných macerátů
  - přehled základních metod pro stanovení hlavních účinných látek
- Charakteristika tukového základu, příprava macerátu a jeho zhodnocení s ohledem na obsah účinných látek, případně stabilitu produktu. Porovnání s komerčním preparátem.
- Vyhodnocení dosažených výsledků, diskuse rozdílů mezi vzorky, formulace závěrů práce.

### Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

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

-----  
Bc. Šimon Komárek  
student(ka)

-----  
Ing. Jana Zemanová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

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

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá maceráty kostivalu lékařského (*Symphytum officinale*) ve vybraných tukových základech (potravinářské sádlo, kosmetické sádlo a mandlový olej).

Vybrané tukové základy byly nejprve charakterizovány obsahem sušiny, číslem zmýdelnění, kyselosti, jodovým a peroxidovým číslem. Zároveň byly stanoveny celkové i volné mastné kyseliny pomocí GC-FID. Poté byly připraveny maceráty sušeného kořene kostivalu lékařského v těchto základech.

V macerátech byla sledována změna čísla kyselosti a peroxidového čísla, a také stanoveny obsahy vybraných biologicky aktivních látek. Stanoven byl obsah celkových fytosterolů pomocí UV-VIS spektrometrie, jednotlivé fytosteroly a karotenoidy pomocí HPLC-DAD, celkové karotenoidy pomocí UV-VIS spektrometrie. Rovněž byly stanoveny tokoferoly pomocí HPLC-DAD, celkové fenolické látky pomocí Folin-Ciocalteuova činidla a antioxidační aktivita pomocí ABTS. Naměřené hodnoty byly následně porovnány s průmyslově vyráběnou kostivalovou masťou.

V macerátech byl stanoven nárůst čísla kyselosti i peroxidového čísla. Dále byl pozorován nárůst celkových fytosterolů i karotenoidů. Stanoven byl obsah  $\beta$ -sitosterolu a stigmasterolu, jednotlivé karotenoidy nebyly detekovány. Z tokoferolů byl detekován pouze DL- $\alpha$ -tokoferol acetát. Díky maceraci fenolických látek do tukových základů byla pozorována i změna antioxidační aktivity.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Kostival lékařský (*Symphytum officinale*), sádlo, mandlový olej, tukové charakteristiky, biologicky aktivní látky v tucích, GC-FID, HPLC-DAD, UV-VIS spektrometrie

## **ABSTRACT**

This diploma thesis deals with macerates of comfrey (*Symphytum officinale*) in selected fats (food lard, cosmetic lard and almond oil).

Selected fats were first characterized by dry matter content, saponification, acid, iodine number, peroxide value. At the same time, total and free fatty acids were determined using GC-FID. Macerates were prepared by extraction of comfrey roots with selected fats.

In prepared macerates the change in acid and peroxide value was monitored, as well as the content of selected bioactive compounds. The content of total phytosterol and total carotenoid content was determined by UV-VIS spectrometry, phytosterols and carotenoids were also analysed using HPLC-DAD. Total phenolic content was measured using Folin-Ciocalteu reagent and antioxidant activity by ABTS assay. The measured properties were then compared with industrially produced comfrey ointment.

In macerated fats the increase in acid and peroxide value was determined. Furthermore, an increase in the content of total phytosterols and total carotenoids was observed. Using HPLC-DAD the content of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol was determined, but carotenoids were not detected. Of the tocopherols, only DL- $\alpha$ -tocopherol acetate was detected. During maceration, the content of total phenolic compound in fat increased, which caused a change in antioxidant activity.

## **KEYWORDS**

Comfrey (*Symphytum officinale*), lard, almond oil, characterisation of fat, bioactive compounds in fat, GC-FID, HPLC-DAD, UV-VIS spectrometry

KOMÁREK, Šimon. *Studium extrakce biologicky aktivních látek do tukového základu* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-27]. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123980>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ing. Jana Zemanová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucí diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

*Rád bych na tomto místě poděkoval své vedoucí Ing. Janě Zemanové, Ph.D. za vedení, odborné rady a pomoc při tvorbě této diplomové práce. Poděkování patří také společnosti Aromatica CZ s.r.o. za poskytnutí vzorků a cenných rad, Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. a Ing. Martinu Szotkowskému za pomoc při analýze mých vzorků. Velký dík pak patří všem mým blízkým, především mé rodině, za podporu během celého studia.*

## OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Kostival lékařský ( <i>Symphytum officinale</i> ) .....	9
2.1.1	Taxonomické zařazení .....	9
2.1.2	Morfologie .....	9
2.1.3	Chemické složení.....	11
2.1.4	Účinky a využití.....	12
2.2	Vepřové sádlo .....	14
2.3	Mandlový olej .....	15
2.4	Bylinné maceráty .....	18
2.5	Metody stanovení vybraných biologicky aktivních látek z tukových základů .....	19
2.5.1	Fenolické látky .....	19
2.5.2	Tokoferoly .....	20
2.5.3	Karotenoidy .....	21
2.5.4	Fytosteroly .....	22
2.5.5	Antioxidační aktivita .....	23
2.6	Možnosti analýzy tukových základů.....	23
2.6.1	Stanovení sušiny .....	23
2.6.2	Stanovení tukových charakteristik.....	24
2.6.3	Stanovení mastných kyselin .....	24
3	Experimentální část .....	26
3.1	Použité chemikálie a laboratorní vybavení .....	26
3.1.1	Laboratorní pomůcky .....	26
3.1.2	Laboratorní přístroje .....	26
3.1.3	Chemikálie.....	26
3.1.4	Plyny pro GC-FID .....	27
3.2	Materiál .....	28
3.3	Příprava kostivalových macerátů .....	28
3.4	Postupy stanovení jednotlivých parametrů .....	28
3.4.1	Stanovení celkové sušiny sušením .....	28
3.4.2	Stanovení čísla kyselosti.....	28
3.4.3	Stanovení čísla zmydlnění .....	29

3.4.4	Stanovení jodového čísla podle Hanuše .....	29
3.4.5	Stanovení peroxidového čísla .....	29
3.4.6	Stanovení volných a celkových mastných kyselin pomocí GC-FID .....	29
3.4.7	Stanovení celkových fytoosterolů pomocí UV-VIS spektrometrie .....	32
3.4.8	Stanovení fytoosterolů a karotenoidů pomocí HPLC-DAD.....	32
3.4.9	Stanovení celkových karotenoidů pomocí UV-VIS spektrometrie .....	33
3.4.10	Stanovení tokoferolů pomocí HPLC-DAD.....	33
3.4.11	Stanovení celkových fenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla .....	34
3.4.12	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS .....	34
3.5	Statistické zpracování výsledků .....	35
4	Výsledky a diskuze.....	36
4.1	Charakterizace tukových základů .....	36
4.1.1	Stanovení sušiny .....	36
4.1.2	Stanovení tukových čísel .....	37
4.1.3	Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID .....	40
4.1.4	Stanovení volných mastných kyselin pomocí GC-FID .....	44
4.2	Vybrané parametry kostivalových macerátů.....	48
4.2.1	Stanovení čísla kyselosti.....	48
4.2.2	Stanovení peroxidového čísla .....	49
4.2.3	Stanovení fytoosterolů .....	50
4.2.4	Stanovení karotenoidů .....	53
4.2.5	Stanovení tokoferolů.....	55
4.2.6	Stanovení celkových fenolických látek .....	55
4.2.7	Stanovení antioxidační aktivity .....	56
5	Závěr.....	58
6	Seznam použité literatury .....	60
7	Použité zkratky .....	73
8	Seznam příloh.....	74
9	Přílohy .....	75

# 1 ÚVOD

Při produkci vepřového masa a bourání jatečních těl vepřů je mimo dalších surovin získáváno také sádlo. To může být hřbetní, plst'ové, střevní nebo kruponové, což závisí na místě výskytu v těle vepřů. Sádlo bývalo dříve ceněnou a hojně využívanou surovinou, a to především jako zdroj potravy pro svou vysokou energetickou hodnotu a pro svou trvanlivost. Nejčastěji bylo sádlo vyráběno suchou cestou neboli škvařením, dnes je využívána mokrá cesta, kdy je sádlo taveno v přítomnosti vody či horké páry. Takto lze získat sádlo s nižším obsahem trans mastných kyselin. Vepřové sádlo však nebylo pouze konzumováno, ale také využíváno při léčbě různých kožních onemocnění, především pro svou promašťovací schopnost.

Dnes je sádlo spíše odpadní surovinou, spotřebitelé mají totiž mnohem více možností i dostupných surovin pro nahrazení sádla v potravě. Začínají se intenzivně zabývat složením a účinky různých potravin, a tak není divu, že sádlo, jehož konzumace zvyšuje hladinu LDL cholesterolu a riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění, přestalo být pro konzumenty atraktivní surovinou.

Producenti proto začali pro porážku vybírat mnohem mladší vepře, kteří mají v mase i v podílu celkové hmotnosti nižší obsah tuku. Dokonce dochází k úpravě stravy vepřů pro vyšší obsah kyseliny linolové v sádle, aby se tato surovina vrátila zpátky do našich kuchyní. Ani to však nemá velkou úspěšnost a vepřové sádlo se začíná stávat odpadní surovinou, sloužící k výrobě pohonných hmot.

Proto je třeba pro vepřové sádlo najít další možnosti využití. Jedním z nich může být macerování bylin do sádla, což je tradiční způsob výroby mastí. Kořen byliny kostivalu lékařského (*Symphytum officinale*) je ceněnou surovinou pro svůj obsah allantoinu, fenolických látek, taninů, karotenoidů či fytosterolů. Extrakty kořene kostivalu vykazují antioxidační i antimikrobiální aktivitu, zmírňují bolest a otok a díky allantoinu zrychlují buněčné dělení, hojení ran, zlomenin atd. Avšak kvůli obsahu pyrrolizidinových alkaloidů, které mají karcinogenní účinky, není doporučeno vnitřní užívání kostivalu. Macerát tohoto kořene v sádle, který je určen pro vnější užití, se proto jeví jako skvělé spojení obou těchto surovin. Společnost Aromatica CZ s.r.o. tak mezi svůj sortiment výrobků zařadila i produkci kostivalové masti, kde jako tukový základ slouží právě sádlo.

Cílem této diplomové práce bylo charakterizování tukových základů jako vstupní suroviny, přičemž byl sledován obsah sušiny, stanovena tuková čísla a obsah celkových a volných mastných kyselin. Dalším krokem byla příprava macerátů kostivalového kořene do těchto základů a následné porovnání změny čísla kyselosti a peroxidového čísla s tukovým základem. V macerátech byly porovnány obsahy fytosterolů, karotenoidů, tokoferolů, fenolických látek a antioxidační aktivity s kostivalovou mastí vyráběnou společností Aromatica. Jako tukové základy byly zvoleny tři šarže kosmetického sádla, které používá i společnost Aromatica, dále sádlo potravinářské pro porovnání obou typů sádla, a také mandlový olej, který má oproti sádlu vyšší teplotu tání a je hojně využívanou surovinou například pro výrobu masážních olejů nebo kosmetických přípravků určených pro citlivou pokožku.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kostival lékařský (*Symphytum officinale*)

#### 2.1.1 Taxonomické zařazení

Říše:	rostliny ( <i>Plantae</i> )
Podříše:	cévnaté rostliny ( <i>Tracheobionta</i> )
Oddělení:	krytosemenné ( <i>Magnoliophyta</i> )
Třída:	vyšší dvouděložné rostliny ( <i>Rosopsida</i> )
Řád:	brutnákotvaré ( <i>Boraginales</i> )
Čeleď:	brutnákovité ( <i>Boraginaceae</i> )
Rod:	kostival ( <i>Symphytum</i> )

Kostival lékařský má mnoho lidových názvů, například černý kořen, lupen sladký či kobylí mléko. Taxonomicky je zařazen do řádu brutnákotvarých (*Boraginales*), čeleď brutnákovité (*Boraginaceae*) [1, 2]. Rod *Symphytum* se postupem času rozšířil z původních 15 druhů na celkem 35 druhů. Jako původ jeho výskytu se označuje oblast v okolí Černého moře. Poté se však kostival rozšířil po celé Evropě i Asii. Roste tak od západní Evropy přes Malou Asii až po Sibiř. Druhotně byl rozšířen do Afriky a Severní Ameriky. Nejčastěji se kostival vyskytuje v oblastech mírného a subtropického pásma, v nížinách i vrchovinách. Vzácně se vyskytuje i na teplejších místech, také se výjimečně objevuje v horských oblastech či v severních končinách. V Evropě je jeho výskyt vzácný na Pyrenejském poloostrově, jižní oblasti Balkánu a Apenin, nebo naopak v severních částech Švédska, Finska či Norska [1, 3, 4].

V České republice se nachází čtyři zástupci rodu *Symphytum*, konkrétně kostival český (*Symphytum bohemicum*), kostival drsný (*Symphytum asperum*), kostival hlíznatý (*Symphytum tuberosum*) a kostival lékařský (*Symphytum officinale*) [1, 3, 4, 5].

#### 2.1.2 Morfologie

Kostival lékařský se nachází na vlhkých loukách či na místech v blízkosti vody. Na zemědělských půdách není jeho výskyt příliš častý. Nejčastěji roste v nížinách, ale může se nacházet i na vyšších místech, přičemž jeho výskyt byl popsán i v oblastech s nadmořskou výškou okolo 1600 m n. m. (v České republice byl popsán jeho výskyt v Krkonoších, v nadmořské výšce přibližně 1240 m n. m.) [3, 4]. Roste v hlinitých až jílovitých půdách s bohatým obsahem minerálních látek (především dusíku), humusu a neutrálním, slabě kyselým nebo slabě zásaditým pH. V nížinách se nachází v oblastech s nepřímým slunečním svitem. Ve vyšších polohách se naopak vyskytuje v místech s dostatečným slunečním svitem [3–5].

Kostival lékařský dorůstá výšky 30–120 cm, nejčastěji okolo 80–100 cm. Jeho nadzemní část je pokryta množstvím krátkých a tuhých chloupků. Rostlina má silné, dužnaté lodyhy, přičemž lodyha uprostřed je označována jako hlavní a kolem ní rostou další tzv. boční lodyhy (viz Obrázek 1). Šířka lodyhy nad nejspodnějším listem je okolo 6–14 mm a směrem nahoru se postupně zužuje [1, 3, 5, 6, 8].



**Obrázek 1** *Kostival lékařský* [9]

Jelikož se jedná o vytrvalou rostlinu, má oproti jedno-, či dvouletým rostlinám mnohem větší kořenový systém, který je tak spíše podobný dřevnatým rostlinám. Kořeny jsou protáhlé, dužnaté, dosahují hloubky až 1,8 metru a mají spíše vertikální charakter. Rostlina však může mít i vzdušné kořeny nebo tvořit adventivní kořeny. V půdě kostival vytváří tlusté, rozvětvené oddenky, které mají řepovitý tvar, na povrchu jsou černé, naopak uvnitř jasně bílé, bez tvorby oddenkových hlíz (viz Obrázek 2). Oddenky jsou větvenité a vícehlavé, rostou vertikálně a mohou dorůst až do 80 cm. Nejčastěji však mají délku okolo 30 cm [1, 3–7, 10].

Počátek růstu je u kostivalu nejčastěji v dubnu či začátkem května, kdy z listové růžice vyrůstají shluky mladých listů, ze kterých se vytváří listové čepele. Listy mají tmavě zelenou barvu, vejčitý, celokrajný tvar a jsou střídavě uspořádané. Na povrchu mají štětinovitě ochlupení a z rubové strany zřetelnou vystoupenou žilnatinu. V dolní části jsou listy dlouze řapíkaté s šířkou řapíku okolo 3 mm. Mohou dosahovat délky 16–25 cm a šířky 6,0–8,5 cm. Listy se směrem vzhůru postupně zužují a zkracují. V horních částech rostliny dosahuje délka čepelí listů okolo 11–16 cm, s šířkou 3,0–4,5 cm [1, 3, 5, 6, 8].

Kostival lékařský kvete přibližně dva měsíce, a to v období května až září. Poté rostlina dále vytváří nové lodyhy. Barva květů se různí, od načervenalé, přes fialovou až po světle bílou. Koruna květu má průměr okolo 1,5 centimetru. Její tvar je baňkovitý, paprscitý a na okraji jsou patrné tři trojboké cípy. Kalich květu má délku přibližně 8,5–10,5 cm a bývá různě hustě chlupatý. U ústí má pět zahnutých šupin, vytvořených z korunních lístků a za nimi je pět prašníků. Květ produkuje sladký nektar, díky kterému láká množství hmyzu, jako jsou mravenci, včely nebo čmeláci. Květenství je nejprve spirálovitě stočené, a poté se postupně rozevívá. Uspořádání květů je ve vrcholových vijanech [1–3, 5, 7].

Plodem kostivalu je 4,5 až 6 mm dlouhá tvrdka, která obsahuje jedno semeno. Barva tvrdky je tmavě šedá, hnědá až černá. Tvrdka má kulovitý tvar, je svrasklá a lesklá. Každý semeník produkuje čtyři tvrdky, které po uzrání vypadávají v okolí rostliny [2, 3].



**Obrázek 2** Oddenky kostivalu lékařského [11]

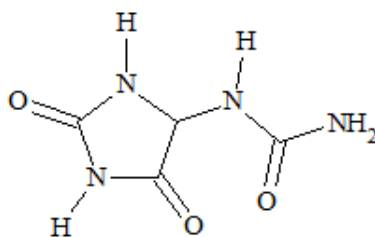
### 2.1.3 Chemické složení

Účinnou látkou kostivalu lékařského je allantoin, jehož obsah v rostlině činí přibližně 0,6 až 0,9 % [1, 4, 12, 13, 14], v kořenu kostivalu to však může být 0,75–2,55 % [19]. Jedná se o rostlinný alkaloid, je to derivát purinu, který vzniká působením enzymu urát syntasy při degradaci nukleových kyselin (viz Obrázek 3, chemická struktura allantoinu). Celkem kostival lékařský obsahuje 23 alkaloidů. Kromě allantoinu a pyrrolizidinových alkaloidů je zde také zastoupen consolicin, consolidin, myoscorpin, heliosupin či asperumin [4, 12, 13].

Již zmíněné pyrrolizidinové alkaloidy jsou rostlinné toxiny. Dosud bylo popsáno 350 přirozeně se vyskytujících látek, patřících do této skupiny. Kostival lékařský obsahuje 8 těchto pyrrolizidinových alkaloidů: acetylintermedin, lykopsamin, intermedin, acetyllykopsamin, symiridin, symfitin, lasiokaprin a echimidin. Některé z těchto látek se přitom mohou v rostlině vyskytovat i jako N-oxidy (například echimidin N-oxid, symfytin N-oxid nebo intermidin N-oxid). Obsah pyrrolizidinových alkaloidů v oddencích kostivalu lékařského činí přibližně 0,02–0,06 %, avšak v nadzemních částech rostliny je tato koncentrace nižší (0,003–0,020 %) [4, 12–16, 19].

Další významnou skupinou látek jsou fenolické kyseliny. Nejvíce zastoupenou je kyselina rozmarýnová (0,185 %), poté kyselina salvianolová, chlorgenová (0,037 % [19]), *m*-hydroxybenzoová, salicyová, *p*-kumarová, kyselina kávová (0,035 % [19]) a její deriváty. Celkem byla v kostivalu popsána přítomnost dvaceti fenolických kyselin [4, 12, 13, 17, 18, 20].

Dále kostival lékařský obsahuje lipidické látky. Z mastných kyselin má největší koncentraci kyselina  $\gamma$ -linolenová. Poté je zastoupena řada isoprenoidních látek, jednak karotenoidy (0,63 %), přičemž nejvíce je zastoupen  $\beta$ -karoten [19], ale především triterpeny, například fytosteroly  $\beta$ -sitosterol a stigmasterol ( $\gamma$ -estigmesterol), triterpenoidní sapogeniny: kyselina oleanová, symphytoxid A, caulosid D, leontosidy A, B a D, steroidní saponiny a isoburaneol [1, 4, 12, 13, 19, 21, 22].



**Obrázek 3** Chemická struktura allantoinu

Další skupinou látek obsažených v kostivalu jsou sacharidy, například monosacharidy arabinosa, mannososa, rhamnosa, xylosa, glukosa, fruktosa či glukuronová kyselina. Z polysacharidů je to celulóza jako stavební látka, dále pak inulin a škrob jako zásobní látky kostivalu a fruktany, které tvoří slizové látky. Kostival lékařský obsahuje i kyselinu elagovou, kyselinu lithospermovou, pyrokatecholové taniny (2,4 %), cholin a 18 aminokyselin (nejvíce kyselinu glutamovou, leucin a kyselinu aspartovou) [1, 4, 17, 19]. Z minerálních látek obsahuje kostival železo, sodík, vápník, hořčík, selen, měď či hliník [1, 12, 17, 23, 24]. Z vitamínů je přítomen vitamin C, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, a také vitamin A a E [12, 13, 17].

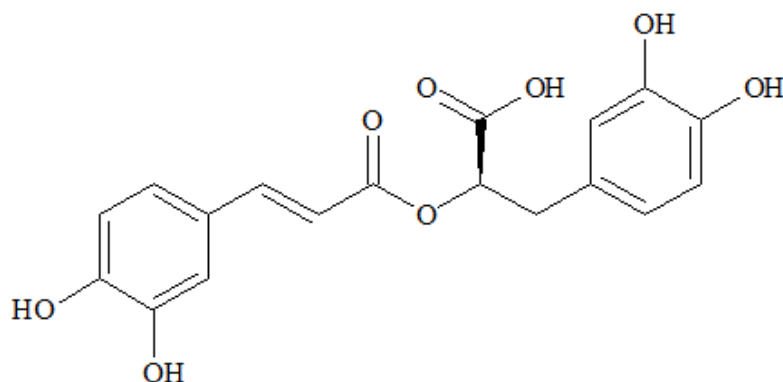
#### 2.1.4 Účinky a využití

Pro svou pestrost a koncentraci biologicky aktivních látek je kostival a výrobky z něj využíván v celé řadě produktů. Jednou z možností využití kostivalu je i potravinářský průmysl. Díky přítomnosti fenolických látek, především fenolických kyselin jako je kyselina rozmarýnová (Obrázek 4) a její deriváty, vykazuje extrakt kostivalu antioxidační vlastnosti. Bylo zjištěno, že antioxidační aktivita kostivalového extraktu je vyšší než aktivita v potravinách běžně používané kyseliny askorbové [12, 19]. Dále vykazuje kostivalový extrakt i antibakteriální účinky. Výtažek z kořene kostivalu vykazoval inhibiční účinky například proti patogenním kmenům, jako jsou *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris* či *Salmonella typhimurium* [12, 19]. Tyto účinky jsou připisovány převážně již zmíněným fenolickým látkám, přičemž zatím nebylo zjištěno přesné působení těchto látek na bakterie. Předpokládá se inhibice replikace či transkripce DNA nebo narušení propustnosti buněčné stěny bakterií [12, 19].

Kromě antibakteriálních účinků byla zkoumána i antimykotická aktivita. Inhibiční aktivita extraktu kostivalového kořene byla zkoumána na různé mykotické druhy. Bylo zjištěno, že jako účinný inhibitor se tento výtažek jeví proti *Bipolaris oryze*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Erysiphe graminis conidia* a *Puccinia graminis uredospores*. Tento účinek je připisován společnému působení fenolických kyselin, allantoinu a luteolinu [12, 19].

Kostival byl také zkoumán pro využití v zemědělství jako součást krmiva či při léčbě onemocnění hospodářských zvířat. Prokázány byly jeho účinky proti mastitidě skotu, a také jako součást krmiva pro brojlery, kde má sloužit nejen jako antibiotikum, ale i pro podporu růstu [19].

Dalším významným odvětvím je medicína a farmaceutický průmysl. Byl zkoumán účinek jednotlivých látek kostivalu, aby bylo možné připsat každé látce její vlastnosti. Antioxidační aktivitu vykazovaly fenolické látky a karotenoidy. Allantoinu jsou připisovány protizánětlivé účinky, stejně jako posílení imunity. Taniny pak vykazovaly rovněž protizánětlivé účinky. Dá se tak říct, že kostival má velký potenciál při vnitřním i vnějším použití [12, 19, 25].



**Obrázek 4** Chemická struktura kyseliny rozmarýnové

V případě vnitřního použití byl kostivalový extrakt testován jako možné léčivo při řadě onemocnění. Při různých testováních byl zkoumán jeho účinek ve srovnání s používanými léčivy. Při pokusu na krysách bylo zjištěno, že extrakt z kořene kostivalu vykazuje podobnou, dokonce i vyšší účinnost při léčbě hepatitidy oproti komerčním lékům [12]. Při zkoumání léčby zlomenin na morčatech bylo pozorováno zrychlené hojení včetně snížení výskytu zánětlivých ložisek při použití výtažku z kostivalu [19].

Podobných výsledků bylo dosaženo i při sledování rychlosti hojení ran u myši. Bylo zjištěno, že extrakt obsahující allantoin má značné účinky na hojení nejen při poškození epitelových tkání, ale také při poškození pojivových tkání a chrupavek, neboť allantoin podporuje dělení buněk [19]. Při testech na myších byl rovněž prokázán protizánětlivý účinek kostivalového extraktu. Zároveň byla potvrzena i schopnost snížení bolesti a otoku pojivových tkání [12].

Z lidové medicíny má však mít kostival ještě daleko širší uplatnění. Především při léčbě onemocnění dýchacích cest a poruch trávicího ústrojí, například bronchitida, zánět pohrudnice, černý kašel, dále gastritida, cholecystitida, úplavice, žaludeční vředy, průjmy, dna, hematurie, menoragie a další [12, 19, 25]. Tyto účinky však prozatím nebyly vědecky testovány.

Problémem pro vnitřní užití kostivalových přípravků je obsah pyrrolizidinových alkaloidů, neboť tyto látky jsou označeny jako potenciální karcinogeny. Byly provedeny testy na hlodavcích, u kterých byl zkoumán účinek pyrrolizidinových alkaloidů. Většina studií potvrzuje vznik rakovinných buněk v játrech hlodavců při konzumaci těchto alkaloidů [12, 15, 16, 19,]. Nicméně při vnějším použití kostivalových přípravků nedochází ke vstřebávání těchto látek, a tak je kostival hojně využíván pro výrobu mastí, tinktur či masážních olejů a jeho léčivé účinky jsou klinicky testovány [12, 19].

V klinické studii léčby výronu kotníku bylo prokázáno zrychlené snížení otoku, snížení bolesti i zrychlené hojení oproti skupině s placebem [19]. Zmírnění bolesti, výskytu zánětu i zrychlení hojení včetně snížení otoku a vstřebávání hematomu bylo prokázáno i ve studii léčby oděrek a menších poranění kůže [12, 19]. Při léčbě žilních vředů byl pozorován snížený výskyt zánětů a rychlejší hojení při použití kostivalového přípravku [19].

Positivní výsledky byly zjištěny i při použití léčivých přípravků s kostivalovým extraktem v léčbě bolestí zad [12, 19], osteoartrózy a muskuloskeletárního revmatismu, kde bylo dosaženo vyšších účinností než při použití komerčního preparátu [12]. Pro své antioxidační vlastnosti byla zkoumána i možnost využití kostivalu ve fotoprotektivních přípravcích [19].

## 2.2 Vepřové sádlo

Sádlo patří mezi živočišné tuky. Získává se škvařením tukových buněk vepřů. Tukové buňky tvoří spolu s malým množstvím mezibuněčného prostoru řídké vazivo. Buňky jsou veliké přibližně 50–150  $\mu\text{m}$  a podle stáří buňky obsahují buď několik malých tukových kapének, nebo jednu velkou tukovou vakuolu [26–28]. Buňky jsou spojeny retikulárními vlákny a vytváří primární lalůčky, které jsou spojeny do sekundárních lalůček. Ty jsou pak spojeny do lalůček vyššího řádu, a tak vzniká tukový polštář. Tuk je v buňce pokládán postupně, přičemž rychlost ukládání tuku je v mladém organismu pomalá, ale s přibývajícím věkem postupně roste [26, 27, 29].

Živočišný tuk je rozdělen podle místa, kde se v organismu nachází. Nejvíce je tuku podkožního, který u prasat tvoří asi 60–70 % z celkového obsahu tuku. Dále je to tuk intermuskulární a intramuskulární, který tvoří přibližně 20–35% část, a tuk viscerální s podílem okolo 5 % [30].



**Obrázek 5** *Hřbetní vepřové sádlo [31]*

Vepřové sádlo se dělí na několik skupin. Hřbetní sádlo je podkožní tuk, je nejvíce zastoupeným a nejkvalitnějším tukem (viz Obrázek 5). Je to tuková tkáň okolo páteře, která je rozdělena vazivovou přepážkou na tuk kožní a podkožní. Plstní sádlo je označení pro tuk na stěnách břišní dutiny. Dalším typem je sádlo střevní, které spojuje střevní kličky, a sádlo kruponové, což jsou odřezky sádla z vepřových kůží [26, 30].

Vepřové sádlo má bílou barvu, mírné aroma a je za laboratorních podmínek v tuhém stavu [26, 30]. Získává se škvařením či tavením tukové tkáně. Škvaření je klasický způsob získávání sádla, používaný především pro domácí výrobu. Jedná se o zahřívání tukové tkáně na teplotu přibližně 135 °C. Průmyslově se však využívá metody tavení, kdy je tuková tkáň zahřívána v přítomnosti vody či vodní páry při teplotě 90 °C. Díky nižší teplotě nedochází k transesterifikaci mastných kyselin, ani k tak vysoké degradaci biologicky aktivních látek [30, 32].

Obsah sádla v jatečně upraveném těle prasat (tzn. vykrvení, vykolení, odstranění hlavy a nohou) se mění v závislosti na hmotnosti těla. Obecně se dá říct, že nižší hmotnostní kategorie znamená nižší podíl tuku a naopak. Dále je zde závislost i na pohlaví prasete, případně i na tom, zda došlo ke kastraci či nikoli. Podíl sádla tak může nabývat 20–35 % [30, 33, 34].

Vepřové sádlo obsahuje až 95–99 % tuku, zbytek je tvořen bílkovinami (1,3–1,5 %), vodou (okolo 0,2–1 %) a doprovodnými látkami [35, 36]. Sádlo obsahuje asi 40 % triacylglycerolů (TAG) nasycených mastných kyselin, tvořených estery kyseliny palmitové (24–27 %), stearové (11–14 %) a myristové (1,3–2 %). Dále sádlo obsahuje 55 % nenasycených TAG, z toho jsou nejvíce zastoupené mononenasyčené kyseliny palmitoolejová (3–4 %) a olejová (41–44 %) a dále polynenasycené kyseliny linolová (10 %) a linolenová (0,3–1 %) [35–40].

Z dalších lipofilních látek obsahuje sádlo především cholesterol, jehož zastoupení činí přibližně 100 mg/100 g sádla. Z vitaminů je zastoupen nejvíce vitamin E (5–25 mg/100 g), A (0,01–0,08 mg/100 g) a vitamin D v obsahu 2,5 µg/100 g [35, 36, 38]. Z minerálních prvků je zastoupen selen a zinek. Jejich obsah však nepřevyšuje hodnotu 0,2, respektive 0,11 mg/100 g sádla [35, 36, 38].

Z hlediska mastných kyselin se složení vepřového tuku liší nejen podle daného druhu vepře, ale také podle složení krmiva. Obsah kyseliny linolové je úměrný podílu této kyseliny v krmivu, neboť tato kyselina je vstřebávána ve střevech prasat a následně, pokud není přímo spotřebována na energii či pro syntézu jiných potřebných metabolitů, je ukládána do tukových buněk. Takto se dá zvýšit podíl nenasycených mastných kyselin ve vepřovém sádle v řádu několika procent. S tím však souvisí i teplota tání sádla, která by tak byla snížena, což následně velmi negativně ovlivní výrobu a vlastnosti mastných výrobků [30, 33, 34].

Sádlo je tradiční surovinou používanou v mnoha oblastech gastronomie, především ve výrobě masných výrobků. Ačkoli by živočišný tuk měl tvořit třetinu veškerého přijatého tuku, je příjem sádla spojován s výskytem kardiovaskulárních onemocnění a také se zvýšenou hladinou LDL cholesterolu, a sádlo tak i přes obsah esenciálních mastných kyselin není příliš doporučovanou složkou v jídelníčku člověka [41].

Sádlo je však ceněnou surovinou v přípravcích pečujících o pleť, kde se používá jak v tradiční lidové medicíně, tak i v moderních kosmetických produktech. Je ceněno především díky své schopnosti pronikání do kůže, a také díky účinnému promašťování [42, 43].

Proto se sádlo používá jako nosič léčiv, kosmeticky funkčních komponent a dalších lipofilních látek, které slouží k léčbě onemocnění kůže a zevní léčbě svalových a kloubních nemocí [42–44].

Díky teplotě tání okolo 37 °C a schopnosti pronikání do pokožky se sádlo doporučuje i jako nosič v přípravcích pro ošetření vlasových folikulů [45]. I samotné sádlo je doporučováno k ošetření pooperačních jizev či k hojení ran po zranění, a to pro svou schopnost promašťování. Nevýhodou sádla je však pocit mastnoty, který na pokožce po aplikování zanechává [42–44].

### 2.3 Mandlový olej

Mandlový olej je získáván z jader pecek plodů mandloně obecné (latinsky *Prunus dulcis*), rostliny, která je taxonomicky zařazena do řádu růžotvarých (*Rosales*), čeledi růžovitých (*Rosaceae*) a rodu slivoní (*Prunus*) [46, 47]. Původ mandloní je ve Střední Asii, odkud byla následně rozšířena do subtropických oblastí celé Asie, a také do oblasti Středomoří. Druhotně

pak byly mandloně rozšířeny i do Severní a Jižní Ameriky, přičemž Spojené státy se postupem času staly největším producentem mandlí na světě. V roce 2016 měly 63% podíl ze světové produkce, následovala Austrálie, země Evropské unie, Turecko a Chile [48, 49].

Mandle se získávají z plodů, kterými jsou peckoviny. Po odstranění oplodí je odhalena pecka plodu, ze které se po rozbití získá jádro, které je obaleno polopapírovou membránou (viz Obrázek 6) [47, 50].



**Obrázek 6** Plod mandloně (pecka s jádrem) [51]

Tato jádra jsou jako jediná z rodu slivoní vhodná pro konzumaci, neboť jádra ostatních zástupců tohoto rodu obsahují kyanogenní glykosid amygdalin, který je pro člověka toxický. Amygdalin je totiž ve střevech štěpen enzymem amygdalin  $\beta$ -glukosidasou, za současného uvolnění kyanidu [47].

Mandle jsou rozlišovány na hořké a sladké. Hořké mandle jsou produktem divokých mandloní a obsahují vyšší koncentraci amygdalinu. Tyto hořké mandle nejsou určeny k přímé spotřebě, ale pouze k dalšímu zpracování, například k výrobě mandlového oleje. Naopak mandle sladké se nachází v plodech šlechtěných mandloní, a mohou tak být konzumovány i syrové [47].

Mandle jsou bohatým zdrojem lipidů (50 %), z mastných kyselin jsou to především nenasycené mastné kyseliny olejová (32 %) a linolová (13 %), z nasycených pak většinu tvoří kyselina palmitová (10 %) [47, 53, 55]. Mandle obsahují vysoký podíl bílkovin (21 %) a sacharidů (22 %). Dále obsahují vodu (4 %), minerální látky a řadu biologicky aktivních látek [47, 52, 53, 55]. Jsou bohatým zdrojem draslíku (733 mg/100 g), fosforu (481 mg/100 g), hořčíku (270 mg/100 g) a vápníku (269 mg/100 g). V minoritním množství je obsažen i selen, mangan, měď, zinek či železo [47, 53, 55].

V mandlích je obsažen nejvíce vitamin E (25 mg/100 g), poté vitaminy skupiny B a A [47, 48, 53, 55]. Z karotenoidních látek obsahují  $\beta$ -karoten, lutein a zeaxanthin. Nachází se zde i vysoká koncentrace fytosterolů, především  $\beta$ -sitosterol (130 mg/100 g), dále  $\delta$ -5-avenasterol, kampesterol, stigmasterol, sitostanol či kampestanol [47, 53, 55].



Díky vysokému podílu lipidů jsou mandle vhodné pro výrobu oleje. Po sklizni mandlí a sušení je odstraněna slupka jader a následně jsou mandle lisovány za studena pomocí šnekového či hydraulického lisu, pro zachování co nejvyšší koncentrace doplňkových látek. Pro získání vyšších výtěžků je možné mandle před samotným lisováním zahřát na vyšší teplotu, avšak zde dochází k inaktivaci některých biologicky aktivních látek. Další možností je i chemická extrakce nepolárními rozpouštědly. K té je potřeba mandle nejprve nadrtit. Samotná extrakce pak probíhá za vysoké teploty (až 90 °C) [57, 58].

Díky tomu, a také díky použitým rozpouštědlům, dochází k inaktivaci biologicky aktivních látek a ke vzniku různých degradačních produktů. Ty negativně ovlivňují organoleptické vlastnosti a stabilitu oleje a musí být odstraněny. Během odsazení, alkalické rafinace, bělení, dezodorace a fyzikální rafinace jsou postupně odstraněny sacharidy, bílkoviny, fosfolipidy, volné mastné kyseliny, barviva a aromatické látky, za vzniku rafinovaného oleje. Při výrobě mandlového oleje se však rafinace využívá pouze u oleje z hořkých mandlí, neboť během rafinace dochází k odstranění toxického amygdalinu [57, 58].

Z hlediska mastných kyselin obsahuje mandlový olej asi 8 % nasycených mastných kyselin, tvořených převážně kyselinou palmitovou. Mononenasyčená kyselina olejová tvoří 70 % a dalších zhruba 18 % je tvořeno polyneenasycenou kyselinou linolovou. V minoritním množství obsahuje mandlový olej i kyselinu stearovou a linolenovou [49, 56, 59]. Panenský olej má nažloutlou barvu, mírný zápach a lehce mandlovou chuť. Obsahuje vitaminy E a A, dále fosfolipidy, fytosteroly, karotenoidy, je bohatý na měď, fosfor, hořčík a zinek [47, 52, 56, 59].

Podobně jako u jiných ořechů, mohou i mandle být pro část populace alergenem. V mandlích byl nalezen globulární protein amandin, na který se u některých jedinců váže protilátka IgE. Díky tomu byly vytvořeny testy, které reakcí s králičí anti-amandinovou polyklonální protilátkou mohou odhalit přítomnost mandlí v potravinách [54].

Mandle, stejně jako mandlový olej, mají pozitivní vliv na hladinu HDL cholesterolu. Bylo prokázáno, že příjem mandlového oleje snižuje hladinu LDL cholesterolu a současně zvyšuje koncentraci HDL cholesterolu v organismu, čímž zabraňuje výskytu kardiovaskulárních onemocnění spojených s vysokou hladinou LDL cholesterolu [47, 48, 54]. Dále mandlový olej zvyšuje průchodnost střev, a má tak pozitivní účinek na tzv. syndrom dráždivého tračníku [47, 48, 54]. Momentálně je zkoumána i možnost jeho využití na snížení rizika vzniku rakoviny tlustého střeva [47, 48, 54].

Mandlový olej má široké využití nejen v potravinářství, ale i ve farmacii a kosmetice. Je dobrým nosičem a rozpouštědlem pro různé lipofilní látky, je snadno emulgovatelný, nedráždivý a netoxický. Používá se jako suspenzační činidlo pro ve vodě nerozpustné práškové látky a jako nosič různých kosmetických surovin (UV protektanty, těkavé silikonu, antiperspirační látky) [47, 56].

V kosmetice se mandlový olej s oblibou využívá pro své dobré vstřebávání, uklidňující a regenerační účinky. Navíc nezanechává pocit mastnoty na pokožce. Proniká až do třetí vrstvy *Stratum Corneum* a zároveň napomáhá bariérovým vlastnostem pokožky. Díky svým nedráždivým účinkům se využívá pro dětské přípravky, a také v přípravcích určených pro citlivou pokožku [47, 56]. Napomáhá v léčbě ekzémů a má protizánětlivé účinky. Dále se používá k odstranění strií nebo při ošetření pooperačních zjizvení. Mandlový olej je hojně

využívaným masážním olejem. Uplatnění nachází i v aromaterapii, neboť je dobrým nosičem vonných látek [47, 56].

## 2.4 Bylinné maceráty



**Obrázek 7** *Macerované byliny v tucích [60]*

Macerace je jedním z tradičních způsobů extrakce. Nejčastěji se používá pro extrakci přírodních látek, a to především z bylin. Jedná se o jednoduchý proces, při kterém jsou byliny smíchány s tukovým základem, který slouží jako extrakční činidlo [61, 62].

Dochází tak ke dvěma procesům, vyplavování a extrahování. Při vyplavování jsou látky na povrchu bylin a látky z poškozených pletiv rozpouštěny v extrakčním činidle. Oproti tomu při extrakci jsou látky uvnitř nepoškozených buněk uvolňovány difúzně [63].

V praxi se používají dva způsoby macerace, a to macerace za tepla a za studena. Při maceraci za studena je bylina smíchána s tukovým základem a následně je tato směs ponechána při pokojové teplotě po dobu několika dnů, příp. týdnů (viz Obrázek 7). Oproti tomu při maceraci za tepla je nejprve tuk zahříván na teplotu 40–50 °C, následně je přidána navážka bylin a směs je udržována při této teplotě po dobu 12–24 hodin. U obou typů macerace může být extrahovaná bylina obměňována za čerstvou, aby došlo k zvýšení koncentrace látek v extraktu. Po ukončení extrakce je dalším krokem filtrace. Následně mohou být přidávány i další látky, jako jsou aromatické látky či konzervanty (přírodní či syntetické antioxidanty) [61, 63–65].

Při maceraci se běžně používají byliny sušené, aby tak nedocházelo ke zvýšení možnosti výskytu mikrobiální kontaminace. Tradičním poměrem hmotnosti byliny ku hmotnosti tukového základu je poměr 1:5 nebo 1:10 [61, 65, 66]. Vysušené byliny by měly být mírně nadrcené, aby byla celková doba extrakce co nejmenší. Avšak při příliš jemném nadrcení bylin musí být použito dokonalejších filtračních procesů pro získání čistého macerátu [61, 64].

Oproti běžně používané destilaci nedochází při maceraci pouze k získání aromatických látek, ale především k extrakci makromolekulárních biologicky aktivních látek, jakými jsou polyfenoly, fytosteroly, karotenoidy či lipofilní vitaminy. Tyto látky tak díky nízkým teplotám macerace nejsou degradovány jako v případě destilace. Nevýhodou macerace je však dlouhá

doba extrakce a nižší výtěžnost oproti použití nepolárních rozpouštědel jako hexan, pentan, chloroform atd. [61, 64, 66].

Využití macerovaných tuků se různí podle použitých bylin i podle použitých tukových základů. Běžně se používají v gastronomii pro svou chuť, barvu či aroma, ale také v kosmetice, při aromaterapii, jako masážní oleje nebo v případě použití tuku s vysokou teplotou tání jako součást mast'ových přípravků [61, 66].

## 2.5 Metody stanovení vybraných biologicky aktivních látek z tukových základů

### 2.5.1 Fenolické látky

Stanovení fenolických látek může být rozděleno na stanovení celkových fenolických látek a na stanovení kvalitativní. Fenolické látky mají oproti lipofilním látkám polární charakter. Při jejich stanovení z lipidických vzorků je potřeba je nejprve extrahovat. K oddělení těchto látek se používá několik typů extrakce, a to v závislosti na požadované čistotě extraktu či na použité instrumentaci.

Pro stanovení celkových fenolických látek v tucích se používá nejčastěji extrakce do dimethylsulfoxidu (DMSO), ethanolu (50, 60% (v/v)) nebo methanolu (50, 60% (v/v)). Poměr extrakčního roztoku ku vzorku se v literatuře liší, může to být například 2:1, 4:1, 8:1 či 9:1. Vzorky jsou po přidání extrakčního roztoku vortexovány, následně je provedena centrifugace, a poté samotné stanovení [67–69].

Pro stanovení celkových fenolických látek se nejčastěji používá metoda Follin-Cicalteuoa. Jedná se o činidlo, které obsahuje fosfowolframan a fosfomolybdenan. Toto činidlo redukuje fenolické látky, což je charakterizováno změnou zbarvení vzorku. Následně je intenzita zbarvení měřena pomocí UV-VIS spektrofotometrie (*UltraViolet-Visible spectroscopy*) při vlnové délce 750 nm. Koncentrace celkových fenolických látek je vyjádřena jako ekvivalent kyseliny gallové, která slouží jako standard pro získání kalibrační řady [67, 68, 70, 71].

Při stanovení jednotlivých fenolických látek je potřeba získat extrakt s co nejvyšší čistotou. Pro dosažení požadované čistoty se používá dvou postupů. Prvním je extrakce pevnou fází (SPE – *solid phase extraction*). Vzorek je rozpuštěn v hexanu, následně je přečištěn v koloně C<sub>8</sub> či C<sub>18</sub> (která byla nejprve přečištěna hexanem a následně regenerována acetonitrilem), poté je kolona promyta znovu hexanem a následně jsou zachycené fenolické látky vymyty methanolem [70, 72].

Druhým typem extrakce je extrakce kapalina-kapalina (LLE – *liquid-liquid extraction*). Vzorek je rozpuštěn v hexanu, ke kterému je přidán roztok methanolu (50-80% (v/v)). Následuje vortexování a centrifugace. Po oddělení methanolové fáze je extrakce ještě jednou až dvakrát opakována [70–72].

Takto připravené vzorky mohou být analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC – *high performance liquid chromatography*) [70–72], elektroforézy [74] či pomocí plynové chromatografie (GC – *gas chromatography*), kde však musí být ještě zařazen proces derivatizace fenolických látek [74].

Nejčastějším typem analýzy fenolických látek s pomocí HPLC je chromatografie s reverzními fázemi (RP – *reverse phase*) s kolonou obsahující jako stacionární fázi navázaný uhlovodíkový řetězec C<sub>18</sub> [70–73]. Použitých mobilních fází bývá více, například mobilní fáze obsahující složku A – 1% vodný roztok kyseliny mravenčí a složku B – acetonitril [73] nebo

0,001 mol·dm<sup>-3</sup> kyselina sírová a acetonitril [72], či 0,5% kyselina fosforečná a směs acetonitrilu a methanolu (50:50 (v/v)) [72]. Eluce může být jak gradientová, tak isokratická. Jako detektor slouží diodové pole (DAD – *diode array detector*), UV-VIS spektrometr či hmotnostní detektor (MS – *mass spectrometry*) [70–73].

### 2.5.2 Tokoferoly

Při stanovení tokoferolů v tucích nemusí být jako první krok zařazena extrakce. Vzorek tuku je pouze rozpuštěn v isopropanolu a následně analyzován pomocí RP-HPLC s fluorescenčním detektorem. Jako mobilní fáze může být použit roztok methanolu (97% v/v) nebo směs 50% methanolu (v/v) a 50% acetonitrilu (v/v). Stacionární fázi tvoří částice s navázaným uhlovodíkem C<sub>18</sub> [75, 76].

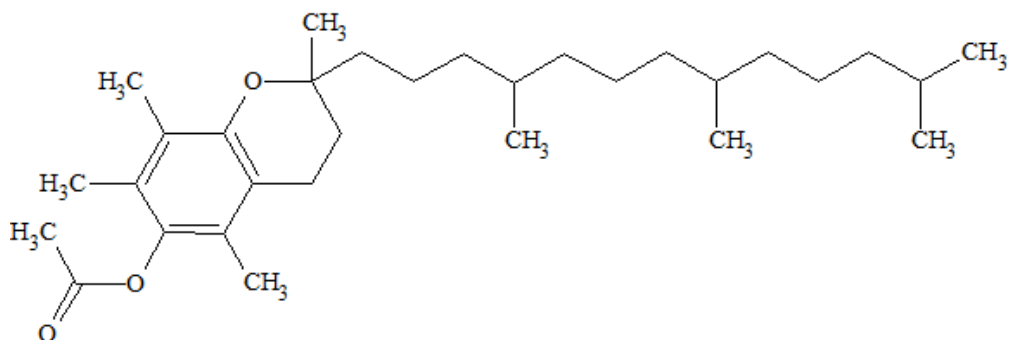
Při použití diethyletheru jako rozpouštědla se pro analýzu tokoferolů používá spíše kapalinová chromatografie s normálními fázemi (NP – *normal phase*). Jako stacionární fáze tak slouží částice s navázanými aminoskupinami. Mobilní fáze je tvořena směsí hexanu a ethylacetátu v poměru 70:30 (v/v), eluce je gradientová. Tokoferoly jsou detekovány pomocí fluorescenčního detektoru [76].

V případě extrakce může být jako extrakční činidlo použitý methanol. Navážka tuku je extrahována pomocí 25 ml methanolu, přičemž extrakce je opakována dvakrát. Následně jsou rezidua vzorku ještě dvakrát extrahována směsí methanolu a isopropanolu (80:20 (v/v)). Extrakty jsou poté smíchány a rozpouštědla jsou odpařena pomocí vakuové odparky. Následně je vzorek rozpuštěn ve směsi methanolu, isopropanolu a hexanu (1:3:1 (v/v)) a připraven k analýze. Při použití této metody dochází nejen k extrakci tokoferolů, ale zároveň i k extrakci fenolických látek [78].

Obě skupiny látek tak mohou být najednou analyzovány pomocí RP-HPLC a detekovány UV-VIS spektrometrickým detektorem při vlnové délce 280 nm. Stacionární fází jsou uhlovodíkové řetězce C<sub>18</sub>, mobilní fázi tvoří směs 2% vodného roztoku kyseliny octové (v/v), methanolu, acetonitrilu a isopropanolu, přičemž eluce je gradientová [78].

Další možností stanovení tokoferolů je použití plynové chromatografie. Extrakce tokoferolů však nejprve zahrnuje saponifikaci mastných kyselin, například ethanolovým roztokem hydroxidu draselného. Následně je nezmýdelnitelný podíl extrahován do hexanu. Po oddělení fází je hexan odpařen a ke vzorku je přidána derivatizační směs pyridinu a bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA) s trimethylchlorosilanem. Takto upravený vzorek je následně analyzován pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (FID – *flame ionization detector*). Stacionární fáze je tvořena (5% fenyl)methylpolysiloxanem. Jako nosný plyn slouží helium [79].

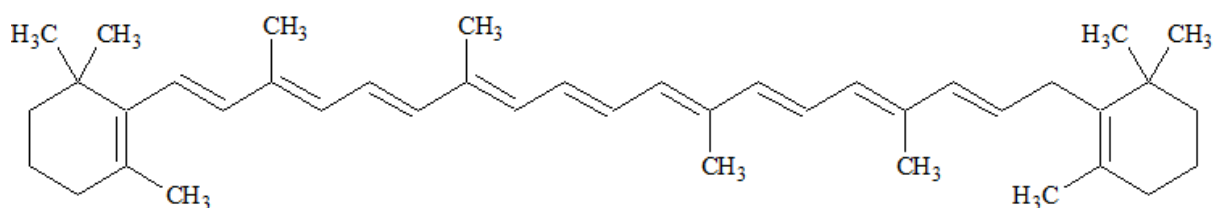
Rychlejší metodou je vynechání saponifikace zmýdelnitelných složek, kdy je ke vzorku nejprve přidána derivatizační směs pyridinu a n-methyl-n-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (MSTFA). Poté jsou derivatizované tokoferoly odděleny pomocí SPE silikagelové kolony a následně rozpuštěny do směsi hexanu a methyl-terc-butyleteru (MTBE) (99:1 (v/v)). Analýza vzorku je provedena pomocí GC-FID nebo GC-MS. Stacionární fází je (50% fenyl)methylpolysiloxan, nosným plynem je vodík [80].



**Obrázek 8** Chemická struktura *DL*- $\alpha$ -tokoferol acetátu

### 2.5.3 Karotenoidy

Stanovení celkových karotenoidů je prováděno pomocí UV-VIS spektrofotometrie. V případě tukových vzorků je postup velice snadný. Vzorek je rozpuštěn v hexanu, případně cyklohexanu a následně je změřena jeho absorbance při vlnové délce 450–470 nm [69, 81]. Pokud není vzorek čirý, například vlivem přítomnosti vody nebo polárních látek, musí být ke vzorku přidáno malé množství 0,5% chloridu sodného (0,5 ml na 10 ml vzorku). Vzorek je vortexován, centrifugován, a poté je měřena organická fáze [82]. Koncentrace celkových karotenoidů je následně vypočítána z kalibrační řady  $\beta$ -karotenu (viz Obrázek 9, chemická struktura  $\beta$ -karotenu) [69, 81, 82].



**Obrázek 9** Chemická struktura  $\beta$ -karotenu

Pro stanovení jednotlivých karotenoidů může být použita metoda, při které je vzorek rozpuštěn v dimethylformamidu (DMF) a následně jsou karotenoidy extrahovány do hexanu, zatímco ve fázi s DMF zůstávají chlorofyly a polární látky. Analýza probíhá pomocí RP-HPLC s gradientovou elucí. Kolona obsahuje jako stacionární fázi částice s uhlovodíkovým řetězcem  $C_{18}$ . Mobilní fáze je dvousložková, první složkou je roztok obsahující vodný roztok  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  tetrabutylamonium,  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  vodný roztok octanu amonného a methanol v poměru 1:1:8 (v/v). Druhou složkou je roztok acetonu a methanolu (1:1 (v/v)). Jako detektor slouží spektrofotometr [83, 84].

Další možností stanovení jednotlivých karotenoidů je analýza pomocí RP-HPLC s coulometrickým detektorem. Vzorek je rozpuštěn v MTBE a methanolu (1:1 (v/v)) a následně nastříknut na kolonu, kde stacionární fázi tvoří uhlovodíkový řetězec  $C_{30}$ , pro ochranu kolony může být připojena i předkolona s řetězcem  $C_{18}$ . Mobilní fázi tvoří složka A (methanol, MTBE, octan amonný a voda v poměru 88:5:5:2 (v/v)) a složka B (methanol, MTBE a octan amonný (20:78:2 (v/v)). Eluce je opět gradientová [85].

Karotenoidy mohou být analyzovány i pomocí NP-HPLC, kdy je vzorek rozpuštěn v hexanu a následně analyzován. Stacionární fázi tvoří částice se substituovaným uhlíkovým řetězcem, který tak má polární charakter. Mobilní fázi je roztok isooktanu a isopropanolu (99:1 (v/v)), eluce je isokratická. Pro detekci látek je použit UV detektor [86].

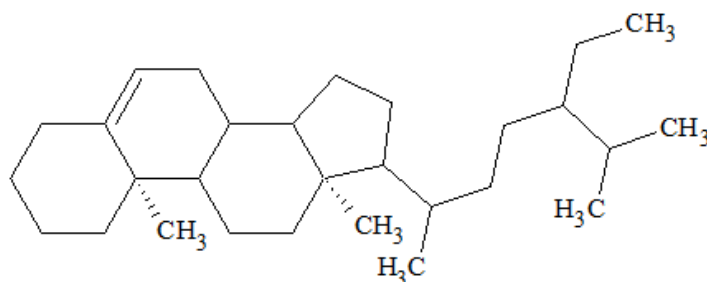
#### 2.5.4 Fytosteroly

Pro stanovení celkových fytosterolů se využívá metoda s Liebermann-Burchardovým činidlem. Vzorek je rozpuštěn v chloroformu a následně je k němu přidáno Liebermann-Burchardovo činidlo, které obsahuje anhydrid kyseliny octové a koncentrovanou kyselinu sírovou v poměru 60:5 (v/v). Vzorek je poté měřen pomocí UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 625 nm. Koncentrace celkových fytosterolů je vypočítána z kalibrační řady použitého standardu vybraného fytosterolu, například stigmasterolu, nebo  $\beta$ -sitosterolu (struktura  $\beta$ -sitosterolu, viz Obrázek 10) [87].

Při stanovení jednotlivých fytosterolů pomocí HPLC nebo GC bývá nejčastěji před samotnou analýzou zařazena saponifikace zmýdelnitelných látek, neboť tyto látky mohou interferovat s fytosteroly a bránit tak jejich separaci [79, 80, 88].

Jednou z těchto metod je stanovení fytosterolů pomocí RP-HPLC. Vzorek je zmýdelněn ethanolickým roztokem hydroxidu draselného. Následně jsou lipidické látky extrahovány do diethyletheru a přečištěny přidáním vody, do které jsou extrahovány zmýdelněné látky a další polární sloučeniny. Diethyletherová vrstva je odebrána a rozpouštědlo je odpařeno ve vakuové odparce. Následně je vzorek rozpuštěn v ethanolu a analyzován. Stacionární fázi tvoří částice s navázaným uhlovodíkovým řetězcem  $C_{18}$  a mobilní fázi tvoří roztok methanolu a vody v poměru 98:2 (v/v), eluce je isokratická. Pro detekci slouží odpařovací detektor rozptylu světla [88].

Pro stanovení fytosterolů bez nutnosti saponifikace se využívá analýzy pomocí NP-HPLC-DAD-MS/MS, díky které mohou být detekovány a identifikovány fytosteroly bez předchozí úpravy vzorku. Oproti použití HPLC s reverzními fázemi je délka této analýzy mnohem kratší a zároveň dochází i k lepší separaci látek vzorku. Vzorek je pouze rozpuštěn v hexanu a následně analyzován. Stacionární fázi tvoří částice s polárními řetězci, mobilní fáze má dvě složky (hexan a ethylacetát), eluce je gradientová [89].



**Obrázek 10** Chemická struktura  $\beta$ -sitosterolu

Pro stanovení jednotlivých fytosterolů pomocí plynové chromatografie se používá obou metod, které jsou popsány v kapitole 2.5.2 Tokoferoly – metody stanovení tokoferolů pomocí GC, kde je mimo saponifikace zařazen i krok derivatizace tokoferolů, respektive fytosterolů [79, 80].

### 2.5.5 Antioxidační aktivita

Pro stanovení antioxidační aktivity je v případě tukových vzorků nejprve potřeba extrahovat polární antioxidační látky, především fenolické sloučeniny. Je tedy potřeba využít některé z již výše zmíněných extrakčních postupů (kapitola 2.5.1 Fenolické látky). Jako extrakční činidlo se nejčastěji využívá methanol, ethanol, nebo jejich vodou ředěné roztoky, či DMSO [67–69], případně extrakce SPE nebo LLE [70–72].

Jednou z metod stanovení antioxidační aktivity je metoda s použitím ABTS (2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)), při které je sledována schopnost vzorku zhaset kation-radikál  $ABTS^{\bullet+}$ . Jedná se tedy o metodu, která je založena na eliminaci syntetických radikálů, ve které jsou antioxidační látky donorem vodíku [90].

V této metodě je extrakt vzorku smíchán s roztokem ABTS, směs je ponechána ve tmě a následně je měřena absorbance vzorku pomocí UV-VIS spektrometru při vlnové délce 734 nm. Schopnost vzorku zhaset radikál  $ABTS^{\bullet+}$  je následně porovnána se standardem, kterým je derivát vitamínu E – kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová neboli Trolox [67, 90].

Podobnou metodou je i měření schopnosti vzorku zhaset radikál DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Jedná se opět o metodu eliminace syntetických radikálů, při které je radikál DPPH redukován za vzniku stabilního difenylpikrylhydrazinu (DPPH-H). Podobně jako v metodě s ABTS je extrakt vzorku smíchán s roztokem DPPH, ponechán ve tmě a poté je měřena jeho absorbance pomocí UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 517 nm. Antioxidační aktivita vzorku je opět porovnána se standardem Troloxu [67, 69, 70, 90].

Metodou založenou na hodnocení redoxních vlastností látek je metoda FRAP (*ferric reducing antioxidant potential*). V této metodě dochází k redukci železitých iontů na železnaté ionty, konkrétně se jedná o redukci komplexu  $Fe^{3+}$ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) (neboli  $Fe^{3+}$ -TPTZ) na komplex  $Fe^{2+}$ -TPTZ [67–69, 90].

Extrakt vzorku je smíchán s pufrům (pH 3,6) a komplexem železitých iontů a následně je změřena absorbance vzniklých železnatých iontů pomocí UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 593 nm. Hodnota redukčního potenciálu vzorku je vypočítána z kalibrační řady síranu železnatého [67–69, 90].

Nevýhodou této metody je nutnost dodržení pH reakce na hodnotě 3,6, dále nedochází k redukci iontů thioley a pomalu reagujícími fenolickými látkami. Celková antioxidační aktivita se tak nemusí shodovat s hodnotou zjištěnou touto metodou [90].

## 2.6 Možnosti analýzy tukových základů

### 2.6.1 Stanovení sušiny

Navážka vzorku je sušena při zvolené teplotě (nejčastěji 105 °C). Sušení za normálních podmínek probíhá do konstantní hmotnosti. V případě tuků nejprve klesá hmotnost vzorku odpařováním vody, ale následně roste, neboť vlivem teploty vznikají různé oxidační produkty. Hodnota sušiny je tedy stanovena z nejnižší naměřené hmotnosti [91, 92].

## 2.6.2 Stanovení tukových charakteristik

### 2.6.2.1 Číslo zmydlnění

Volné i vázané mastné kyseliny ve vzorku jsou zmydlněny varem s nadbytkem ethanolickeho hydroxidu sodného. Následně je přebytek nezreagovaného hydroxidu stanoven zpětnou titrací kyselinou chlorovodíkovou na fenolftalein. Koncentrace volných i vázaných mastných kyselin (číslo zmydlnění) je vyjádřena jako hmotnost hydroxidu draselného potřebná k neutralizaci mastných kyselin na hmotnost vzorku [91, 93].

### 2.6.2.2 Číslo kyselosti

V této metodě je stanovena koncentrace pouze volných mastných kyselin ve vzorku tuku. Vzorek je rozpuštěn v ethanolu a následně ihned titrován odměrným roztokem hydroxidu draselného na fenolftalein. Koncentrace volných mastných kyselin (číslo kyselosti) je vyjádřena v hmotnosti hydroxidu draselného potřebná k neutralizaci na hmotnost vzorku [91, 94].

### 2.6.2.3 Esterové číslo

Toto číslo vyjadřuje koncentraci vázaných mastných kyselin. Jeho stanovení se provádí pouhým výpočtem rozdílu hodnot čísla zmydlnění a čísla kyselosti. Esterové číslo je opět vyjádřeno jako hmotnost hydroxidu draselného potřebná k neutralizaci vázaných mastných kyselin na hmotnost vzorku [91, 95].

### 2.6.2.4 Jodové číslo (metoda podle Hanuše)

Jodové číslo vyjadřuje koncentraci nenasycených mastných kyselin. Vzorek je rozpuštěn v chloroformu, následně je přidán jodmonobromid a vzorek je ponechán ve tmě. Během této doby se jod aduje na nenasycené vazby. Poté je ke vzorku přidán jodid draselný, který reaguje se zbylým jodmonobromidem za vzniku bromidu draselného a jodu. Jod je následně stanoven titrací odměrným roztokem thiosíranu sodného na škrobový maz. Jodové číslo je vyjádřeno jako hmotnost jodu adovaného na 100 g vzorku [91, 96].

### 2.6.2.5 Peroxidové číslo

Toto číslo vyjadřuje množství peroxidů v tuku. Peroxidy vznikají oxidací mastných kyselin a udávají míru žluklosti tuku, respektive stáří tuku či ukazují na nevhodné podmínky během jeho skladování, neboť přítomnost peroxidů se zvyšuje s dobou skladování, teplotou nebo světelným zářením. Redukce jodidu na jod však může být rušena redukujícími látkami, například přítomnými antioxidanty [91, 97].

Vzorek je rozpuštěn ve směsi kyseliny octové a chloroformu a následně je ke vzorku přidán jodid draselný. Vzorek je ponechán ve tmě, během této doby redukují přítomné peroxidy jodid na jod. Jod je následně stanoven titrací odměrným roztokem thiosíranu na škrobový maz. Peroxidové číslo je vyjádřeno v hmotnosti kyslíku na hmotnost vzorku [91, 97].

## 2.6.3 Stanovení mastných kyselin

### 2.6.3.1 Volné mastné kyseliny

Stanovení jednotlivých volných mastných kyselin ve vzorku je provedeno pomocí plynové chromatografie, přičemž volné mastné kyseliny musí být nejprve derivatizovány pro zvýšení jejich těkavosti. To se provádí pomocí methanolickeho (bezvodého) roztoku katalyzátoru



bortrifluoridu. Ten při zahřívání esterifikuje mastné kyseliny. Následně je ke vzorku přidán isooktan a vodný roztok nasyceného chloridu sodného. Isooktanová vrstva obsahující esterifikované mastné kyseliny je odebrána, přesušena a analyzována [98–101].

Stacionární fázi tvoří vysoce polární polyethylenglykol. Nosným plynem je vodík a mastné kyseliny jsou detekovány pomocí plamenově ionizačního detektoru. Separace methylesterů mastných kyselin (MEMK) závisí na délce řetězce, a také na množství přítomných nenasycených vazeb v řetězci [100].

### **2.6.3.2 Celkové mastné kyseliny**

Veškeré mastné kyseliny přítomné ve vzorku jsou stanoveny pomocí kyselé esterifikace. Nejprve jsou vázané mastné kyseliny převedeny na methylestery reakcí s methanolickým roztokem hydroxidu sodného. Volné mastné kyseliny však vytváří sodné soli, proto je potřeba přidat methanolický roztok katalyzátoru bortrifluoridu, který převádí tyto soli na estery mastných kyselin. Po přidání isooktanu a nasyceného roztoku chloridu sodného jsou veškeré estery mastných kyselin extrahovány do isooktanové vrstvy [98, 99]. Ta je po oddělení a přesušení analyzována pomocí GC-FID za stejných podmínek jako probíhá stanovení volných mastných kyselin [100].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie a laboratorní vybavení

#### 3.1.1 Laboratorní pomůcky

- Mikropipeta 1-20  $\mu\text{l}$ , BIOHIT, Finsko
- Mikropipeta 1-100  $\mu\text{l}$ , BIOHIT, Finsko
- Mikropipeta 100-1000  $\mu\text{l}$ , Labopette®, Německo
- Mikropipeta 100-1000  $\mu\text{l}$ , Sartorius, Německo
- Stříkačkové filtry Nylon 0,45  $\mu\text{m}$ , Chromservis, Česká republika
- Stříkačkové filtry PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ , Chromservis, Česká republika
- Skleněná kvjeta, Thermo Fischer scientific, USA
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky
- Vialky o objemu 2 a 4 ml
- Lednice

#### 3.1.2 Laboratorní přístroje

- Topné hnízdo 100 ml, BRNĚNSKÁ DRUTĚVA, Česká republika
- Termostat INE 400, Memmert, Německo
- Horkovzdušná sušárna UFE550, Memmert, Německo
- Vodní lázeň PUTRA 10, Julabo, Německo
- Analytické váhy GR-202-EC, HELAGO, Itálie
- Analytické váhy HR-120-EC, A&D Instruments, Japonsko
- Předvážky EK 600H, A&D Instruments, Japonsko
- UV-VIS spektrometr Helios  $\gamma$ , Thermo Fischer scientific, USA
- Centrifuga T52.1, MLW, Německo
- Vortex MS1 S1, IKA, Německo
- HPLC-DAD s kolonou Kinetex C<sub>18</sub> EVO (150×4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ), Thermo Fischer scientific, USA
- HPLC-DAD Agilent Infinity 1260 s kolonou Luna Omega C<sub>18</sub> Polar (150×3 mm; 3  $\mu\text{m}$ ), Agilent, USA
- GC-FID TRACE™ GC 2000 s kolonou DB-WAX 23 (60 m×0,25 mm×0,25  $\mu\text{m}$ ), ThermoQuest Italia S. p. A, Itálie

#### 3.1.3 Chemikálie

- Ethanol 96 % p. a., Sigma-Aldrich, Německo
- Hydroxid draselný p. a., PENTA, Česká republika
- Destilovaná voda, FCH VUT
- Fenolftalein
- Kyselina chlorovodíková 35 %, Lach:ner, Česká republika
- Kyselina citronová monohydrát p. a., ZMBD chemik s.r.o., Česká republika
- Jodmonobromid, Alfa Aesar, Thermo Fischer Scientific, USA
- Jodid draselný p. a., Lach:ner, Česká republika
- Chloroform pure stab. with amylen, Penta, Česká republika

- Thiosíran sodný bezvodý pure, Lach:ner, Česká republika
- Škrob rozpustný p. a., Lach:ner, Česká republika
- Kyselina octová 99 % p. a., PENTA, Česká republika
- Hydroxid sodný p. a., Penta, Česká republika
- Methanol p. a., Lach:ner, Česká republika
- Isooktan p. a., Sigma-Aldrich, Německo
- Chlorid sodný p. a., Penta, Česká republika
- Bortrifluorid methanolický roztok 10 %, Sigma-Aldrich, Německo
- Síran sodný, bezvodý p. a., Lach:ner, Česká republika
- Hexan p. a., Lach:ner, Česká republika
- Směsný standard methylesterů mastných kyselin, Supelco™ 37 Component FAME mix, Sigma-Aldrich, Německo
- Anhydrid kyseliny octové, Lach:ner, Česká republika
- Kyselina sírová 96 % G.R., Penta, Česká republika
- $\beta$ -sitosterol Sigma-Aldrich, Německo
- Acetonitril pro HPLC, Carl ROTH, Německo
- Ethylacetát pro HPLC, Carl ROTH, Německo
- Methanol pro HPLC, Carl ROTH, Německo
- 2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol pro HPLC, Carl ROTH, Německo
- Stigmasterol, Sigma-Aldrich, Německo
- $\beta$ -sitosterol, Sigma-Aldrich, Německo
- $\beta$ -karoten, Sigma-Aldrich, Německo
- Lutein, Sigma-Aldrich, Německo
- Diethylether, Lach:ner, Česká republika
- DL-alpha-tocopherol acetate, Sigma-Aldrich, Německo
- Retinyl palmitate, Sigma-Aldrich, Německo
- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich, Německo
- Uhličitan sodný bezvodý p. a., Lach:ner, Česká republika
- Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Německo
- 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát), Sigma-Aldrich, Německo
- Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich, Německo
- kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová, Sigma-Aldrich, Německo

#### 3.1.4 Plyny pro GC-FID

- Vodík 5.5, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
- Vzduch 5.0, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
- Helium 5.0, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

## 3.2 Materiál

V této práci byly zkoumány čtyři vzorky sádla, jeden vzorek mandlového oleje a vzorek kořene kostivalu lékařského. Sušený kořen kostivalu lékařského a tři vzorky kosmetického sádla byly dodány společností Aromatica CZ s.r.o. sídlící ve Šlapanicích. Vzorky sádla byly vyrobeny z plstního sádla pocházejícího z německých jatek. Během výrobního procesu bylo sádlo nejprve zmrazeno na 2–3 dny, poté rozmrazeno a taveno. Jednotlivé vzorky sádla jsou rozděleny do šarží dle data výroby: š. 200106, š. 200203 a š. 200224.

Čtvrtý vzorek sádla pochází od společnosti PILLER s.r.o. z Roudnice nad Labem. Jedná se o sádlo potravinářské, které je určeno ke konzumaci a bylo zakoupeno v běžné obchodní síti.

Mandlový olej byl dodán společností Gustav Heess Oleochemische Erzeugnisse GmbH, Leonberg, Německo. Olej byl vyroben z kalifornských mandlí. Lisování probíhalo za studena, a poté byl olej rafinován.

Sušený kostivalový kořen byl skladován v temnu a suchu v perforované folii při laboratorní teplotě. Mandlový olej byl skladován ve tmavé plastové nádobě při laboratorní teplotě. Vzorky sádla byly skladovány při teplotě do 5 °C.

Potravinářské sádlo sloužilo především pro porovnání s kosmetickým sádlem při analýze vybraných parametrů tuků. Mandlový olej byl vybrán pro porovnání macerátů tuků s nízkou a vysokou teplotou tání.

Společností Aromatica s.r.o. byla rovněž dodána i kostivalová mast, která sloužila k porovnání macerátů připravovaných pro účely tohoto měření. Kostivalová mast navíc obsahovala včelí vosk, výtažek z listů blahovičnicku kulatoplodého a tokoferol acetát jako antioxidant. Mast byla skladována za stejných podmínek jako vzorky sádla a sloužila pro porovnání připravených macerátů s průmyslově vyrobeným produktem.

## 3.3 Příprava kostivalových macerátů

Maceráty byly připraveny po konzultaci s výrobcem kostivalových masť tak, aby postup přípravy byl shodný, případně se co nejvíce přibližoval postupu výroby používaný výrobcem. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 20 g sušeného kostivalového kořene. K navážce bylo přidáno 200 g sádla, respektive mandlového oleje, baňka byla uzavřena a ponechána v termostatu po dobu 24 hodin při teplotě 55 °C. Stejný postup byl opakován dvakrát pro každý vzorek tuku. Poté byl připraven ještě kontrolní vzorek, a to pouze s navážkou tuku. Kontrolní vzorek sloužil pro sledování změny čísla kyselosti a peroxidového čísla oproti macerátům.

## 3.4 Postupy stanovení jednotlivých parametrů

### 3.4.1 Stanovení celkové sušiny sušením

Do vysušené a předem zvážené hliníkové misky byly s přesností na 4 desetinná místa naváženy 3 g vzorku. Miska byla umístěna do sušárny a vzorek byl sušen při teplotě 105 °C. Sušení probíhalo do zaznamenání minimální hmotnosti, přičemž celková doba sušení byla 4 hodiny [91].

### 3.4.2 Stanovení čísla kyselosti

Do titrační baňky bylo s přesností na dvě desetinná místa naváženo 5 g vzorku. Do baňky bylo přidáno 100 ml ethanolu a obsah baňky byl přiveden k varu na topném hnízdě. Následně

byly k roztoku přidány tři kapky fenolftaleinu a obsah baňky byl ihned titrován odměrným roztokem ethanolického hydroxidu draselného ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) do růžového zbarvení, které bylo stálé po dobu 30 s. Výsledné číslo kyselosti je uváděno v mg hydroxidu draselného potřebných k neutralizaci 1 g tuku. Standardizace odměrného roztoku hydroxidu draselného byla provedena pomocí roztoku kyseliny citronové ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) [91].

### 3.4.3 Stanovení čísla zmýdelnění

Do baňky s kulatým dnem byly s přesností na dvě desetinná místa naváženy 2 g vzorku. Do baňky bylo pipetováno 25 ml ethanolického roztoku hydroxidu draselného ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a obsah baňky byl zmýdelňován na topném hnízdě pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Následně byly přidány 3 kapky fenolftaleinu a obsah baňky byl za horka titrován odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) do odbarvení. Stejným způsobem, avšak bez navážky tuku, byl proveden slepý pokus. Výsledné číslo zmýdelnění je uváděno v mg hydroxidu draselného, potřebných ke zmýdelnění 1 g tuku. Standardizace odměrného roztoku hydroxidu draselného byla provedena pomocí odměrného roztoku hydroxidu draselného ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), standardizace roztoku hydroxidu draselného ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) pak byla provedena odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) [91].

### 3.4.4 Stanovení jodového čísla podle Hanuš

Do Erlenmayerovy baňky se zábrusem bylo s přesností na 4 desetinná místa naváženo 0,5 g vzorku. Vzorek byl rozpuštěn v 10 ml chloroformu a po přidání 25 ml jodmonobromidového roztoku a po ovlhčení zátky v roztoku jodidu draselného byla baňka uzavřena a umístěna na temné místo. Po hodině stání s průběžným promícháním bylo ke vzorku pipetováno 25 ml 10% jodidu draselného a 100 ml destilované vody. Po přidání škrobového mazu a protřepání byl obsah baňky titrován odměrným roztokem thiosíranu sodného ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) do odbarvení vodné fáze. Stejným způsobem byl připraven i slepý pokus. Jodové číslo je vyjádřeno v g  $\text{I}_2$ , který je adován na 100 g tuku [91].

### 3.4.5 Stanovení peroxidového čísla

S přesností na dvě desetinná místa byly naváženy 3 g vzorku do Erlenmayerovy baňky se zábrusem. Vzorek byl rozpuštěn v 50 ml směsi kyseliny octové a chloroformu (3:2 (v/v)) a následně byl ke vzorku pipetován 1 ml nasyceného roztoku jodidu draselného. Vzorek byl ponechán ve tmě po dobu 20 minut a poté k němu bylo přidáno 100 ml destilované vody. Po přidání škrobového mazu byl obsah baňky titrován odměrným roztokem thiosíranu sodného ( $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) do odbarvení vodné fáze. Peroxidové číslo je pak vyjádřeno v mmol  $\text{O}_2$  na kg tuku [91].

### 3.4.6 Stanovení volných a celkových mastných kyselin pomocí GC-FID

#### 3.4.6.1 Stanovení mastných kyselin kyselou esterifikací s bortrifluoridem jako katalyzátorem

Do 50 ml baňky s kulatým dnem byla navážena s přesností na 4 desetinná místa 0,1 g vzorku. Ke vzorku byly přidány 4 ml methanolického roztoku hydroxidu sodného ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a následně byl vzorek saponifikován na topném hnízdě pod zpětným chladičem

s průběžným promícháváním. Saponifikace probíhala do vymizení kapek tuku na hladině roztoku (přibližně 10 minut) [98, 99].

Poté bylo přes zpětný chladič přidáno 5 ml 10% methanolického roztoku bortrifluoridu. Po 30 minutách od začátku varu byly do baňky přidány 3 ml isooktanu a var byl ukončen. Po přidání 20 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (NaCl) byla baňka protřepána a po doplnění baňky roztokem NaCl po hrdlo byly pipetovány 2 ml isooktanové vrstvy do 4ml vialky. K isooktanu bylo přidáno malé množství bezvodého síranu sodného pro odstranění zbytkové vlhkosti. 1 ml bezvodého roztoku byl pipetován do vialky a analyzován pomocí GC-FID [98–100].

Identifikace mastných kyselin byla provedena porovnáním retenčních časů s retenčními časy standardů (Tabulka 2 a příloha 1). Kvantifikace byla provedena výpočtem ze známé koncentrace a plochy píku standardu (Tabulka 2) a naměřené plochy píku methylesteru mastné kyseliny [98–100].

### **3.4.6.2 Stanovení volných mastných kyselin kyselou esterifikací s bortrifluoridem jako katalyzátorem**

Do 50 ml baňky s kulatým dnem byla navážena s přesností na 4 desetinná místa 0,1 g vzorku. Ke vzorku bylo napipetováno 5 ml 10% methanolického roztoku bortrifluoridu a následně byla směs přivedena k varu. Po třech minutách varu byly do baňky přidány 3 ml isooktanu a var byl ukončen. Po přidání 20 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (NaCl) byla baňka protřepána a po doplnění baňky roztokem NaCl po hrdlo byly pipetovány 2 ml isooktanové vrstvy do 4ml vialky. K isooktanu bylo přidáno malé množství bezvodého síranu sodného pro odstranění zbytkové vlhkosti. Následně byl 1 ml bezvodého roztoku pipetován do vialky a analyzován pomocí GC-FID [98–100]. Identifikace a kvantifikace MEMK viz kapitola 3.4.6.1.

**Tabulka 1** Nastavená GC-FID metoda [100]

Přístroj	TRACE™ GC 2000 (ThermoQuest Italia S. p. A, Itálie)
Kolona	DB-WAX 23 (60 m×0,25 mm×0,25 μm)
Teplota injektoru	250 °C
Dávkování	bez děliče toku (splitless)
Objem nástřiku	1 μl
Doba bezděličového dávkování	5 minut
Nosný plyn	dusík
Průtok nosného plynu	0,5 ml/min
Detektor	FID
Teplota detektoru	250 °C
Průtok vzduchu	350 ml/min
Průtok vodíku	35 ml/min
Make-up dusíku	30 ml/min
Celková doba analýzy	47 minut

**Tabulka 2** Směs standardů MEMK ( $T_R$  – retenční čas MEMK,  $c_s$  – koncentrace standardů MEMK,  $P_s$  – plocha standardů MEMK,  $M_{MEMK}$  – molekulová hmotnost MEMK,  $M_{MK}$  – molekulová hmotnost MK) [102]

Název MK	Zkrácený zápis MK	$T_R$ [min]	$c_s$ [mg·ml <sup>-1</sup> ]	$P_s$ [mV·s]	$M_{MEMK}$ [g·mol <sup>-1</sup> ]	$M_{MK}$ [g·mol <sup>-1</sup> ]
Kyselina máselná	C4:0	4,35	0,04	3125173	102,133	88,106
Kyselina kapronová	C6:0	5,59	0,04	3194222	130,187	116,160
Kyselina kaprylová	C8:0	6,75	0,04	4061317	158,241	144,214
Kyselina kaprinová	C10:0	7,88	0,04	4223169	186,295	172,268
Kyselina undekanová	C11:0	8,5	0,02	2210409	200,322	186,295
Kyselina laurová	C12:0	9,20	0,04	4640412	214,349	200,322
Kyselina tridekanová	C13:0	10,00	0,02	2365835	228,376	214,349
Kyselina myristová	C14:0	10,96	0,04	4953419	242,403	228,376
Kyselina myristoolejová	C14:1 <sup>Δ9</sup>	11,39	0,02	2366989	240,387	226,360
Kyselina pentadekanová	C15:0	12,08	0,02	2470555	256,430	242,403
Kyselina <i>cis</i> -10-pentadecenová	C15:1 <sup>Δ10</sup>	12,59	0,02	2447994	254,414	240,387
Kyselina palmitová	C16:0	13,41	0,06	8071065	270,457	256,43
Kyselina palmitoolejová	C16:1 <sup>Δ9</sup>	13,83	0,02	2520590	268,441	254,414
Kyselina heptadekanová	C17:0	14,92	0,02	2544888	284,484	270,457
Kyselina <i>cis</i> -10-heptadecenová	C17:1 <sup>Δ10</sup>	15,40	0,02	2489531	282,468	268,441
Kyselina stearová	C18:0	16,63	0,04	5174886	298,511	284,484
Kyselina olejová	C18:1 <sup>Δ9</sup>	17,06	0,04	9238057	296,495	282,468
Kyselina linolová	C18:2 <sup>Δ9,12</sup>	17,96	0,02	4897549	294,479	280,452
Kyselina $\gamma$ -linolenová	C18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>	18,62	0,02	2376273	292,463	278,436
Kyselina $\alpha$ -linolenová	C18:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	19,38	0,02	2266846	292,463	278,436
Kyselina arachová	C20:0	21,08	0,04	4888960	326,565	312,358
Kyselina <i>cis</i> -11-eikosenová	C20:1 <sup>Δ11</sup>	21,71	0,02	2433557	322,533	308,506
Kyselina <i>cis</i> -11,14-eikosadienová	C20:2 <sup>Δ11,14</sup>	23,20	0,02	2504386	322,533	308,506
Kyselina heneikosanová	C21:0	24,18	0,02	4522345	340,592	326,565
Kyselina <i>cis</i> -8,11,14-eikosatrienová	C20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	24,99	0,02	2016421	320,517	306,490
Kyselina arachidonová	C20:4 <sup>Δ5,8,11,4</sup>	25,55	0,02	2213031	318,501	304,474
Kyselina <i>cis</i> -11,14,17-eikosatrienová	C20:3 <sup>Δ11,14,17</sup>	25,95	0,02	1767455	316,485	302,458
Kyselina behenová	C22:0	27,68	0,04	2046415	354,619	340,592
Kyselina eikosapentaenová	C20:5	28,27	0,02	4092799	316,477	302,451
Kyselina eruková	C22:1 <sup>Δ13</sup>	29,31	0,02	2010098	352,603	338,576
Kyselina <i>cis</i> -13,16-docosadienová	C22:2 <sup>Δ13,16</sup>	31,84	0,02	1902903	350,587	336,560

### 3.4.7 Stanovení celkových fytoosterolů pomocí UV-VIS spektrometrie

*Příprava kalibrační křivky:* Ze základního roztoku standardu  $\beta$ -sitosterolu (1 g/l) bylo připraveno pět roztoků kalibrační řady o koncentraci 20, 40, 60 a 100 mg/l. Pro měření kalibrace byl do odměrných baněk pipetován 1 ml roztoku standardu a k němu byly přidány 2 ml Liebermann-Burchardova činidla (roztok 50 ml anhydridu kyseliny octové a 5 ml koncentrované kyseliny sírové). Baňka byla doplněna po rysku chloroformem a protřepána. Po dvou minutách byla spektrofotometricky měřena absorbance vzorku při vlnové délce 625 nm. Jako blank byl použit chloroform [87]. Poté byl sestaven graf (příloha 2) a vypočítána rovnice kalibrační přímky (rovnice 1).

$$y = 3,18548 \cdot x - 0,03391 \quad (1)$$

*Měření vzorků:* S přesností na čtyři desetinná místa bylo naváženo 0,5 g vzorku. Vzorek byl rozpuštěn přidáním 10 ml chloroformu. Následně byl do suché zkumavky pipetován 1 ml vzorku, k němu byly přidány 2 ml Liebermann-Burchardova činidla a roztok byl doplněn chloroformem na výsledný objem 5 ml. Poté byla spektrofotometricky měřena absorbance vzorku při vlnové délce 625 nm [87].

### 3.4.8 Stanovení fytoosterolů a karotenoidů pomocí HPLC-DAD

Do zkumavky bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 0,2 g vzorku. Vzorek byl rozpuštěn v 10 ml směsi acetonitrilu a ethylacetátu (2:1 (v/v)). Následně byl vzorek filtrován přes stříkačkový filtr (PTFE (polytetrafluorethylen), porozita 0,45  $\mu$ m) do vialky a analyzován [85, 89].

**Tabulka 3** Nastavená HPLC metoda [85, 89]

Přístroj	Thermo Fischer Scientific, USA
Kolona	Kinetex C <sub>18</sub> EVO (150 × 4,6 mm; 5 $\mu$ m)
Složení mobilní fáze A	ACN:MeOH:TrisHCl – 84:2:14
Složení mobilní fáze B	MeOH:Ethylacetát – 60:40
Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Objem nástřiku	20 $\mu$ l
Detektor	DAD
Vlnová délka detekce	285 nm (fytoosteroly), 445, 455 (karotenoidy)
Délka analýzy	25 min

Gradient:

0-13 minut – 100 % A → 100 % B

13-19 minut – 100 % B

19-20 minut – 100 % B → 100 % A

20-25 minut – 100 % A

Rovnice kalibrační přímky pro  $\beta$ -sitosterol:

$$y = 19714,32 \cdot x + 40908,1 \quad (2)$$



Rovnice kalibrační přímky pro stigmasterol:

$$y = 47678,73 \cdot x + 28028,7 \quad (3)$$

Rovnice kalibrační přímky pro  $\beta$ -karoten:

$$y = 322802 \cdot x - 838301 \quad (4)$$

Rovnice kalibrační přímky pro lutein:

$$y = 3313829,42 \cdot x - 24693,26 \quad (5)$$

### 3.4.9 Stanovení celkových karotenoidů pomocí UV-VIS spektrometrie

*Příprava kalibrační křivky:* Ze základního roztoku standardu  $\beta$ -karotenu (1,5 g/l) bylo připraveno pět roztoků kalibrační řady o koncentraci 0,05; 0,1; 0,25; 0,75 a 1;5 g/l. Následně byla spektrofotometricky měřena absorbance roztoku při vlnové délce 450 nm a vypočítána rovnice kalibrační přímky (rovnice 6). Graf kalibrační přímky viz příloha 3. Jako blank byl použit hexan [69, 82].

$$y = 0,2492245 \cdot x + 0,0009110 \quad (6)$$

*Měření vzorku:* Do zkumavky bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 0,5 g vzorku. Vzorek byl rozpuštěn přidáním 10 ml hexanu a přečištěn 0,5 ml 0,5% roztoku chloridu sodného. Vzorek byl vortexován a centrifugován. Následně byla spektrofotometricky měřena absorbance hexanové vrstvy při 450 nm [82].

### 3.4.10 Stanovení tokoferolů pomocí HPLC-DAD

Do zkumavky bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 0,5 g vzorku. Vzorek byl rozpuštěn v 10 ml diethyletheru. Následně byl vzorek filtrován přes stříkačkový filtr (Nylon, porozita 0,45  $\mu$ m) do vialky a analyzován [77, 102].

Rovnice kalibrační přímky pro DL- $\alpha$ -tokoferol acetát:

$$y = 19714,32 \cdot x + 40908,1 \quad (7)$$

**Tabulka 4** Nastavená HPLC metoda [75–77, 103]

Přístroj	Agilent Infinity 1260, USA
Kolona	Luna Omega C <sub>18</sub> Polar (150 × 3 mm; 3 $\mu$ m)
Složení mobilní fáze	ACN:MeOH – 60:40
Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Objem nástřiku	5 $\mu$ l
Teplota kolony	30 °C
Detektor	DAD
Vlnová délka detekce	285 nm
Délka analýzy	15 min

### 3.4.11 Stanovení celkových fenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

*Příprava kalibrační křivky:* Ze základního roztoku standardu kyseliny gallové (1 g/l) bylo připraveno pět roztoků kalibrační řady o koncentraci 10, 20, 50, 100 a 250 mg/l. Pro měření kalibrační křivky byl do zkumavek pipetován 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova (1:9) činidla 1 ml vody a 0,1 ml jednotlivých standardů. Obsah zkumavek byl promíchán a ponechán ve tmě [67]. Po 5 minutách byl do zkumavek přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a obsah zkumavek byl promíchán. Po 15 minutách stání byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Blank byl připraven stejným způsobem jako kalibrační řada, avšak objem přidaného roztoku standardu byl nahrazen stejným množstvím destilované vody. Z naměřených hodnot byl sestaven graf (příloha 4) a vypočítána rovnice kalibrační přímky (rovnice 8) [67].

$$y = 0,002304 \cdot x \quad (8)$$

*Měření vzorků:* S přesností na čtyři desetinná místa byl do zkumavky navážen 1 g vzorku. Fenolické látky byly následně extrahovány do DMSO, kdy byl obsah zkumavky nejprve vortexován a následně centrifugován. Postup stanovení vzorku je shodný jako při měření kalibrační závislosti, pouze bylo místo 0,1 ml standardu pipetováno 0,1 ml extraktu vzorku. Celkové fenolické látky jsou pak vyjádřeny jako ekvivalent hmotnosti kyseliny gallové ku hmotnosti vzorku [67].

### 3.4.12 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

*Příprava pracovního roztoku ABTS:* Základní roztok ABTS byl připraven rozpuštěním ABTS a peroxodisíranu draselného ve vodě. Výsledná koncentrace ABTS činila  $7 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a výsledná koncentrace peroxodisíranu draselného činila  $2,45 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Tento roztok byl ponechán ve tmě po dobu 12 hodin. Ze základního roztoku ABTS o koncentraci  $7 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  byl ředěním 60% ethanolem připraven pracovní roztok, jehož absorbance při 734 nm, měřená spektrofotometricky, byla rovna hodnotě  $0,70 \pm 0,02$ , přičemž jako blank byl použit 60% ethanol. Následně byl do kyvety pipetován 1 ml pracovního roztoku, k němu bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  destilované vody a ihned byla měřena jeho absorbance. Takto byla stanovena absorbance v čase nula ( $A_0$ ), od které se následně při výpočtu antioxidační aktivity odečítaly všechny měřené hodnoty [67].

*Příprava kalibrační křivky:* Ze základního roztoku Troloxu (400 mg/l) bylo připraveno osm roztoků kalibrační řady o koncentraci 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 a 400 mg/l. Z takto připravených roztoků byl postupně do kyvety pipetován objem 10  $\mu\text{l}$ , ke kterému byl přidán 1 ml pracovního roztoku ABTS. Poté byla kyveta ponechána ve tmě a po deseti minutách byla spektrofotometricky měřena absorbance ( $A_{10}$ ) roztoku při vlnové délce 734 nm, která byla odečtena od absorbance  $A_0$ . Z těchto hodnot byl následně sestaven graf (příloha 5) a vypočítána rovnice kalibrační přímky (rovnice 9) [67].

$$y = 0,001416 \cdot x \quad (9)$$

Kde y je hodnota  $A_0 - A_{10}$

*Měření vzorku:* Extrakce vzorku byla provedena podle postupu v kapitole 3.3.11 Stanovení celkových fenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Měření antioxidační aktivity pak bylo provedeno stejně jako v případě kalibrační řady, ovšem objem standardu byl nahrazen objemem vzorku. Výsledná antioxidační aktivita je vyjádřena v ekvivalentu hmotnosti Troloxu ku hmotnosti vzorku [67].

### **3.5 Statistické zpracování výsledků**

Stanovení jednotlivých parametrů bylo u všech vzorků opakováno třikrát. Naměřené hodnoty byly následně zpracovány v programu MS Excel 365. Výsledky měření jsou průměrná hodnota měření  $\pm$  směrodatná odchylka. Ve sloupcových diagramech jsou směrodatné odchylky znázorněny pomocí chybových úseček.

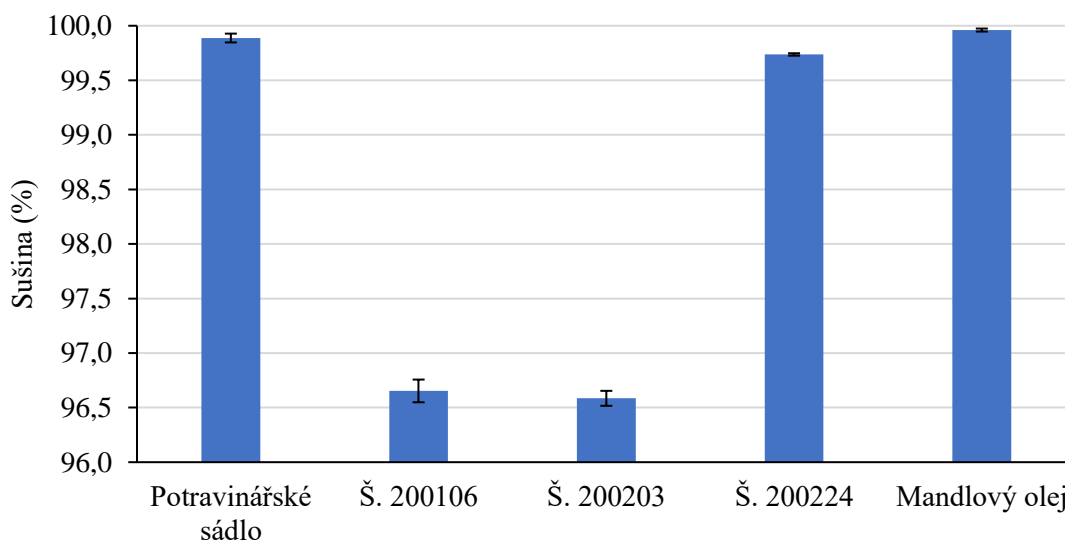
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Charakterizace tukových základů

#### 4.1.1 Stanovení sušiny

Tabulka 5 Stanovené hodnoty sušiny v % hmotnosti vzorku

	Sušina (%)
Potravinářské sádlo	99,84 ± 0,04
Š. 200106	96,65 ± 0,10
Š. 200203	96,59 ± 0,07
Š. 200224	99,74 ± 0,01
Mandlový olej	99,94 ± 0,01



Graf 1 Obsah sušiny jednotlivých vzorků v % hmotnosti vzorku

Z Tabulky 5 a Grafu 1 vyplývá, že nejvyšší hodnota celkové sušiny byla stanovena v mandlovém oleji ( $99,94 \pm 0,01$  %), nejnižší hodnoty pak byly stanoveny pro vzorky kosmetických sádel šarže 200106 a 200203, přičemž se obě tyto hodnoty liší pouze v rámci směrodatných odchylek.

Z literatury vyplývá, že obsah vody v sádle se pohybuje okolo hodnoty 0,01 % [103], této hodnoty tak žádný vzorek nedosahuje. Vyhláška MZe stanovuje maximální hodnotu těkavých látek v sádle při 105 °C na 0,3 % [105]. Této hodnotě tak odpovídá pouze vzorek potravinářského sádlu a vzorek šarže 200224. Naměřené hodnoty průmyslového partnera pro celkovou sušinu kosmetických sádel činí 95,99 % pro šarži 200106, 97,74 % pro šarži 200203 a 99,54 % pro šarži 200224. Naměřená hodnota pro vzorek š. 200106 se tak liší pouze o 0,7 %, pro vzorek š. 200203 byl rozdíl hodnot 1,0 % a u vzorku š. 200224 činil rozdíl hodnot pouhé 0,2 %. Lze tedy říct, že rozdíl mezi oběma hodnotami u všech vzorků je minimální, přestože celková sušina byla ve společnosti průmyslového partnera stanovena pomocí přesnějších sušících vah na přístroji Mettler Toledo HG63 při 103 °C.

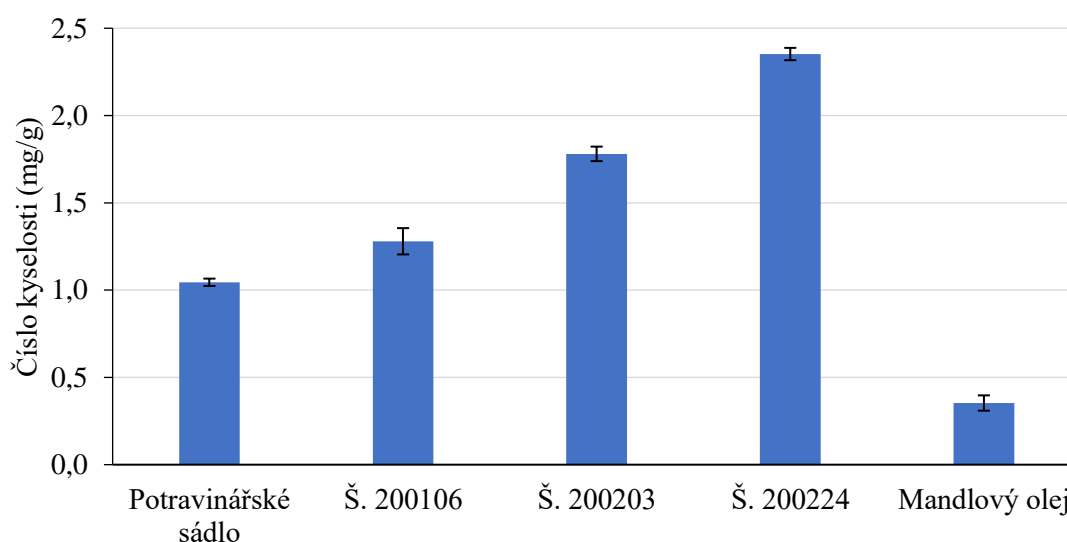
Hodnota celkové sušiny pro mandlový olej v literatuře činí 0,55 % [106], další zdroj pak udává hodnotu 4,41 % [35]. Stanovená sušina vzorku mandlového oleje tak odpovídá spíše prvnímu údaji, přičemž rozdíl obou hodnot je přibližně 0,5 %.

#### 4.1.2 Stanovení tukových čísel

Číslo kyselosti je vyjádřeno v mg KOH/g vzorku, číslo zmydelnění je vyjádřeno v mg KOH/g vzorku, jodové číslo je vyjádřeno v g I<sub>2</sub>/100 g vzorku a peroxidové číslo je vyjádřeno v mmol O<sub>2</sub>/kg vzorku.

**Tabulka 6** Výsledky stanovení čísla kyselosti (ČK), čísla zmydelnění (ČZ), jodového čísla (JČ) a peroxidového čísla (PČ) pro jednotlivé vzorky tuku

	ČK (mg/g)	ČZ (mg/g)	JČ (g/100 g)	PČ (mmol/kg)
<b>Potravinářské sádlo</b>	1,05 ± 0,02	190,7 ± 2,2	56,2 ± 0,4	1,70 ± 0,09
Š. 200106	1,28 ± 0,08	190,3 ± 0,4	50,3 ± 2,2	1,29 ± 0,21
Š. 200203	1,78 ± 0,04	190,2 ± 0,9	51,2 ± 2,1	0,85 ± 0,04
Š. 200224	2,35 ± 0,04	191,8 ± 1,6	48,6 ± 1,3	1,24 ± 0,09
<b>Mandlový olej</b>	0,35 ± 0,04	186,0 ± 0,5	99,3 ± 2,0	2,04 ± 0,03

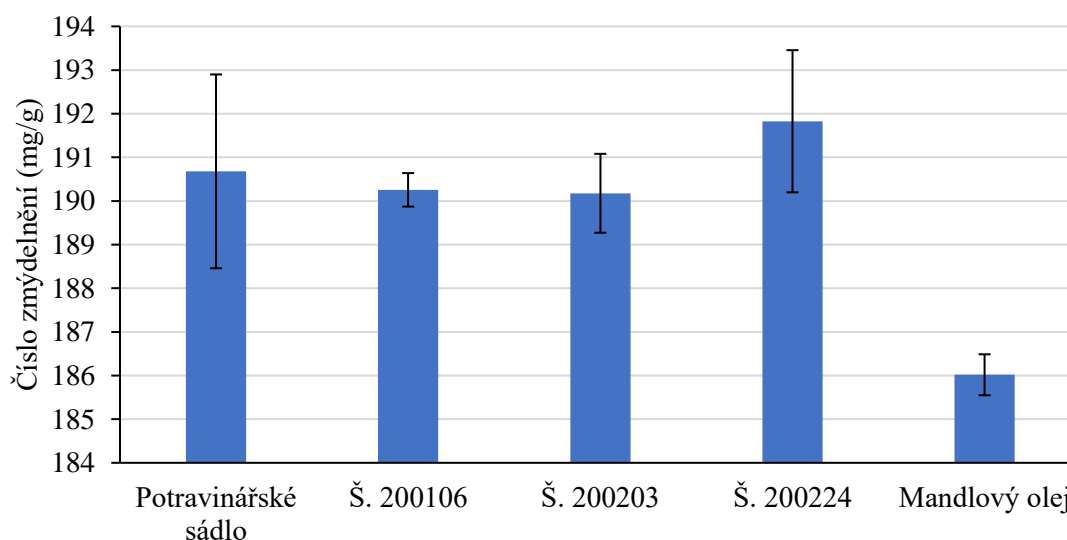


**Graf 2** Číslo kyselosti vzorků v mg KOH/g vzorku

Z Tabulky 6 a Grafu 2 je patrné, že nejvyšší hodnota čísla kyselosti byla stanovena pro vzorek kosmetického sádla šarže 200224, nejnižší hodnota pak byla změřena u vzorku mandlového oleje. Ze čtyř vzorků sádla byla nejnižší hodnota čísla kyselosti stanovena pro potravinářské sádlo. Vzhledem k tomu, že mezi třemi šaržemi kosmetických sádla byla nejvyšší hodnota stanovena pro vzorek s nejmladším datem výroby, se dá usuzovat, že hodnota čísla kyselosti u těchto vzorků není závislá na datu výroby a na postupné hydrolýze esterických vazeb triacylglycerolů v průběhu skladování, ale spíše na složení vstupní suroviny, případně i na výrobním procesu.

Vyhláška MZe udává maximální hodnotu čísla kyselosti na 2,5 mg/g [104]. Stanovené číslo kyselosti u všech čtyř vzorků je nižší než tato hodnota, a to o 1,45–0,15 mg/g.

Literatura udává maximální hodnotu čísla kyselosti pro rafinované tuky a oleje na 0–1 mg/g [91]. Vzorek rafinovaného mandlového oleje se tak nachází v tomto intervalu. Další literární zdroj uvádí hodnotu čísla kyselosti pro mandlový olej, která činí 0,78 mg/g [105]. Tato hodnota je 2,2× vyšší než naměřená hodnota vzorku.



**Graf 3** Číslo zmydelnění vzorků v mg KOH/g vzorku

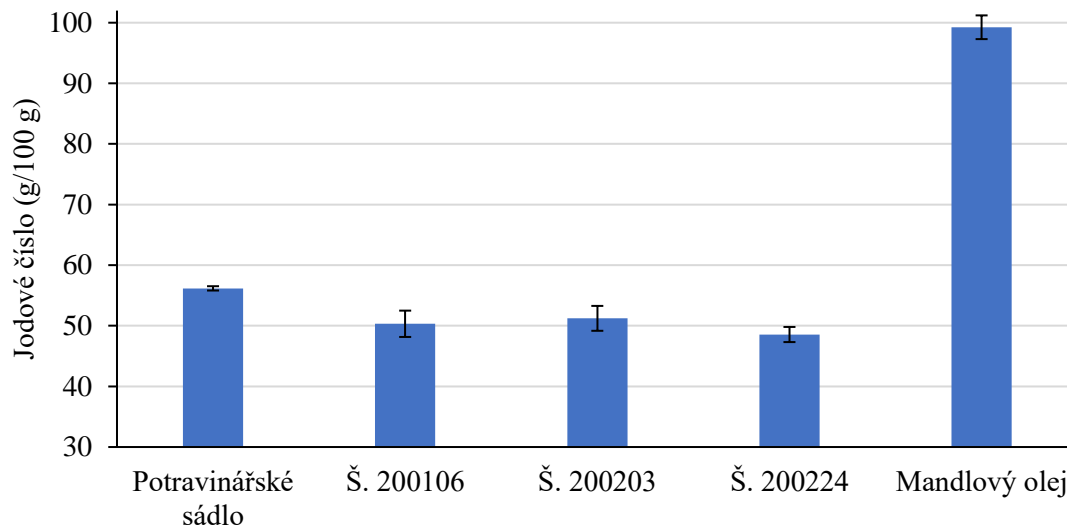
Z Tabulky 6 a Grafu 3 vyplývá, že stanovená hodnota čísla zmydelnění se u vzorků sádla liší pouze v rámci směrodatné odchylky a že tyto hodnoty jsou vyšší o 2,3–3,1 % než hodnota čísla zmydelnění u vzorku mandlového oleje. To znamená, že mandlový olej obsahuje vyšší podíl nezmýdelnitelných látek, a má tak nižší podíl tuku.

Hodnota čísla zmydelnění u vzorků sádla činí 190,2–191,8 mg/g, což odpovídá intervalu hodnot čísla zmydelnění pro sádlo z literatury (190–200 mg/g) [91, 104].

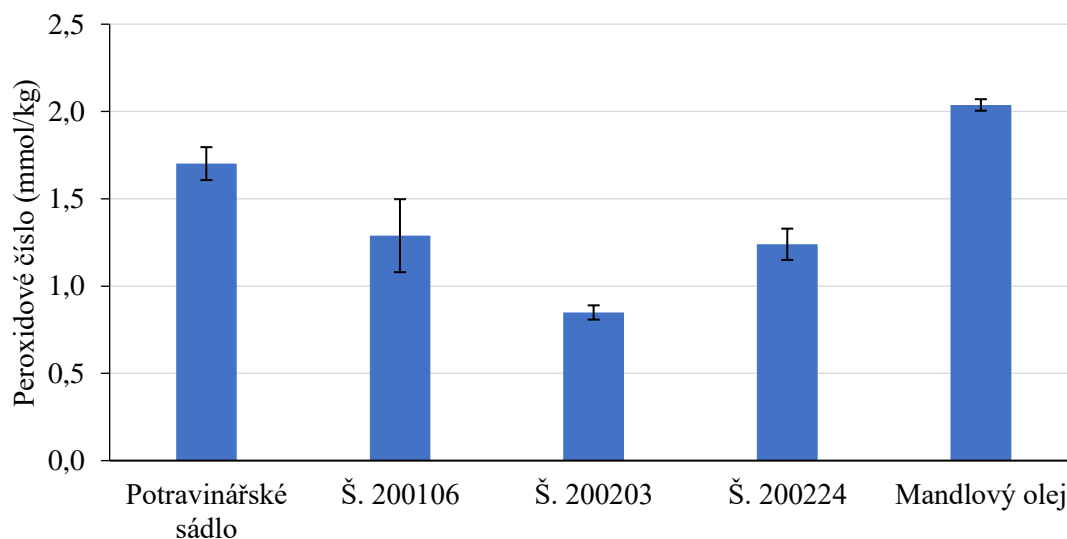
Hodnota čísla zmydelnění mandlového oleje se pak nachází v intervalu hodnot čísla zmydelnění pro rostlinné oleje (185–190 mg/g) [91]. Další zdroj uvádí hodnotu 168,27 mg/g [105]. Vzorek mandlového oleje se s touto hodnotou liší o 9,5 %. U vzorku mandlového oleje se tak může jednat o vyšší stupeň rafinace. Další zdroj uvádí interval 178–201 mg/g [39], v tomto intervalu se nachází i měřený vzorek.

Hodnoty jodových čísel vzorků jsou uvedeny v Tabulce 6 a Grafu 4. Z těchto hodnot vyplývá, že jodové číslo mandlového oleje je oproti vzorkům sádla větší přibližně 1,8–2,0×, což odpovídá vyšší nanesycenosti řetězců mastných kyselin u mandlového oleje. Literatura udává pro mandlový olej interval hodnot jodového čísla 95,5–104,7 [39], kam tedy spadá i vzorek mandlového oleje.

Z Grafu 4 je patrné, že u vzorků sádla byla nejvyšší hodnota jodového čísla stanovena pro potravinářské sádlo, přičemž šarže kosmetických sádel 200106, 200203 a 200224 se mezi sebou liší pouze v rámci statistické chyby. Všechny vzorky sádla se také svou hodnotou jodového čísla nacházejí v intervalu 45–70 g/100 g, který udává literatura [91, 104].



**Graf 4** Jodové číslo vzorků v g I<sub>2</sub>/100 g vzorku



**Graf 5** Peroxidové číslo vzorků v mmol O<sub>2</sub>/kg vzorku

Z hodnot peroxidového čísla z Tabulky 6 a Grafu 5 lze usoudit, že všechny vzorky lze z hlediska této hodnoty považovat za čerstvé tuky (0–16 mmol/kg [91]). Nejvyšší hodnoty dosahuje mandlový olej, nejnižší pak vzorek šarže 200203, jehož hodnota je asi 2,4× menší. U všech vzorků se tak dá říct, že podmínky skladování byly zvoleny správně.

### 4.1.3 Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID

Tabulka 7 Zastoupení mastných kyselin v jednotlivých vzorcích v %, ND – nebyla detekována

Zkrácený zápis MK	Potravinářské sádlo	Š. 200106	Š. 200203	Š. 200224	Mandlový olej
<b>C4:0</b>	0,38 ± 0,03	0,49 ± 0,01	0,33 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,37 ± 0,05
<b>C6:0</b>	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01
<b>C8:0</b>	0,11 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,00
<b>C10:0</b>	0,47 ± 0,06	0,25 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,43 ± 0,05
<b>C11:0</b>	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
<b>C12:0</b>	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,01 ± 0,00
<b>C13:0</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>C14:0</b>	2,47 ± 0,22	2,24 ± 0,06	2,46 ± 0,16	2,25 ± 0,09	0,11 ± 0,01
<b>C14:1</b>	0,22 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00
<b>C15:0</b>	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,00
<b>C15:1</b>	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	ND
<b>C16:0</b>	37,51 ± 1,46	36,84 ± 1,37	33,60 ± 1,04	36,53 ± 1,34	10,13 ± 0,78
<b>C16:1</b>	2,76 ± 0,08	2,72 ± 0,02	3,00 ± 0,24	2,72 ± 0,10	0,58 ± 0,06
<b>C17:0</b>	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,00	0,33 ± 0,04	0,36 ± 0,00	0,05 ± 0,00
<b>C17:1</b>	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,33 ± 0,04	0,28 ± 0,02	0,06 ± 0,00
<b>C18:0</b>	14,71 ± 0,46	15,37 ± 0,74	9,51 ± 0,44	16,18 ± 0,39	2,97 ± 0,13
<b>C18:1cis</b>	30,21 ± 1,21	31,47 ± 1,07	39,63 ± 0,69	32,25 ± 0,92	59,31 ± 1,30
<b>C18:2cis</b>	7,15 ± 0,45	7,55 ± 0,27	7,27 ± 0,95	6,87 ± 0,36	24,42 ± 0,62
<b>C18:3n6</b>	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	ND
<b>C18:3n3</b>	0,60 ± 0,01	0,70 ± 0,03	0,63 ± 0,00	0,48 ± 0,03	0,26 ± 0,03
<b>C20:0</b>	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01
<b>C20:1</b>	0,27 ± 0,00	0,34 ± 0,01	0,58 ± 0,04	0,36 ± 0,00	0,16 ± 0,01
<b>C20:2</b>	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,12 ± 0,01	ND
<b>C21:0</b>	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	ND	0,02 ± 0,00	ND
<b>C20:3n6</b>	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	ND	0,06 ± 0,00	ND
<b>C20:3n3</b>	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	ND
<b>C22:0</b>	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	ND
<b>C20:5</b>	0,07 ± 0,01	ND	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00	ND
<b>C22:1</b>	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01
<b>C22:2</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	ND



Z Tabulky 7 vyplývá, že ve vzorcích potravinářského sádla a vzorku šarže 200224 bylo detekováno celkem 30 mastných kyselin, zatímco ve vzorku š. 200106 jich bylo detekováno 29, ve vzorku š. 200203 28 a ve vzorku mandlového oleje bylo detekováno pouze 21 MK.

Z hlediska složení mastných kyselin se pochopitelně od ostatních vzorků lišil vzorek mandlového oleje. Ten měl vyšší obsah nenasycených mastných kyselin, především kyseliny olejové a linolové a nižší obsah kyseliny palmitové. Výrobce udává složení mastných kyselin takto: 6,5 % kyseliny palmitové, 0,5 % kyseliny palmitoolejové, 1,4 % kyseliny stearové, 64,7 % kyseliny olejové, 26,2 % kyseliny linolové a 0,2 % kyseliny linolenové (viz příloha č. 6). Naměřený obsah kyseliny palmitové je však větší přibližně o 47 %, u kyseliny stearové je hodnota vyšší o 63 %. U nejvíce zastoupené kyseliny olejové činí rozdíl naměřené a udávané hodnoty 9 %, zatímco u kyseliny linolové se obě hodnoty liší o 7 % a u kyseliny linolenové o 23 %, avšak zde se jedná o minoritně zastoupenou kyselinu. Rozdíly hodnot se příliš nezmění ani při zahrnutí chyb měření. Výrobce však neudává, jakou metodou byly mastné kyseliny stanoveny a naměřené hodnoty se tak mohou lišit.

Obsah majoritně zastoupených mastných kyselin ve vzorcích sádla se značně rozchází s hodnotami, které uvádí literatura [35–40], zároveň se liší i jednotlivé vzorky mezi sebou (viz Tabulka 7 a Graf 6). U kyseliny myristové byly naměřeny hodnoty, které jsou oproti literatuře o 11–19 % vyšší (1,3–2,0 % [35–40]), vyšší byly i hodnoty obsahu kyseliny palmitové, konkrétně o 20–28 % oproti nejvyšším udávaným hodnotám (24–27 % [35–40]). Obsah této kyseliny se však lišil i mezi jednotlivými vzorky, neboť vzorek šarže 200203 měl oproti zbylým třem vzorkům nižší obsah kyseliny palmitové, konkrétně o 8,7–11,6 %. Zbylé tři vzorky se v obsahu této kyseliny mezi sebou lišily pouze v rámci směrodatné odchylky.

Obsah kyseliny stearové byl oproti literatuře [35–40] vyšší pouze u tří vzorků (potravinářské sádlo, š. 200106 a š. 200224), kde rozdíl činil 5–13 %, ale u vzorku 200203 byl obsah kyseliny stearové o 16 % než nejnižší uváděná hodnota (11–14 % [35–40]). Zároveň byla tato hodnota o 55–70 % nižší než u zbylých vzorků.

Vzorek šarže 200203 měl oproti zbylým vzorkům sádla o 19–24 % vyšší obsah i u kyseliny olejové. Tento vzorek se tak nejvíce přiblížil literárním hodnotám (41–44 % [48–53]), neboť se lišil přibližně o 3,5 %. Všechny vzorky sádla měly také oproti hodnotě uváděné v literatuře (10 % [35–40]) nižší obsah kyseliny linolové, konkrétně činil rozdíl 32–46 %. Naopak při porovnání obsahu kyseliny linolenové v měřených vzorcích a literatuře (0,3–1,0 % [35–40]) vyplývá, že se v tomto intervalu nacházejí naměřené hodnoty všech čtyř vzorků.

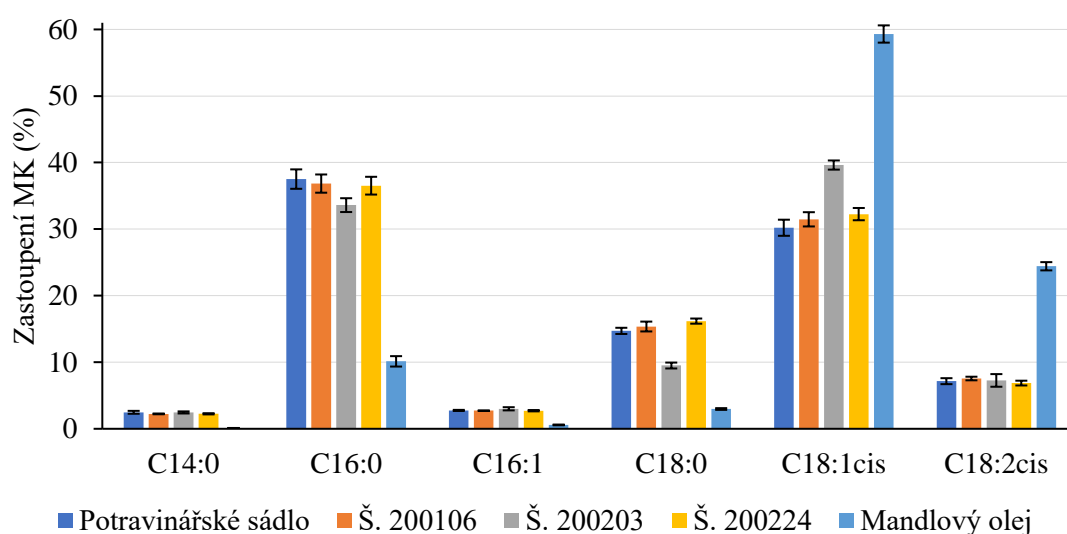
Při porovnání jednotlivých vzorků v Grafu 7 je patrné, že nejvíce se od ostatních vzorků liší mandlový olej, neboť se jedná o rostlinný olej a dá se tak předpokládat rozdílné složení nejen jednotlivých mastných kyselin, ale také součtu nasycených, mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin. Mandlový olej má tak oproti zbylým vzorkům vyšší podíl PUFA (přibližně o 66–68 %), a také vyšší podíl MUFA (26–35 %). Naopak oproti vzorkům sádla má mandlový olej 3,3–3,9× nižší hodnotu nasycených mastných kyselin.

Mezi vzorky sádla je rozdílný vzorek 200203, zatímco mezi ostatními třemi vzorky jsou rozdíly mezi obsahy SFA, MUFA a PUFA minimální. Vzorek šarže 200203 má oproti ostatním třem vzorkům o 20–21 % nižší podíl nasycených mastných kyselin a o 19–22 % vyšší podíl mononenasycených mastných kyselin. Tyto hodnoty jsou však v rozporu se stanoveným

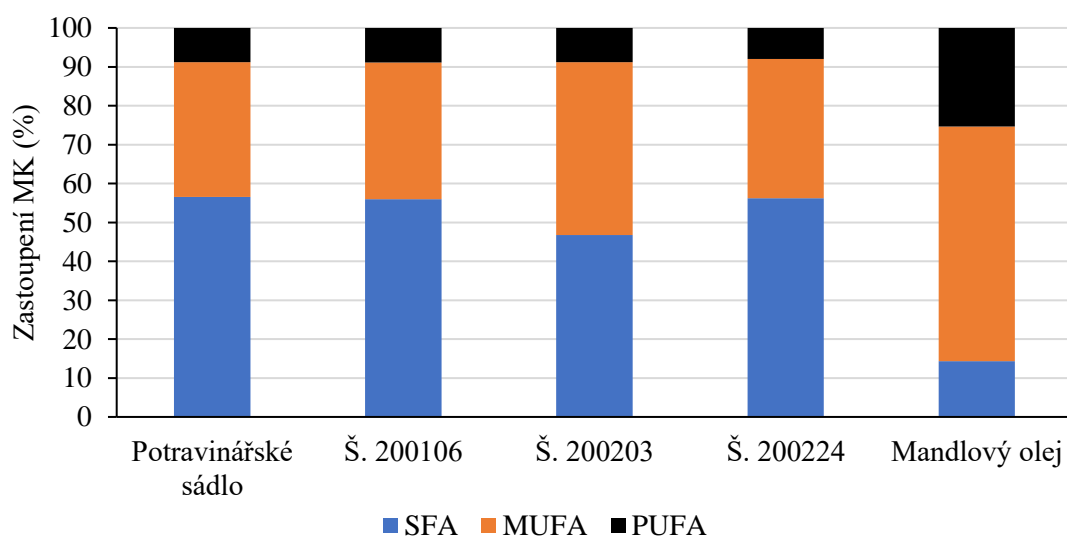
jodovým číslem a dá se tak předpokládat, že jedna z těchto metod nebyla dostatečně citlivá, nebo byla jedna z těchto analýz zatížena významnou chybou.

Z Grafu 8 vyplývá, že mandlový olej se oproti vzorkům sádla liší i v obsahu minoritně zastoupených mastných kyselin, například v obsahu kyseliny heptadekanové, *cis*-10-heptadecenové,  $\alpha$ -linolenové nebo kyseliny *cis*-11-eikosenové. Zároveň se mandlový olej oproti ostatním vzorkům liší i v počtu zastoupených kyselin.

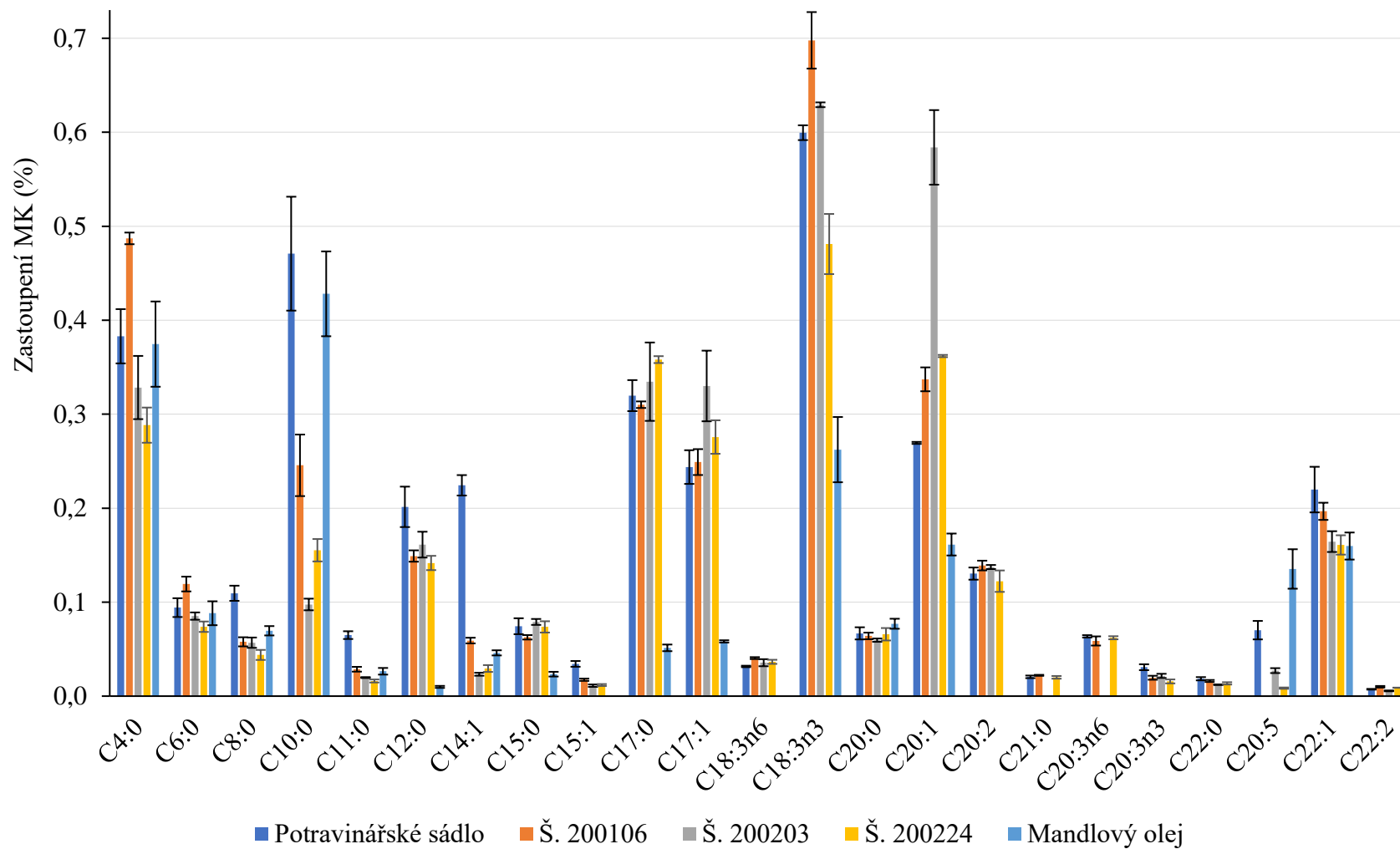
U vzorků sádla je mezi minoritně zastoupenými MK zajímavý vyšší obsah kyseliny kaprinové a myristolejové u vzorku potravinářského sádla, vyšší obsah kyseliny máselné a  $\alpha$ -linolenové u vzorku šarže 200106 nebo kyseliny *cis*-10-heptadecenová u vzorku šarže 200203. Obsah těchto kyselin je však velice malý a nemá tak zásadní vliv na celkový charakter vzorku. Ukázky chromatogramů vzorků viz příloha č 7.



**Graf 6** Zastoupení majoritních mastných kyselin ve vzorcích v %



**Graf 7** Procentuální zastoupení nasycených (SFA), mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin v jednotlivých vzorcích

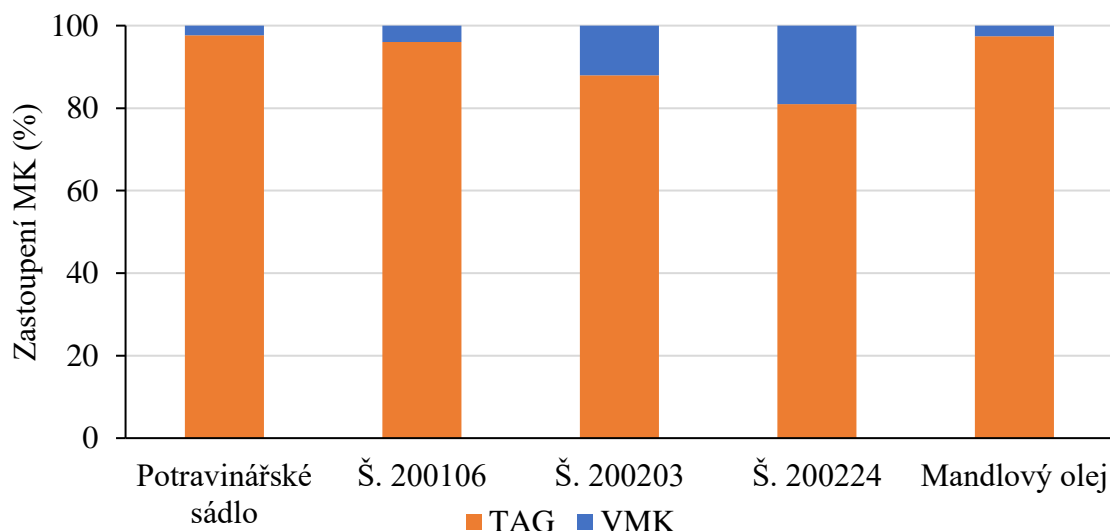


**Graf 8** Zastoupení minoritních mastných kyselin ve vzorcích v %

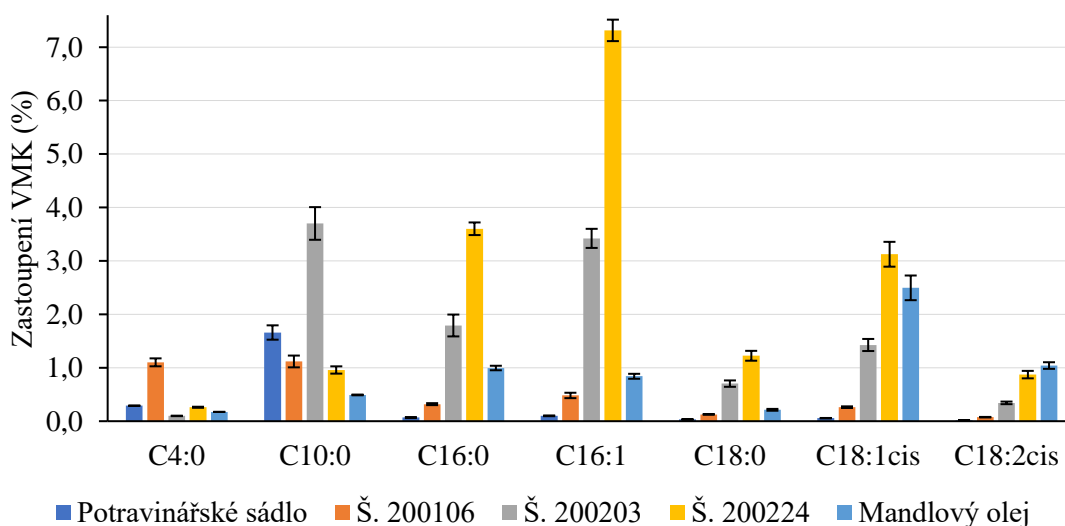
#### 4.1.4 Stanovení volných mastných kyselin pomocí GC-FID

**Tabulka 8** Zastoupení volných mastných kyselin v jednotlivých vzorcích v %, ND – nebyl detekován

Zkrácený zápis MK	Potravinářské sádlo	Š. 200106	Š. 200203	Š. 200224	Mandlový olej
<b>C4:0</b>	0,2899 ± 0,0014	1,1016 ± 0,0746	0,0990 ± 0,0045	0,2605 ± 0,0098	0,1739 ± 0,0018
<b>C6:0</b>	0,0756 ± 0,0037	0,2904 ± 0,0196	0,0326 ± 0,0017	0,0731 ± 0,0070	0,0744 ± 0,0020
<b>C8:0</b>	0,0454 ± 0,0044	0,1319 ± 0,0058	0,0538 ± 0,0027	0,0692 ± 0,0081	0,0374 ± 0,0039
<b>C10:0</b>	1,6600 ± 0,1344	1,1180 ± 0,1104	3,7014 ± 0,3056	0,9586 ± 0,0681	0,4911 ± 0,0070
<b>C11:0</b>	0,0088 ± 0,0008	0,0075 ± 0,0009	0,0297 ± 0,0028	0,0153 ± 0,0005	0,0215 ± 0,0020
<b>C12:0</b>	0,0041 ± 0,0002	0,0136 ± 0,0007	0,0278 ± 0,0033	0,0543 ± 0,0037	0,0084 ± 0,0008
<b>C13:0</b>	0,0001 ± 0,0000	0,0002 ± 0,0000	0,0011 ± 0,0001	0,0026 ± 0,0002	0,0016 ± 0,0001
<b>C14:0</b>	0,0072 ± 0,0010	0,0309 ± 0,0015	0,1665 ± 0,0140	0,4707 ± 0,0078	0,0200 ± 0,0020
<b>C14:1</b>	0,0004 ± 0,0001	0,0010 ± 0,0001	0,0180 ± 0,0014	0,0181 ± 0,0016	0,0089 ± 0,0003
<b>C15:0</b>	0,0003 ± 0,0000	0,0011 ± 0,0001	0,0073 ± 0,0009	0,0189 ± 0,0016	0,0031 ± 0,0003
<b>C15:1</b>	0,0001 ± 0,0000	0,0003 ± 0,0000	0,0022 ± 0,0001	0,0093 ± 0,0009	0,0085 ± 0,0006
<b>C16:0</b>	0,0678 ± 0,0098	0,3190 ± 0,0185	1,7916 ± 0,2045	3,6022 ± 0,1183	0,9955 ± 0,0422
<b>C16:1</b>	0,1004 ± 0,0070	0,4818 ± 0,0503	3,4220 ± 0,1789	7,3154 ± 0,2010	0,8404 ± 0,0466
<b>C17:0</b>	0,0008 ± 0,0001	0,0044 ± 0,0005	0,0229 ± 0,0020	0,0363 ± 0,0008	0,0035 ± 0,0004
<b>C17:1</b>	0,0010 ± 0,0001	0,0044 ± 0,0003	0,0325 ± 0,0022	0,0668 ± 0,0053	0,0081 ± 0,0008
<b>C18:0</b>	0,0330 ± 0,0026	0,1270 ± 0,0049	0,7034 ± 0,0595	1,2245 ± 0,0923	0,2130 ± 0,0171
<b>C18:1cis</b>	0,0561 ± 0,0042	0,2624 ± 0,0154	1,4265 ± 0,1131	3,1247 ± 0,2324	2,4959 ± 0,2310
<b>C18:2cis</b>	0,0150 ± 0,0009	0,0748 ± 0,0050	0,3426 ± 0,0242	0,8719 ± 0,0698	1,0420 ± 0,0616
<b>C18:3n6</b>	0,0026 ± 0,0001	ND	0,0046 ± 0,0002	ND	0,0140 ± 0,0008
<b>C18:3n3</b>	ND	0,0141 ± 0,0011	0,0493 ± 0,0030	0,1287 ± 0,0127	0,0271 ± 0,0006
<b>C20:0</b>	0,0003 ± 0,0000	0,0010 ± 0,0001	0,0044 ± 0,0004	0,0070 ± 0,0008	0,0067 ± 0,0004
<b>C20:1</b>	0,0010 ± 0,0001	0,0045 ± 0,0001	0,0260 ± 0,0020	0,0769 ± 0,0075	0,0111 ± 0,0010
<b>C20:2</b>	0,0005 ± 0,0000	0,0026 ± 0,0003	0,0092 ± 0,0002	0,0295 ± 0,0026	ND
<b>C20:3n6</b>	0,0007 ± 0,0000	0,0022 ± 0,0002	0,0118 ± 0,0006	0,0302 ± 0,0033	ND
<b>C22:0</b>	ND	ND	ND	0,0383 ± 0,0035	ND
<b>C22:1</b>	0,0026 ± 0,0003	0,0094 ± 0,0013	0,0665 ± 0,0051	0,1606 ± 0,0176	0,1019 ± 0,0036



**Graf 9** Porovnání procentuálního zastoupení vázaných (TAG) a volných (VMK) mastných kyselin



**Graf 10** Zastoupení majoritních volných mastných kyselin ve vzorcích v %

Z Tabulky 8 je patrné, že nejvyšší počet stanovených kyselin (25) byl u vzorků šarže 200203 a šarže 200224, 24 VMK bylo stanoven ve vzorcích potravinářského sádla a š. 200106 a 23 VMK bylo stanoven ve vzorku mandlového oleje. Počet VMK u mandlového oleje je tedy o 2 vyšší než u celkových mastných kyselin vzorku, což mohlo být způsobeno velkým ředěním vzorku pro stanovení celkových mastných kyselin.

Z Tabulky 8 a Grafu 9 vyplývá, že nejvyšší obsah volných mastných kyselin byl stanoven ve vzorku šarže 200224 a naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny ve vzorcích potravinářského sádla a mandlového oleje. Naměřené hodnoty tak odpovídají stanoveným číslům kyselosti, kde byly rozdíly mezi jednotlivými vzorky podobné.

Z Tabulky 8 a Grafu 10 je patrné, že vzorek potravinářského sádla měl nejvyšší obsah VMK stanoven u kyseliny kapronové, dále byl obsah ostatních VMK vzorku minimální. Vzorek šarže 200106 měl oproti ostatním vzorkům 3,8–12,2× vyšší obsah kyseliny máselné. Obsah dalších kyselin byl oproti ostatním vzorkům spíše nižší.

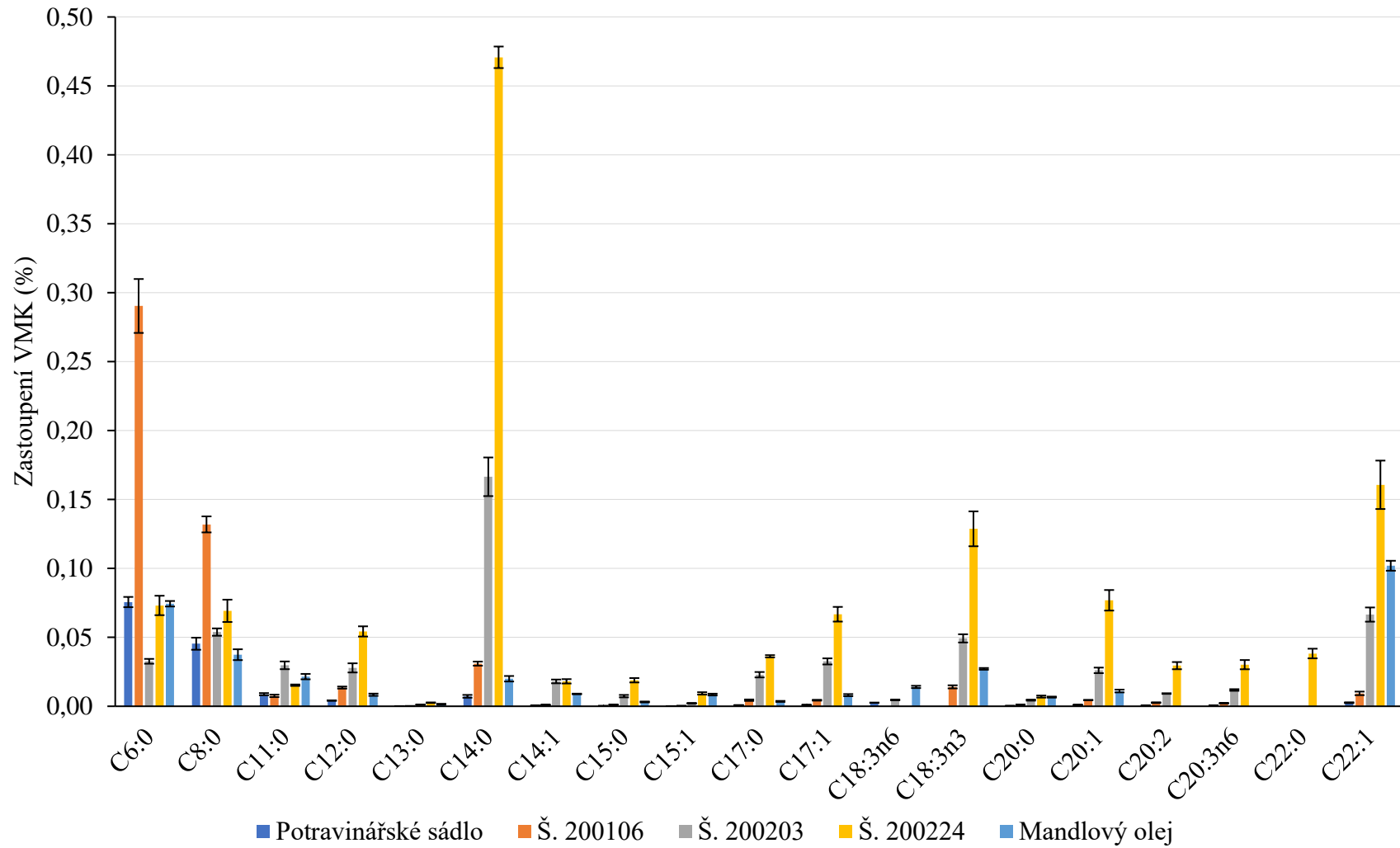
Vzorek šarže 200203 měl druhý nejvyšší podíl VMK, a to převážně díky kyselině kapronové, jejíž obsah byl 2,2–7,5× vyšší než u ostatních vzorků, a také díky vysokým obsahům kyseliny palmitové, palmitoolejové a olejové.

Vzorek šarže 200224 měl nejvyšší hodnoty obsahu nejen celkových VMK, ale konkrétně i kyseliny palmitové (2–53× oproti ostatním vzorkům), palmitoolejové, kde byla hodnota obsahu vyšší dokonce 2–73×. Dále to byl vysoký obsah kyseliny stearové (2–40×) a olejové (1,3–55,7× než u ostatních vzorků).

Mandlový olej měl nejvyšší obsah VMK stanoven pro nejzastoupenější celkové mastné kyseliny. Jedná se tedy o kyselinu palmitovou, olejovou a linolovou, u které byla hodnota obsahu vyšší než u ostatních vzorků 1,2–66,5×.

Z hlediska minoritně zastoupených mastných kyselin je z Tabulky 8 a převážně z Grafu 11 patrné, že nejvyšších obsahů dosahují volné mastné kyseliny vzorku šarže 200224. Nejvyšší rozdíl mezi volnými mastnými kyselinami tohoto a ostatních vzorků byly stanoveny pro kyseliny laurovou, myristovou, heptadekanovou, *cis*-10-heptadecenovou, dále pro kyseliny  $\alpha$ -linolenovou, *cis*-11-eikosenovou, behenovou nebo erukovou.

Ukázky chromatogramů jsou uvedeny v příloze 8.



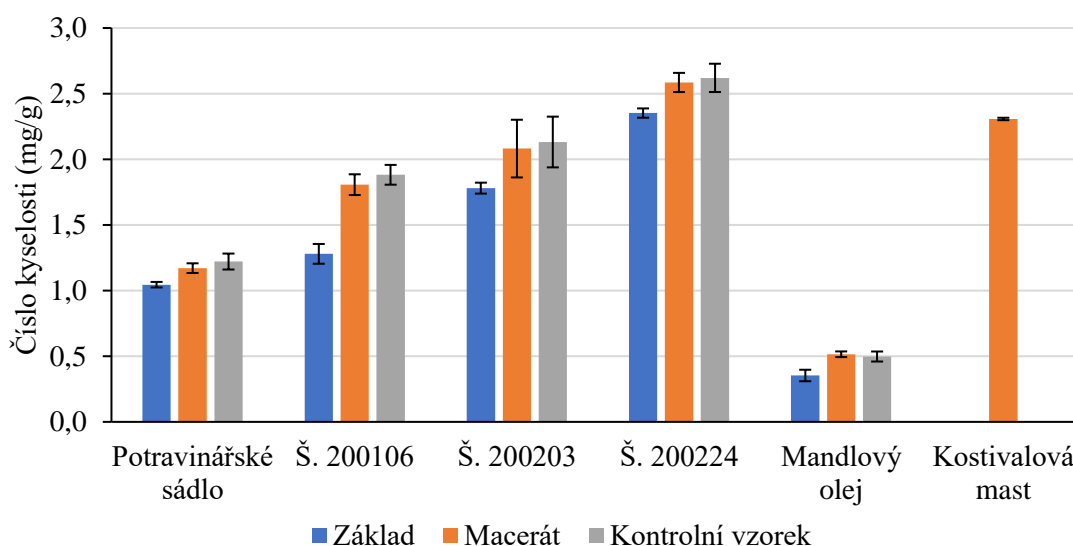
**Graf 11** Zastoupení minoritních volných mastných kyselin ve vzorcích v %

## 4.2 Vybrané parametry kostivalových macerátů

### 4.2.1 Stanovení čísla kyselosti

**Tabulka 9** Stanovení čísla kyselosti v mg KOH/g vzorku macerátu a kontrolního vzorku a porovnání se stanoveným číslem kyselosti tukových základů z kapitoly 4.1.2.

	Základ	Macerát	Kontrolní vzorek
<b>Potravinářské sádlo</b>	1,04 ± 0,02	1,17 ± 0,04	1,22 ± 0,06
<b>Š. 200106</b>	1,28 ± 0,08	1,81 ± 0,08	1,88 ± 0,08
<b>Š. 200203</b>	1,78 ± 0,04	2,08 ± 0,22	2,13 ± 0,19
<b>Š. 200224</b>	2,35 ± 0,04	2,59 ± 0,07	2,62 ± 0,11
<b>Mandlový olej</b>	0,35 ± 0,04	0,52 ± 0,02	0,50 ± 0,04
<b>Kostivalová mast</b>	–	2,31 ± 0,01	–



**Graf 12** Hodnoty čísla kyselosti v mg KOH/g vzorku pro tukový základ, kostivalový macerát a kontrolní vzorek

Z Tabulky 9 a Grafu 12 je patrné, že během macerace došlo ke zvýšení čísla kyselosti u všech pozorovaných vzorků. Nejvyšší nárůst hodnoty čísla kyselosti byl stanoven pro vzorek mandlového oleje, nárůst činil 48,6 %. Při sledování pouze vzorků sádla pak byl nejvyšší rozdíl hodnot stanoven u šarže 200106 (nárůst o 41,4 %). Naopak nejnižší rozdíl mezi všemi vzorky byl pozorován u vzorku potravinářského sádla (12,5 %). Příčinou zvýšení čísla kyselosti je tak s velkou pravděpodobností vysoká teplota během procesu macerace (55 °C).

Hodnota čísla kyselosti kostivalové masti je v rámci směrodatné odchylky shodná s hodnotou vzorku šarže 200203. Lze tedy předpokládat, že sádlo v kostivalové masti bylo během macerace vystaveno podobným podmínkám jako vzorky.

Veškeré stanovené hodnoty však pořád odpovídají intervalu hodnot čísla kyselosti (0–2,5 mg KOH/g vzorku) pro sádlo, respektive rafinovaný olej (0–1 mg KOH/g vzorku) [91].

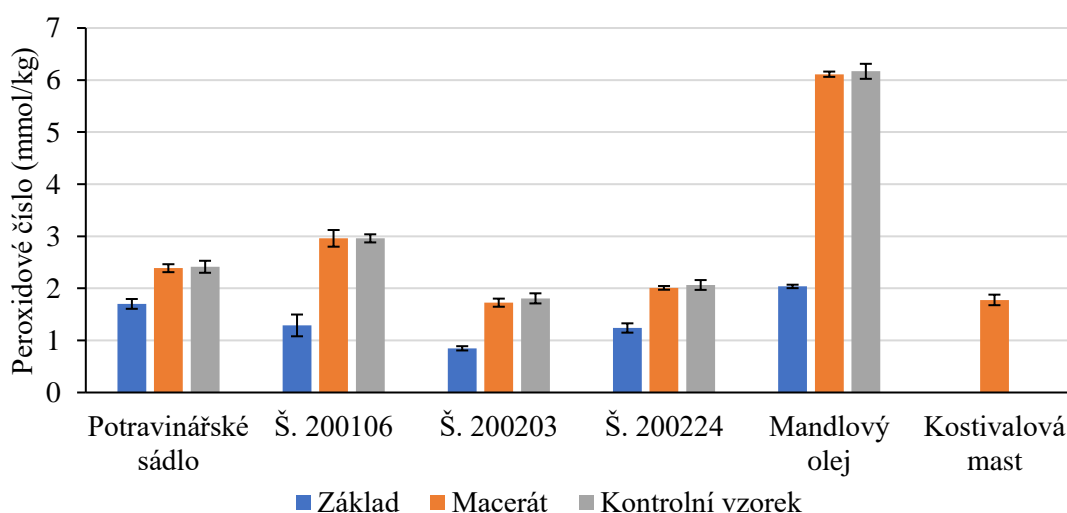


Číslo kyselosti kontrolních vzorků odpovídá hodnotám čísla kyselosti stanovených u macerátů. Dá se tedy předpokládat, že macerované látky z kostivalového kořene nezabránily hydrolyzaci esterických vazeb triacylglycerolů v tucích.

#### 4.2.2 Stanovení peroxidového čísla

**Tabulka 10** Stanovení peroxidového čísla v mmol O<sub>2</sub>/kg vzorku macerátu a kontrolního vzorku a porovnání se stanoveným peroxidovým číslem tukových základů z kapitoly 4.1.2

	Základ	Macerát	Kontrolní vzorek
<b>Potravinářské sádlo</b>	1,70 ± 0,09	2,39 ± 0,08	2,41 ± 0,12
<b>Š. 200106</b>	1,29 ± 0,21	2,96 ± 0,16	2,96 ± 0,08
<b>Š. 200203</b>	0,85 ± 0,04	1,72 ± 0,08	1,81 ± 0,10
<b>Š. 200224</b>	1,24 ± 0,09	2,01 ± 0,04	2,07 ± 0,09
<b>Mandlový olej</b>	2,04 ± 0,03	6,11 ± 0,05	6,17 ± 0,14
<b>Kostivalová mast</b>	–	1,78 ± 0,10	–



**Graf 13** Hodnoty peroxidového čísla v mmol O<sub>2</sub>/kg vzorku pro tukový základ, kostivalový macerát a kontrolní vzorek

Při porovnání dat z Tabulky 10 a Grafu 13 lze pozorovat, že u všech sledovaných vzorků došlo ke zvýšení hodnoty peroxidového čísla. Nejnižší zvýšení peroxidového čísla bylo pozorováno u vzorku potravinářského sádla, kde byla hodnota peroxidového čísla v macerátu vyšší o 40,6 %. Nejvyšší nárůst peroxidového čísla byl stanoven pro mandlový olej, kde hodnota peroxidového čísla během macerace vzrostla přibližně 3×. Při sledování pouze vzorků sádla pak byl nejvyšší rozdíl hodnot stanoven pro vzorek šarže 200106 (2,3× vyšší hodnota oproti tukovému základu). Tento nárůst hodnoty peroxidového čísla by mohl být rovněž zapříčiněn vysokou teplotou a dobou macerace, stejně jako v kapitole 4.2.1.

Hodnota peroxidového čísla kostivalové masti je po započtení směrodatné odchylky shodná se vzorkem šarže 200203. Jako v případě čísla kyselosti se tak dá usuzovat, že sádlo v kostivalové masti bylo vystaveno podobným podmínkám macerace.

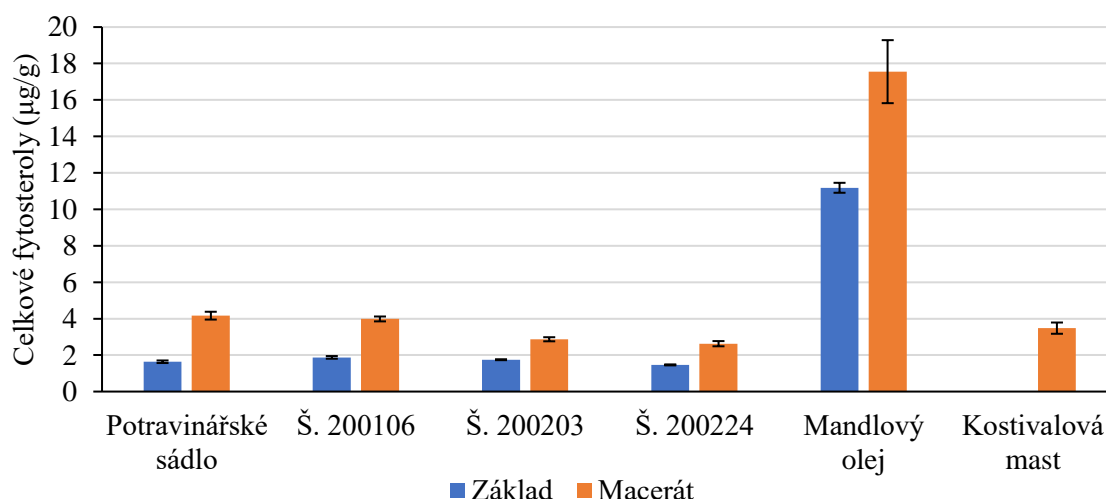
Veškeré naměřené hodnoty se nacházely v intervalu 0–16 mmol/kg, který je v literatuře uváděn pro čerstvé tuky [91].

Hodnoty peroxidového čísla kontrolních vzorků jsou opět shodné s hodnotou macerátů a macerované látky z kostivalu tak nemají vliv ani na změnu peroxidového čísla.

#### 4.2.3 Stanovení fytosterolů

**Tabulka 11** Stanovení celkových fytosterolů pomocí UV-VIS spektrometrie v  $\mu\text{g/g}$  vzorku v tukovém základu, kostivalovém macerátu a kostivalové masti

	Základ	Macerát
<b>Potravinářské sádlo</b>	$1,64 \pm 0,07$	$4,17 \pm 0,21$
<b>Š. 200106</b>	$1,87 \pm 0,07$	$3,99 \pm 0,13$
<b>Š. 200203</b>	$1,75 \pm 0,02$	$2,87 \pm 0,11$
<b>Š. 200224</b>	$1,46 \pm 0,03$	$2,63 \pm 0,14$
<b>Mandlový olej</b>	$11,18 \pm 0,27$	$17,55 \pm 0,93$
<b>Kostivalová mast</b>	–	$3,48 \pm 0,31$



**Graf 14** Hodnoty celkových fytosterolů pomocí UV-VIS spektrometrie v  $\mu\text{g/g}$  vzorku pro tukový základ, kostivalový macerát a kostivalovou mast

Z Tabulky 11 a Grafu 14 je patrné, že fytosteroly byly detekovány a stanoveny i ve vzorcích čistého sádla jako tukového základu. Tato metoda stanovení fytosterolů však slouží k celkovému stanovení sterolů, takže se dá říct, že hodnoty stanovené pro vzorky sádla odpovídají obsahu cholesterolu. U tří ze čtyř vzorků sádla se stanovené hodnoty tukového základu liší pouze v rámci směrodatné odchylky, vzorek šarže 200224 má nižší hodnotu celkových fytosterolů, respektive cholesterolu o 12–28 %.

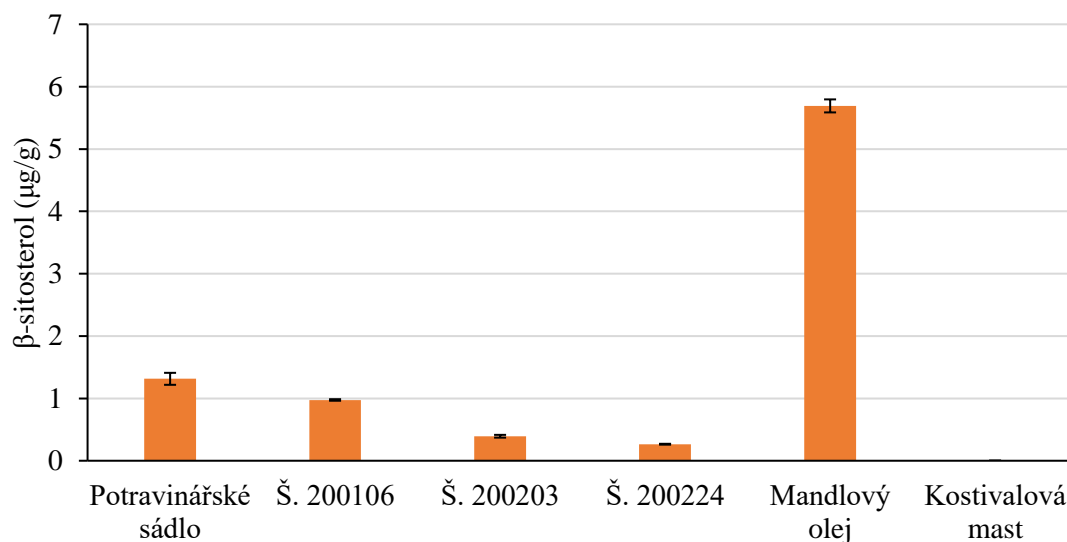
Nejvyšší hodnota celkových fytosterolů v tukovém základu byla stanovena pro mandlový olej, který podle výrobce obsahuje v nejvyšším zastoupení  $\beta$ -sitosterol, dále  $\delta$ -5-avanasterol, kampesterol, stigmasterol,  $\delta$ -7-stigmastenol, brasicasterol, a také cholesterol (viz příloha 6).

Pro účely této práce je důležitý pouze nárůst těchto hodnot, který je způsoben macerováním biologicky aktivních látek z kostivalu do tukových základů. Nejvyšší rozdíl hodnot tukového základu a macerátu byl zjištěn u mandlového oleje, kde došlo k zvýšení obsahu fytosterolů o 6,37  $\mu\text{g/g}$  (57 % oproti původní hodnotě). Ze vzorků sádla byl nejvyšší nárůst pozorován u potravinářského sádla (2,53  $\mu\text{g/g}$ , 154 %), nejmenší pak u vzorku šarže 200203, kde rozdíl činil pouze 1,12  $\mu\text{g/g}$  (64 %).

Obsah celkových fytosterolů v kostivalové masti se svou hodnotou nachází mezi vzorky šarží 200106 a 200203. Za předpokladu podobného obsahu cholesterolu jako u vzorků sádla lze tedy uvažovat podobný nárůst obsahu fytosterolů, který byl sledován u uvedených dvou vzorků.

**Tabulka 12** Stanovení  $\beta$ -sitosterolu a stigmasterolu v kostivalových macerátech a kostivalové masti včetně součtu obou hodnot v  $\mu\text{g/g}$  vzorku, pro mandlový olej je uveden rozdíl hodnot tukového základu a macerátu, ND – nebyl detekován

	$\beta$ -sitosterol	Stigmasterol	Součet
<b>Potravinářské sádlo</b>	1,314 $\pm$ 0,096	0,201 $\pm$ 0,012	1,515 $\pm$ 0,108
<b>Š. 200106</b>	0,975 $\pm$ 0,012	0,301 $\pm$ 0,013	1,276 $\pm$ 0,026
<b>Š. 200203</b>	0,393 $\pm$ 0,022	0,051 $\pm$ 0,005	0,444 $\pm$ 0,027
<b>Š. 200224</b>	0,265 $\pm$ 0,007	0,010 $\pm$ 0,001	0,275 $\pm$ 0,007
<b>Mandlový olej základ</b>	1,214 $\pm$ 0,090	0,276 $\pm$ 0,010	1,490 $\pm$ 0,100
<b>Mandlový olej macerát</b>	6,905 $\pm$ 0,194	1,290 $\pm$ 0,115	8,195 $\pm$ 0,309
<b>Kostivalová mast</b>	ND	1,062 $\pm$ 0,046	1,062 $\pm$ 0,046

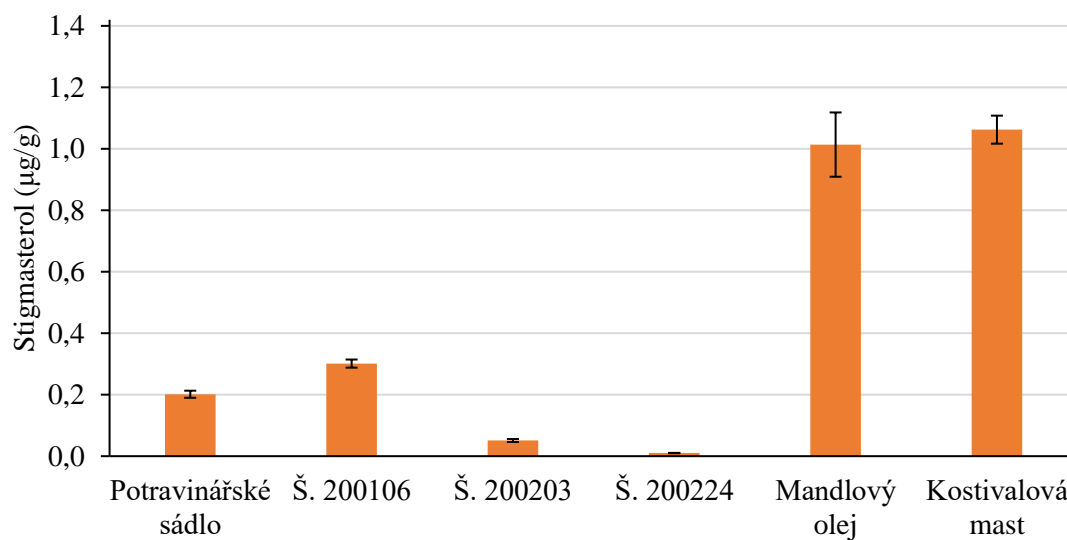


**Graf 15** Obsah  $\beta$ -sitosterolu v kostivalových macerátech a kostivalové masti v  $\mu\text{g/g}$ , pro mandlový olej je vyjádřen rozdíl hodnot macerátu a základu

Z Tabulky 12 a Grafu 15 vyplývá, že mezi obsahem  $\beta$ -sitosterolu v jednotlivých vzorcích jsou patrné velké rozdíly. Nejvyšší hodnoty dosahuje vzorek mandlového oleje, jehož obsah byl vyšší 4–21 $\times$  oproti ostatním vzorkům. Naopak u kostivalové masti nebyl  $\beta$ -sitosterol detekován. Což je zajímavé i z hlediska přidaného eukalyptového výtažku, neboť u něj literatura uvádí  $\beta$ -sitosterol jako nejvíce zastoupený fytosterol [107].

Mezi vzorky sádla pak byl nejvyšší obsah  $\beta$ -sitosterolu stanoven pro potravinářské sádlo, stejně jako při stanovení celkových fytosterolů pomocí UV-VIS.

Ukázky chromatogramů stanovení fytosterolů pomocí HPLC jsou uvedeny v příloze 9.



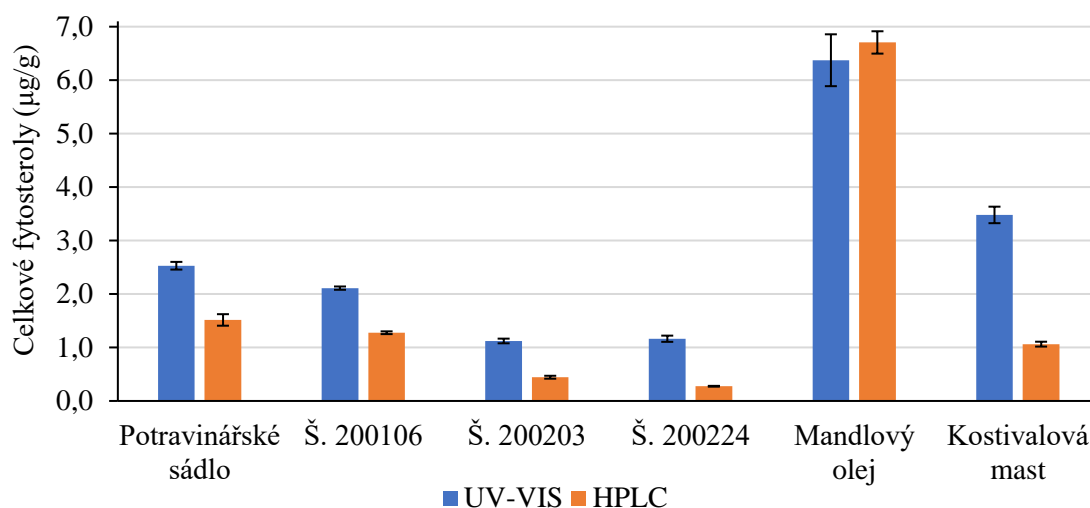
**Graf 16** Obsah stigmasterolu v kostivalových macerátech a kostivalové masti v  $\mu\text{g/g}$ , pro mandlový olej je vyjádřen rozdíl macerátu a základu

Vzorek mandlového oleje a kostivalové masti měl dle výsledků z Tabulky 12 a Grafu 16 po zahrnutí směrodatné odchylky nejvyšší obsah stigmasterolu (4–106 $\times$  vyšší oproti ostatním vzorkům). Ze vzorků sádla měl nejvyšší obsah stigmasterolu vzorek šarže 200106, naopak u vzorku šarže 200224 byl zjištěný obsah téměř zanedbatelný.

Porovnání vzorků v Grafu 17 ukazuje, že po zahrnutí směrodatné odchylky bylo dosaženo shodných hodnot v obsahu fytosterolů při použitých metodách pouze u vzorku mandlového oleje. Ve vzorcích sádla a kostivalové masti byly při analýze pomocí HPLC stanoveny hodnoty, které jsou oproti metodě UV-VIS menší 1,65- 4,23 $\times$ . U vzorku UV-VIS kostivalové masti je uvedena hodnota, která zahrnuje i obsah cholesterolu, takže porovnání obou hodnot je možné pouze v rámci odhadu.

Nízký obsah fytosterolů v HPLC analýze může být způsoben jednak přítomností jiných fytosterolů, které nebyly stanovovány, nebo nízkým výtěžkem extrakce, protože narozdíl od vzorku mandlového oleje musely být vzorky sádla během extrakce rozpuštěny ve vodní lázni a po extrakci byly odstraněny vysrážené lipidické frakce vzorku pomocí stříkačkového filtru, což mohlo snížit celkový obsah fytosterolů v extraktu.

Z hlediska množství vyextrahovaných látek z kostivalu do tukového základu jsou stanovené hodnoty velice nízké, u některých vzorků se naměřené hodnoty blížily limitu kvantifikace. Nedá se tedy říct, že by zvolený postup macerace měl z hlediska fytoosterolů vysokou výtěžnost. To je však způsobeno i nízkou koncentrací fytoosterolů v samotném kostivalovém kořeni, neboť literatura uvádí přítomnost fytoosterolů pouze jako doplňkovou informaci [19].



**Graf 17** Porovnání rozdílu hodnot obsahu celkových fytoosterolů stanovených pomocí UV-VIS spektrometrie v kostivalových macerátech, tukových základech a kostivalové masti a součtu hodnot obsahu  $\beta$ -sitosterolu a stigmasterolu stanovených pomocí HPLC v  $\mu\text{g/g}$  vzorku pro kostivalové maceráty a kostivalovou mast, pro mandlový olej je uveden rozdíl hodnot tukového základu a macerátu

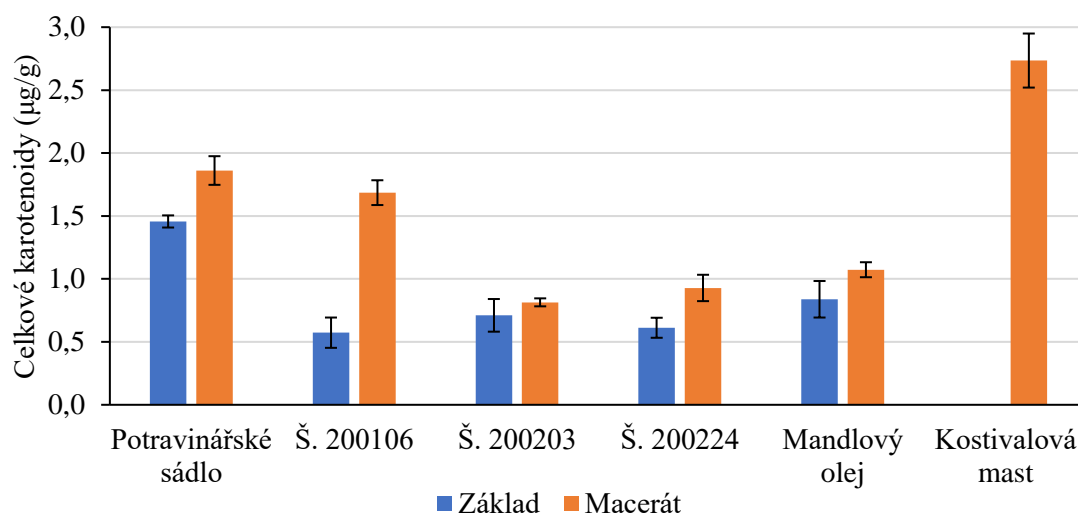
#### 4.2.4 Stanovení karotenoidů

**Tabulka 13** Stanovení celkových karotenoidů pomocí UV-VIS spektrometrie v tukových základech, kostivalových macerátech a kostivalové masti v  $\mu\text{g/g}$  vzorku

	Základ	Macerát
<b>Potravinářské sádlo</b>	$1,46 \pm 0,05$	$1,86 \pm 0,11$
<b>Š. 200106</b>	$0,57 \pm 0,12$	$1,69 \pm 0,10$
<b>Š. 200203</b>	$0,71 \pm 0,13$	$0,81 \pm 0,03$
<b>Š. 200224</b>	$0,61 \pm 0,08$	$0,93 \pm 0,10$
<b>Mandlový olej</b>	$0,84 \pm 0,15$	$1,07 \pm 0,06$
<b>Kostivalová mast</b>	–	$2,73 \pm 0,21$

Z Tabulky 13 a Grafu 18 vyplývá, že u všech vzorků macerátů byla stanovená hodnota celkových karotenoidů vyšší než u tukových základů. Konkrétně nejvyšší nárůst této hodnoty byl stanoven u vzorku šarže 200106 ( $2,96\times$  oproti základu) a nejnižší pak u vzorku š. 200203 ( $1,14\times$ ). I přesto, že se v čistém sádle dle literatury karotenoidy nenacházejí, bylo měřeno zvýšení absorbance těchto vzorků oproti blanku. Z literatury vyplývá, že při vlnové délce 450 nm dochází k absorpenci nejen karotenoidů, ale také nenasycených vazeb uhlíkových

řetězců mastných kyselin [108]. Je také nutné zdůraznit, že naměřené hodnoty v tukových základech i v macerátech a kostivalové masti byly velmi nízké a některé vzorky se svou absorbancí pohybovaly na hranici kvantifikace.



**Graf 18** Obsah celkových karotenoidů pomocí UV-VIS spektrometrie v µg/g vzorku pro tukové základy, kostivalové maceráty a kostivalovou mast

**Tabulka 14** Stanovení vybraných karotenoidů pomocí HPLC v kostivalových macerátech a kostivalové masti µg/g vzorku

	<b>β-karoten</b>	<b>Lutein</b>
<b>Potravinářské sádlo</b>	ND	ND
<b>Š. 200106</b>	ND	ND
<b>Š. 200203</b>	ND	ND
<b>Š. 200224</b>	ND	ND
<b>Mandlový olej</b>	ND	ND
<b>Kostivalová mast</b>	ND	ND

Přestože došlo k nárůstu obsahu celkových karotenoidů stanovených pomocí UV-VIS spektrometrie, nebyly detekovány píky β-karotenu ani luteinu při analýze pomocí HPLC-DAD v žádném macerátu ani v kostivalové masti (viz Tabulka 14). K tomu mohlo dojít opět nízkou výtěžností extrakce ze vzorku, podobně jako u fytosterolů.

Dalším vysvětlením rozdílu naměřených hodnot při použití uvedených obou metod by mohl zákal vzorku při stanovení celkových karotenoidů pomocí UV-VIS spektrometrie. To by vysvětlovalo i nárůst hodnot v macerátu, neboť zákal mohl být zvýšen přítomností částic sušeného kostivalového kořene. To by znamenalo, že i přes přidání roztoku NaCl pro přečištění a následnou centrifugaci nebylo dosaženo požadované čistoty vzorku, ačkoli ve vzorku nebyl zákal pouhým okem pozorován.

Další možnou příčinou může být velmi nízký obsah karotenoidů ve vzorku, který mohl být způsoben malou výtěžností macerace, ale také nízkým obsahem karotenoidů v sušeném kostivalovém kořeni, ačkoliv v čerstvém kostivalovém kořeni činí obsah karotenoidů asi 0,63 % [19]. Ke snížení obsahu karotenoidů totiž mohlo dojít vysokou teplotou během sušení byliny, a také během macerace (55 °C), neboť karotenoidy nejsou tepelně odolné. Jejich obsah v extraktech totiž při teplotě 50 °C klesá už po 10 minutách [109]. Tento fakt je tak s nejvyšší pravděpodobností hlavní příčinou nízkých obsahů karotenoidů v macerátech.

#### 4.2.5 Stanovení tokoferolů

**Tabulka 15** Stanovení tokoferolů v tukových základech, kostivalových macerátech a kostivalové masti v mg DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu/g vzorku

<b>Potravinářské sádlo</b>	ND	ND
<b>Š. 200106</b>	ND	ND
<b>Š. 200203</b>	ND	ND
<b>Š. 200224</b>	ND	ND
<b>Mandlový olej</b>	ND	ND
<b>Kostivalová mast</b>	–	3,03 ± 0,08

Z Tabulky 15 vyplývá, že při analýze vzorků pomocí kapalinové chromatografie nebyly detekovány píky tokoferolů v žádném připraveném vzorku. Pouze v kostivalové masti byl detekován pík jednoho ze skupiny tokoferolů, a to DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu. Ten však byl výrobcem do masti přidán jako antioxidant pro zvýšení trvanlivosti výrobku a jeho hodnota odpovídá běžně přidávanému množství 0,3 % hmotnosti.

Nepřítomnost tokoferolů může kromě samotného nízkého obsahu tokoferolů ve vzorcích indikovat také stáří vzorků tukových základů, případně i kostivalu, neboť tokoferoly mají krátkou dobu expirace [110] a mohlo tak dojít k jejich rozpadu.

Ukázka chromatogramu kostivalové masti viz příloha 10.

#### 4.2.6 Stanovení celkových fenolických látek

**Tabulka 16** Stanovení celkových fenolických látek v mandlovém oleji, kostivalových macerátech a kostivalové masti v  $\mu$ g ekvivalentu kyseliny gallové/g vzorku

<b>Potravinářské sádlo</b>	84 ± 10
<b>Š. 200106</b>	77 ± 4
<b>Š. 200203</b>	104 ± 8
<b>Š. 200224</b>	132 ± 11
<b>Mandlový olej základ</b>	64 ± 4
<b>Mandlový olej macerát</b>	92 ± 5
<b>Kostivalová mast</b>	157 ± 13

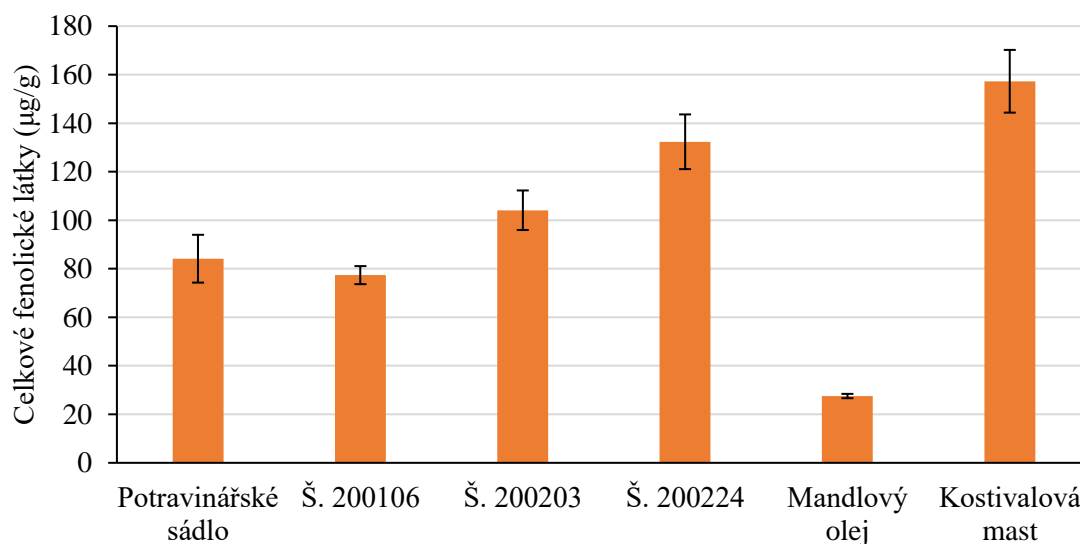
Tabulka 16 a Graf 19 ukazuje obsah celkových fenolických látek ve vzorcích. Tento parametr byl jednou z nejdůležitějších charakteristik kostivalových macerátů, protože kostivalový kořen je ceněn především pro svůj obsah fenolických kyselin a fenolických látek

obecně. Celkové výtěžky však nejsou příliš výrazné, spíše velmi nízké. Nejvyšší hodnoty dosahuje kostivalová mast, ale obsah fenolických látek činí pouze  $157 \pm 13 \mu\text{g/g}$ . K tomuto produktu však výrobce přidává výtažek z listů eukalyptu, což mohlo způsobit zvýšení této hodnoty, a ovlivnit tak výtěžnost kostivalového macerátu. Literatura udává obsah celkových fenolických látek v extraktech eukalyptu, který činí 40–60 mg ekvivalentu kyseliny gallové na g listů blahovičnicku kulatoplodého [111].

Ze vzorků sádla byl nejvyšší obsah fenolických látek stanoven u vzorku šarže 200224, nejnižší pak u šarže 200106, přičemž rozdíl obou hodnot činí přibližně  $55 \mu\text{g/g}$ .

Vůbec nejnižší obsah celkových fenolických látek byl měřen u vzorku mandlového oleje, přičemž už v samotném mandlovém oleji byla tato hodnota velmi nízká, což bylo způsobeno rafinací oleje během výroby.

Z naměřených hodnot tak lze pozorovat, že použitý způsob macerace nebyl pro získání těchto látek příliš účinný.



**Graf 19** Obsah celkových fenolických látek v  $\mu\text{g}$  ekvivalentu kyseliny gallové/g vzorku pro kostivalové maceráty a kostivalovou mast, hodnota mandlového oleje je vyjádřena jako rozdíl macerátu a základu

#### 4.2.7 Stanovení antioxidační aktivity

**Tabulka 17** Stanovení antioxidační aktivity v mandlovém oleji, kostivalových macerátech a kostivalové masti v  $\mu\text{g}$  ekvivalentu Troloxu/g vzorku

<b>Potravinářské sádlo</b>	$212 \pm 16$
<b>Š. 200106</b>	$360 \pm 18$
<b>Š. 200203</b>	$307 \pm 10$
<b>Š. 200224</b>	$46 \pm 4$
<b>Mandlový olej základ</b>	$249 \pm 27$
<b>Mandlový olej macerát</b>	$204 \pm 12$
<b>Kostivalová mast</b>	$86 \pm 7$

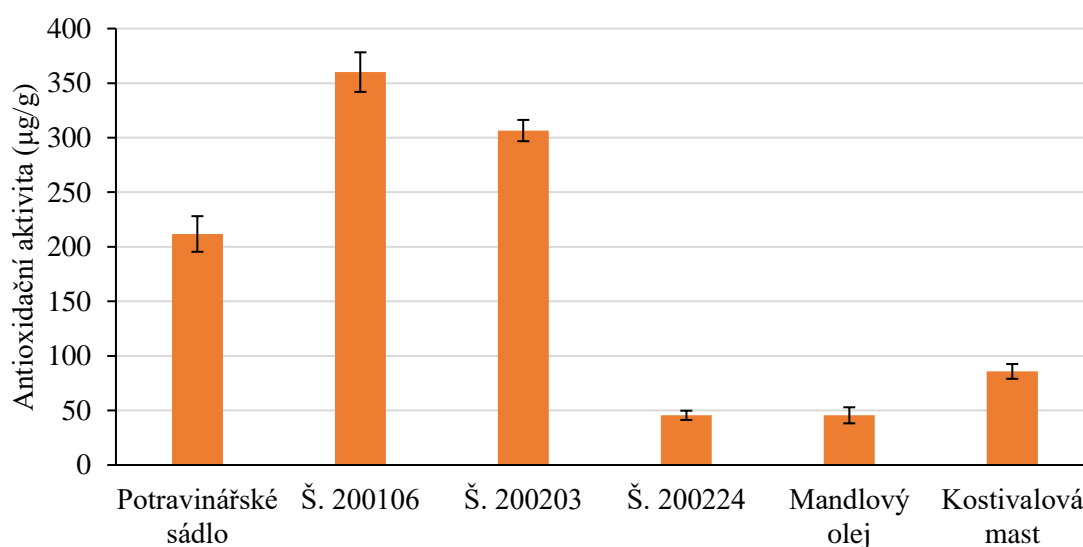


Uvedené hodnoty antioxidační aktivity v Tabulce 17 a Grafu 20 ukazují, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval vzorek 200106, tato hodnota byla 1,2–8,0× vyšší oproti ostatním vzorkům. Nejmenší antioxidační aktivita byla stanovena ve vzorcích mandlového oleje a šarži 200224. Vzorek kostivalové masti měl v porovnání s ostatními sádlovými maceráty rovněž nízkou antioxidační aktivitu. Při porovnání celkových fenolických látek a antioxidační aktivity lze pozorovat značné rozdíly mezi těmito hodnotami u každého vzorku. Nejvíce je to patrné u vzorků šarže 200224 a kostivalové masti, které měly i přes vysoký obsah fenolických látek velmi nízkou antioxidační aktivitu.

Pokud by byla stažena antioxidační aktivita pouze na obsah fenolických látek, tak by v tomto ohledu odpovídala antioxidační aktivita pouze vzorkům potravinářského sádla, vzorku šarže 200203 a mandlového oleje. Ve zbylých případech by byl poměr opačný, neboť v těchto vzorcích by odpovídala vysoká antioxidační aktivita nízkému obsahu fenolických látek a naopak.

Lze tedy usuzovat, že antioxidační aktivita nesouvisí pouze s přítomností fenolických látek, ale také s přítomností některých vitaminů, flavonoidů atd.

Stejně jako u celkových fenolických látek platí, že stanovené hodnoty jsou velice nízké a zvolený postup macerace kořene kostivalu přímo do tukového základu není vhodný pro extrakci polárních látek s antioxidační aktivitou.



**Graf 20** Antioxidační aktivita v µg ekvivalentu Troloxu pro kostivalové maceráty a kostivalovou mast, hodnota mandlového oleje je vyjádřena jako rozdíl macerátu a základu

## 5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla vypracována ve spolupráci s průmyslovým partnerem a jejím cílem byla charakterizace vybraných tukových základů, příprava macerátů kostivalu lékařského a porovnání obsahu vybraných biologicky aktivních látek s kostivalovou masťou vyrobenou průmyslovým partnerem.

Teoretická část se věnuje podrobné charakteristice kostivalu lékařského, s důrazem na hlavní biologicky aktivní látky a možnostem využití v potravinářství, farmacii a kosmetice. Dále jsou popsány tukové základy (sádlo a mandlový olej) a možnosti přípravy bylinných macerátů. Zbylá část je věnována možnostem stanovení hlavních účinných látek v těchto macerátech a charakterizaci tukových základů. V experimentální části bylo nejprve pomocí hodnot sušiny, tukových čísel a obsahu celkových a volných mastných kyselin charakterizováno pět vzorků tukových základů: vzorek potravinářského sádla, tři vzorky kosmetického sádla a vzorek mandlového oleje. Dále byly připraveny maceráty těchto základů a sušených oddenků kostivalu lékařského. Následně byly v těchto macerátech stanoveny změny hodnot čísla kyselosti, peroxidového čísla, obsahu celkových fytosterolů,  $\beta$ -sitosterolu, stigmasterolu, celkových karotenoidů,  $\beta$ -karotenu, tokoferolu, celkových fenolických látek a antioxidační aktivity. Veškeré hodnoty pak byly porovnány s kostivalovou masťou průmyslového partnera.

Obsah sušiny ve vzorcích činil 96,59–99,74 % hmotnosti vzorku. Číslo kyselosti se pohybovalo v rozmezí 0,35–2,35 mg KOH/g vzorku, číslo zmydelnění činilo 186,0–191,8 mg KOH/g vzorku. Jodové číslo bylo stanoveno na 48,6–99,3 g I<sub>2</sub>/100 g vzorku a peroxidové číslo na 0,85–2,04 mmol O<sub>2</sub>/kg vzorku. Hodnoty čísla kyselosti, zmydelnění i jodového čísla tak odpovídají hodnotám uváděným pro sádlo, resp. rafinovaný rostlinný olej. Dle hodnoty peroxidového čísla by bylo možné charakterizovat všechny vzorky jako čerstvé tuky.

Dále byly stanoveny celkové a volné mastné kyseliny. Celkových mastných kyselin bylo ve vzorcích stanoveno 21–30, z nichž nejzastoupenější byly kyseliny olejová (30,21–59,31 %), palmitová (10,13–37,51 %), linolenová (6,87–24,42 %), stearová (2,97–9,51 %), palmitoolejová (0,58–3,00 %) a myristová (0,11–2,47 %) a linolenová (0,26–0,60 %). Počet stanovených volných kyselin byl ve vzorcích 23–25 a jejich celkový podíl činil 2,37–19,06 %, což odpovídá i stanovenému číslu kyselosti.

Obsah nejvíce zastoupených celkových mastných kyselin vzorků sádla se mírně lišil oproti literárním hodnotám [35–40], navíc vzorek šarže 200203 se oproti zbylým vzorkům sádla lišil v obsahu kyseliny palmitové, stearové a olejové, což by mohlo znamenat i rozdíl ve vstupních surovinách pro výrobu sádla u této šarže.

U macerátů bylo sledováno zvýšení čísla kyselosti o 0,13–0,53 mg KOH/g vzorku, stejně jako čísla peroxidového (0,63–2,07 mmol O<sub>2</sub>/kg vzorku). V obou případech bylo stejné zvýšení pozorováno i u kontrolních vzorků, přesto lze maceráty pořád považovat za čerstvé tuky.

Obsah celkových fytosterolů byl v macerátech stanoven na 1,12–6,37  $\mu$ g/g vzorku, u kostivalové masti byla tato hodnota stanovena na  $3,5 \pm 0,3$   $\mu$ g/g, avšak v této hodnotě je zahrnut i obsah cholesterolu, který byl u ostatních vzorků sádla stanoven na 1,46–1,87  $\mu$ g/g vzorku. Obsah  $\beta$ -sitosterolu činil 0,265–6,905  $\mu$ g/g vzorku, u kostivalové masti nebyl detekován. Obsah sitosterolu byl stanoven na 0,010–1,290  $\mu$ g/g vzorku.

Celkové karotenoidy byly ve vzorcích stanoveny spektrofotometricky na 0,57–2,73 µg/g vzorku, avšak pomocí HPLC-DAD nebyly píky karotenoidů detekovány. Absorbance vzorku tak byla ovlivněna přítomností nenasycených mastných kyselin (absorbance nenasycených vazeb v uhlíkovém řetězci je okolo 450 nm), případně i zákalem v měřeném vzorku.

Z tokoferolů nebyly pomocí HPLC-DAD detekovány ve vzorcích žádné píky, ale u kostivalové masti byl stanoven obsah DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu na  $3,03 \pm 0,08$  mg/g masti. Tento derivát je výrobcem udáván na etiketě jako přidávaný antioxidant a jeho obsah odpovídá běžně přidávanému množství 0,3 % hmotnosti. Následně byl stanoven i obsah celkových fenolických látek, který činil 32–157 µg kyseliny gallové/g a hodnota antioxidantní aktivity (46–360 µg Troloxu/g).

V případě celkových (měřených spektrofotometricky) i jednotlivých (měřených pomocí HPLC-DAD) fytosterolů byly nejvyšší hodnoty obsahu stanoveny pro macerát mandlového oleje. Kostivalová mast se svým obsahem celkových fytosterolů a součtem hodnot obsahu jednotlivých fytosterolů nachází v intervalu hodnot pro vzorky sádla. Rozdíl však byl pozorován u obsahu  $\beta$ -sitosterolu, který nebyl v kostivalové masti detekován, a stigmasterolu, který byl oproti vzorkům sádla 4–106× vyšší. V kostivalové masti byl oproti vzorkům sádla vyšší i obsah celkových fenolických látek, avšak antioxidantní aktivita byla 2,5–4,2× nižší než u tří vzorků sádla. Oproti čtvrtému vzorku sádla však byla tato hodnota v kostivalové masti 1,9× vyšší.

Při pozorování obsahů biologicky aktivních látek nelze říct, že jsou jejich hodnoty příliš vysoké, spíše naopak jsou minimální a často byly měřeny na hranici kvantifikace. U obsahu fytosterolů je to pochopitelné vzhledem k tomu, že obsah těchto látek v oddencích kostivalu není v žádné literatuře uváděn, a to proto, že je rovněž velmi nízký. Navíc díky vysoké teplotě macerace pravděpodobně došlo ke ztrátě většiny karotenoidních barviv. Díky nepolárnímu charakteru tukových základů nebylo možné získat vysoké výtěžky polárních fenolických látek a zvýšit tak antioxidantní aktivitu macerátů.

Maceraci kostivalových oddenků v tucích tak nelze považovat za dobrou metodu pro získání biologicky aktivních látek z této byliny. Nejlepším způsobem by bylo získat extrakt kostivalu, odpařit rozpouštědlo a následně vmíchat získaný koncentrovaný extrakt do vybraného tuku. Pro extrakci polárních látek je nejčastěji používán ethanol, methanol či vodné roztoky těchto látek. Pro získání nepolárních biologicky aktivních látek lze doporučit například hexan.

Díky prokázaným účinkům a množství biologicky aktivních látek v kořeni kostivalu by proto bylo dobré optimalizovat získání těchto extraktů, stanovit obsah jednotlivých biologicky aktivních látek a následně najít způsob přidávání těchto extraktů do tukových základů.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ROBINSON, Robert G. *Comfrey—A Controversial Crop*. University of Minnesota. Agricultural Experiment Station; St. Paul, MN, USA: 1983.
- [2] KAZDA, Jan, Jan MIKULKA a Evženie PROKINOVÁ. *Encyklopedie ochrany rostlin, polní plodiny*. 1. Praha Smíchov: Profi Press, 2010. ISBN 978-80-86726-34-2.
- [3] KOBRLOVÁ, Lucie. Rod Symphytum (kostival) v České republice II. *S. officinale* agg. *Zprávy České botanické společnosti*. 2017, **52**(2), 175-223.
- [4] Spilková, Jiřina. Symphytum officinale L. - Kostival lékařský. *Praktické Lékárenství*. 2010, **6**(3), 156-158.
- [5] PANTŮČEK, Jiří a kol. TOPVET. Kostival lékařský (Symphytum Officinale L.). *Topvet* [online]. 2009 [cit. 2020-02-13]. Dostupné z: <https://www.topvet.cz/herbar/kostival-lekarsky>.
- [6] SEIDEL, Dankwart. *Květiny: klíč ke spolehlivému určování - 3 znaky*. Čestlice: Rebo, 2004. Průvodce přírodou (Rebo). ISBN 80-723-4309-2.
- [7] GAZDA, Jaroslav, Hana STŘIHAVKOVÁ a Věra TOBĚRNÁ. *Základy soustavné botaniky II: Rostliny krytosemenné pro pedagogické fakulty*. 3. vyd. Paha: SPN, 1976.
- [8] KOTELNIKOVA, Ksenia, Daria TRETJAKOVA a Maxim NURALIEV. Shoot structure of *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae) in relation to the nature of its axially shifted lateral branches. *Wulfenia*. Kärntner Botanikzentrum, 2011, **18**, 63-79.
- [9] SYMPHYTUM OFFICINALE L. – kostival lékařský / kostihoj lékařský. In: BOTANY.CZ [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/symphytum-officinale/>
- [10] KIMBERLEY, Miranda. Symphytum. Landscape plant Focus. *HorticultureWeek* [online]. 2015 [cit. 2020-02-13]. Dostupné z: <http://www.hortweek.com/symphytum/article/1014435>
- [11] Zázrak jménem kostival. In: *Zahrada centrum* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://www.zahrada-centrum.cz/clanky/570-zazrak-jmenem-kostival>
- [12] SALEHI, Bahare, Farukh SHAROPOV, Tugba BOYUNEGMEZ TUMER, et al. *Symphytum* Species: A Comprehensive Review on Chemical Composition, Food Applications and Phytopharmacology. *Molecules* [online]. 2019, **24**(12) [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.3390/molecules24122272. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/12/2272>

- [13] NEAGU, Elena, Gabriela PAUN a Gabriel RADU. Phytochemical study of some *Symphytum officinale* extracts concentrated by membranous procedures. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*. 2011, **3**(73), 65-74. ISSN 1454-2331.
- [14] FURUYA, Tsutomu a Keisuke ARAKI. *Studies on Constituents of Crude Drugs. I. Alkaloids of Symphytum officinale LINN* [online]. 1968, **16**(12), 2512-2516 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1248/cpb.16.2512. ISSN 0009-2363. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/cpb1958/16.2512?from=CrossRef>
- [15] OBERLIES, Nicholas H, Nam-Cheol KIM, Dolores R BRINE, Bradley J COLLINS, Robert W HANDY, Charles M SPARACINO, Mansukh C WANI a Monroe E WALL. Analysis of herbal teas made from the leaves of comfrey (*Symphytum officinale*): reduction of N-oxides results in order of magnitude increases in the measurable concentration of pyrrolizidine alkaloids. *Public Health Nutrition* [online]. 2004, **7**(7), 919-924 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1079/PHN2004624. ISSN 1368-9800. Dostupné z: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1368980004001156/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1368980004001156/type/journal_article)
- [16] MEI, Nan, Lei GUO, Peter P FU, Robert H HEFLICH a Tao CHEN. Mutagenicity of comfrey (*Symphytum Officinale*) in rat liver. *British Journal of Cancer* [online]. 2005, **92**(5), 873-875 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602420. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/6602420>
- [17] SAVIC, Vesna, Sasa SAVIC, Vesna NIKOLIC, Ljubisa NIKOLIC, Stevo NAJMAN, Jelena LAZAREVIC a Aleksandra DJORDJEVIC. The identification and quantification of bioactive compounds from the aqueous extract of comfrey root by UHPLC-DAD-HESI-MS method and its microbial activity. *Hemijaska industrija* [online]. 2015, **69**(1), 1-8 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.2298/HEMIND131202013S. ISSN 0367-598X. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0367-598X1400013S>
- [18] ÜSTÜN ALKAN, Fulya, Ceren ANLAS, Oya USTUNER, Bakırel TÜLAY a Ataman SARI. Antioxidant and proliferative effects of aqueous and ethanolic extracts of *Symphytum officinale* on 3T3 Swiss albino mouse fibroblast cell line. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2014, (4(4)), 62-68. ISSN 2249-7412.
- [19] BIRÓ-SÁNDOR, Zsuzsanna. *Assessment report on Symphytum officinale L., radix* [online]. In: London. 2011, s. 1-44 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-symphytum-officinale-l-radix\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-symphytum-officinale-l-radix_en.pdf)

- [20] SOWA, Ireneusz, Roman PADUCH, Maciej STRZEMSKI, et al. Proliferative and antioxidant activity of *Symphytum officinale* root extract. *Natural Product Research* [online]. 2017, **32**(5), 605-609 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1080/14786419.2017.1326492. ISSN 1478-6419. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2017.1326492>
- [21] FURUYA, Tsutomu a Manabu HIKICHI. Alkaloids and triterpenoids of *Symphytum officinale*. *Phytochemistry* [online]. 1971, **10**(9), 2217-2220 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)97225-X. ISSN 00319422. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003194220097225X>
- [22] YUNUSOVA, Svetlana G., Svetlana S. LYASHENKO, N. I. FEDOROV, M. S. YUNUSOV a Oleg N. DENISENKO. Lipids and Lipophilic Constituents of Comfrey (*Symphytum Officinale* L.) Seeds. *Pharmaceutical Chemistry Journal* [online]. 2017, **50**(11), 728-731 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1007/s11094-017-1521-7. ISSN 0091-150X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11094-017-1521-7>
- [23] GATO. *Léčivé rostliny v praktickém bylinkářství, kosmetice a kuchyni*. Olomouc: Rubico, 2013. Příroda (Rubico). ISBN 978-80-7346-156-0.
- [24] STUMPF, Ursula. *Naše léčivé rostliny: [určování a užívání]*. Praha: Ikar, 2013. Příroda (Rubico). ISBN 978-80-249-2207-2.
- [25] TRIFAN, Adriana, Sebastian E.W. OPITZ, Roland JOSURAN, et al. Is comfrey root more than toxic pyrrolizidine alkaloids? Salvianolic acids among antioxidant polyphenols in comfrey (*Symphytum officinale* L.) roots. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2018, **112**, 178-187 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/j.fct.2017.12.051. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691517307998>
- [26] PIPEK, Petr. *Technologie masa II*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 1998. ISBN 80-719-2283-8.
- [27] SMITH, SB., SMITH, SR. *Encyclopedia of Meat Sciences.: Adipose Tissue* [online]. 2014, s. 222-234 [cit. 2020-30-04]. ISBN 978-0-12-464970-5. Dostupné z: [https://app.knovel.com/web/view/swf/show.v/rcid:kpEMSE0003/cid:kt00U6FRC3/viewerType:pdf/root\\_slug:encyclopedia-meat-sciences?cid=kt00U6FRC3&page=86&q=adipose%20tissue&b-q=adipose%20tissue&sort\\_on=default&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default&scrollto=Adipose%20Tissue%0A](https://app.knovel.com/web/view/swf/show.v/rcid:kpEMSE0003/cid:kt00U6FRC3/viewerType:pdf/root_slug:encyclopedia-meat-sciences?cid=kt00U6FRC3&page=86&q=adipose%20tissue&b-q=adipose%20tissue&sort_on=default&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default&scrollto=Adipose%20Tissue%0A)
- [28] FIRESTRONE, D. *Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes*. [online]. 2013, s. 252 [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: [https://app.knovel.com/web/view/swf/show.v/rcid:kpPCCOFW02/cid:kt00C44WA5/viewerType:pdf/root\\_slug:physical-chemical-characteristics?cid=kt00C44WA5&page=24&q=fat%20pig&b-q=fat%20pig&sort\\_on=default&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default&scrollto=Pig%20Fat%0ASpeci%20](https://app.knovel.com/web/view/swf/show.v/rcid:kpPCCOFW02/cid:kt00C44WA5/viewerType:pdf/root_slug:physical-chemical-characteristics?cid=kt00C44WA5&page=24&q=fat%20pig&b-q=fat%20pig&sort_on=default&b-group-by=true&b-search-type=tech-reference&b-sort-on=default&scrollto=Pig%20Fat%0ASpeci%20)

- [29] HEINZ, Gunter, HAUZINGER, Peter *Meat processing technology*. Food and agriculture organization of the united nations regional office for Asia and the Pacific, Bangkok, 2007. ISBN 978-974-7946-99-4.
- [30] KAMENÍK, Josef, Bohumíra JANŠTOVÁ a Alena SALÁKOVÁ. *Technologie a hygiena potravin živočišného původu* [online]. [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <https://fvhe.vfu.cz/files/technologie-a-hygiena-potravin-zivocisneho-puvodu.pdf>. VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO.
- [31] AKOH, Casimir C. a David B. MIN. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 2. New York: Marcel Dekker, 2002. ISBN 0-8247-0749-4.
- [32] THOMAS, Alfred, Bertrand MATTHÄUS a Hans-Jochen FIEBIG. Fats and Fatty Oils. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. 2015 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1002/14356007.a10\_173. ISBN 3527306730. Dostupné z: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/14356007.a10\\_173.pub2](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/14356007.a10_173.pub2)
- [33] FRANCO, Inmaculada, M. CRISTINA ESCAMILLA, José GARCÍA, M. CAMINO GARCÍA FONTÁN a Javier CARBALLO. Fatty acid profile of the fat from Celta pig breed fattened using a traditional feed: Effect of the location in the carcass. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2006, 2000-06-15, **19**(8), 792-799 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.05.005. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157506000974>
- [34] Lard. *FoodData Central Search Results* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171401/nutrients>
- [35] ANTONIETTA PALEARI, Maria, Vittorio MARIA MORETTI, Carla BERSANI, Giuseppe BERETTA a Tiziana MENTASTI. Characterisation of a lard cured with spices and aromatic herbs. *Meat Science* [online]. 2004, **67**(4), 549-557 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2003.12.002. ISSN 03091740. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174003003462>
- [36] MARTINS, Taiane da Silva, Marcos Vinícius Antunes de LEMOS, Lenise Freitas MUELLER, et al. Fat Deposition, Fatty Acid Composition, and Its Relationship with Meat Quality and Human Health. *Meat Science and Nutrition* [online]. InTech, 2018, 2018-10-10 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.5772/intechopen.77994. ISBN 978-1-78984-233-3. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/meat-science-and-nutrition/fat-deposition-fatty-acid-composition-and-its-relationship-with-meat-quality-and-human-health>
- [37] KARLESKIND, Alain. *Oils & Fats manual*. 1. Paris: Lavosier Publishing, 1996. ISBN 2-7430-00-87-2.

- [38] CHEONG, Ling-Zhi, Hong ZHANG, Yuan XU a Xuebing XU. Physical Characterization of Lard Partial Acylglycerols and Their Effects on Melting and Crystallization Properties of Blends with Rapeseed Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, **57**(11), 5020-5027 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1021/jf900665h. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf900665h>
- [39] PIPEK, Petr, Bo-Anne ROHLÍK, Tomáš PANTŮČEK a Anna ŠIMONIOVÁ. The composition of pork lard as a raw material in meat production. *MASO INTERNATIONAL Journal of food science and technology* [online]. 2012, **2**, 115-119 [cit. 2020-05-01]. ISSN 1805-529X. Dostupné z: <http://www.maso-international.cz/download/maso-international-2012-2-page-115-119.pdf>
- [40] Jak poznáme kvalitní hřbetní sádlo. In: *Nasadle.cz* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: [https://nasadle.cz/2019/03/16/jak-pozname-kvalitni-hrbetni-sadlo/?doing\\_wp\\_cron=1588321736.7851469516754150390625](https://nasadle.cz/2019/03/16/jak-pozname-kvalitni-hrbetni-sadlo/?doing_wp_cron=1588321736.7851469516754150390625)
- [41] ROMANKO, Igor, Michal VRABLÍK a Michaela ROMANKO INGRISCHOVÁ. Praktické poznámky ke konzumaci tuků ve vztahu k ateroskleróze a kardiovaskulárním příhodám. *Interní Med.* [online]. **20**(4), 178-182 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: [https://www.internimedicina.cz/artkey/int-2018040004\\_Prakticke\\_poznamky\\_ke\\_konzumaci\\_tuku\\_ve\\_vztahu\\_k\\_ateroskleroze\\_a\\_kardiovaskularnim\\_prihodam.php](https://www.internimedicina.cz/artkey/int-2018040004_Prakticke_poznamky_ke_konzumaci_tuku_ve_vztahu_k_ateroskleroze_a_kardiovaskularnim_prihodam.php)
- [42] JIRÁSEK, Robert a Vladimíra ŠÍPKOVÁ. Péče o kůži rizikových pacientů. *EDUKAFARM MediNews* [online]. 2010, 12, [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <http://www.edukafarm.cz/data/soubory/casopisy/52/kuze.pdf>
- [43] FERTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2005. ISBN 80-734-5046-1.
- [44] Krs, V.: *Materiály I pro 1. a 2. ročník oboru kosmetička*. Praha: MAXDORF, 2000. ISBN 80-85912-19-8.
- [45] RŮŽIČKOVÁ JAREŠOVÁ, Lucie. Dermatologická externa polotuhé konzistence. *Dermatologie pro praxi* [online]. 2010, **4**(1), 59-61 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/der/2010/01/14.pdf>
- [46] HUMMER, Kim E. a Jules JANICK. Rosaceae: Taxonomy, Economic Importance, Genomics. *Genetics and Genomics of Rosaceae* [online]. New York, NY: Springer New York, 2009, 1-17 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1007/978-0-387-77491-6\_1. ISBN 978-0-387-77490-9. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-77491-6\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-77491-6_1)
- [47] AHMAD, Zeeshan. The uses and properties of almond oil. *Complementary Therapies in Clinical Practice* [online]. 2010, **16**(1), 10-12 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/j.ctcp.2009.06.015. ISSN 17443881. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1744388109000772>



- [48] CSAKVARI, Adriana Cecilia. Fatty acids profile and antioxidant activity of almond oils obtained from six romanian varieties. *Farmacia* [online]. 2019, **67**(5), 882-887 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.31925/farmacia.2019.5.19. ISSN 00148237. Dostupné z: <http://farmaciajournal.com/issue-articles/fatty-acids-profile-and-antioxidant-activity-of-almond-oils-obtained-from-six-romanian-varieties/>
- [49] OJEDA-AMADOR, Rosa M., Giuseppe FREGAPANE a María Desamparados SALVADOR. Chemical Characterization of Virgin Almond and Hazelnut Oils and Their By-Products. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2019, **121**(11) [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1002/ejlt.201900114. ISSN 1438-7697. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejlt.201900114>
- [50] The Seasonal Patterns of Almond Production. *The Almond Doctor: Addressing issues within nut orchards* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://thealmonddoctor.com/2009/06/22/the-seasonal-patterns-of-almond-production/>
- [51] Mandle, 10 ml. In: *Alkoholesence.cz* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://www.alkholesence.cz/alkoesence-cz/eshop/32-1-Ochucovadla/90-2-Esence-Koreni/5/738-Mandle-10-ml>
- [52] BOUKHCHINA, Sadok, Khaled SEBAI, Ammar CHERIF, Habib KALLEL a Paul M MAYER. Identification of glycerophospholipids in rapeseed, olive, almond, and sunflower oils by LC-MS and LC-MS/MS. *Canadian Journal of Chemistry* [online]. 2004, **82**(7), 1210-1215 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1139/v04-094. ISSN 0008-4042. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/v04-094>
- [53] OLATIDOYE, Olawale P, Sunday S SOBOWALE, J.V AKINLOTAN a Omobolanle O OOLORODE. Chemical composition and physicochemical characteristics of tropical almond nuts (*Terminalia Catappal*) cultivated in South west Nigeria. *Journal of Medical and Applied Biosciences* [online]. 2011-11, **2**, 1-10 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.13140/RG.2.1.2452.7845. Dostupné z: [https://www.academia.edu/31809962/CHEMICAL\\_COMPOSITION\\_AND\\_PHYSICO-CHEMICAL\\_CHARACTERISTICS\\_OF\\_TROPICAL\\_ALMOND\\_NUTS\\_TERMINALIA\\_CATAPPIA\\_L\\_CULTIVATED\\_IN\\_SOUTH\\_WEST\\_NIGERIA](https://www.academia.edu/31809962/CHEMICAL_COMPOSITION_AND_PHYSICO-CHEMICAL_CHARACTERISTICS_OF_TROPICAL_ALMOND_NUTS_TERMINALIA_CATAPPIA_L_CULTIVATED_IN_SOUTH_WEST_NIGERIA)
- [54] CHEN, Chung-Yen, Karen LAPSLEY a Jeffrey BLUMBERG. A nutrition and health perspective on almonds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2006, **86**(14), 2245-2250 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1002/jsfa.2659. ISSN 0022-5142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2659>
- [55] Nuts, almonds. *FoodData Central Search Results* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170567/nutrients>

- [56] HAŠEK, Jan. Mandlový olej v magistraliter receptuře. *Praktické lékařství* [online]. 2011, 7(4), 176-179 [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2011/04/06.pdf>
- [57] Nuts, almonds. *National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release* [online]. U.S. Department of Agriculture 1400 Independence Ave., S.W. Washington, DC 20250: U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2019 [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/12061?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=almond&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>
- [58] RONCERO, J. M., M. ÁLVAREZ-ORTÍ, A. PARDO-GIMÉNEZ, R. GÓMEZ, A. RABADÁN a J. E. PARDO. Virgin almond oil: Extraction methods and composition. *Grasas y Aceites* [online]. 2016, 67(3) [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.3989/gya.0993152. ISSN 1988-4214. Dostupné z: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1609/1946>
- [59] SHARIATIFAR, Nabi a Issa Mohammad POURFARD. Physic-chemical characteristics of Bitter and Sweet Almond kernel oil. *International Journal of ChemTech Research* [online]. 2015, 8(2), 878-882 [cit. 2020-04-30]. ISSN 0974-4290. Dostupné z: [http://www.sphinxsai.com/2015/ch\\_vol8\\_no2/7/\(878-882\)V8N2.pdf](http://www.sphinxsai.com/2015/ch_vol8_no2/7/(878-882)V8N2.pdf)
- [60] Recept na domácí bylinkový olej a vonný ocet. *IREceptář.cz* [online]. [cit. 2020-06-23]. Dostupné z: <https://www.ireceptar.cz/zahrada/recept-na-domaci-bylinkovy-olej-a-vonny-ocet.html>
- [61] DALLMEIER, Lorraine. How to make Macerated Oils. *Formula botanica* [online]. Wadebridge House, 16 Wadebridge Square, Poundbury, Dorchester, Dorset DT1 3AQ, UK: Herb & Hedgerow [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://formulabotanica.com/how-to-make-macerated-oils/>
- [62] SURBURG, Horst a Johannes PANTEN. Natural Raw Materials in the Flavor and Fragrance Industry. *Common Fragrance and Flavor Materials* [online]. Weinheim, FRG, 2006, 177-238 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1002/3527608214.ch3. ISBN 9783527608218. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527608214.ch3>
- [63] HANIKA, Jiří. *Speciální separační procesy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0242-1.
- [64] LANGMAIER, Ferdinand. *Základy kosmetických výrob*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2001. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-731-8016-2.
- [65] BACÍLKOVÁ, Bronislava a Hana PAULUSOVÁ. *VLIV SILIC A JEJICH HLAVNÍCH ÚČINNÝCH LÁTEK NA MIKROORGANISMY A NA ARCHIVNÍ MATERIÁL* [online]. Praha, 2012 [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://www.nacr.cz/wp-content/uploads/2019/06/silice.pdf>. Národní archiv

- [66] ADELMANN, Marlene. HOW TO MAKE HERB-INFUSED OILS. *HERBAL ACADEMY* [online]. 2013 [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://theherbalacademy.com/herb-infused-oils/>
- [67] KANTAWONG, Fahsai, Supawatchara SINGHATONG, Aomjai AOMJAI, Kantarose BOONYUEN, Nirroot MOOTI, Phenphichar WANACHANTARARAK a Thasaneeya KUBOKI. Properties of macerated herbal oil. *BioImpacts* [online]. 2017, **7**(1), 13-23 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.15171/bi.2017.03. ISSN 2228-5660. Dostupné z: [http://bi.tbzmed.ac.ir/FullHtml/BI\\_4003\\_20160407124221](http://bi.tbzmed.ac.ir/FullHtml/BI_4003_20160407124221)
- [68] HAJIMAHMOODI, Mannan, Naficeh SADEGHI, Behrooz JANNAT, Mohammad R. OVEISI, S. MADANI, M. KIAYI, M.R. AKRAMI a A.M. RANJBAR. Antioxidant Activity, Reducing Power and Total Phenolic Content of Iranian Olive Cultivar. *Journal of Biological Sciences* [online]. 2008, **8**(4), 779-783 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.3923/jbs.2008.779.783. ISSN 17273048. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jbs.2008.779.783>
- [69] SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, Aleksandra, Konrad TROKOWSKI, György KARLOVITS a Edward SZŁYK. Effect of refining processes on antioxidant capacity, total contents of phenolics and carotenoids in palm oils. *Food Chemistry* [online]. 2011, **129**(3), 1187-1192 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.101. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611008041>
- [70] SIGER, Aleksander, Malgorzata NOGALA-KALUCKA, Eleonora LAMPART-SZCZAPA. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids* [online]. 2008, **15**(2), 137-149 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1111/j.1745-4522.2007.00107.x. ISSN 1065-7258. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4522.2007.00107.x>
- [71] FUENTES, Edwar, María E. BÁEZ, Manuel BRAVO, Camila CID, Fabián LABRA. Determination of Total Phenolic Content in Olive Oil Samples by UV-visible Spectrometry and Multivariate Calibration. *Food Analytical Methods* [online]. 2012, **5**(6), 1311-1319 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1007/s12161-012-9379-5. ISSN 1936-9751. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-012-9379-5>
- [72] PIRISI, Filippo M., Paolo CABRAS, Clara Falqui CAO, Marzia MIGLIORINI a Marco MUGGELLI. Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Reappraisal of the Extraction, HPLC Separation, and Quantification Procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, **48**(4), 1191-1196 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1021/jf991137f. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf991137f>

- [73] PALAFOX-CARLOS, Hugo, E.M. YAHIA, G.A. GONZÁLEZ-AGUILAR. Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food Chemistry* [online]. 2012, **135**(1), 105-111 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.04.103. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612007662>
- [74] HURTADO-FERNÁNDEZ, Elena, María GÓMEZ-ROMERO, Alegría CARRASCO-PANCORBO a Alberto FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ. Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2010, **53**(5), 1130-1160 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.07.028. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708510004188>
- [75] GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, Anna, Ewa SIKORSKA, G.A. GONZÁLEZ-AGUILAR, Marzia MIGLIORINI a Marco MUGGELLI. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1048**(2), 195-198 [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.07.051. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304012117>
- [76] GÓRNAŚ, Paweł a Aleksander SIGER. Simplified sample preparation and rapid detection by RP-HPLC/FLD of tocopherols and tocotrienols in margarines: Preliminary screening of plant fats-potential quality markers. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2015, **117**(10), 1589-1597 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1002/ejlt.201400435. ISSN 14387697. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201400435>
- [77] BOTINEȘTEAN, Cristina, Matthias SCHREINER a Ionel JIANU. Influence of Solvent Used for Extraction on Tocopherols Content of Tomato Seed Oil. *Bulletin University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*. Agriculture. Cluj-Napoca, 2013, **70**(2), 431-432 [cit. 2020-06-24]. ISSN 1843-5386.
- [78] TASIOULA-MARGARI, Maria a Otu OKOGERI. Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. *Food Chemistry* [online]. 2001, **74**(3), 377-383 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00176-5. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814601001765>
- [79] DU, M. a Dae U. AHN. Simultaneous Analysis of Tocopherols, Cholesterol, and Phytosterols Using Gas Chromatography. *Journal of Food Science* [online]. 2002, **67**(5), 1696-1700 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08708.x. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08708.x>

- [80] LECHNER, Marion, Birgit REITER a Eberhard LORBEER. Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **857**(1-2), 231-238 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00751-7. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399007517>
- [81] CAYUELA, José A., Khaled YOUSFI, M. CARMEN MARTÍNEZ a José M. GARCÍA. Rapid Determination of Olive Oil Chlorophylls and Carotenoids by Using Visible Spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 2014, **91**(10), 1677-1684 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1007/s11746-014-2515-1. ISSN 0003-021X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-014-2515-1>
- [82] RANJITH, A., K. Sarin KUMAR, V. V. VENUGOPALAN, C. ARUMUGHAN, R. C. SAWHNEY a Virendra SINGH. Fatty acids, tocopherols, and carotenoids in pulp oil of three sea buckthorn species (*Hippophae rhamnoides*, *H. salicifolia*, and *H. tibetana*) grown in the Indian Himalayas. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 2006, **83**(4), 359-364 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1007/s11746-006-1213-z. ISSN 0003-021X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-006-1213-z>
- [83] CICHELLI, Angelo a Gian Pietro PERTESANA. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1046**(1-2) [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.06.093. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304010611>
- [84] MINGUEZ-MOSQUERA, M. Isabel., Beatriz. GANDUL-ROJAS a M. Lourdes. GALLARDO-GUERRERO. Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1992, **40**(1), 60-63 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1021/jf00013a012. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00013a012>
- [85] PUSPITASARI-NIENABER, Ni Luh, Mario G. FERRUZZI a Steven J. SCHWARTZ. Simultaneous detection of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls in vegetable oils by direct injection C 30 RP-HPLC with coulometric electrochemical array detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 2002, **79**(7), 633-640 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1007/s11746-002-0536-0. ISSN 0003021X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-002-0536-0>
- [86] RAMADAN, Mohamed a Jörg-Thomas MÖRSEL. Direct isocratic normal-phase HPLC assay of fat-soluble vitamins and  $\beta$ -carotene in oilseeds. *European Food Research and Technology* [online]. 2002, **214**(6), 521-527 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1007/s00217-002-0511-4. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-002-0511-4>

- [87] ARAÚJO, Larissa B.D.C., Sarah L. SILVA, Marcos A.M. GALVÃO, Magda R.A. FERREIRA, Evani L. ARAÚJO, Karina P. RANDAU a Luiz A.L. SOARES. Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2013, **23**(5), 736-742 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1590/S0102-695X2013000500004. ISSN 0102695X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X13700991>
- [88] WARNER, K. a T. L. MOUNTS. Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1990, **67**(11), 827-831 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1007/BF02540500. ISSN 0003021X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02540500>
- [89] FLAKELAR, Clare L., Paul D. PRENZLER, David J. LUCKETT, Julia A. HOWITT a Gregory DORAN. A rapid method for the simultaneous quantification of the major tocopherols, carotenoids, free and esterified sterols in canola ( *Brassica napus* ) oil using normal phase liquid chromatography. *Food Chemistry* [online]. 2017, **214**, 147-155 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.07.059. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616310810>
- [90] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*, Praha, ČR: Česká společnost chemická, 2004, **98**(4), s. 174-179. ISSN 0009-2770.
- [91] HRSTKA, Miroslav, SOMROVÁ Lenka. *Praktikum z analytické chemie potravin*. Brno, 2013, 55 s.
- [92] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [93] ČSN EN ISO 3657: *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení čísla zmýdelnění*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015.
- [94] ČSN EN ISO 660: *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení čísla kyselosti a kyselosti*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015.
- [95] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravin: Cvičenie*. 2. vyd. Bratislava: Slov. technická univerzita, Chemickotechnologická fakulta, 1991, 394 s. ISBN 80-227-0398-2.
- [96] ČSN EN ISO 961: *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení jodového čísla*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015.
- [97] ČSN EN ISO 27107: *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení peroxidového čísla – Potenciometrické stanovení koncového bodu*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015.

- [98] ČSN EN ISO 12966-1. *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin – Část 1: Směrnice pro moderní plynovou chromatografii methylesterů mastných kyselin*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015.
- [99] S ČSN EN ISO 12966-2. *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin – Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015.
- [100] ČSN EN ISO 12966-4. *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin – Část 4: Metoda kapilární plynové chromatografie*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015.
- [101] SADOUDI, Djamil a D. ALI AHMED. Studies on physico-chemical characteristics and fatty acid composition of commercially available Algerian frying edible oils. *International Food Research Journal* [online]. 2017, **24**(1), 60-67 [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: [http://www.ifrj.upm.edu.my/24%20\(01\)%202017/\(6\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/24%20(01)%202017/(6).pdf)
- [102] MITRA, Michal. *Charakterizace sýrových analogů vyrobených s přidávkem ořechového oleje*. Brno, 2020. Dostupné také z: [https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace?zp\\_id=124106](https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace?zp_id=124106). Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [103] KARASUMA, Nijo. Vitamin Analysis by HPLC. *Www.nacalai.com: Cosmosil* [online]. Japan: NACALAI TESQUE [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: [https://www.nacalai.co.jp/global/cosmosil/pdf/Vitamine\\_Analysis.pdf](https://www.nacalai.co.jp/global/cosmosil/pdf/Vitamine_Analysis.pdf)
- [104] ZHANG, Linshang, Guolong YANG, Jingnan CHEN, Yanlan BI, Shuai CHEN, Dandan TAN, Jing FU a Dan PENG. Effect of Lard Quality on Chemical Interesterification Catalyzed by KOH/Glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 2015, **92**(4), 513-521 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1007/s11746-015-2619-2. ISSN 0003-021X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-015-2619-2>
- [105] ČESKÁ REPUBLIKA. Vyhláška ministerstva č. 328/1997 Sb. zemědělství. In: *Sbírka zákonů*. Praha: Ministerstvo zemědělství, 1997, ročník 2000, částka 110/1997. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-328#prilohy>

- [106] ATSU BARKU, Victor Y., Hubert D. NYARKO a Prosper DORDUNU. Studies on the physicochemical characteristics, microbial load and storage stability of oil from indian almond nut (*terminalia catappa* L.). *Food Science and Quality Management* [online]. 2012, **8**, 9-17 [cit. 2020-07-16]. ISSN 2225-0557. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Victor\\_Barku/publication/235339215\\_STUDIES\\_ON\\_THE\\_PHYSICOCHEMICAL\\_CHARACTERISTICS\\_MICROBIAL\\_LOAD\\_AND\\_STORAGE\\_STABILITY\\_OF\\_OIL\\_FROM\\_INDIAN\\_ALMOND\\_NUT\\_TERMINALIA\\_CATAPPA\\_L/links/575ebe1108ae9a9c955f77b4.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Victor_Barku/publication/235339215_STUDIES_ON_THE_PHYSICOCHEMICAL_CHARACTERISTICS_MICROBIAL_LOAD_AND_STORAGE_STABILITY_OF_OIL_FROM_INDIAN_ALMOND_NUT_TERMINALIA_CATAPPA_L/links/575ebe1108ae9a9c955f77b4.pdf)
- [107] DOMINGUES, Rui M. A., Eduardo L. G. OLIVEIRA, Carmen S. R. FREIRE, Ricardo M. COUTO, Pedro C. SIMÕES, Carlos P. NETO, Armando J. D. SILVESTRE a Carlos M. SILVA. Supercritical Fluid Extraction of Eucalyptus globulus Bark—A Promising Approach for Triterpenoid Production. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, **13**(6), 7648-7662 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.3390/ijms13067648. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/6/7648>
- [108] DE OLIVEIRA, Ivan, Willian CORREA, Priscila NEVES, et al. Optical Analysis of the Oils Obtained from *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd: Mapping Absorption-Emission Profiles in an Induced Oxidation Process. *Photonics* [online]. 2017, **4**(4) [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.3390/photonics4010003. ISSN 2304-6732. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2304-6732/4/1/3>
- [109] KADIAN, Sumita S., Alka SHARMA a R. D. SOOD. EFFECT OF LIGHT AND HEAT ON STABILITY OF CRUDE CAROTENOID EXTRACT FROM NATURAL SOURCES. *International journal of pharmaceutical sciences and research* [online]. 2013, 2013-6-1, **4**(6), 2415-2418 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.4(6).2415-18. ISSN 0975-8232. Dostupné z: <https://ijpsr.com/bft-article/effect-of-light-and-heat-on-stability-of-crude-carotenoid-extract-from-natural-sources/?view=fulltext>
- [110] ABRAMOVIČ, Helena, Bojan BUTINAR a Vojko NIKOLIČ. Changes occurring in phenolic content, tocopherol composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil during storage. *Food Chemistry* [online]. 2007, **104**(3), 903-909 [cit. 2020-07-23]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.12.044. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607000052>
- [111] SANTOS, Sónia A.O., Juan J. VILLAVARDE, Carlos M. SILVA, Carlos P. NETO a Armando J.D. SILVESTRE. Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* Labill bark. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2012, **71**, 71-79 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1016/j.supflu.2012.07.004. ISSN 08968446. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844612002434S>



## 7 POUŽITÉ ZKRATKY

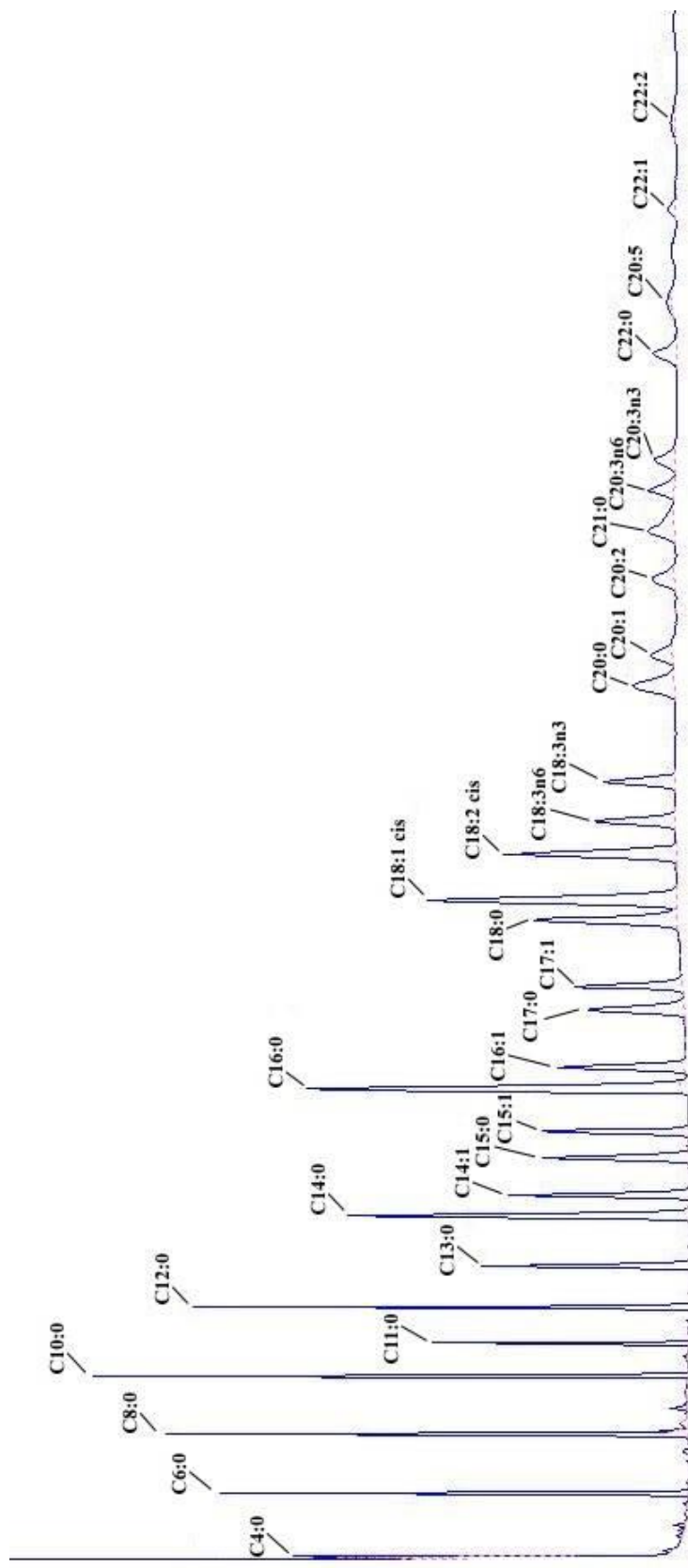
ABTS	2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
BSTFA	Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
ČK	Číslo kyselosti
ČZ	Číslo zmýdelnění
DAD	Detektor diodového pole
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH-H	Difenylpikrylhydrazin
DPPH	(1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
FID	Plamenový ionizační detektor
FRAP	Antioxidační potenciál redukce železitých iontů
GC	Plynová chromatografie
HDL	Lipoprotein s vysokou hustotou
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
JČ	Jodové číslo
LDL	Lipoprotein s nízkou hustotou
LLE	Extrakce kapalina-kapalina
MEMK	Methylester mastné kyseliny
MK	Mastná kyselina
MS	Hmotnostní spektrometr
MSTFA	N-methyl-n-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
MTBE	Methyl-terc-butyleter
MUFA	Mononenasyčená mastná kyselina
MZe	Ministerstvo zemědělství
ND	Nebyl detekován
NP	Normální fáze
PČ	Peroxidové číslo
RP	Reverzní fáze
PTFE	Polytetrafluorethylen
PUFA	Polynenasycená mastná kyselina
SFA	Nasyčená mastná kyselina
SPE	Extrakce pevnou fází
Š	Šarže
TAG	Triacylglycerol
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
VMK	Volná mastná kyselina
UV	Ultrafialová část spektra
VIS	Viditelná část spektra

## **8 SEZNAM PŘÍLOH**

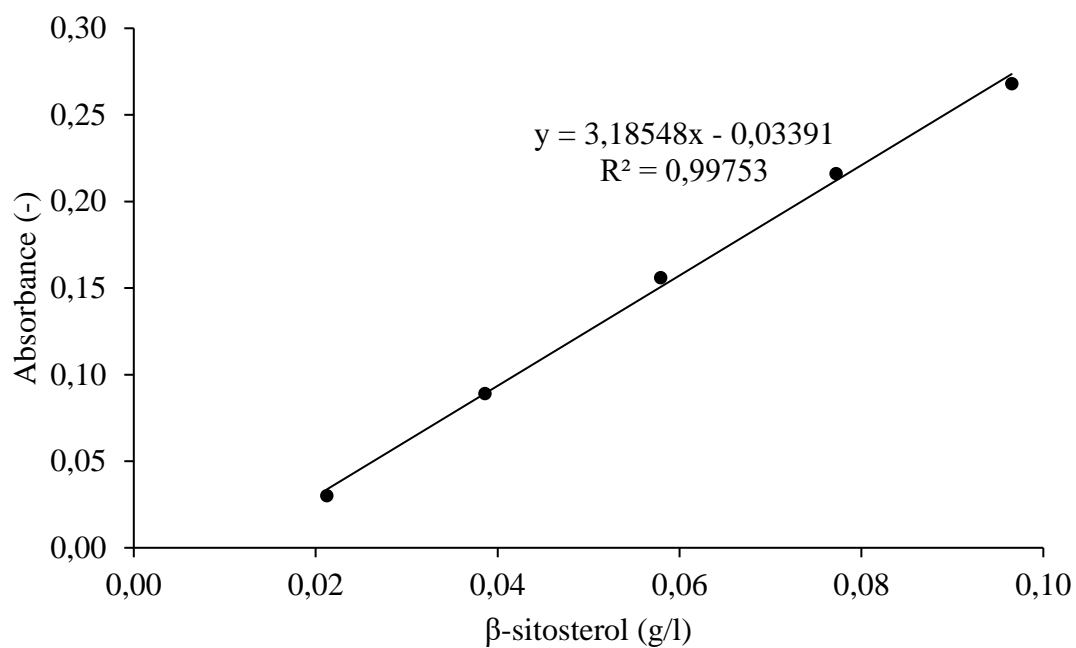
- Příloha 1 Chromatogram standardů methylesterů mastných kyselin
- Příloha 2 Graf kalibrační přímky  $\beta$ -sitosterolu
- Příloha 3 Graf kalibrační přímky  $\beta$ -karotenu
- Příloha 4 Graf kalibrační přímky kyseliny gallové
- Příloha 5 Graf kalibrační přímky Troloxu
- Příloha 6 Výrobce dodaná specifikace mandlového oleje
- Příloha 7 Ukázka chromatogramu stanovení celkových mastných kyselin
- Příloha 8 Ukázka chromatogramu stanovení volných mastných kyselin
- Příloha 9 Ukázka chromatogramu stanovení fytosterolů
- Příloha 10 Ukázka chromatogramu stanovení tokoferolů

## 9 PŘÍLOHY

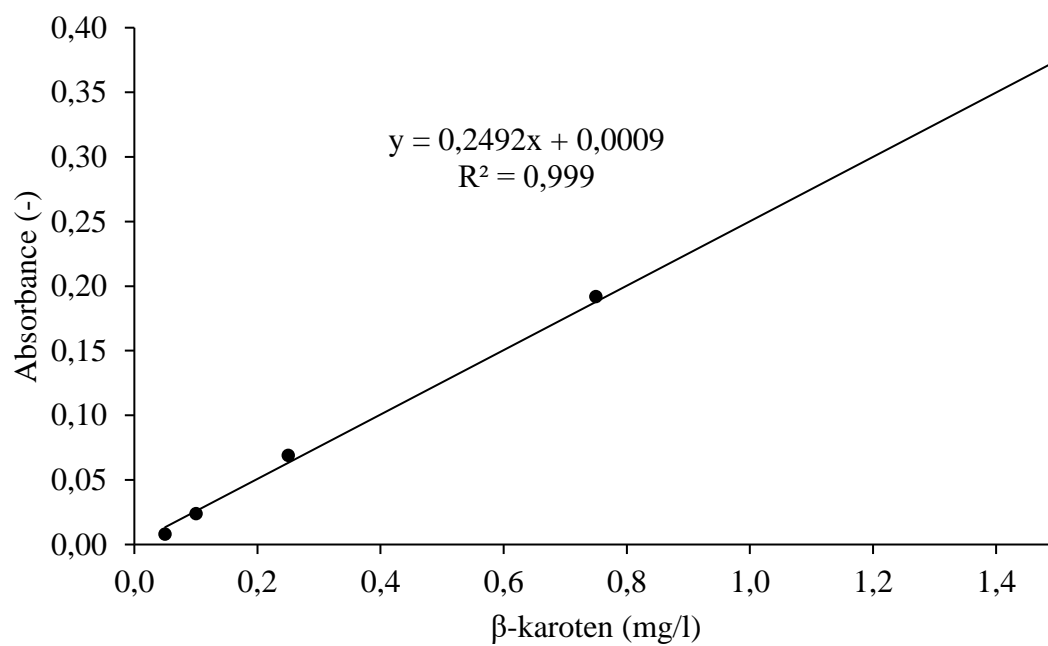
Příloha 1 Chromatogram standardů methylesterů mastných kyselin



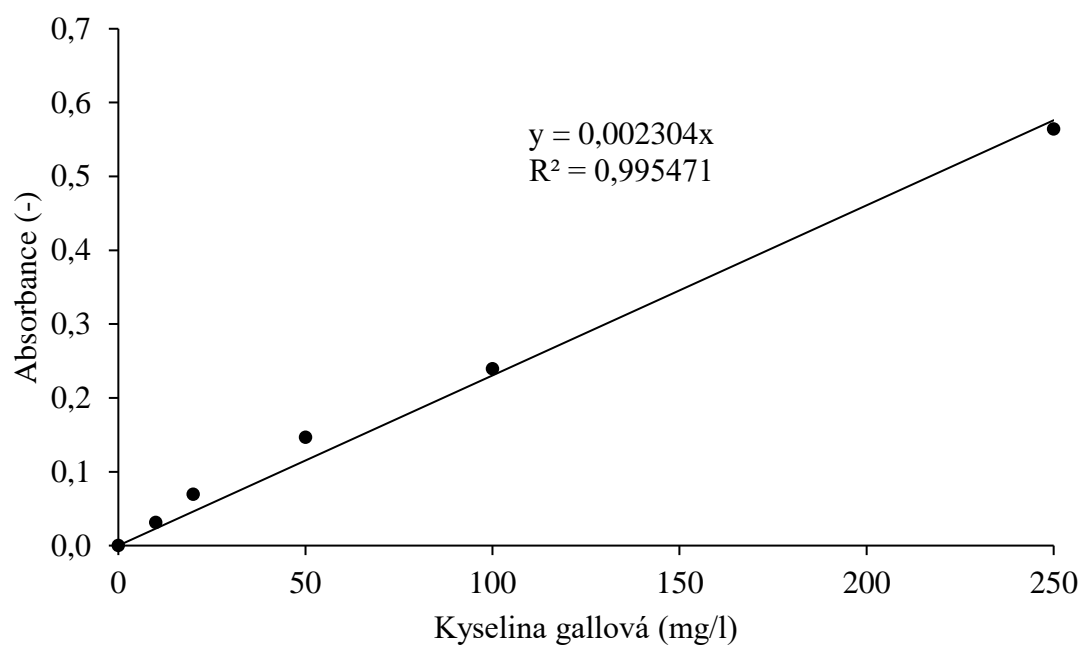
Příloha 2 Graf kalibrační přímky  $\beta$ -sitosterolu



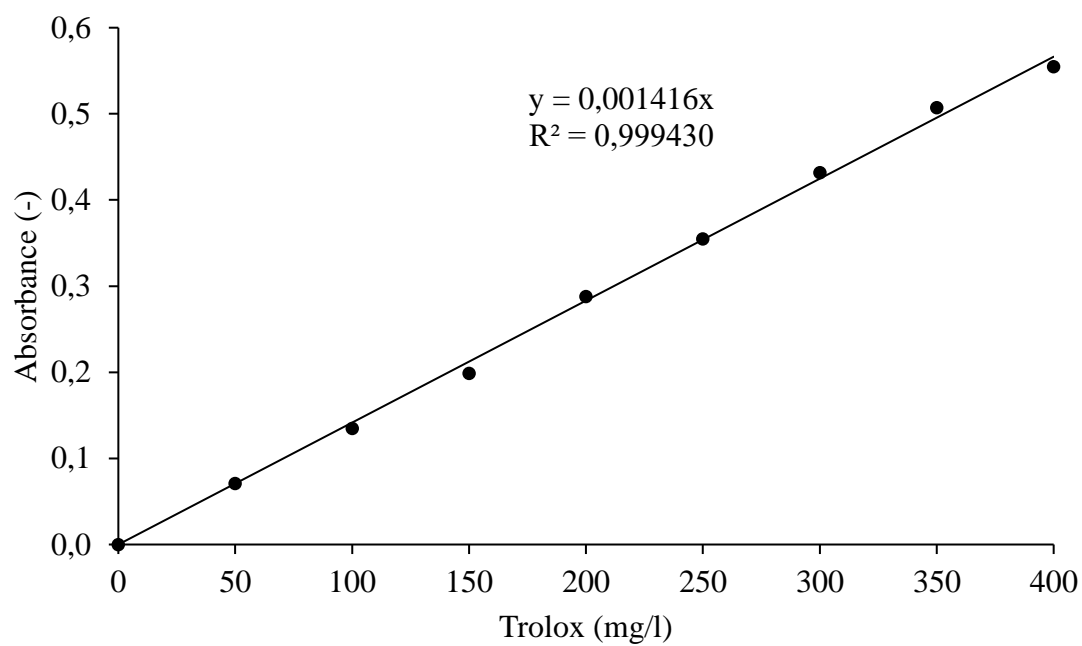
Příloha 3 Graf kalibrační přímky  $\beta$ -karotenu



Příloha 4 Graf kalibrační přímky kyseliny gallové



Příloha 5 Graf kalibrační přímky Troloxu

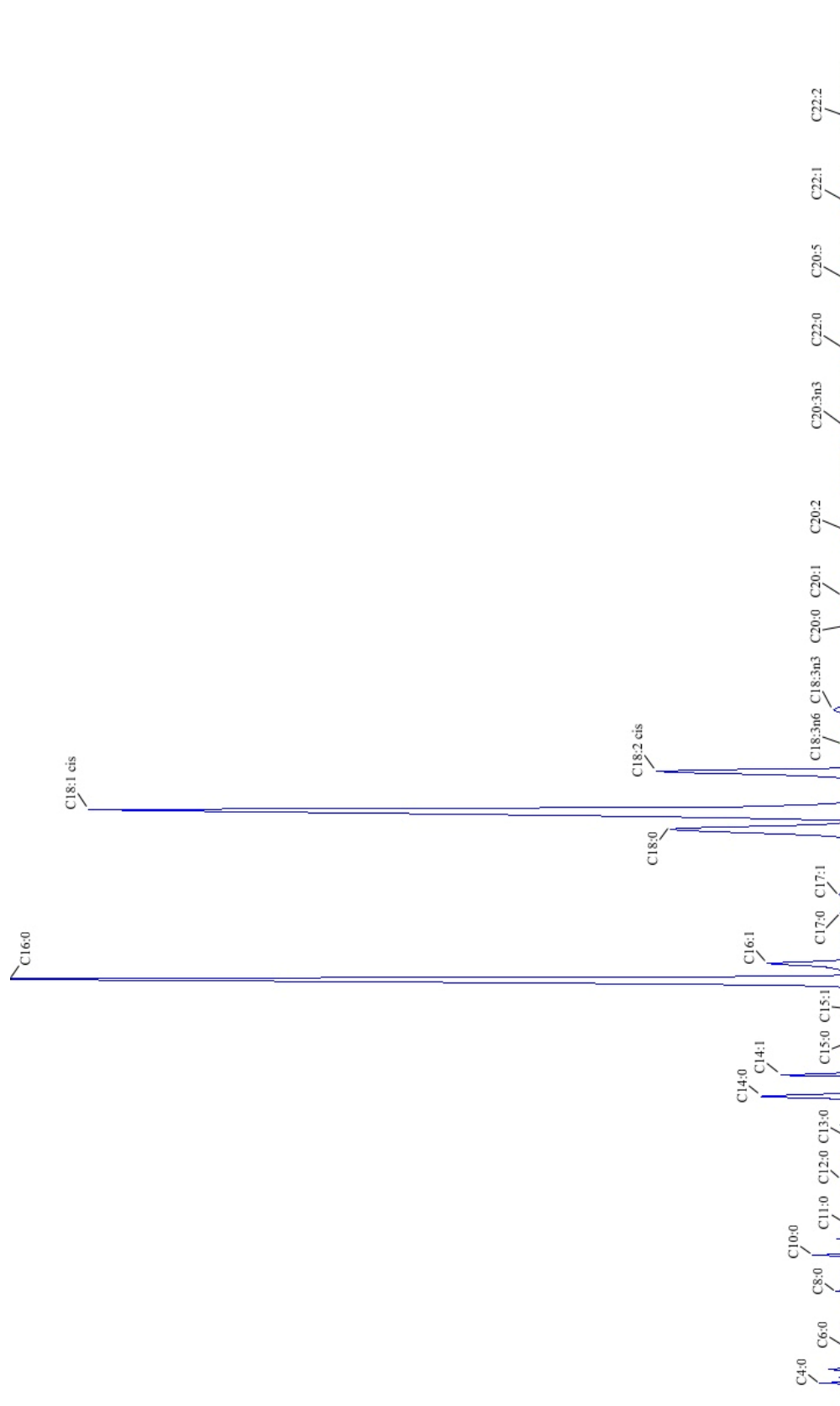


*Příloha 6 Výrobce dodaná specifikace mandlového oleje*

<b>Složení mastných kyselin (%)</b>	
Palmitová	6,5
Plamitoolejová	0,5
Stearová	1,4
Olejová	64,7
Linolová	26,2
Linolenová	0,2
<b>Složení sterolů (%)</b>	
$\beta$ -sitosterol	77,5
$\delta$ -5-avanasterol	6,4
Kampesterol	4,3
Stigmasterol	2,5
$\delta$ -7-stigmastenol	1,1
$\delta$ -7-avanasterol	0,6
Cholesterol	0,6
Brasicasterol	0,1

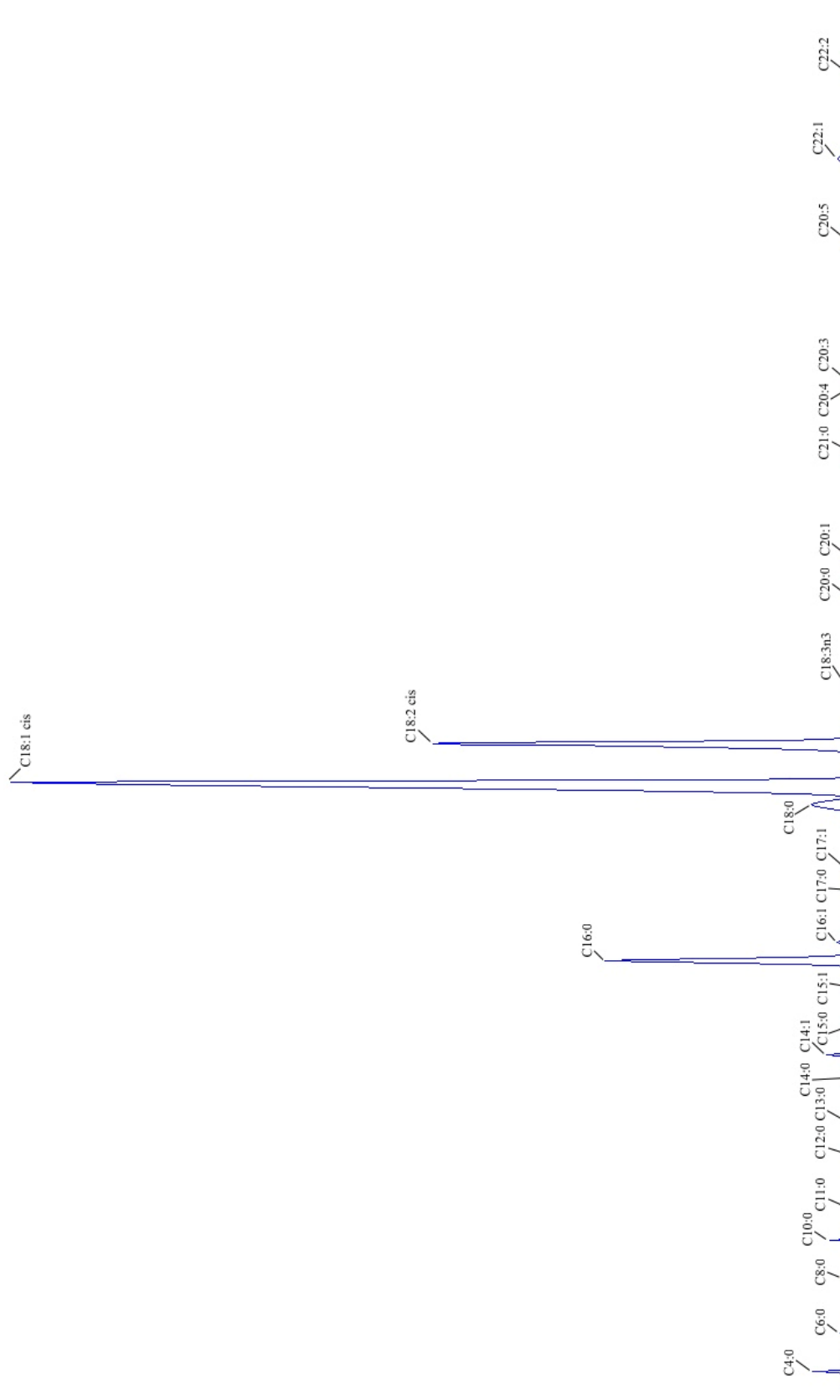
Příloha 7 Ukázka chromatogramu stanovení celkových mastných kyselin

Vzorek 200203



Příloha 7 Ukázka chromatogramu stanovení celkových mastných kyselin

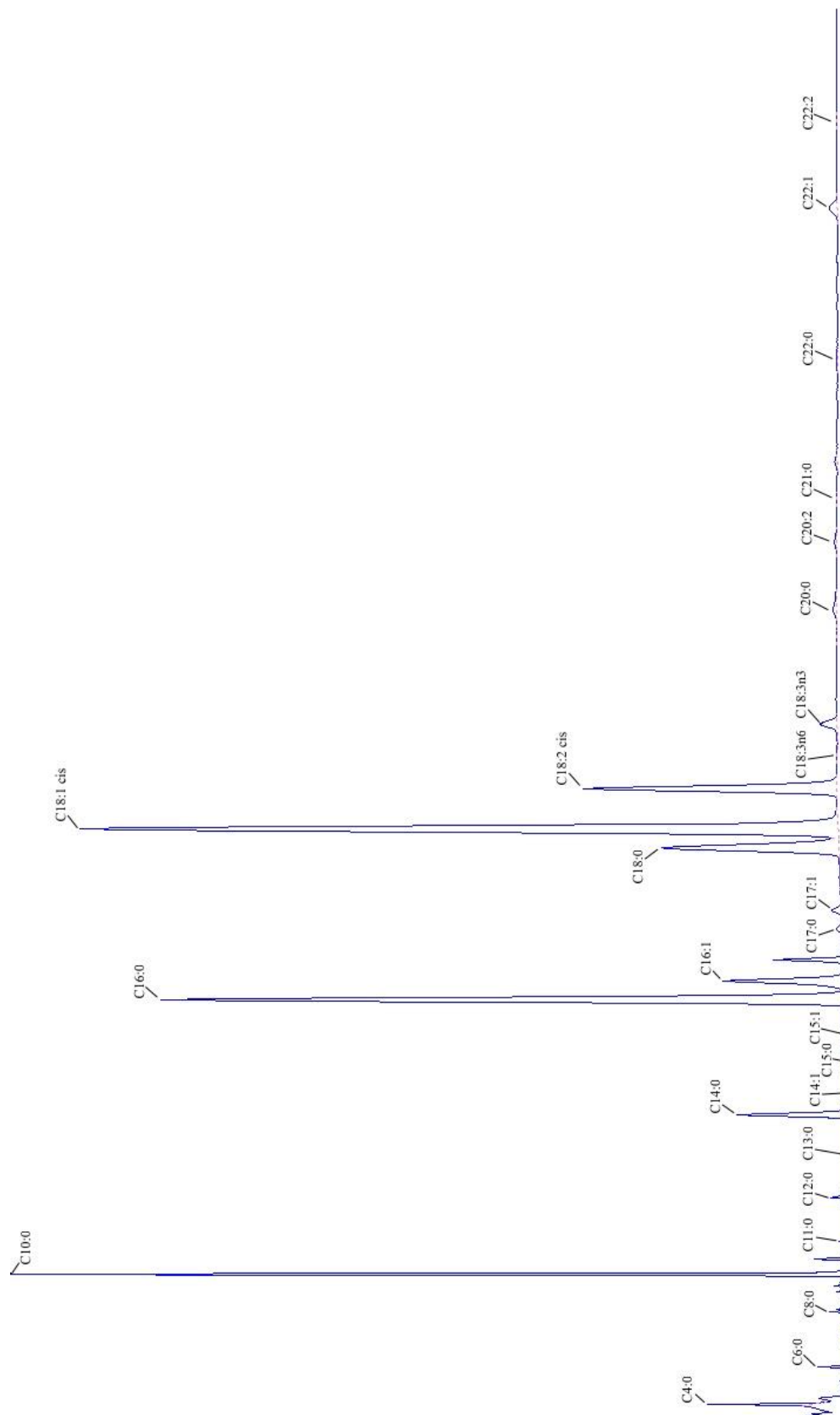
Vzorek Mandlového oleje





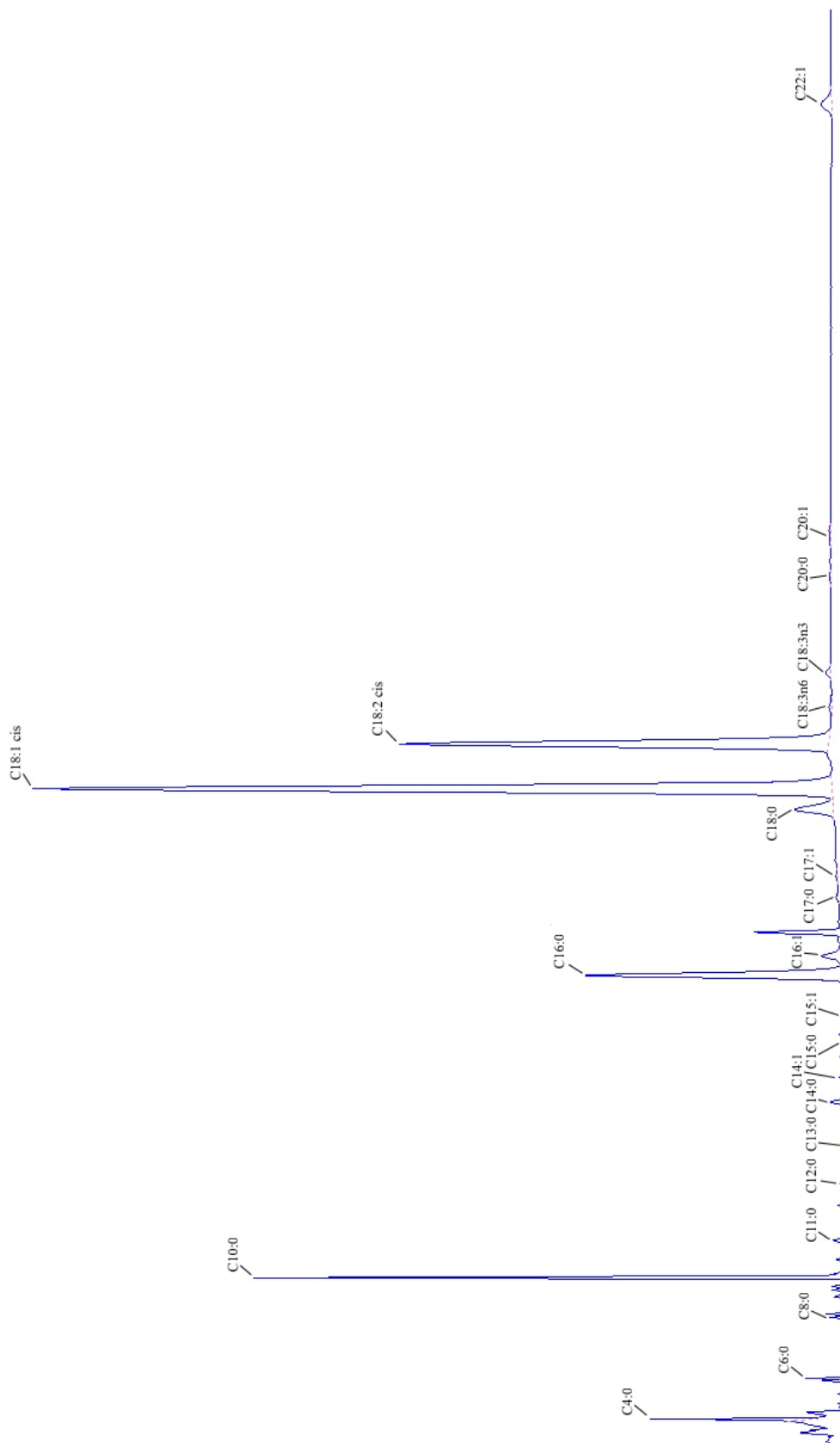
Příloha 8 Ukázka chromatogramu stanovení volných mastných kyselin

Vzorek 200224



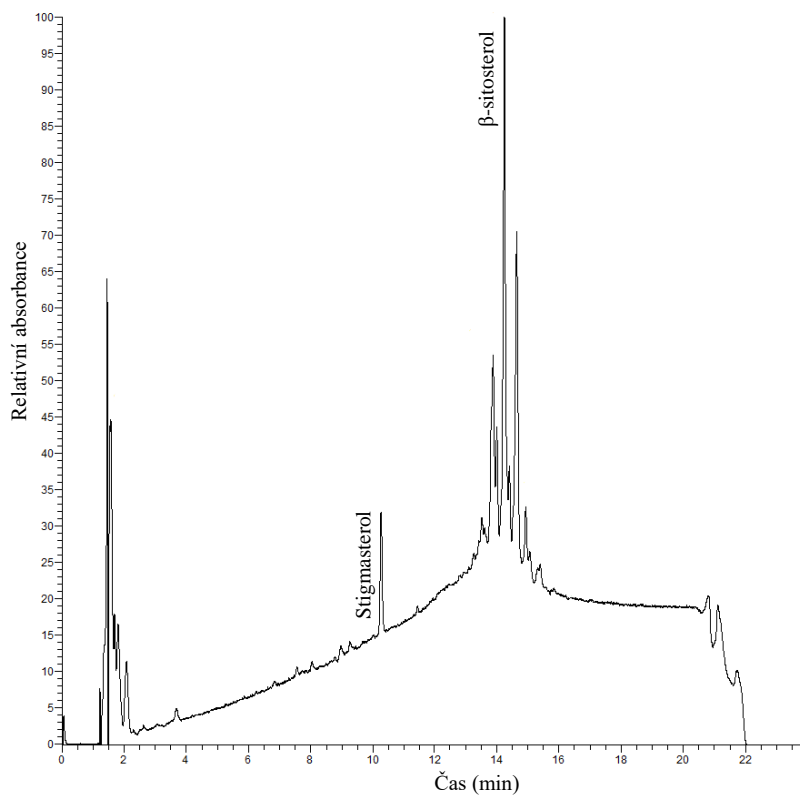
Příloha 8 Ukázka chromatogramu stanovení volných mastných kyselin

Vzorek Mandlového oleje



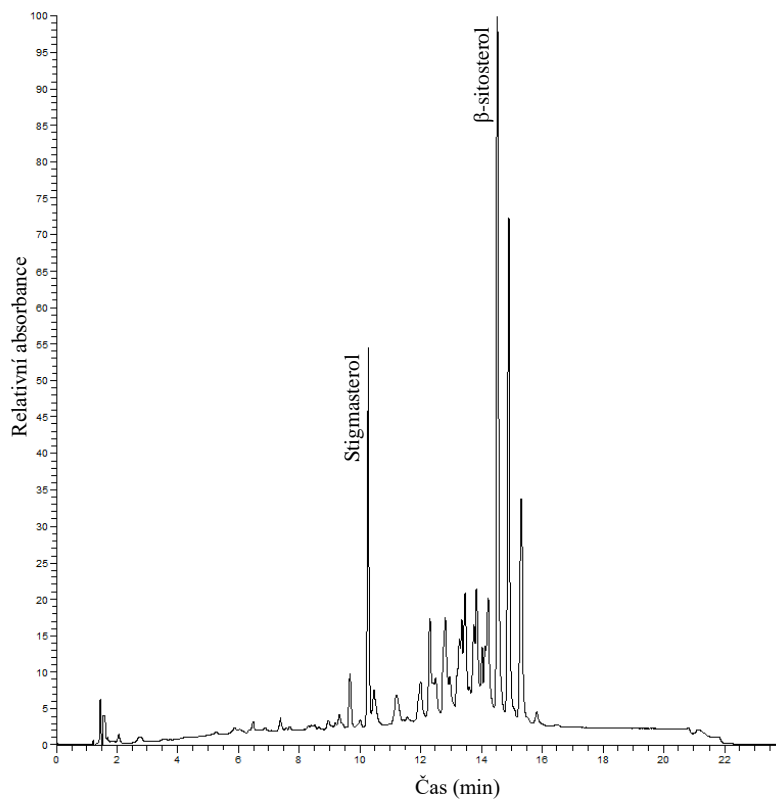
*Příloha 9 Ukázka chromatogramu stanovení fytoosterolů*

Vzorek 200203- macerát



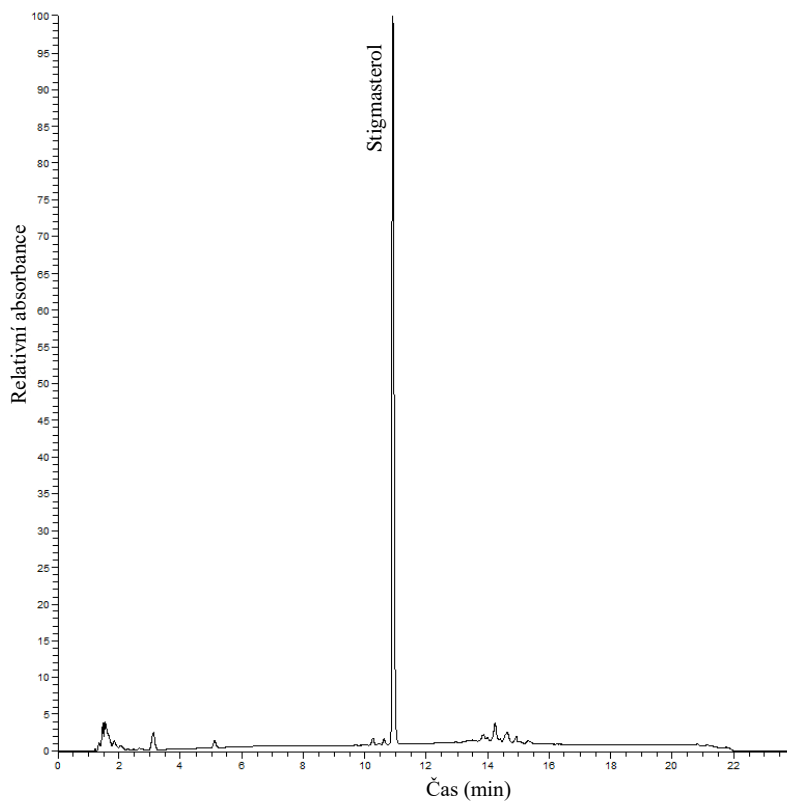
*Příloha 9 Ukázka chromatogramu stanovení fytoosterolů*

Vzorek Mandlového oleje- základ



*Příloha 9 Ukázka chromatogramu stanovení fytosterolů*

Vzorek kostivalové masti



*Příloha 10 Ukázka chromatogramu stanovení tokoferolů*

Vzorek kostivalové masti

