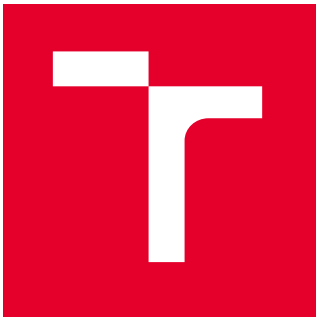


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

HUMINOVÉ LÁTKY V KOSMETICE: CHARAKTERIZACE A STABILITNÍ STUDIE BALZÁMU NA RTY

HUMIC SUBSTANCES IN COSMETICS: CHARACTERIZATION AND STABILITY STUDIES OF LIP BALM

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Bc. Tereza Dostálová**
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**
SUPERVISOR

BRNO 2024

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1907/2023	Akademický rok: 2023/24
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Studentka:	**Bc. Tereza Dostálová**	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace	
Studijní obor:	Procesy a materiály medicínských aplikací	
Vedoucí práce:	**doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**	

Název diplomové práce:

Huminové látky v kosmetice: charakterizace a stabilitní studie balzámu na rty

Zadání diplomové práce:

Cílem této diplomové práce je připravit a následně charakterizovat kosmetický přípravek typu balzámu na rty, který bude obohacen o bioaktivní složky, jako je humát draselný a výtažek z červené řepy. Dále bude tato diplomová práce doplněna o senzorickou analýzu, jejichž korespondenti budou z velké části tvořeni studenty a zaměstnanci FCH VUT.

V první části této diplomové práce bude připravena bohatá a aktuální literární rešerše shrnující problematiku těchto kosmetických přípravků a použitých ingrediencí k jejich přípravě.

Dále bude velmi podrobně fyzikálně–chemicky charakterizován výtažek z červené řepy. Mimo jiné bude určitá část věnována i samotnému vývoji a optimalizaci přípravy těchto balzámů. Za tímto účelem budou studentkou využity termická a spektrometrické metody, a to zejména infračervená a Ramanova spektrometrie.

Celkově budou připraveny tři vzorky balzámů lišících se svým složením, přičemž čtvrtý vzorek nebude obsahovat žádnou bioaktivní ingredienci.

Druhá, ale ne méně důležitá experimentální část bude věnována reologickým testům, které budou doplněny i o samotné testy mikrobiologické.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

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

Bc. Tereza Dostálová studentka	doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D. vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá tvorbou balzámu na rty s obsahem humátu pro dosažení antivirového účinku vůči viru *Herpes simplex* jakožto jednou z dalších možných variant léčby tohoto onemocnění. Pro vizuální zpříjemnění produktu bylo připraveno barvivo z červené řepy, jehož charakterizace je také součástí práce. Barvivo bylo separováno na jednotlivé složky pomocí tenkovrstvé chromatografie a analyzováno pomocí FTIR, aby byly popsány strukturní molekulové jednotky, jež obsahuje. Samotný balzám na rty byl připraven v několika variantách, a to obsahující jak humát, tak i barvivo, obsahující pouze humát nebo barvivo a ve formě slepého vzorku. Tyto vzorky byly podrobeny dlouhodobé čtyřměsíční stabilitní studii, kdy bylo využito dvou rozdílných skladovacích podmínek. Analýza spočívala v posouzení organoleptických vlastností, roztěrových vlastností, stanovení lineární viskoelastické oblasti, flow-pointu a bodu tání a mikrobiální zátěže. Pro větší specifikaci byl studován účinek barviva a humátu pomocí difúzních a antimikrobiálních testů. Na závěr studie byla provedena senzorická analýza pro zjištění případné úspěšnosti produktu mezi spotřebiteli.

KLÍČOVÁ SLOVA

Huminové látky, humát draselný, balzám na rty, opary, červená řepa

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the creation of lip balm containing humate to achieve an antiviral effect against the *Herpes simplex* virus as one of the other possible treatment options for this disease. To visually enhance the product, a dye was prepared from beetroot, the characterization of which is also part of the work. The dye was separated into its individual components by thin-layer chromatography and analyzed by FTIR to describe the structural molecular units it contains. The lip balm itself was prepared in several variants, containing both humate and dye, containing only humate or dye, and in the form of a "blank" sample. These samples were subjected to a long-term four-month stability study, where two different storage conditions were used. The analysis consisted in the assessment of organoleptic properties, spreading properties, determination of the linear viscoelastic area, flow point, melting point and bioburden. For greater specificity, the effect of dye and humate was studied using diffusion and antimicrobial tests. At the end of the study, a sensory analysis was carried out to determine the possible success of the product among consumers.

KEY WORDS

Humic substances, potassium humate, lip balm, herpes, beetroot

DOSTÁLOVÁ, Tereza. *Huminové látky v kosmetice: charakterizace a stabilitní studie balzámu na rty*. Brno, 2024. Dostupné také z: https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156732. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu, doc. Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D., za všechen jeho věnovaný čas, cenné rady a vstřícné vedení. Ráda bych také poděkovala paní Ing. Heleně Hudečkové, Ph.D. za pomoc a vedení mikrobiologické části této diplomové práce, paní Leoně Kubíkové za realizaci měření kalorimetrie a všem, kteří mně při zpracovávání této práce pomohli či povzbudili. V neposlední řadě patří obrovské díky mým rodičům za jejich neutuchající podporu, díky níž jsem se mohla rozvíjet v oboru, který mne naplňuje.

OBSAH

1 ÚVOD 8

2 TEORETICKÁ ČÁST 9

2.1 Využití huminových látek v kosmetice 9

2.1.1 Rašelina a její využití v lázeňství a kosmetice 9

2.1.2 Účinky huminových látek a jejich využití 11

2.1.3 Antivirové vlastnosti huminových kyselin 13

2.2 Herpes simplex virus 14

2.3 Balzámy na rty 14

2.4 Pokožka rtů 15

2.5 Přehled ostatních ingrediencí a jejich vlastností 16

2.5.1 Včelí vosk 16

2.5.2 Lanolin 16

2.5.3 Cocamidopropyl betain 16

2.5.4 Glycerin 17

2.5.5 Aloe vera šťáva 17

2.5.6 Vitamin C a Vitamin E 17

2.5.7 Kokosový olej 17

2.5.8 Barvivo z červené řepy 18

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 19

3.1 Použité chemikálie 19

3.2 Použité přístroje a pomůcky 21

3.3 Charakterizace barviva z červené řepy 22

3.3.1 Zpracování barviva 22

3.3.2 Stanovení rezidua methanolu 24

3.3.3 IČ a Ramanovo spektrum 25

3.3.4 Stanovení jednotlivých složek barviva pomocí TLC, DataColor a FTIR 25

3.4 Charakterizace humátu 29

3.4.1 Izolace huminových a fulvinových kyselin 29

3.4.2 Stanovení obsahu huminových látek 30

3.5 Měření účinnosti barviva a humátu v kosmetice 31

3.5.1 Antioxidační vlastnosti 31
3.5.2 Antimikrobiální vlastnosti 31
3.5.3 Simulace difúze látek skrze pokožku 32
3.6 Vývoj balzámu na rty 34
3.6.1 Optimalizace receptury 34
3.6.2 Optimalizace postupu přípravy 41
3.6.3 Posouzení primární stability receptury 43
3.6.4 Tvorba finálních vzorků pro hodnocení stability 45
3.7 Stabilitní studie balzámu 47
3.7.1 Posouzení organoleptických vlastností 47
3.7.2 Roztěrové testy 48
3.7.3 Reologické testy – měření LVO 49
3.7.4 Kalorimetrie – posouzení teploty tání 49
3.7.5 Mikrobiální zátěž a růst 49
3.7.6 Stabilita barviva 51
3.8 Senzorická analýza 52
4 VÝSLEDKY A DISKUZE 55
4.1 Analýza barviva z červené řepy 55
4.1.1 FTIR a Ramanovo spektrum 55
4.1.2 DataColor spektra 58
4.1.3 FTIR spektra jednotlivých frakcí po TLC 59
4.1.4 Zbytkový obsah methanolu 62
4.1.5 Stabilita barviva 64
4.2 Posouzení dlouhodobé stability balzámu 66
4.2.1 Posouzení organoleptických vlastností 66
4.2.2 Roztěrové testy 71
4.2.3 Reologické testy 72
4.2.4 Kalorimetrie – posouzení teploty tání 75
4.2.5 Mikrobiální zátěž a růst 80
4.3 Další měřené parametry 84
4.3.1 Antioxidační vlastnosti 84
4.3.2 Antimikrobiální vlastnosti 86

4.3.3 Posouzení účinku balzámu ... 88
4.3.4 Simulace difúze látek skrze pokožku ... 89
4.4 Senzorická analýza ... 91
4.4.1 Informace o hodnotící skupině ... 91
4.4.2 Hodnocení balzámů před aplikací ... 92
4.4.3 Hodnocení balzámů po aplikaci ... 93
4.4.4 Celkové zhodnocení ... 94
5 ZÁVĚR ... 96
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ ... 98
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ ... 105
8 SEZNAM OBRÁZKŮ ... 106
9 PŘÍLOHY ... 109

1 ÚVOD

Péče o lidskou pokožku je od pradávna jedním z odvětví, kterému se jako lidstvo věnujeme. Ať už ve formě zkrášlování našeho zevnějšku nebo snaze pomoci s hojením drobných ranek či vyrážek. Mnohé kosmetické úpravy těla nacházely svou podstatu v náboženských i společenských rituálech v téměř každé kultuře, která kdy existovala. Svou roli sehrála zejména dekorativní kosmetika při zvyšování atraktivity pro opačné pohlaví, s čímž souvisela snaha vypadat lépe a zvýšit tak své šance na nalezení partnera. Dnes tomu není jinak.

Zatímco dekorativní kosmetika má za cíl „vylepšit" stávající vzhled a podpořit naše přednosti, pečující kosmetika, kam bychom zařadili i balzámy na rty, se naopak snaží o „zdravě" vypadající pokožku s cílem navrátit nebo podporovat její přirozený stav a obnovovat kožní bariéru. Nelze se tedy divit, že každý z nás jistě doma najde například krém na ruce, po kterém většina sáhne, jakmile má pocit suchých rukou. Primárně nám takový krém pomáhá zahnat nepříjemný napjatý a drsný vjem, který ona suchá pokožka rukou vyvolává. Stejně tak je to s balzámy. Suché a rozpraskané rty nejsou nic žádoucího, jak z osobního pocitového pohledu, tak i z onoho dekorativního – z hlediska atraktivity vypadají hebké rty rozhodně lépe než ty suché, šupinaté a rozpraskané.

To samé se týká některého z onemocnění rtů. Vizuálně se buďto snažíme o skrytí takovýchto „vad", nebo jejich co nejrychlejší odstranění. Samozřejmě v případě závažnějších problémů je dobré využít dostupných léčiv nebo léků ve formě kosmetiky (například krémy, gely, lotia), kterou lze aplikovat topicky. Nicméně s většinou takovýchto komplikací nám zvládne pomoci i běžná pečující kosmetika nebo ji lze využít k podpoře léčby. Cílem této diplomové práce bylo věnovat se takové kosmetice, která by neplnila jen základní pečující účel, ale také měla „něco navíc".

Jelikož je onemocnění oparem jedním z nejběžnějších virových onemocnění, je ceněnou znalostí, jak průběh onemocnění usnadnit nebo urychlit. Ačkoliv jsou na trhu k dostání přípravky typu Zovirax, které obsahují aciclovir, nebo různé hydrogelové krycí náplasti, mají svá úskalí. Náplasti se velice rychle začínají odlepovat, zejména po jídle a pití, a často dochází ke stržení kůže z puchýřku nebo strupu a tím je zvýšeno riziko infekce a také bolest v postiženém místě. Naopak mastičky jsou vidět, snadno se dají ze rtů setřít a je potřeba dbát na hygienu rukou po jejich použití, aby případně nedošlo k zanesení přípravku nebo infekce na jiné části těla.

Z tohoto důvodu je dle mého názoru balzám na rty praktickým kompromisem. Pro osoby užívající balzám pravidelně by se jednalo o pohodlnou alternativu, se kterou by se jim snadněji fungovalo; pokud bude ve formě tubičkového aplikátoru, není potřeba jej nanášet prsty a tím se lze vyhnout kontaminaci jak produktu, tak sebe sama. Na rtech zůstává povětšinou alespoň několik desítek minut a nedochází k jeho setření třeba jen pouhým kontaktem rtů se sklenicí.

Cílem diplomové práce bylo využít snadno dostupné suroviny s prokázaným antivirovým účinkem vůči viru *Herpes simplex*. Z těchto důvodů se tato práce zabývá tvorbou takového balzámu, který by pomáhal s urychlením hojení a prevencí oparového onemocnění rtů dle zvolených ingrediencí, a studiem stability tohoto produktu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

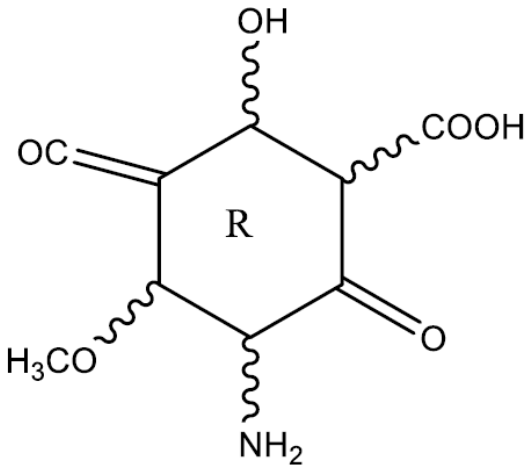
2.1 Využití huminových látek v kosmetice

Huminové látky jsou komplexní supramolekulární asociáty, které se skládají z velkého počtu relativně malých organických sloučenin, které mají svůj původ v tzv. humifikačním procesu. Tyto jednotlivé stavební kameny jsou formovány do supramolekulárního uspořádání prostřednictvím slabých vazebných interakcí. Tvoří až 80 % organické hmoty. Poprvé byly identifikovány roku 1761. Jsou esenciální složkou půdy, neboť zajišťují její výživnost, ale také napomáhají její regenerativní a ochranné funkci. Zdrojem bohatým na huminové látky je především samotná půda, ovšem významnými prameny jsou také rašelina, přírodní vody nebo organické bahno (sapropel) [1] [2] [3].

Huminové látky jakožto organické látky mají širokou škálu zajímavých fyzikálně-chemických vlastností, z nichž vyplývá jejich obrovský aplikační potenciál. Jejich základní rozdělení se většinou definuje na základě rozpustnosti jednotlivých frakcí. Rozeznáváme tak:

- fulvinové kyseliny;
- huminové kyseliny;
- huminy [3] [4].

Všechny tyto tři skupiny obsahují ve svých strukturách rozličné funkční části jako karboxylové, karbonylové, fenolické, aminové nebo hydroxylové skupiny. Ty všechny se podílejí na charakteristických vlastnostech, díky kterým jsou huminové látky využívány [3]. Jednoduchou reprezentaci struktury huminových látek představuje obrázek 1.



Obrázek 1 - Jednoduché znázornění struktury huminových látek, R=základ supra molekuly, převzato [1]

2.1.1 Rašelina a její využití v lázeňství a kosmetice

Původy využívání huminových látek jako něčeho, co tělo potřebuje ke své vnitřní očistě a detoxifikaci, můžeme nalézt zakořeněné v Ajurvédě. I jiné kultury si všimly zejména jejich protizánětlivých vlastností, a tak se již po staletí dostává materiálům, které huminové látky obsahují, zvláštní pozornosti například v lázeňství, kde je rašelina hojně využívána v balneoterapii, pro fyzioterapii nebo při léčbě revmatu. Rašelina sama o sobě obsahuje kromě

huminových látek také pektiny, celulózu, ligniny, vosky a minerální látky, které přispívají jejím blahodárným účinkům na lidský organismus [3] [4] [5].

Léčba rašelinou vychází z antického Řecka a Říma, kde se věnovali zejména hydroterapii (léčbě vodou). Z historického a zeměpisného hlediska jsou léčebné terapie za využití rašeliny specialitou především střední Evropy. Jak hydroterapie, tak balneoterapie či peloidoterapie (léčba bahnem) by se daly shrnout po souhrnný název naturopatie neboli přírodní medicína. Tento pojem vychází z premisy, že příroda sama má dar zahojit a regenerovat cokoliv pokaženého či nemocného, pokud je jedinec správně stimulován. Výše zmíněné procedury jsou dnes již běžné lázeňské postupy, které bývají pacientům zařazeny do péče při jejich regeneraci zejména pohybové soustavy nebo pokožky [6] [7].

Nepřekvapí tedy, že s rozvojem tohoto odvětví, které svou renesanci po antice zažilo opět v 18. a 19. století, ze které těžíme dodnes, jsou spojena známá jména jako například Vincent Priessnitz, který působil i v našich zemích, Sebastian Kneipp nebo Adolf Just, jejichž jména nesou dodnes kosmetické značky zabývající se primárně relaxační a léčebnou kosmetikou. S účinkem rašelinové terapie je také spojen její vliv na psychiku člověka. Důraz je kladen na vytvoření specifické atmosféry, aby bylo zklidněno nejen tělo, ale i mysl pacienta. To vychází z faktu, že na zdravotní stav má vliv jak fyzické rozpoložení organismu, tak i psychika, kdy zejména přetrvávající stres může velmi negativně ovlivňovat hojivé procesy [6].

Nutný posun však peloidoterapie (a obecně veškerá lázeňská léčba) musela překonat v době trvání procedur. Dříve trval pobyt v lázeňském zařízení z pravidla čtyři týdny, dnes se situace změnila v souvislosti s pracovní vytížeností pacientů, a tak je stále více vyhledáváno spíše ambulantní řešení. O to účinnější pak samotný zákrok musí být [6] [8].

Rašelina je pak především využita na tzv. rašelinové zábaly, které mají za cíl vyhřát postiženou oblast nebo pomoci s problematickou pokožkou. Rašelina zde přenáší teplo, jež je jí dodáno pomocí vodní lázně. teplota vyhřáté rašeliny se pohybuje mezi 60–65 °C, ovšem při kontaktu s pokožkou může být teplota až o 5 °C nižší. Taková procedura zároveň reaguje i na nutnost snížit potřebnou dobu trvání, neboť k prohřátí postiženého místa stačí zhruba 20–30 minut [8].

Za rašelinou a jejími blahodárnými účinky už dnes však nemusíme do lázní. K dostání je na trhu nepřeberné množství kosmetiky, jako například mýdla (obrázek 2), pleťové masky a krémy, zábaly či koupele, která ji obsahuje a která těží z benefitů, jež jí přináší hojně obsažené huminové látky. Proto veškeré další účinky popisuje následující kapitola pojednávající o kosmetických a medicínských vlastnostech huminových látek.

Obrázek 2 - Příklad produktu s obsahem rašeliny: rašelinové mýdlo, typicky zabarvené díky obsahu huminových látek; převzato z balneotrade.cz

2.1.2 Účinky huminových látek a jejich využití

Huminové látky byly, jsou a budou, podrobovány dalšímu zkoumání pro své objevené i neobjevené vlastnosti. Jejich účinek lze aplikovat v širokém spektru oborů a vědních oblastí. Níže jsou uvedeny jejich nejznámější vlastnosti a aplikace.

2.1.2.1 Adsorpční vlastnosti

Funkční skupiny, jež se na huminových látkách nachází, jako karboxylové a fenolové, umožňují vytvářet komplexy s ionty hořčíku, vápníku a železa. Jsou známé také tvorbou chelátů s ionty kovů, čímž regulují jejich biologickou dostupnost [5]. V půdě dokáží ovlivňovat pH a tím regulují aktivitu enzymů a hormonů. Taktéž jsou schopné sorbovat vodu a tím udržovat její koncentraci v půdě [9], stejně jako živiny [10].

2.1.2.2 Adstringentní účinek

Tento jev byl pozorován v souvislosti s léčbou nebo řešením jiných potíží u pacientů pomocí rašeliny. Adstringentní efekt se projevil při léčbě zánětlivých onemocnění pokožky, jako například lupénka, atopický ekzém nebo fokální hyperhidróza, tedy lokální nadměrné pocení. Díky použití huminových látek také došlo ke snížení svědění a výronu pupínků. Adstringentní účinek spolu v kombinaci s fungicidními vlastnostmi se taktéž nabízí jako řešení opruzenin a jiných kvasinkových infekcí [4].

2.1.2.3 Antioxidační vlastnosti

Huminové látky mají schopnost redukovat a kompenzovat dopad vlivu volných radikálů v lidském organismu. Tento efekt ústí mimo jiné v antivirový účinek huminových a fulvinových kyselin. Zatímco huminové kyseliny se soustředí spíše na antivirovou činnost, fulvinové kyseliny jsou antibakteriální a aktivují imunitní odpověď. Právě tato imunomodulatorní vlastnost ovlivňuje redoxní rovnováhu organismu a tím i celkový

fyziologický stav. Díky obsahu chinonových a polyfenolových struktur jsou tyto látky schopné zachycovat reaktivní kyslíkové molekuly a radikálové částice a minimalizovat jejich škodlivý účinek. Huminové látky jsou tak považovány za přírodní látky s detoxifikačním účinkem, které mají sílu zastavit počínající infekci a zesílit obrannou reakci těla [5] [11] [12].

2.1.2.4 Anti alergenní účinky

Fulvinové kyseliny ovlivňují taktéž imunitní odpověď organismu na alergie – snižují množství vyplaveného histaminu do krevního řečiště. Byla prokázána inhibice ekzému, jakožto jedním z možných projevů onemocnění imunitního systému člověka, pomocí výtažku z fulvinových kyselin [5].

2.1.2.5 Antibakteriální účinky

Zkoumané antibakteriální účinky byly testovány na mikrobiálních kmenech *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* nebo kvasinkách *Candida albicans*. Těmito účinky jsou známé především huminové a fulvinové kyseliny [4] .

Právě chinonové struktury, které jsou zodpovědné za antioxidační chování huminových látek, mají taktéž baktericidní/fungicidní účinek. Byl zkoumán útlum růstu plísňových patogenů na rostlinách, jenž byl dán do souvislosti s funkčními skupinami, jež se v molekulách huminových kyselin vyskytují. Fungicidní efekt může být ovšem ovlivněn pH okolí, jak prokázala studie zaměřující se na inhibici kultury *Candida utilis*. Nižší hodnoty pH usnadňují permeaci molekul kyseliny skrze buněčnou membránu, čímž narušují homeostázu buňky patogenu [11].

U půdy se antimikrobiální aktivita zvýšila 400–5000krát po přídavku humátu (300 ppm) do zeminy [13].

2.1.2.6 Antikoagulační účinky

Huminové látky mají vlastnosti urychlující rozpouštění krevních sraženin, pomáhají zastavit krvácení a tím i obnovu přirozeného toku krve v postižených oblastech. Huminové kyseliny spouští aktivaci plasminogenu na plasmin, který je zodpovědný za štěpení fibrinu v rozpustný fibrinogen. Také inhibují syntézu fibrinových monomerních jednotek a aktivitu trombinu – enzymu, jenž je za koagulaci zodpovědný [5] [7]. Čínská legislativa umožnila používat výrobky s obsahem huminových a fulvinových kyselin k léčbě hemoroidů [5].

2.1.2.7 Protizánětlivé účinky

Protizánětlivé účinky byly přirazeny huminovým látkám na základě pozorovaných výsledků při léčbě pomocí rašeliny. Humát sodný silně utlumuje vznikající otoky. Huminové kyseliny se vyznačují taktéž obrannými vlastnostmi biologických membrán. Inhibují aktivitu lipoxygenasy v kaskádě kyseliny arachidonové, která je integrální částí fosfolipidové membrány buněk [5].

Ve studii provedené R. Klöcking a kol. roku 1968 byl prokázán daleko silnější protizánětlivý účinek u humátu amonného, který překonává i sodnou sůl huminových kyselin a je dvakrát tak účinnější než například kyselina acetylsalicylová [7].

Naopak synetitcky připravené, nízkomolekulární deriváty huminových látek podporují funkci neutrofilů a tím i zánětlivou odpověď v lidském organismu [5].

2.1.2.8 Ochrana proti UVB záření

Bylo popsáno mnoho aspektů, díky kterým mají huminové látky velký potenciál jako kosmetické suroviny nebo léčivé aktivní látky. Jedním z případů je i příprava balzámu na rty, který díky obsahu huminových látek pomáhal bránit pokožku rtů vůči UVB slunečnímu záření. Studovaný produkt měl zároveň zabránit re-aktivaci oparového onemocnění díky vystavení léze slunečnímu světlu [14].

Humát amonný vykazuje stejné ochranné účinky vůči UVB záření jako *p*-aminobenzoová kyselina, jež je běžnou složkou opalovacích emulzí [4].

2.1.2.9 Další účinky

Jsou známy i případy, kdy se huminové látky přidávají i do potravin pro zvýšení antioxidačního efektu v organismu i mimo něj. Výzkum probíhal například na chlebu nebo koláčích s obsahem huminových látek, kdy výsledné produkty podlehly plísním o dva dny později, než produkty bez nich [1].

Použití huminových látek v medicíně je taktéž zkoumanou oblastí. Bylo prokázáno, že kombinace běžných léčiv spolu s huminovými látkami urychluje léčbu zánětu průdušek. Studie zkoumající účinek huminových látek v boji s a prevencí proti rakovině jícnu prokázala jejich 100% účinek. Fulvinové kyseliny velmi dobře hojí vředy v oblasti tlustého střeva [5].

Koupele s výtažkem z huminových látek pomáhají ve zhojení vředů na pokožce a přispívají k její dobré kondici. Tento efekt byl pozorován dokonce i u podpovrchových onemocnění [5]. Fulvinové kyseliny jsou považovány za látku s „anti-ageing“ efektem na pokožku. Jelikož se v organismu chovají jako elektrolyty a dokáží doplňovat minerální látky do organismu, pomáhají tak kožním buňkám obnovit jejich vnitřní rovnováhu. Zároveň ovlivňují kvalitu spánku a chuť k jídlu u starších osob, což ovlivnilo kvalitu života i u pacientů s demencí [5].

Huminové látky lze využít také jako „drug delivery“ systémy neboli nosiče léčiv, které jsou schopny zvýšit biologickou aktivitu nesené substance. Nesporným přínosem je způsob, kterým snižují toxický dopad mnohých léčiv na játra, než kdyby tato léčiva byla do organismu distribuována samostatně, jelikož stimulují jejich regeneraci. Huminové látky dokáží vytvářet klastry, které mohou při určitém pH precipitovat, čehož se při dizajnu nosičů dá využít [5] [13].

2.1.3 Antivirové vlastnosti huminových kyselin

Výzkum protivirových účinků byl rozvíjen po objevu pozitivního efektu na lidský organismus při léčbě kožních onemocnění a onemocnění dutiny ústní. Jejich aktivita jak proti otevřeným, tak proti virům uzavřeným v jejich proteinové kapsidě byla testována na mnohých virových kmenech, z nichž za zmínku stojí právě virus *Herpes simplex*, jemuž se ve své studii z roku 1997 věnoval i B. Helbig a kol. [15].

Huminové kyseliny a polyhydroxykarboxyláty patří mezi selektivní inhibitory viru *Herpes simplex* a fungují také jako blokátory replikace *Cytomegaloviru*. Byly dokonce zkoumány i účinky oxyhumátu, což je přirozeně se vyskytující derivát huminových kyseliny, proti viru HIV-1 s inhibiční koncentrací roztoku IC(50)=12,5 μg/ml. U HIV viru byla nevratně snížena

jeho infekčnost, zejména s využitím huminové kyseliny, která byla syntetizována z hydrochinonu [5].

Mechanismus účinku vůči oparům spočívá v zablokování receptorů buněk, na které by se jinak virus navázal. Tím pádem je mu zabráněno v adhezi na buňky, vniknutí do nich, což v konečném důsledku brání samotnému množení viru v buňkách hostitele. Při provádění pokusů na buňkách infikovaných virem *Herpes simplex* byly využity dva druhy solí huminových kyselin, a to humátu sodného a amonného. Účinná koncentrace, která inhibovala množení viru v 50 % buněk, byla pro humát sodný 18,2 μg/ml, pro humát amonný 17,8 μg/ml [5] [7].

Účinnější než samotný humát nebo huminové kyseliny jsou již jen jejich syntetické deriváty, jako například produkt oxidace kyseliny kávové (KOP) [7] [16].

2.2 Herpes simplex virus

Všechny viry ze skupiny *Herpesviridae* se vyznačují společnými znaky, mezi které patří dvoušroubovicová DNA, jež je uložena uprostřed těla viru v bílkovinné kapsidě, jež se skládá z 262 kapsomer. Velikost těchto virů se pohybuje mezi 120 a 300 nm. Nejvíce příbuznými jsou mezi všemi herpesviry právě HSV-1 a HSV-2, kdy se tyto dva genomicky shodují zhruba z 50 % [17] [18].

Historicky jsou onemocnění herpesviry známy již z antického Řecka, odkud pochází i samotný výraz *herpes*, značící sloveso plížit se a odkazující na průběh nemoci. Typické jsou léze vyskytující se v okolí rtů nebo genitálií. Aby se onemocnění u osob projevilo, musí přijít do kontaktu s virem skrze sliznici anebo poškozenou pokožku. Při replikaci viru dochází k jeho transportu po neuronech až k dorsálním gangliím, jež slouží jako rezervoár a kde dochází k vývoji latentního stádia, jež může být reaktivováno. Reaktivaci může mít na svědomí více faktorů – fyzický nebo emoční stres, lokální trauma, horečka, hormonální dysbalance, menstruace nebo vystavení se UV záření [17] [18] [19].

Onemocnění projevující se výsevem puchýřků a lézí zpravidla samo po dvou týdnech odezní. K léčbě oparů se využívají běžně dostupná antivirotická léčiva jako například aciclovir, popřípadě valaciclovir nebo famciclovir. Při setkání s rezistentní formou viru je možné k léčbě využít foscarnet. Při léčbě oparu je důležité udržovat infikovanou oblast nedotčenou, puchýřek by neměl prasknout, jelikož hrozí zanesení onemocnění na větší plochu [19].

2.3 Balzámy na rty

Balzámy na rty jsou kosmetické formulace, které se aplikují přímo na pokožku rtů. Na trhu je dostupné velké množství variant, nejčastěji ve formě tuhé tyčinky ve vysouvatelné tubě, ačkoliv nejsou výjimkou ani balzámy ve formě kelímků nebo viskózní kapaliny v tubách [20].

Na balzámy na rty jsou jakožto na dekorativní a zároveň pečující kosmetiku kladeny vysoké nároky. Musí splňovat nejen fyzikálně chemické limity jako dlouhodobá stabilita vůči teplotě, adheze na pokožce, mikrobiální odolnost, ale také organoleptické vlastnosti, mezi které patří vůně, vzhled, barva, chuť, jež jsou důležité pro zákazníka a tržní úspěšnost produktu [20] [21].

V literatuře toho přímo k balzámům na rty mnoho najít nelze a často jsou balzámy spojovány spolu se rtěnkami. Ačkoliv jde o zcela odlišné produkty svým účelem použití – rtěnky mají především dodat barvu, balzámy mají spíše pečující funkci – mají mnoho společného. U obou kosmetických přípravků jsou základem jejich složení mastné kyseliny a tuky, které fungují jako emolienty a určují jejich konzistenci. Rtěnky také zpravidla obsahují antioxidanty, pigmenty a parfemaci. Jejich složením lze ovlivnit dobu výdrže na pokožce. Pokud je v receptuře hojněji zastoupen vosk (včelí, karnaubský…), bude produkt lépe odolávat podmínkám okolí. Oba produkty vytvářejí film na povrchu rtů, který hydratuje, zvláčňuje tuto oblast a chrání ji před vnějšími vlivy, kterým je například UV záření [20] [21].

Balzámy na rty aplikujeme zpravidla jako prevenci proti vysychání pokožky. Jelikož jsou v tak blízkém kontaktu s dutinou ústní, nezřídka kdy dojde k jejich požití, a proto je potřeba dbát na kvalitu a bezpečnost surovin, ze kterých je balzám vyráběn. Balzámy z přírodních surovin nabízejí jednoduchou a přijatelnou cestu, jak o své rty pečovat. Bohužel díky tomu často trpí kvalita produktu, protože se výrobci vyhýbají konzervantům a jiným látkám a dlouhodobá stabilita takového balzámu je kratší než u produktů s částečně syntetickým složením [20] [21].

U všech kosmetických produktů musí být dbáno na jejich stabilitu a výdrž při běžných podmínkách použití, skladování a převážení, chemickou stabilitu, mikrobiální odolnost a kompatibilitu produktu s jeho obalem. Každý produkt by měl projít stabilitní studií, aby bylo známo, jak se jeho vlastnosti a kvalita vyvíjejí v čase nebo různých stresových podmínkách. Speciální požadavky jsou kladeny také na obalový materiál, který musí produktu pomoci dosáhnout nejvyšší možné výdrže před dobou expirace a ovlivňuje přímo jeho stabilitu [22].

2.4 Pokožka rtů

Ústa jsou pokládána za část obličeje, která dokáže upoutat nejvíce pozornosti. Oproti pokožce na těle, kde svrchní zrohovatělou vrstvu tvoří asi 15–16 vrstev, jsou na pokožce vrstvy 3 až 4, které musí zastat ochrannou funkci. Taktéž obsahuje kůže na rtech méně melaninu. I díky tomuto faktu je tato část tváře velmi dobře prokrvená, kapiláry jsou patrné a dodávají rtům jejich přirozeně narůžovělou barvu. Pokožka rtů nemá žádné mazové ani potní žlázy, které by zajišťovaly její promazávání a tím obnovu bariéry. Je proto nutné jí v tomto směru dodat vše potřebné zvenčí [21].

Jde o velmi namáhanou oblast, neboť ústa využíváme denně ke konzumaci, komunikaci a svaly pod nimi neustále pracují. Vzhled rtů hraje svou roli v atraktivitě jedince a také nám může o druhém leccos napovědět – na základě stavu rtů můžeme poznat, zda je člověk hydratovaný, nemocný, ale také mohou signalizovat jeho emoční rozpoložení, například okousané rty jsou náznakem stresu a nervozity. Taktéž je zde pokožka vysoce citlivá a na rtech se vyskytuje velké množství nervových zakončení [21].

Mezi nejčastější onemocnění rtů patří otoky, jakožto projev alergické reakce například na právě konzumovanou potravinu, záněty, kdy nejznámějším projevem jsou tzv. koutky, opary, puchýřky nebo možné pigmentové diskolorace a barevná nejednotnost [21].

2.5 Přehled ostatních ingrediencí a jejich vlastností

2.5.1 Včelí vosk

Včelí vosk tvoří základní ingredienci drtivé většiny balzámů na rty, které jsou dostupné na trhu. Jeho relativně vysoká teplota tání (60–70 °C [23], v poměru ke zbylým ingrediencím) a pevná struktura jsou důvodem dobré teplotní a mechanické odolnosti tohoto typu kosmetických produktů.

Z chemického hlediska jde o směs uhlovodíků s lichým počtem atomů, s nízkým výskytem aromatických sloučenin. Aroma včelího vosku ovlivňuje jeho původ a způsob zpracování. Procesem bělení dochází k ovlivnění některých vlastností včelího vosku, zejména vůně a tvrdosti, jež je tímto způsobem navýšena [23].

V kosmetice se využívá vzhledem ke svým antibakteriálním vlastnostem, které jsou známy již po staletí. Jeho účinek se uplatňuje například vůči bakteriím rodu *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli*, jež jsou v této práci využity ke stanovení antimikrobiálních vlastností a stanovení mikrobiální odolnosti balzámu na rty. Důležitou roli zastává včelí vosk při obnově bariérové funkce pokožky. Přispívá k retenci vlhkosti v pokožce a brání jejímu dalšímu vysoušení, což má pozitivní efekt zejména při hojivých procesech. Ze zpracovatelského hlediska přispívá včelí vosk jakožto zahušťovadlo k vyšší hustotě kosmetických produktů, kde je použit. Také má nedráždivé vlastnosti a nezpůsobuje alergické reakce [24].

2.5.2 Lanolin

Lanolin je žlutá voskovitá látka získávaná z ovčí vlny. Jejím cílem je chránit vlnu a pokožku ovcí před změnami klimatu. Využití lanolinu v péči o lidskou pokožku znali již starověcí Egypťané, Řekové a Římané. Často je mylně označován jako tuk, ačkoliv se ze své chemické podstaty jedná o vosk. Tvoří jej dlouhé esterové řetězce (z 97 %), které doplňuje malé množství alkoholů, ceramidů, kyseliny lanolové a uhlovodíkové řetězce. Dle výzkumu existuje až 20000 možných esterových kombinací, jež se v lanolinu mohou nacházet [25].

Lanolin, i když plní stejnou funkci jako lidský kožní maz, má svou strukturou a složením blíže k lipidům nacházejícím se ve svrchní zrohovatělé vrstvě pokožky *Stratum corneum*. Podobnost zapříčiňuje přítomnost sterolových látek, volných a esterifikovaných mastných kyselin, ceramidů a cerebrosidů. Z toho důvodu je ideální látkou pro obnovu přirozené kožní bariéry, neboť nevyvolává imunitní reakci organismu a pomáhá tak rehydrataci pokožky. Má významné emulgační schopnosti, kdy stabilizuje emulze typu voda v oleji [25].

2.5.3 Cocamidopropyl betain

Cocamidopropyl betain (CAPB) je povrchově aktivní látka odvozená z kokosového oleje. Může být vyráběn jak z přírodních surovin, tak synteticky a v obou formách je využíván v přírodní kosmetice. Jedná se o doplňkový surfaktant, který se využívá k zesílení pěnivosti nebo zahuštění výsledných kosmetických produktů [26].

2.5.4 Glycerin

Glycerin je vícesytný alkohol, v jehož struktuře se nachází tři hydroxylové skupiny. V rostlinách a živočiších se běžně vyskytuje v kombinované formě triacylglycerolů, jež dále fungují jako tuky, vosky nebo lipidy. Jde o viskózní kapalinu, která je mísitelná s vodou. V kosmetice má široké zastoupení, například v péči o vlasy nebo zuby, zejména jako humektant, složka vůní a jako látka upravující hustotu výsledného produktu [27].

2.5.5 Aloe vera šťáva

Aloe vera je rostlinou, která je využívána pro své hydratační a hojivé účinky. Obsažené gibereliny a glukomanany stimulují fibroblasty, které pak produkují kolagen. Mimo ty obsahuje více než 70 aktivních látek, mezi které patří vitaminy, enzymy, minerály, sacharidy, saponiny, aminokyseliny a kyselinu salicylovou [28].

Aloe vera se často využívá v kosmetice s „anti-age“ efektem. Podporuje prokrvení pokožky a zklidňuje ji při podráždění, zejména při jejím poškození slunečním zářením. Přílišný obsah barbaloinu a antrachinonu může vyvolat alergickou reakci [28] [29].

2.5.6 Vitamin C a Vitamin E

Vitamin C neboli kyselina askorbová patří do skupiny vitaminů rozpustných ve vodě. Valná většina savců si jej dokáže syntetizovat sama, ovšem v případě onemocnění je dobré jej přijímat ve vyšších dávkách. Z potravin jej obsahují hlavně citrusové plody, špenát nebo rebarbora. Vitamin C je v přímé spojitosti s funkcí imunitního systému. Jeho nedostatek stál v minulosti za kurdějemi, onemocněním, kterým trpěli zejména mořeplavci v dobách velkých námořních objevů v důsledku málo pestré a na vitamin C chudé stravy. Infekce v organismu zvyšují oxidativní stres. Vitamin C je antioxidantem, takže proti tomuto stresu pomáhá tělu bojovat [30].

Vitamin E zahrnuje skupinu 8 molekul zvaných tokoferoly. Tokoferoly mají tři chirální centra a izomery, které se přirozeně vyskytují, obsahují všechna centra v konfiguraci *R*. Všechny tokoferoly mají antioxidační aktivitu, ale nejvyšší mírou z nich oplývá α-tokoferol, který je také nejvíce biologicky aktivní. Jeho antioxidační efekt spočívá v reakci s peroxylovým radikálem mastných kyselin, jenž je přímým produktem oxidace mastných kyselin; přebírá tento radikálový charakter a stabilizuje jej [31].

2.5.7 Kokosový olej

V kosmetickém průmyslu je kokosový olej hojně vyžívanou surovinou, zejména pak jako panenský kokosový olej. Ten se od „obyčejného“ odlišuje zejména způsobem získávání a taky přirozeně se vyskytujícím obsahem vitaminu E, který brání oxidaci olejových složek. Skládá se hlavně z triglyceridů mastných kyselin. Hlavními složkami panenského kokosového oleje jsou kyselina laurová (45–52 %), myristová (16–21 %) a palmitová (7–10 %). Kokosový olej by si měl zachovávat své kokosové aroma [32].

Kokosový ojel má i v kosmetice značné množství benefitů. Jeho antioxidační a antistresová aktivita pomáhá snižovat dopad oxidačních jevů na organismus a předchází vzniku stresu spojeného s cvičením nebo onemocněním. Oxidativní stres v těle je také příčinou

hepatotoxicity. I té pomáhá předcházet právě kokosový olej. V kosmetice se využívá taktéž jeho protizánětlivých vlastností, hojivého účinku a hydratačního efektu. Monolaurin (monoglycerid kyseliny laurové) pak vyniká svými antivirovými účinky [32].

2.5.8 Barvivo z červené řepy

Červená řepa by se dala označit za jednu ze superpotravin dnešní doby. Má pestré látkové složení, jak uvádí L. Chen a kol. [33]. Toto složení, v přepočtu na 100 g, je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1 - Látkové složení červené řepy [33]

Druh látek	Obsah [g] na 100 g
Proteiny	1,68
Sacharidy	9,96
Tuky	0,18
Aminokyseliny	1,22
Mastné kyseliny	0,11
Fytosteroly	$2{,}50 \cdot 10^{-2}$
Minerální látky	0,48
Vláknina	2,00

Je bohatá i na antioxidační činidla, jimiž jsou zejména barviva, které jí dodávají její typickou purpurovou barvu. Patří zde hlavně polyfenoly a antokyany, ale i betanin, hlavní složka betalainiů. Betanin je v potravinářství znám jako E162, červené barvivo. Schopnost zastavovat vliv oxidantů je u betaninu dokonce vyšší než u antokyanů, což je dáno bohatým obsahem nenasycených vazeb na benzenových jádrech v jeho struktuře. Mimo barviva obsahuje červená řepa také vitaminy C a E, které mají taktéž jistou antioxidační aktivitu. Červená řepa je známá svým příznivým účinkem na organismus při léčbě rakoviny [33].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Chemikálie	Výrobce	Účel použití
Kokosový olej lisovaný za studena	dmBio	Olejové prostředí
Včelí vosk bílý	Ekokoza.cz	Zahušťovadlo
Lanolin	Ekokoza.cz	Emulgátor
Glycerin	Penta	Stabilizátor, zahušťovadlo, humektant
Aloe vera šťáva	Dr. Max Pharma	Vodné prostředí, humektant,
Humát draselný	TBIO Crop science	Aktivní látka s antivirovým účinkem
Vitamin C	Penta	Antioxidant
Vitamin E	Sigma-Aldrich	Antioxidant
Cocoamidopropyl betain (CAPB)	Ekokoza.cz	Ko-emlgátor, antimikrobiální složka
Barvivo z červené řepy	-	Barvivo, aktivní složka
Mandlový olej	Ekokoza.cz	Složka olejové fáze
Bambucké máslo	Ekokoza.cz	Složka olejové fáze
MQ voda	-	Prostředí pro analýzy aktivních látek
Methanol	Penta	Macerace červené řepy, fáze TLC
Ethanol	Penta	Fáze TLC
Propanol	Penta	Fáze TLC
Isopropanol	Penta	Fáze TLC
Ethylacetát	Penta	Fáze TLC
TLC silikagelové pásky	Sigma-Aldrich	Pevná fáze TLC
Pryskyřice DAX-8	Supelco	Pevná fáze separace humátu
Amberlite 120 IR, H^+ forma	Sigma-Aldrich	Pevná fáze separace humátu
Sabouraud dextrose broth	Himedia	Živné médium
Brain Heart Infusion broth	Himedia	Živné médium
LB broth (Lennox)	Sigma-Aldrich	Živné médium
Agar powder	Himedia	Ztužovač pro agarové misky

ABTS	Sigma-Aldrich	Základ pro tvorbu roztoku na měření antioxidační aktivity
Trolox	Sigma-Aldrich	Standard pro měření antioxidační aktivity
Plate Count Agar	Himedia	Univerzální živná půda

3.2 Použité přístroje a pomůcky

Běžné laboratorní sklo a nástroje

Magnetická míchačka s ohřevem (Heidolph)

Lyofilizátor (adVantage Pro, VirTis, US)

Rotační vakuová odparka (Heidolph)

Spektrometr Nicolet *i*S50 FT-IR (Thermo Scientific)

Analytická odstředivka LUMiSizer (Malvern)

Diferenční skenovací kalorimetr DSC Q2000 (Mettler Toledo)

Reometr Discovery HR-2 (TA Instruments)

Lednice (Liebherr Profi Line)

UV-VIS spektrofotometr (Hitachi)

UV-VIS spektrofotometr SPEKOL 1300 (Analytik Jena)

Biologický inkubátor (Binder)

Tlakový hrnec

Plynový chromatograf TRACE 1610 (Thermo Scientific)

Horizontální difúzní cely

UV-VIS spektrofotometrická sonda

DVS Advantage (Surface Measurement Systems)

pH indikační papírky

Euro Vector EA3000

TGA5500 (TA Instruments)

Ultrazvuková lázeň UCC1 (Powersonic)

Laboratorní třepačka IKA KS 4000 i control (IKA)

3.3 Charakterizace barviva z červené řepy

Jelikož je roztok humátu tmavě hnědé barvy a dopředu nebylo známo, jak moc ovlivní obarvení samotného balzámu na rty, bylo vybráno barvivo přírodního původu, které by samotné hnědé zabarvení bylo schopné zakrýt.

Z možných variant byla jako ideální vybrána červená řepa i vzhledem ke svým vlastnostem, které byly popsány v kapitole 2.5. Rozpouštědlo bylo vybráno na základě odborného článku [34], kdy se poté rozhodovalo mezi ethanolem a methanolem. Ačkoliv je ethanol pro použití v kosmetice přijatelnější, z důvodu nižší hodnoty bodu varu (64,7 °C [35]) a tedy i menší nutnosti tepelného namáhání barviva byl vybrán methanol.

3.3.1 Zpracování barviva

Přibližně dva kilogramy červené řepy byly omyty pod tekoucí vodou, najemno nastrouhány a přes noc macerovány v 1 l methanolu. Uzavíratelná krabice byla po celou dobu macerace uložena v lednici. Druhý den byl veškerý obsah přefiltrován skrze Büchnerovu nálevku za pomocí vakua do čisté odsávací baňky, odkud byl rozdělen na dvě části a ve dvou dvoulitrových baňkách s kulatým dnem postupně odpařen na vakuové rotační odparce. Zbylá nastrouhaná řepa byla ještě jednou macerována v půl litru methanolu po dobu zhruba pěti hodin, uložena v lednici a poté zfiltrována a zpracována stejným způsobem.

Pro odpařování bylo využito následující nastavení odparky: rychlost otáčení 250 RPM, teplota vodní lázně 60 °C a počáteční nastavení podtlaku na 600 mBar. Postupně s ubývajícím objemem bylo vakuum snižováno až na hodnotu 0 Pa, a to takovým způsobem, aby nedošlo k vypěnění obsahu baňky do chladiče.

Původním záměrem bylo dostat jako výsledek prášek, se kterým by byla jednoduchá manipulace při přípravě balzámu. Bohužel výsledkem byla viskózní kapalina podobná medu, která se obtížně dostávala z baněk ven. Pravděpodobným důvodem tohoto chování je fakt, že methanol z čerstvé řepy vyextrahoval nejen barvivé látky, ale také sacharidy, které jsou hygroskopického charakteru a zapříčiňují toto chování. Taktéž se z červené řepy uvolnila macerováním voda, která je s methanolem mísitelná a přispěla k celkovému charakteru výsledného vzorku. Proto byla kapalina naředěna destilovanou vodou a přelita do uzavíratelné lahve. Celkový objem tohoto roztoku byl 400 ml.

Takto naředěný roztok byl poté zamražen v mrazničce a poté lyofilizován podle nastavení popsané v tabulce 2. První fází bylo tepelné ošetření vzorku (kroky 1–6), v další fázi následovalo samotné sušení (kroky 7–12).

Výsledný lyofilizát (obrázek 3) byl překryt buničinou, obalen alobalem, aby bylo zamezeno přístupu světla a tím degradaci barviva, a uchováván v exsikátoru po celou dobu příprav a měření. Charakterizace tohoto lyofilizátu je popsána v následujících podkapitolách.

Tabulka 2 - Nastavení procesu lyofilizace

Zmražení vzorku			
Krok	***Teplota [°C]***	***Rampa [min]***	***Setrvání v kroku [min]***
1	0	15	60
2	–2	15	30
3	–5	30	60
4	–10	30	120
5	–15	60	120
6	–20	60	240

Sušení				
Krok	***Teplota [°C]***	***Rampa [min]***	***Setrvání v kroku [min]***	***Tlak [mTorr]***
7	–15	30	960	80
8	–10	60	960	240
9	–7	60	960	300
10	–5	60	960	500
11	–2	60	960	800
12	0	60	960	900

Obrázek 3 - Lyofilizát barviva z červené řepy

3.3.2 Stanovení rezidua methanolu

Pomocí plynové chromatografie bylo stanoveno reziduum methanolu v lyofilizátu barviva z červené řepy, aby bylo možné říct, že barvivo zbytkový methanol obsahuje v legislativně povolených mezích a je jej tak možné použít v kosmetice.

Analýza probíhala na přístroji TRACE 1610 firmy Thermo Scientific, což je plynový chromatograf, který je schopen analýzy v módu „head-space“, tedy analyzuje plyny nad vzorkem. V případě methanolu je vzorek potřebné zahřát nad teplotu varu analyzovaného rozpouštědla, aby se ze vzorku odpařilo a poté je plyn nad vzorkem nasán jehlou a analyzován na koloně.

V prvním kroku byl připraven 1% roztok methanolu ve vodě pro otestování pozice píku methanolu, který byl dále ředěn, aby byla ověřena dolní mez detekce a tím i stanovena hranice, pod kterou by se případná koncentrace methanolu ve vzorku vyskytovala. Pro toto stanovení bylo použito vždy 100 µl roztoku, který byl po dobu 25 minut zahříván při 80 °C, což by měla být dostatečně dlouhá doba pro vypaření a uvolnění methanolu. Zároveň byl také vzorek průběžně protřepáván, což je dobré v případě pevných sypkých vzorků, jakým je i lyofilizát barviva z červené řepy. Injektovaný objem plynu činil 1 ml. Plynný vzorek byl poté unášen vodíkem na kolonu ZB-642, která má délku 59 m, průměr 0,32 mm a tloušťka filmu tvoří 0,18 mm. Při kontaktu s plamenově ionizačním detektorem se plyn dostal až na teplotu 220 °C. Po převedení organických molekul plamenem na ionty byla měřena vodivost.

Pro zpřesnění měření byly vytvořeny tři navážky barviva, ve všech případech byla snaha navážit co nejvíce malých částic tak, aby byl vzorek dostatečně sypký a měl co největší specifický povrch a methanol se co nejlépe uvolňoval. Hmotnosti jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3 - Navážky barviva na GC analýzu

Vzorek	Navážka [g]
1	0,6548
2	0,5674
3	0,5351

3.3.3 IČ a Ramanovo spektrum

Základní charakterizace barviva byla provedena pomocí infračervené spektroskopie a Ramanovy spektroskopie. Jelikož je lyofilizovaný produkt směsí více látek, nelze tato spektra definovaně použit pro identifikaci barviva. Můžeme však stanovit, které vazby, případně skupiny, ba dokonce i strukturní motivy se v barvivu vyskytují. Pro infračervenou spektrometrii byl využit měřící režim na krystalu ATR, měření bylo realizováno na spektrometru Nicolet *i*S50 FT-IR.

Pro podrobnější stanovení obsahu jednotlivých složek a typů látek byl vybrán rozklad barviva na základě tenkovrstvé chromatografie a následná zpětná eluce a analýza samostatných složek, jak popisuje podkapitola níže.

3.3.4 Stanovení jednotlivých složek barviva pomocí TLC, DataColor a FTIR

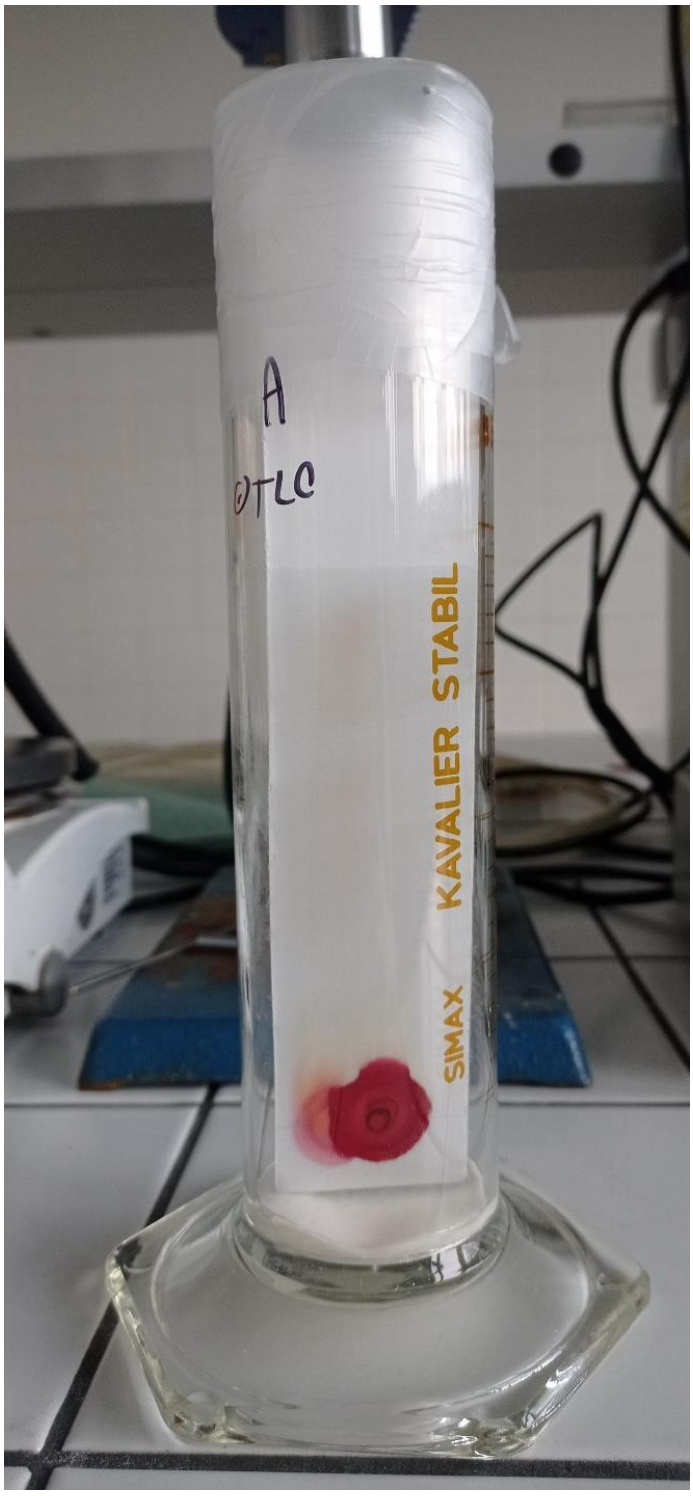
Pro rozklad lyofilizátu na jednotlivé složky byla zvolena metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC) a několik různých mobilních fází. Kombinace a poměry jednotlivých rozpouštědel ve fázích jsou uvedeny v tabulce 4. Fáze C zde záměrně uvedena není, neboť její měření nebylo realizováno.

Tabulka 4 - Složení TLC fází

Fáze	Rozpouštědla	Poměr [ml]
A	n-Propanol:Voda:Kyselina octová	85:14:1
B	Ethylacetát:Aceton:Methanol	20:20:40
D	Ethylacetát:Methanol:Voda	100:16,5:13,5
E	Methanol:Ethanol:H_2O	30:30:15

Přibližně 0,5 g lyofilizátu bylo rozpuštěno ve 4 ml mobilní fáze a poté byly tyto roztoky kapány na tenkou vrstvu silikagelu na uhlíkové folii, vždy každá kapka až poté, co předchozí plně zaschla. Celkově bylo na každou fázi použito 30 kapek a pokusy byly prováděny v duplikátech.

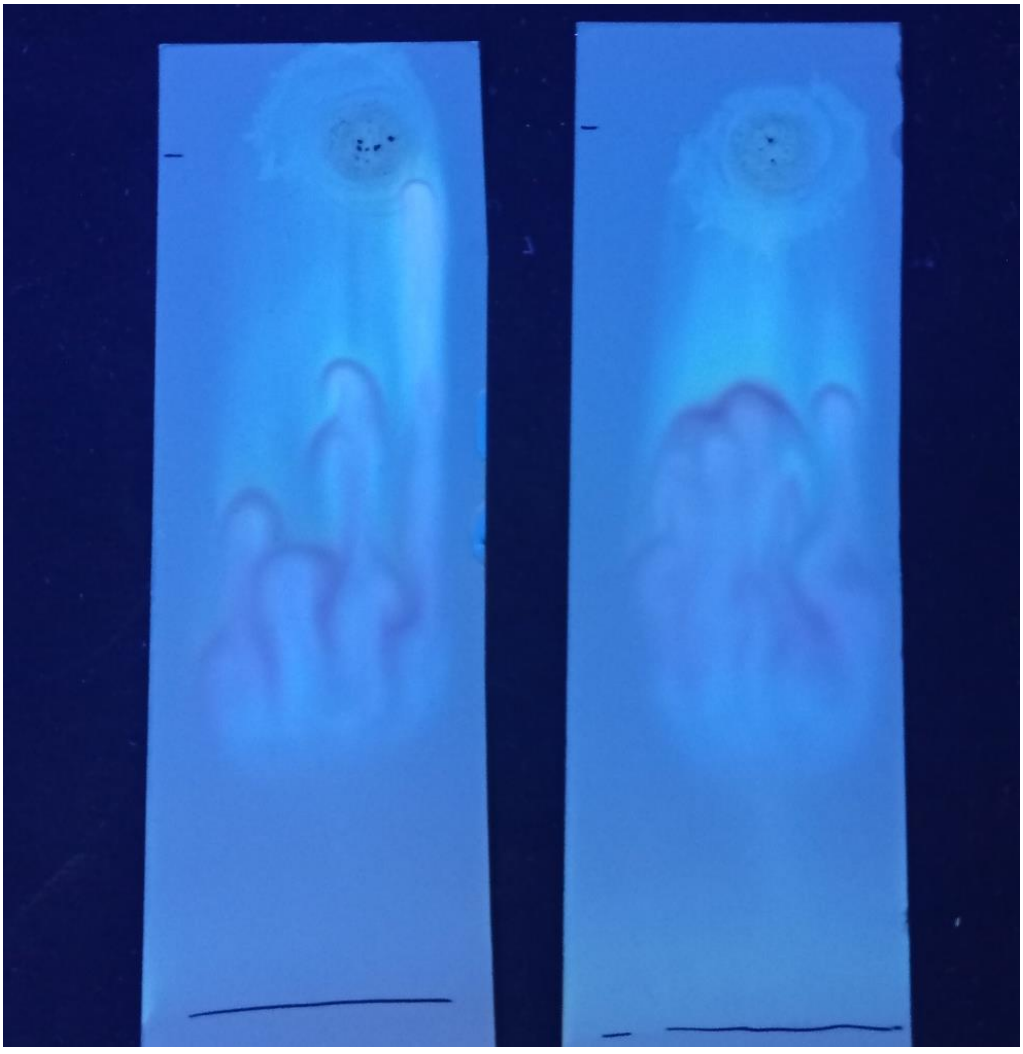
Na dno 250ml odměrného válce bylo umístěno 10 koleček filtračního papíru o průměru menším, než byl průměr samotného válce. Na ty byla nalita čistá mobilní fáze tak, aby její hladina končila hned pod posledním kolem filtračního papíru. Na filtrační papíry byl poté postaven pruh silikagelu s naneseným roztokem barviva v korespondující fázi, válec byl u hrdla obalen parafilmem, do kterého byly udělány otvory pomocí nůžek a aparatura byla takto ponechána stát při laboratorní teplotě dvě až tři hodiny v závislosti na rychlosti vzlínání jednotlivých fází. Tento proces zachycuje obrázek 4.



Obrázek 4 - Aparatura pro chromatografii na tenké vrstvě

Po zastavení procesu byly jednotlivé pásky silikagelu nechány k volnému odpaření použitého elučního činidla v laboratoři a pod denním světlem a UV lampou byly zhruba zjištěny jednotlivé barevné oblasti. To je ukázáno na obrázku 5 a 6. Jak je vidět, na denním světle se chromatografický vývin může jevit málo barevný nebo zcela bezbarvý, ovšem pod ultrafialovým světlem jsou patrné oblasti obsahující složky na denním světle neviditelné.

Obrázek 5 - Chromatografické vývíny na denním světle



Obrázek 6 - Chromatografické vývíny pod UV světlem

Zároveň byly jednotlivé chromatografické vývíny analyzovány na přístroji DataColor. Měření na přístroji probíhá skrze štěrbinu, která definuje analyzovanou oblast. Ta je osvětlena a je určeno její spektrum. Měření mělo za cíl zpřesnit hranice, kde se nacházejí jednotlivé složky barviva rozložené pomocí tenkovrstvé chromatografie a probíhalo v nastavení VIS.

Z každého vývinu bylo analyzováno několik oblastí, u kterých se zdálo nebo bylo patrné, že obsahují jinou barvu. Pozice vzorku byla vždy v přístroji upravena tak, aby analyzovaná plocha byla jednotně barvená. Z této oblasti pak bylo získáno spektrum, všechna spektra jsou součástí vyhodnocení v kapitole 4.1.2.

Přístroj se bohužel nepovedlo kalibrovat na menší štěrbinu, proto musí být data chápána jako orientační, ovšem k porovnání, zda se jedná o jiné složky v rámci jejich odlišných spekter, tato analýza naprosto postačuje.

Jednotlivé oblasti byly rozstříhány a rozděleny samostatně do vialek, k nim bylo přidáno malé množství elučního činidla (korespondujícího se složením mobilní fáze) a vzorky byly přes noc eluovány. Druhého dne byly jednotlivé eluáty měřeny pomocí infračervené spektrometrie metodou ATR. Takto získaná spektra byla využita pro identifikaci možných vyskytujících se funkčních skupin a z nich odvozených typů látek, které lyofilizát barviva z červené řepy obsahuje.

3.4 Charakterizace humátu

Použitý humát pro tvorbu balzámu je komerčně zakoupený HumiKey, tedy draselná sůl huminových kyselin. Jeho charakterizace byla provedena již dříve jakožto součást prezentace této látky v rámci konference IHSS ve Valticích konané roku 2020 [36].

V komerčním produktu HumiKey byl stanovován obsah huminových kyselin, ale také obsah fulvinových kyselin. Pro samotnou separaci byly potřeba skelněné kolony (délka 600 mm o průměru 50 mm a délka 250 mm o průměru 40 mm), hydrofobní pryskyřice DAX-8 a katex Amberlite 120 IR v H^+ formě. Postup separace huminových a fulvinových kyselin byl převzat z článku *A New Standardized Method for Quantification of Humic and Fulvic Acids in Humic Ores and Commercial Products* [37].

3.4.1 Izolace huminových a fulvinových kyselin

V první fázi byly naplněny kolony. Větší z nich obsahovala katex Amberlite 120 IR, H^+ forma, menší byla plněna pryskyřicí DAX-8, která byla nejprve aktivována methanolem a vodou.

Samotný postup izolace probíhal rozpuštěním zhruba 1 g vzorku v 1 dm^3 0,1M roztoku hydroxidu sodného. Ten se odstředil při 4000 ot/min^{-1} za dobu 20 minut, aby se odstranil nerozpustný podíl. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové bylo pH roztoku upraveno do rozmezí 1–2 tak, aby došlo k vysrážení huminových kyselin. To probíhalo po dobu 24 hodin. Následně byly vysrážené huminové kyseliny opět separovány pomocí centrifugace při 4000 ot/min^{-1} po dobu 20 minut, supernatant byl uchován pro izolaci fulvinových kyselin a sraženiny huminových kyselin byly opětovně rozpuštěny pomocí 100 ml 0,1M roztoku hydroxidu draselného s přídavkem 2,2 g chloridu draselného. Bylo opakováno srážení a centrifugace s opětovným uchováním supernatantu pro pozdější izolaci fulvinových kyselin. Vysrážené huminové kyseliny byly dialyzovány a v konečném kroku vymraženy a lyofilizovány.

Izolace fulvinových kyselin probíhala na menší z kolon, kdy byl celý objem supernatantu nadávkován na kolonu obsahující pryskyřici. Kolona byla promyta vodou promyta vodou, promývání bylo ukončeno při naměřené absorbanci $A_{350\,nm}$ <0,015. Následně byly fulvinové kyseliny desorbovány za pomocí 0,1M roztoku hydroxidu sodného, jejich desorpce byla ukončena při naměřené absorbanci vycházejícího roztoku $A_{350\,nm}$ <0,03. Poté následovala regenerace kolony, a to 0,1M roztokem kyseliny chlorovodíkové a vodou do srovnání pH přibližně na hodnotu 7. Roztok fulvinových kyselin byl opakovaně eluován kolonou, kdy eluce byla zastavena při naměření hodnoty vodivosti roztoku nižší než 120 $\mu S \cdot cm^{-1}$, kolona byla opět promývána vodou, promývání bylo zastaveno při hodnotách absorbance $A_{350\,nm}$ <0,015. Následovala regenerace katexu Amberlite 120 IR pomocí 2 l 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkové a poté proplachování vodou až do srovnání pH zhruba na hodnotu 7.

Fulvinové kyseliny byly následně zakoncentrovány na vakuové odparce, dialyzovány skrze membránu o velikosti pórů 500 Da, vzniklý roztok byl vymražen a lyofilizován. Lyofilizáty obou kyselin jsou vyobrazeny na obrázku 7.

Obrázek 7 - Lyofilizáty fulvinových (vlevo) a huminových kyselin, převzato [36]

3.4.2 Stanovení obsahu huminových látek

Z vytěžených produktů byl stanoven procentuální hmotnostní obsah jednotlivých složek ve vzorku, který byl poté srovnán s tvrzením výrobce. Pro stanovení zastoupení jednotlivých prvků byla využita elementární analýza (EA) v kombinaci s termograimetrií (TGA), kdy byly mezi sebou porovnány původní vzorek a vyextrahované huminové a fulvinové kyseliny. Z této analýzy byl stanoven obsah uhlíku, dusíku, kyslíku, vodíku a síry. Využity byly přístroje Euro Vector EA3000 a TGA5500 TA Instruments. Na závěr bylo v rámci charakterizace produktu využito taktéž infračervené spektrometrie v režimu FTIR DRIFT, ke které byl využit spektrometr Nicolet *i*S50 FT-IR Thermo Scientific.

Výsledkem, dle autorů, je zastoupení huminových kyselin 63,32 hm. %, fulvinových kyselin 18,20 hm. % a zbylých 18,48 hm. % produktu HumiKey tvoří hydrolyzované molekuly. Obsah huminových látek tak tvoří 81,52 hm. % [36]. Dle výrobce produktu je celkový obsah huminových látek 80 hm. %, fulvinové kyseliny by se pak měly pohybovat svým obsahem v rozmezí 15–20 hm. % [38].

3.5 Měření účinnosti barviva a humátu v kosmetice

3.5.1 Antioxidační vlastnosti

Antioxidační vlastnosti byly stanoveny metodou TEAC pomocí použití radikálového roztoku $ABTS^{\bullet+}$. Jde o kyselinu 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonovou), a tato metoda je jednou z nejhojněji využívaných pro stanovení obsahu látek s antioxidační schopností. Principem této metody je zhášení (odbarvování) modrozeleného roztoku radikálu látkami, které jej jakožto donory vodíkových atomů redukují.

Bylo připraveno 10 ml roztoku radikálu, a to přípravou 7,4mM roztoku ABTS (navážka 0,036 g) v destilované vodě, do kterého bylo naváženo a rozpuštěno 0,0066 g peroxodisíranu draselného. Takto připravený roztok byl ponechán ve tmě při laboratorní teplotě minimálně 12 hodin, aby zreagoval a teprve poté s ním bylo možné měřit.

Celé měření absorbance probíhalo při nastavení lampy na 734 nm na spektrofotometru Analytik Jana. Nejprve byla přichystána kalibrační řada. Měření se kalibrovalo roztokem Trolox, který byl nachystán v koncentracích 100, 200, 300, 400 a 500 μM. Před zahájením byl roztok $ABTS^{\bullet+}$ naředěn ethanolem zhruba 1:15 tak, aby se výsledná absorbance čistého roztoku radikálu při 734 nm pohybovala okolo 0,7. Kalibrační roztoky poté byly smíseny s roztokem radikálu v poměru 20 μl Troloxu do 2 ml $ABTS^{\bullet+}$. Tyto směsi byly ihned měřeny a byla odečítána jejich absorbance.

Po proměření kalibrační řady byly měřeny přichystané vzorky – roztoky samotného barviva, humátu a jejich kombinace, připravené ve dvou variantách, a to čerstvé a jeden měsíc staré. Toto pozorování pak bylo zahrnuto také do vyhodnocení stability barviva, kterému se věnuji v kapitole 3.7.6. Všechny měřené roztoky byly připravovány v poměru 3 ml roztoku radikálu $ABTS^{\bullet+}$ s 30 μl roztoku stanovované látky. Pro stanovení počáteční absorbance v čase nula byl připraven kontrolní vzorek, kde účinné látky nahrazuju jejich čisté prostředí, ve kterém byly rozpuštěny, tedy voda. Každý vzorek byl pak přichystán v triplikátech a měřen po deseti minutách od přídavku do roztoku radikálu, kdy byl po celou dobu uchováván ve tmě.

3.5.2 Antimikrobiální vlastnosti

U obou aktivních látek byla také vyvinuta snaha o prokázání jejich antimikrobiálních vlastností. K tomuto účelu byl využit jednoduchý difúzní diskový test, ke kterému jsou potřeba pouze agarové plotny s nakultivovanými mikrobiálními kulturami a sterilní disky.

Jako vhodné mikroogranismy pro studium těchto vlastností byly zvoleny *Candida glabrata, Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis*, které se běžně vyskytují na lidské pokožce [39] [40] [41]. Kultury byly připraveny dvojím přeočkováním, aby byla zajištěna jejich dostatečná viabilita pro testování. Pro kultivační média i agarové plotny byly využity následující substráty, které uvádí tabulka 5. Pro agarové plotny byl do připravovaného substrátu přidán navíc agar (dávkování 1,5 % celkového média, HIMEDIA), aby došlo k vytvoření pevné živné půdy pro difúzní testování.

Tabulka 5 - Živná média pro zvolené kultury

Kultura mikroorganismu	Živné médium	Dávkování
Candida glabrata	Sabouraud dextrose broth	3,9 g na 100 ml vody
Escherichia coli	LB broth	2 g na 100 ml vody
Staphylococcus epidermidis	Brain Heart Infusion	3,7 g na 100 ml vody

Každá z živných půd byla připravena na tři plotny, aby mohlo měření probíhat v triplikátech. Pomocí děrovačky byly z filtračního papíru vyrobeny difúzní disky, které byly následně vysterilizovány v autoklávu. Na agarovou plotnu pak bylo pipetováno 200 µl kultury, na níž byly položeny přichystané disky, na které bylo pipetováno 20 µl zkoumaného roztoku. Takto připravené difúzní testy byly inkubovány při 35 °C po dobu 1 týdne.

Zkoumanými roztoky byly samostatné roztoky humátu a barviva z červené řepy a jejich kombinovaný roztok, všechny připraveny v koncentracích, které byly použity v balzámu. Jako negativní kontrola posloužil roztok ethanolu, jako pozitivní kontrola naopak sterilní voda. Po 1 týdnu byly změřeny šířky inhibičních zón u jednotlivých disků.

3.5.3 Simulace difúze látek skrze pokožku

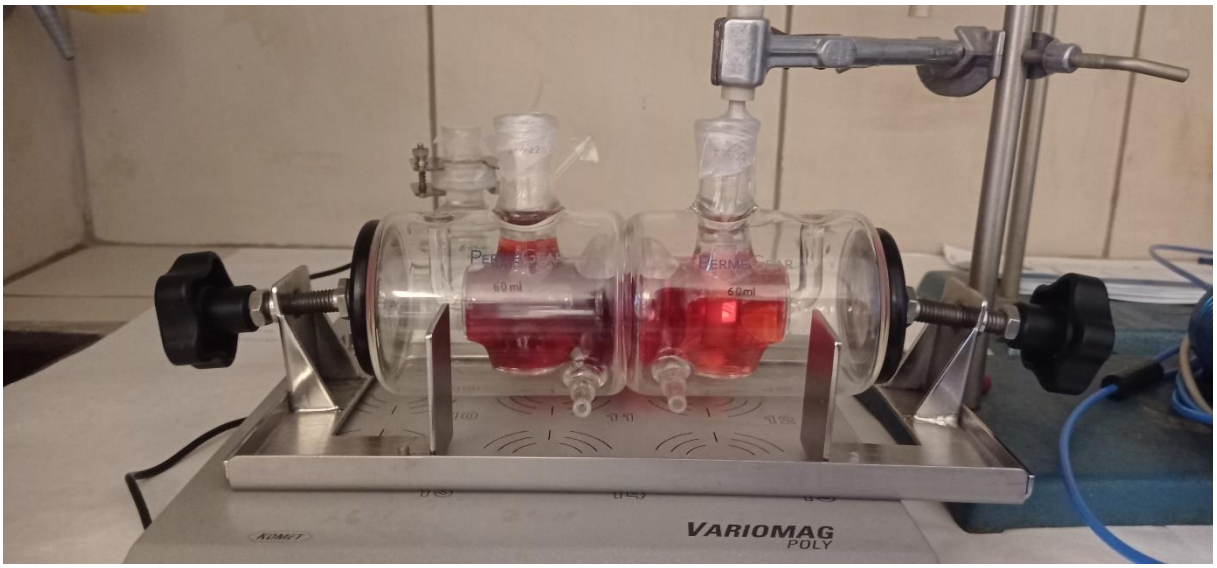
Pro doplnění znalostí o prostupu účinných látek pokožkou bylo zvoleno měření za použití difúzních cel. Jako prostupová bariéra byla zvolena polykarbonátová membrána s velikostí pórů 1 µm. Lidská pokožka má velikost póru pohybující se do 250 µm, přičemž závisí na fyzikálních podmínkách (teplo/chlad) a životnímu stylu, kterému je kůže vystavena [42]. Ačkoliv jsou dnes na trhu k dostání i takové membrány, které prostupnost pokožkou velmi přesně simulují, toto bylo zvoleno jako levnější a jednoduchá alternativa pro měření, jelikož póry jsou zde menší a pokud molekuly aktivních látek dokáží difundovat skrze tuto membránu, zcela jistě se dá určit, že budou procházet i skrze pokožku.

Aktivní látky byly rozpuštěny ve vodě, tím pádem do přijímací cely byla také použita MQ voda, aby bylo možné sledovat pouze látkový prostup a nemusely se brát v potaz další faktory. K měření byly využity sondy, které jsou schopny snímat průběh měření kontinuálně bez potřeby vzorek pipetovat do kyvet a vracet nazpět do přijímací cely. Měří se absorbance recipientního roztoku v celém spektru.

Pro ověření limitu měření a toho, zda jsme schopni vůbec průchozí látky registrovat, bylo nejprve proměřeno na spektrofotometru Hitachi celé spektrum původního roztoku. Ten byl příliš koncentrovaný, a tak se přistoupilo k jeho ředění. Výsledky jsou připojeny k vyhodnocení dat difúze v kapitole 4.3.4. Zároveň tato data posloužila jako provizorní kalibrační řada, takže bylo možné orientačně určit množství prošlých aktivních látek v čase skrze difúzní membránu.

Zahájení měření difúze je zachyceno na obrázku 8, obrázek 9 pak ukazuje donorovou a akceptorovou celu při ukončení měření. Měření probíhalo celkově 6 hodin se snímáním spektra co 2 minuty.

Obrázek 8 - Difúzní cely při zahájení měření prostupu vodné fáze s účinnými látkami



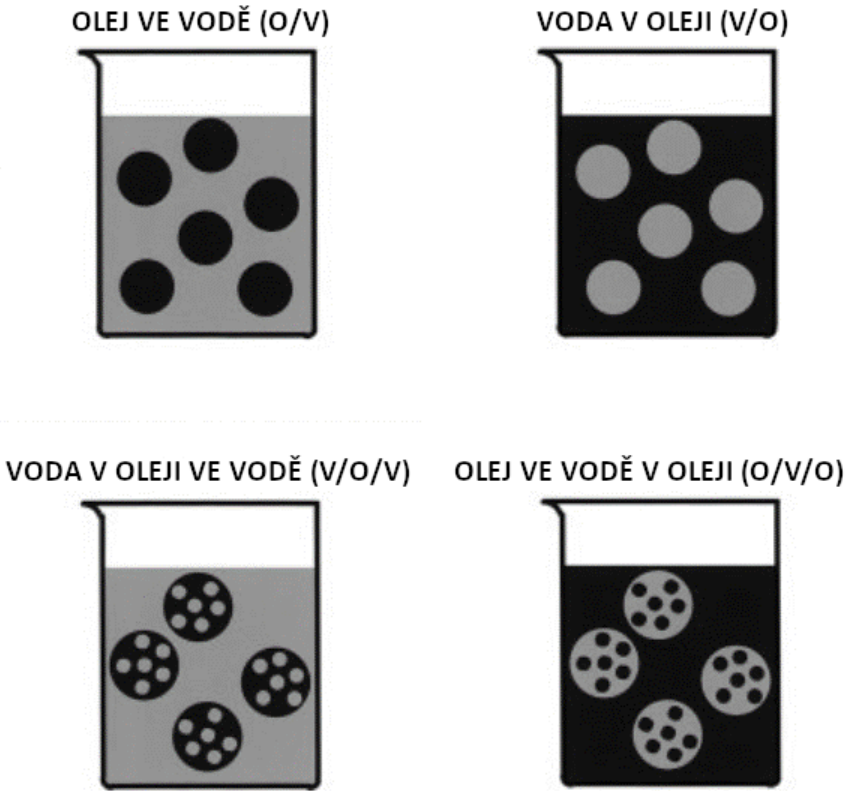
Obrázek 9 - Difúzní cely při ukončení měření

3.6 Vývoj balzámu na rty

Původní ingredience balzámu na rty byly vybrány jak pro své vlastnosti uváděné v literatuře, tak všeobecně známé. Ovšem bylo nutné vyzkoušet, jak spolu jednotlivé složky budou kooperovat a vytvářet balzám na rty.

3.6.1 Optimalizace receptury

Jelikož jsou obě hlavní aktivní složky, které balzám využívá, a to humát a řepné barvivo, rozpustné ve vodě, bylo nutné vymyslet, jakým způsobem mohou být zakomponovány do balzámu, který je již ze své podstaty spíše hydrofobního charakteru. Jako vhodnou variantou se jevilo využití emulze typu voda v oleji (V/O), kdy by aktivní látky byly rozpuštěny nebo dispergovány ve vodné fázi, která je následně dispergována ve spojité olejové fázi. Emulze a jejich typy jsou vyobrazeny na obrázku 10 [43].



Obrázek 10 - Typy emulzí, převzato a upraveno [43]

Bylo důležité zvolit vhodný způsob emulgace a vybrat vhodný emulgátor, který by byl schopný stabilizovat zvolené množství a typy olejových složek. Aby bylo omezeno zkoušení na opravdových surovinách a tím omezen i odpad, byly využity internetové HLB kalkulačky. Většina takovýchto systémů pracuje na podobné bázi, a to porovnáváním jednotlivých HLB čísel v závislosti na množství použité olejové složky a z toho odvozenou „silou“ potřebnou k jejich stabilizaci v emulzi, tedy HLB číslem emulgátoru, který je zamýšlen pro použití. HLB (*Hydrophili-Lipophile Balance*) číslo je parametr, který udává míru hydrofility dané složky. Poprvé jej popsal v roce 1949 William C. Griffin [44].

Emulze typu voda v oleji se vyznačuje nižšími hodnotami HLB čísel pro emulgátory a v konečném důsledku i pro jednotlivé komponenty olejové fáze [45] [46]. Jak je vidět na obrázku, je nutné, aby se výsledné hodnoty HLB pro olejové složky a vybraný emulgátor příliš nelišily. Jak uvádí samotné webové stránky HLB kalkulačky, tento rozdíl hodnot by neměl být větší než 2 [45]. Kategorie emulgátorů a jejich chování na základě hodnoty jejich HLB čísla udává tabulka 6.

Tabulka 6 - HLB klasifikace látek, převzato [47]

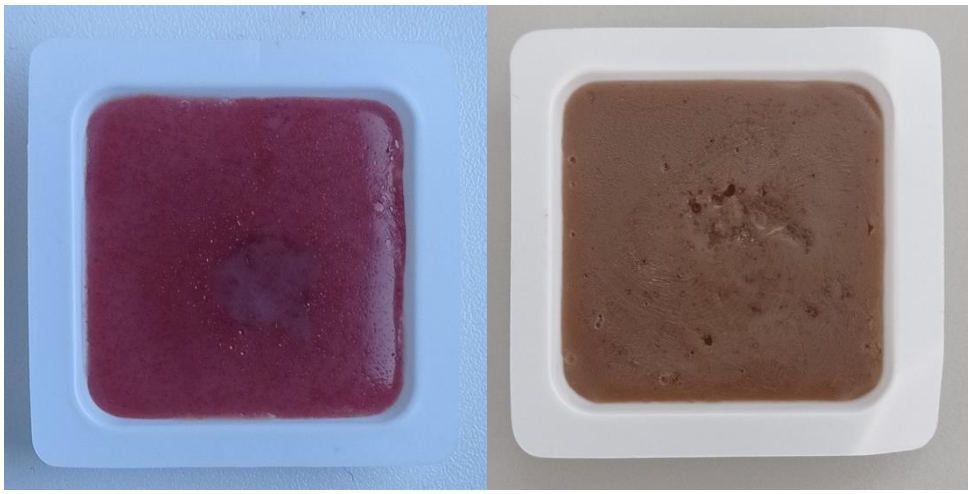
Interval HLB	**Oblast aplikace**
1–3	Proti-pěnivý přípravěk
3–6	V/O emulgátor
7–9	Smáčedlo
8–16	O/V emulgátor
13–15	Detergent
15–18	Rozpouštědlo

Jeden z prvních pokusů obsahoval suroviny a jejich poměry uvedené v tabulce 7. Při výpočtu bylo využito on-line HLB kalkulačky pro tvorbu emulzí [45].

Tabulka 7 - Výpočet první receptury

Surovina	**Obsah [%]**	**Navážka [g]**
Ingredience na vodní bázi		
Aloe Vera šťáva	10,0	4,0
Gylcerin	3,0	1,2
Ingredience na olejové bázi		
Mandlový olej	15,0	6,0
Kokosový olej	50,0	20,0
Ostatní ingredience		
Řepné barvivo	0,5	0,2
Humát draselný	0,5	0,2
Emulgátory		
Emulgační vosk č. 3	8,0	3,2
Včelí vosk	13,0	5,2

Z takto navážených surovin byl připraven první vzorek tak, že olejové složky byly spolu s emulgátory rozpuštěny na vodní lázni o teplotě 80 °C při rychlosti míchání magnetickým míchadlem 600 RPM. Do olejové fáze byla po kapkách přidávána fáze vodná spolu s barvivem a humátem, zahřátá na 60 °C, zhruba rychlostí 1 kapka za sekundu. Jakmile byl celý objem vodné složky nadávkován do emulze, byl balzám promíchán ještě na dispergátoru při otáčkách 2000 RPM po dobu 1 minuty. Vzorky byly nality do malých váženek, ponechány k vychladnutí, překryty parafilmem a uloženy do skříňky do druhého dne pro „vyzrání“. Vzorek s obsahem řepného barviva, humátu a vzorek čistě s humátem je na obrázku 11.



Obrázek 11 - První vzorky balzámů

Jak je vidět v pravé části obrázku, obsah humátu musel být upraven, neboť jej bylo příliš. Byl proto proveden přepočet ideálního obsahu na základě publikace R. Klöckingové a B. Helbiga [7]. Ti uvádějí, že inhibiční koncentrace IC_{50} pro humát amonný je 17,80 µg/ml. Pro humát sodný je naopak 18,20 µg/ml. Byla tedy zvolena průměrná hodnota těchto koncentrací, a to 18,00 µg/ml. Byl proto zvolen přepočet těchto koncentrací s aproximací, kdy 40 g balzámu zhruba odpovídá 40 ml, proto by výsledná použitá koncentrace měla být 0,72 mg.

Jelikož se jedná o výpočet účinné koncentrace v polovině případů (IC_{50}), byla koncentrace použitá do balzámů zvýšena dvojnásobně i s předpokladem, že ne všechno množství ihned projde pokožkou k postiženému místu. Druhá receptura byla opět teoreticky přepočítána, aby byla zjištěna její možná stabilita a je uvedena v tabulce 8. Jelikož se první pokus zdál býti příliš tvrdý, bylo taktéž upraveno množství použitého včelího vosku a zvýšeno množství použitého barviva.

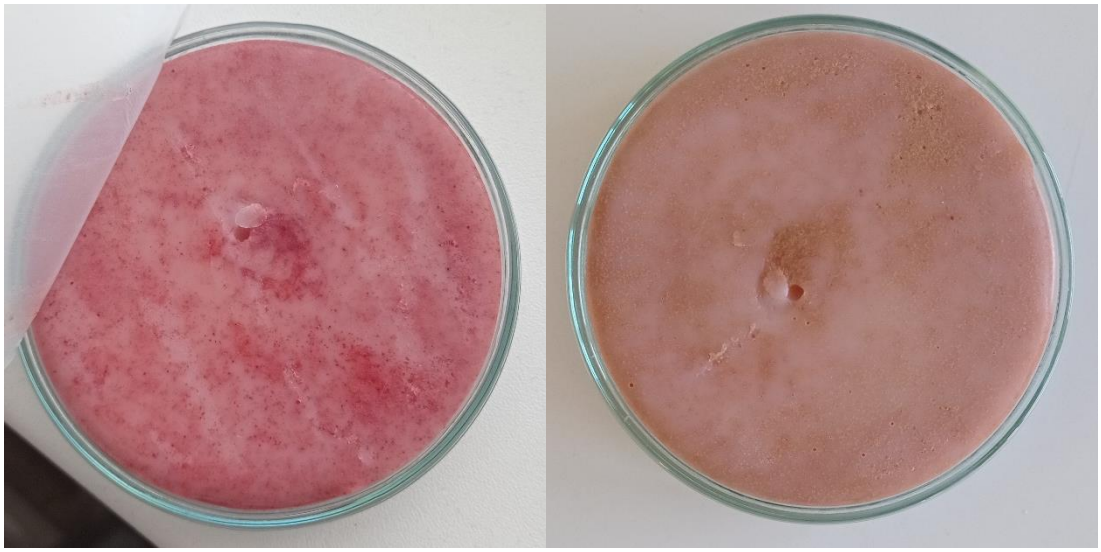
Tabulka 8 - Receptura s přepočteným množstvím humátu draselného

Surovina	Obsah [%]	Navážka [g]
Ingredience na vodní bázi		
Aloe Vera šťáva	10,0	4,0
Gylcerin	3,0	1,2
Ingredience na olejové bázi		
Mandlový olej	15,0	6,0
Kokosový olej	50,0	20,0
Ostatní ingredience		
Řepné barvivo	4,0	1,6
Humát draselný	$4 \cdot 10^{-3}$	$1{,}6 \cdot 10^{-3}$
Emulgátory		
Emulgační vosk č. 3	8,0	3,2
Včelí vosk	10,0	4,0

U tohoto vzorku byl použit stejný způsob přípravy jako u předchozích, pouze se změnil způsob uskladnění – balzám již nebyl nalit na váženky, ale do 50ml šroubovací nádobky. V tomto balení bylo také možné pozorovat další jev, který bylo nutné pro přípravu balzámu optimalizovat, a sice nedostatečná dispergace vodné fáze. Jak ukazuje obrázek 12, jednotlivé kapičky vodné fáze jsou příliš velké, a tak během tuhnutí stihnou sedimentovat na dno nádoby a balzám je tak jak barevně, tak látkově nehomogenní. Tato problematiku a její náprava je podrobněji rozebrána v kapitole 3.6.2.

Po zhruba 14 dnech začal být patrný také jiný jev, a to odbarvování balzámu. Jeho světle růžové zabarvení začalo přecházet ve žluté až hnědě, jak je ukázáno na obrázku 13. Jako řešení se zdálo zahrnutí antioxidantů do receptury pro předcházení oxidace barviva. Jako ideální byly zvoleny vitamin E a vitamin C, které mimo svůj dobrý přínos pro organismus mají taktéž dobré výsledky při synergickém účinku [48]. Proto následovaly další úpravy a přepočty receptury.

Obrázek 12 - Nedostatečná dispergace vodné složky balzámu a její následná sedimentace



Obrázek 13 - Změna barvy balzámu

Upravený návrh receptury obsahoval šťávu z Aloe Vera, glycerin, mandlový a kokosový olej, kyselinu askorbovou, vitamin E, řepné barvivo, humát, včelí vosk a glyceryl stearát. Výpočet z internetové HLB kalkulačky pro celkovou navážku 40 g balzámu je uveden v tabulce 9. Při jeho přípravě byl využit inovovaný postup, který je uveden v kapitolách 3.6.2 a 3.6.4.

Tabulka 9 – První teoretický výpočet upravené receptury balzámu

Surovina	**Obsah [%]**	**Navážka [g]**
Ingredience na vodní bázi		
Aloe Vera šťáva	12,0	4,8
Gylcerin	3,0	1,2
Ingredience na olejové bázi		
Mandlový olej	15,0	6,0
Kokosový olej	45,0	18,0
Ostatní ingredience		
Vitamin C (askorbát)	2,5	1,0
Vitamin E	0,5	0,2
Řepné barvivo	4,0	1,6
Humát draselný	$4 \cdot 10^{-3}$	$1{,}6 \cdot 10^{-3}$
Emulgátory		
Emulgační vosk č. 3	8,0	3,2
Včelí vosk	10,0	4,0

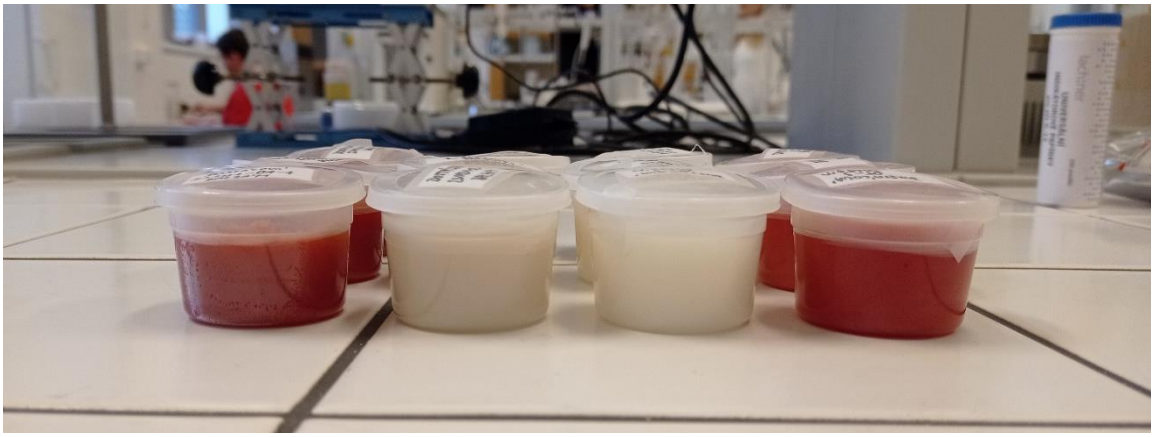
U receptury č. 3, uvedené v tabulce 9, byly kvůli celkovému chování vzorku upraveny poměry jednotlivých surovin tak, aby složení odpovídalo tomu uvedenému v tabulce 10. Zároveň byl snížen obsah včelího vosku vzhledem k faktu, že jeho maximální koncentrace v kosmetice dle uvedení výrobce na obalu může být pouze 8 % hmotnosti výrobku. Druhá varianta receptury byla subjektivně příjemnější konzistence, bylo proto pokračováno s přípravou dalších vzorků a testování jejich stability na analytické odstředivce, o čem pojednává kapitola 3.6.3.

Připravená receptura č. 4 (tabulka 10) byla po odzkoušení vybrána jako natolik stabilní, že dle její předlohy byly připraveny zamýšlené finální vzorky pro posouzení stability. Pro stabilitní studii bylo zamýšleno pět sérií vzorků v triplikátech, a to vzorky s obsahem řepného barviva a humátu, vzorky pouze s barvivem, vzorky pouze s humátem, kontrolní vzorky bez obou látek a vzorky opět s obsahem obou látek, které byly na rozdíl od předešlých zmíněných uskladněny v lednici. První čtyři série byly uskladněny při laboratorní teplotě ve skříňce ve tmě.

Tabulka 10 - Druhý teoretický výpočet upravené receptury balzámu

Surovina	Obsah [%]	Navážka [g]
Ingredience na vodní bázi		
Aloe Vera šťáva	15,0	6,0
Gylcerin	3,0	1,2
Ingredience na olejové bázi		
Mandlový olej	15,0	6,0
Kokosový olej	47,0	18,8
Ostatní ingredience		
Vitamin C (askorbát)	2,5	1,0
Vitamin E	0,5	0,2
Řepné barvivo	3,0	1,2
Humát draselný	$4 \cdot 10^{-3}$	$1{,}6 \cdot 10^{-3}$
Emulgátory		
Emulgační vosk č. 3	7,0	2,8
Včelí vosk	7,0	2,8

Vzorky byly po 14 dnech od přípravy převzaty k prvotní analýze. Zde se ovšem projevila nekvalita použitého obalového materiálu, neboť kelímky popraskaly a vzorkům tak pravděpodobně napomohly k degradaci. Zároveň se zdálo, že se ze struktury balzámu oddělila některá z kapalných složek, jak ukazuje obrázek 14. Proto bylo také přistoupeno ke změnám v obsažených složkách. Jako emulgátor byl využit nově lanolin, jako ko-emulgátoru se využilo CAPB (cocoamidopropyl betain), který zároveň účinkuje jako konzervant a měl by působit preventivně proti mikrobiální degradaci. Z receptury byl vyřazen emulgační vosk č. 3 a mandlový olej.



Obrázek 14 - První finální vzorky, které podlehly degradaci vlivem složení a defektům obalového materiálu

Bohužel zde se projevil limit on-line HLB kalkulaček, jelikož neumí počítat s tím, že některé látky mohou mít dvojí charakter, jako například lanolin, který je složkou hydrofobní fáze, ale zároveň má vlastnosti stabilizující emulze typu voda v oleji, podobně je na tom včelí vosk. Proto byla následující receptura, kterou uvádí tabulka 11, vytvořena na základě experimentálních pozorování a její stabilita byla odzkoušena na analytické odstředivce. Zároveň byly také vzorky týden pozorovány, zda se jejich chování nějak výrazně změní.

Tabulka 11 - Receptura s obsahem lanolinu a CAPB

Surovina	**Obsah [%]**	**Navážka [g]**
Ingredience na vodní bázi		
Aloe Vera šťáva	15,0	6,0
CAPB	2,5	1,0
Gylcerin	3,0	1,2
Ingredience na olejové bázi		
Kokosový olej	47,0	18,8
Ostatní ingredience		
Vitamin C (askorbát)	2,5	1,0
Vitamin E	0,5	0,2
Řepné barvivo	3,0	1,2
Humát draselný	$4 \cdot 10^{-3}$	$1{,}6 \cdot 10^{-3}$
Emulgátory		
Lanolin	7,0	2,8
Včelí vosk	7,0	2,8

Poté, co byla tato receptura vyhodnocena jako vyhovující, byla zahájena příprava finálních vzorků pro posouzení stability, kterou popisuje kapitola 3.6.3. Po drobných úpravách byla vytvořena finální receptura, kterou popisuji v kapitole 3.6.4.

3.6.2 Optimalizace postupu přípravy

V přípravě emulzí bylo vycházeno ze zkušeností nabytých při zpracování bakalářské práce. Jako základní postup byla proto zvolena přímá emulzifikace, tedy přidávání disperzního podílu do kontinuální fáze [43]. Teplota pro tvorbu emulze byla odvozena od látky s nejvyšším bodem tání, v tomto případě byl určující včelí vosk, který taje při 60–70 °C [23]. Teplota vodní lázně tak byla nastavena na 80 °C.

Při prvních pokusech byla vodná fáze přidávána po kapkách do olejové fáze, celá směs byla míchána rychlostí 800 RPM a poté minutu dispergována. Tento postup se bohužel neověřil, protože kapičky disperzního podílu byly příliš málo rozmíchány a také byly natolik objemné, že v postupně chladnoucím balzámu sedimentovaly ke dnu, jak již bylo ukázáno na obrázku 12.

Jako první řešení se nabízelo delší míchání vzorku, aby alespoň částečně vychladnul, což ovšem opět končilo sedimentací dispergované složky, v důsledku čehož byl výsledek nehomogenní jak vizuálně, tak koncentračně.

Druhým návrhem, jak tomuto chování zabránit, bylo prodloužení času a intenzity mechanické dispergace. Zde ovšem, jak je vidět na obrázku 15, docházelo k degradaci barviva a vysrážení vodné fáze.

Obrázek 15 - Vzorek balzámu po nadměrné mechanické dispergaci

Jako další možný způsob dispergace emulze byl vyzkoušen ultrazvuk. Původně bylo zamýšleno smíchat balzám obvyklým způsobem, tedy přídavkem vodné fáze do olejové po kapkách při rychlosti míchání 800 RPM pomocí magnetického míchadla a ohřevu vodní lázní na 80 °C, a následné chlazení probíhalo nejprve při odtavení ohřevu směsi za stálého míchání míchadlem a teprve poté byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně. Bohužel vzorek stačil zatuhnout rychleji, než bylo přepokládáno a také se opět projevil vliv sedimentace, jelikož při míchání stačily kapičky dispergované fáze opět klesnou více ke dnu kádinky.

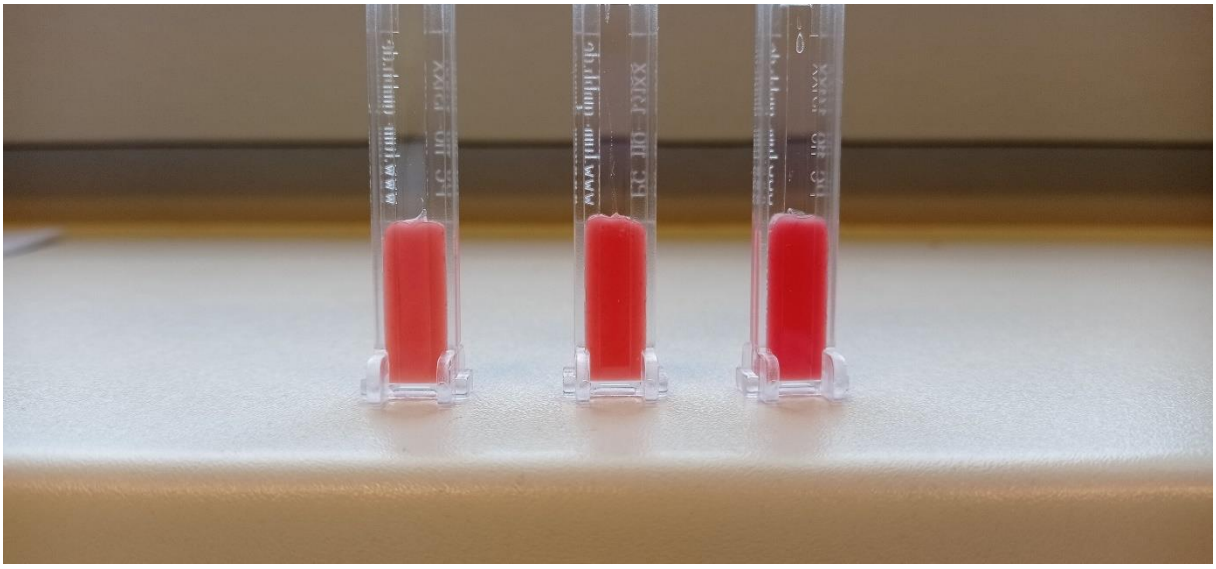
Proto byla vyzkoušena střídavá metoda – vzorek se po celkovém smísení vždy 30 sekund míchal při 800 RPM, poté byl na 30 sekund vložen do ultrazvukové lázně. Tento cyklus se opakoval pětkrát, kdy finálním krokem bylo ještě konečné promíchání, po kterém následovalo lití balzámu do připravené nádoby. Zároveň byla ultrazvuková lázeň využita pro přídavek Vitaminu E do balzámu, jelikož vzorek již nebyl tak horký, aby došlo ke znehodnocení tokoferolu. Tento postup se osvědčil jako nejlepší z hlediska homogenity výsledného produktu, účinnosti dispergace a taktéž fungoval s pozměněným složením, ke kterému došlo před přípravou finálních vzorků, jehož důvod je zmíněn výše v kapitole 3.6.1.

3.6.3 Posouzení primární stability receptury

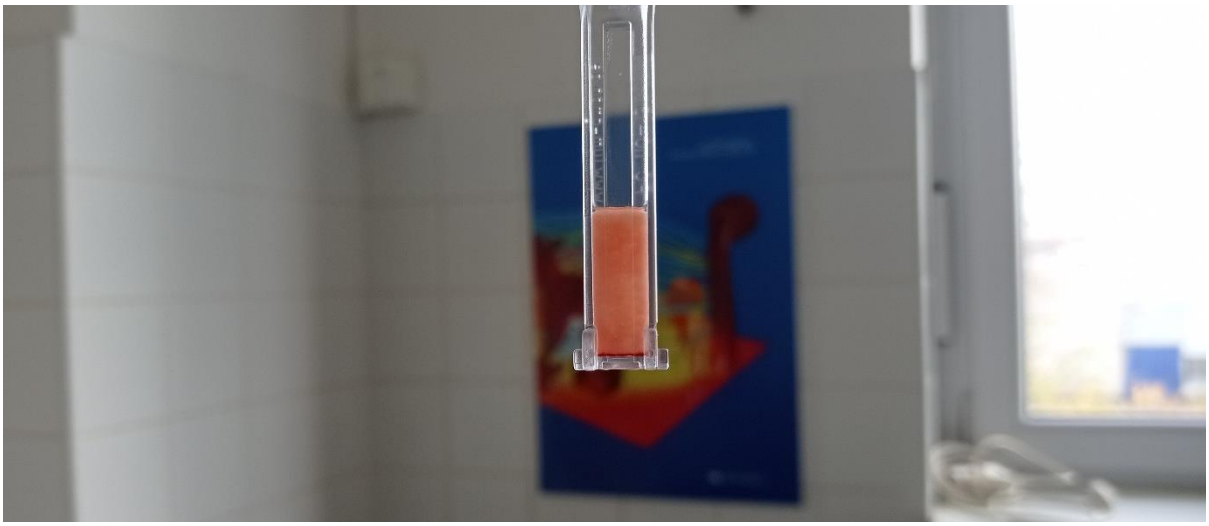
Stabilita připravených receptur byla posouzena na analytické odstředivce LUMiSizer od společnosti Malvern. Využity při tom byly polykarbonátové kyvety LUM 2mm, PC, Rect. Synthetic Cell (110-131xx). Měření funguje na principu zjištění transmitance v celé optické dráze kyvety. Pokud dojde k rozdělení fází, dojde i ke změně hodnoty míry procházejícího světla. Díky tomu lze identifikovat index nestability i čas, při kterém k počátečním projevům nestabilního chování začalo docházet. Tato analýza byla využita k primárnímu posouzení, zda vizuálně na první pohled stabilní vzorek nedegraduje v čase a zda je jeho receptura vhodným adeptem na přípravu vzorků pro konečnou dlouhodobou stabilitu.

Vzorky byly nadávkovány do 10ml stříkaček a dlouhou jehlou plněny ode dna do přichystaných a označených kyvet tak, aby bylo zamezeno případnému vzniku vzduchových bublin nebo potřísnění stěn měřící části kyvety. Poté byla vytvořena metoda měření na přístroji a kyvety byly podle pokynů odstředivky uloženy do rotoru. Rychlost odstřeďování vzorků byla 4000 RPM, snímání probíhalo ve čtyřech cyklech po 150 zaznamenávaných profilech v intervalech 30 sekund. Celé měření probíhalo při 25 °C, aby teplota korespondovala se zamýšleným měřením dlouhodobé stability v čase, která je hlavní náplní této diplomové práce a která byla taktéž měřena při pokojové teplotě.

Na obrázku 16 jsou vidět naplněné kyvety před spuštěním měření a obrázek 17 zobrazuje kyvetu po již proběhlém měření. Jak je možné zpozorovat, během měření došlo k částečnému oddělení fází, což značí červená linka na dně kyvety. Jde o část oddělené vodné fáze s barvivem.



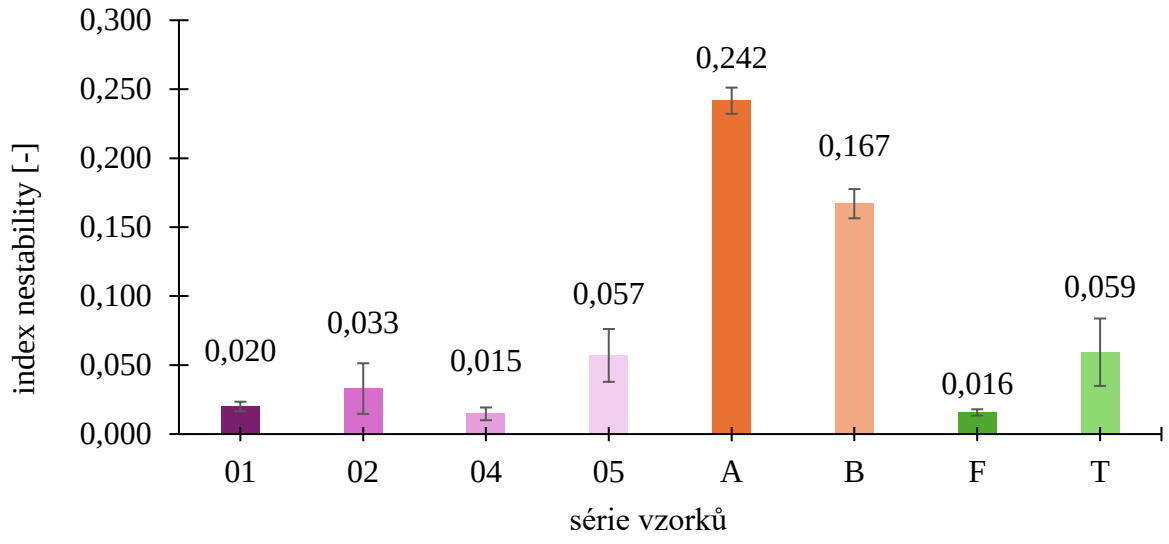
Obrázek 16 - Kyvety před analýzou na LUMiSizeru



Obrázek 17 - Kyveta po analýze na LUMiSizeru

Celkově byly této analýze podrobeny tři sady vzorků. V prvním měření byly takto analyzovány vzorky, které byly zamýšleny jako finální pro měření pětiměsíční stability (řady 01, 02, 04 a 05; řada 03 byla složením stejná jako řada 01, lišila se pouze skladováním). V této analýze dopadly všechny vzorky více než dobře, jejich index nestability je ve všech případech nižší než 0,1. Druhý pokus proběhl po objevení degradace prvních finálních vzorků a muselo tak být přistoupeno k přípravě nových a pozměnění receptury. Vzorky analyzované v této sadě dopadly stabilitně o poznání hůř, první typ A se pohyboval svou nestabilitou okolo hodnoty 0,25, druhý typ B okolo 0,175. Menšími úpravami v receptuře pak byly připraveny i vzorky řady F a T, které se od sebe lišily jen poměrem složek, koncepcí surovin odpovídaly vzorkům, které byly nakonec měřeny v rámci dlouhodobé čtyřměsíční stability, jejíž vzorky byly připraveny právě na základě receptury a postupu pro řadu T. Hodnoty indexu nestability pro řadu T se taktéž pohybují pod hodnotou 0,1, jde o stabilní vzorky.

Graf na obrázku 18 ukazuje průměrné hodnoty indexů nestability pro jednotlivé řady vzorků, jelikož všechny byly chystány v triplikátech, řada T je detailněji rozebrána ve výsledcích.



Obrázek 18 - Průměrné hodnoty indexů nestability jednotlivých řad

3.6.4 Tvorba finálních vzorků pro hodnocení stability

Vlivem okolností bylo nakonec přistoupeno k měření pouze čtyřměsíčních dlouhodobých stabilit vzorků. Po zkušenostech z přípravy předchozích vzorků a analýzy receptur na analytické odstředivce bylo přistoupeno k přípravě podle postupu a receptury T. Složení a plánované navážky uvádí tabulka 12, skutečné navážky jednotlivých vzorků lze nalézt v příloze 1.

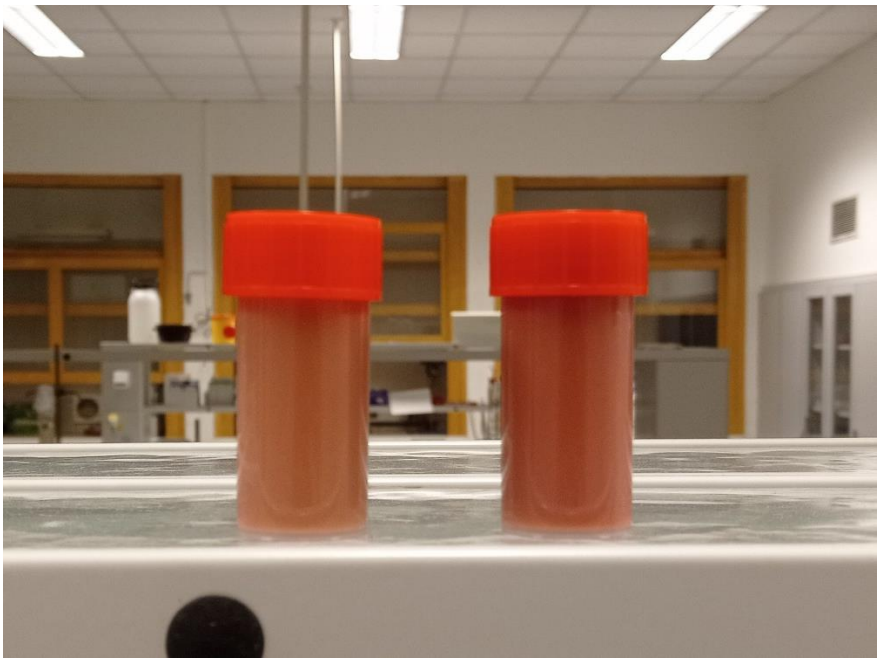
Tabulka 12 - Teoretické složení finální receptury

Surovina	**Navážka [g]**
Ingredience na vodní bázi	
Aloe Vera šťáva	5,0
CAPB	1,0
Gylcerin	1,2
Ingredience na olejové bázi	
Kokosový olej	18,8
Ostatní ingredience	
Vitamin C (askorbát)	0,5
Vitamin E	0,2
Řepné barvivo	0,8
Humát draselný	$1{,}6 \cdot 10^{-3}$
Emulgátory	
Lanolin	5,0
Včelí vosk	4,0

Teoretické složení uvádí všechny složky, jejich zastoupení se pak lišilo v závislosti na typu připravovaných vzorků. Celkově byly zvoleny tři typy kombinací, kdy řada 01 obsahovala všechny složky uvedené v tabulce 12, řada 02 byla ochuzena o humát a řada 03 naopak o barvivo. Vzorky řady 04 představovaly tzv. kontrolní vzorky, tedy vzorky, které neobsahovaly ani jednu z aktivních složek, které představoval humát draselný nebo připravené řepné barvivo. Řada 05 byla složením naprosto stejná jako řada 01, jediným jejich rozdílem byly podmínky skladování vzorků. Zatímco první čtyři série vzorků byly uchovávány v laboratorní skříňce, takže jejich stabilita byla posuzována při laboratorní teplotě, vzorky série 05 byly uchovávány v lednici, aby byl posouzen vliv snížené teploty a zda se nějak zásadně podílí na stálosti některé z použitých složek. V každé řadě byly připraveny samostatně tři vzorky, postup je uveden níže.

Složky vodné fáze byly smíchány dohromady a rozpuštěny ve šťávě z Aloe vera včetně barviva z červené řepy, vitaminu C, humátu a vyjma CAPB. To bylo naváženo dohromady spolu se složkami olejové fáze. Lipofilní složky byly poté rozpuštěny na vodní lázni při 80 °C za míchání rychlostí 500 RPM. Hydrofilní fáze byla zahřáta na 60 °C a po kapkách přikapávána k míchajícímu se disperznímu prostředí zhruba tempem 1 kapka za sekundu, aby se stihla dostatečně dispergovat. Po kompletním přidání disperzního podílu byla rychlost otáček zvýšena na 800 RPM, vodní lázeň byla odstavena a bylo aplikováno střídavě působení ultrazvukové lázně a míchání, jak bylo popsáno na konci kapitoly 3.6.2. Ultrazvuková lázeň pracovala při frekvenci 60 Hz.

Po dostatečné dispergaci byly vzorky ještě teplé přelity do šroubovacích plastových lahviček o objemu 50 ml, které byly předem umyty, vypláchnuty ethanolem a vysušeny v sušárně; jsou uvedeny na obrázku 19. Následně označeny a uschovány v lednici nebo skříňce v laboratoři. U finálních vzorků již neprobíhalo posouzení primární stability pomocí analytické centrifugy, neboť vycházejí z receptury, která tímto způsobem byla otestována.



Obrázek 19 - Krabičky pro uchování finálních vzorků během měření jejich stability

3.7 Stabilitní studie balzámu

Případné změny a stabilita vzorků byly sledovány průběžně po dobu 4 měsíců. Měření a sledování bylo zahájeno na čerstvě připravených vzorcích a poté byly parametry kontrolovány vždy po 1 měsíci. Sledovány byly obecné organoleptické vlastnosti, které jsou zhodnotitelné pouhým okem, ale i reologické chování a teplotní zatížení vzorku pro posouzení teploty tání.

Z pohledu fyzikálně chemického testování byla také posouzena stabilita barviva v samotném balzámu, jelikož u prvních připravených vzorků docházelo po čase k jeho degradaci. Pro celkový komplexní obraz o odolnosti a stabilitě produktu byl také zamýšlen test mikrobiální odolnosti, které se běžně v praxi u kosmetických produktů testují. Zde byly testy upraveny pro použití na balzámech na rty.

3.7.1 Posouzení organoleptických vlastností

Pro testování organoleptických vlastností byly inspirací mnohé studie [20] [49] [50] [51] [52] [53]. Zde autoři hodnotili zejména vůni, vzhled, změnu struktury vzorku a barvu. Rozhodla jsem se tedy zahrnout i měření změny hodnoty pH balzámu, které uvádí studie Siti N. H. M. Azmin [54].

U každého vzorku bylo vždy v daném časovém intervalu vizuálně posouzeno, zda se s ním nestala nějaká změna oproti předchozímu měření, vyjma měření hned čerstvých vzorků, které slouží jako prvotní porovnávací a výchozí bod pro tuto analýzu. Takto byla určena barva vzorku a homogenita jeho vzhledu, která byla zároveň určována při roztěrovém testu zmíněném níže. Čichem byly určeny změny ve vůni vzorku, zde se jednalo zejména o to, zda se neprojeví například žluknutí ingrediencí a na to navazující odér balzámu. Již ve vzorcích na počátku analýzy byly patrné rozdíly, jelikož barvivo dodávalo vůni vzorků sladší nádech podobný malinám, ve zbývajících, kde nebylo, tedy v řadách 03 a 04, se projevila pouze vůně použitého kokosového oleje.

Dále byla posuzována hydratační schopnost balzámů a jejich případná tendence dráždit pokožku. Tyto dvě vlastnosti byly testovány na pokožce předloktí jednoduchým „patch“ testem (na obrázku 20), tedy nanesením vzorku na danou plochu, ponecháním vzorku na pokožce po dobu určitého časového intervalu (5 minut), jeho setření a zhodnocení stavu pokožky před použitím a po použití produktu.

Obrázek 20 - Patch test pro určení dráždivosti balzámů a schopnosti hydratovat, stáří balzámu 3 měsíce

K indikaci pH balzámů byly využity pH indikační papírky kvůli charakteru vzorků, jelikož pH sondy je možné použít na vodné roztoky. Papírek byl otřen o balzám na skle po roztěrovém testu, přebytek vzorku byl odstraněn pomocí buničiny a papírek byl ponechán k vyvinutí barvy pro určení výsledného pH vzorku. Toto, spolu s roztěrovými testy, zachycuje obrázek 21.

Obrázek 21 - Roztěrové a pH testování vzorků, stáří balzámu 3 měsíce

3.7.2 Roztěrové testy

Roztěrové testy byly v literatuře zmiňovány jako rozetření balzámu mezi nebo po podložním mikroskopovém sklíčku. Některé zdroje uváděly i hodnocení tvrdosti tímto způsobem, ale zejména se soustředily na míru ochoty vzorku se roztírat a také na homogenitu jeho struktury [52].

V případě balzámů v této diplomové práci bylo k této metodě přistupováno z trochu jiného směru – malé množství vzorku bylo nabráno na špachtli a tou poté rozetřeno po podložním skle, jak je vidět na obrázku 21. Ze vzhledu byla určena homogenita struktury, tedy tendence tvořit hrudky nebo deemulgovat, byly srovnány i rozdíly v ochotě roztírat se mezi jednotlivými vzorky i typy vzorků. Pro doplnění a zpřesnění roztěrových vlastností vzorků bylo využito také reologického měření.

3.7.3 Reologické testy – měření LVO

K měření reologického chování balzámů byl využit rotační reometr HR-2 společnosti TA Instruments. Pro měření byla použita geometrie typu deska-deska o průměru 25 mm a temperace spodní desky byla nastavena na 25 °C. Využit byl amplitudový test (režim *Oscillation amplitude*), ze kterého je možné určit lineární viskoelastickou oblast (LVO) a „flow point", tedy bod překřížení obou viskoelastických modulů, kdy se vzorek stává zcela tekutým. Lineární viskoelastická oblast naopak odpovídá pevnosti struktury a její schopnosti namáhání odolávat. U obou parametrů je výsledkem hodnota napětí, která obě meze charakterizuje a tím udává limity vzorku.

Měřící mezera byla nastavena na výšku 1 mm, relaxační čas po nadávkování vzorku na 180 sekund, aby mohl vzorek po manipulaci obnovit svou strukturu. Poté se měřilo v rozpětí napětí 10^{-3} až 10^{3} % s frekvencí 1 Hz se záznamem 6 bodů v dekádě. Přímo v softwaru reometru byl vyhodnocen flow point, zbylé vyhodnocení probíhalo v excelu. Každý vzorek byl měřen jednou.

3.7.4 Kalorimetrie – posouzení teploty tání

Dle článku [52] byla posuzována u balzámů v rámci studování jejich stability také teplota tání vzorku a její případný posun vlivem stárnutí vzorku pomocí bodotávku. Autoři článku využívali kapiláry, které balzámem plnili a poté v daných časových intervalech sledovali.

Jelikož by plnění kapilár balzámem byla komplikovaná práce, byla vybrána diferenční skenovací kalorimetrie jako jednodušší a praktičtější varianta tohoto měření. Ve spolupráci s paní Leonou Kubíkovou tedy byla navržena metoda, která umožnila snadno identifikovat teploty tání.

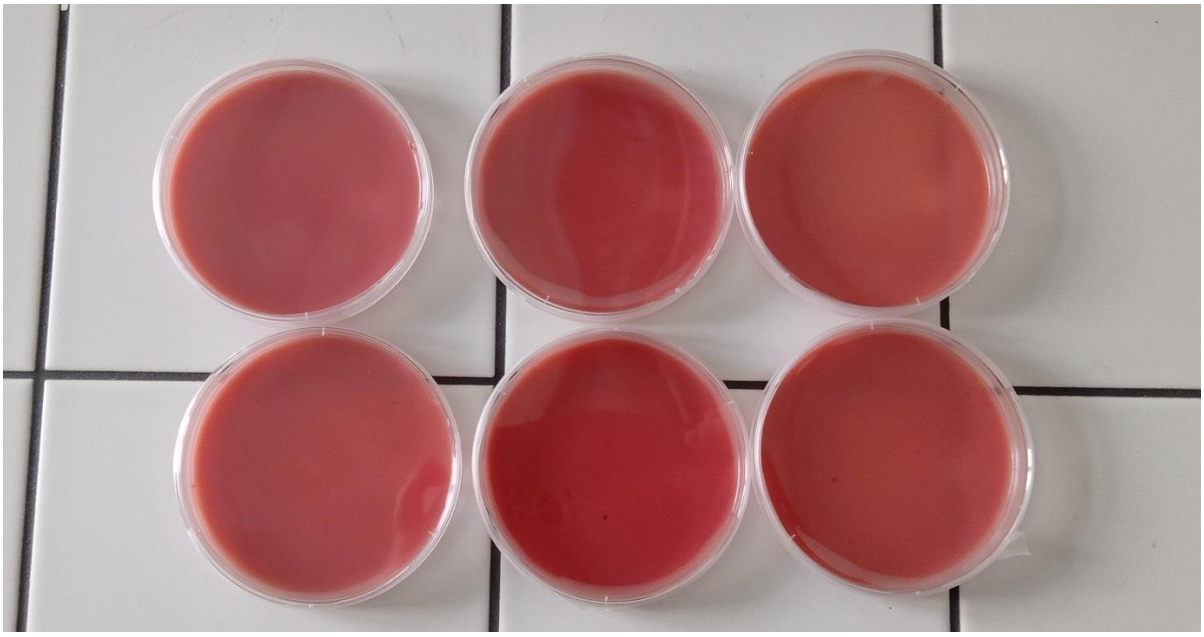
Měření probíhalo na kalorimetru DSC Q2000 firmy Mettler Toledo. V měření byla použita modulace 0,4 °C každých 30 sekund, poté byla držena izoterma po dobu 5 minut. Následovala teplotní rampa z laboratorní teploty až na –50 °C rychlostí 5 °C za minutu. Zde byla navážka vzorku podržena u této teploty po dobu 2 minut, odkud se pak rychlostí 5 °C za minutu začala ohřívat na konečných 80 °C. Tato teplota byla zvolena na základě přípravy balzámu, kdy ve vodní lázni při teplotě 80 °C byly všechny složky jednoznačně v kapalném stavu a viditelně nedocházelo k degradaci některé z nich. I u této teploty bylo setrváno po dobu 2 minut, načež se vzorek vrátil teplotně opět na úroveň laboratorní teploty.

3.7.5 Mikrobiální zátěž a růst

Mikrobiální zátěž byla měřena dvakrát. Poprvé byla vyzkoušeno přímo očkování kultury na samotný balzám. Byly tedy nachystány petriho misky s balzámem, které jsou ukázány na obrázku 22. Všechny misky byly připraveny z jedné dávky balzámu, tedy ze 40 g. Současně s tím byly připraveny agarové plotny. Pro každou ze tří kultur, které byly použity i pro stanovení antimikrobiálních vlastností (*Candida glabrata, Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis*), byla média připravena tak, jak uvádí tabulka 5 – dvě misky s médii, dvě misky s balzámem pro každý mikroorganismus.

Pro měření byly použity zamražené kultury, které byly dvakrát přeočkovány do předem připraveného vysterilizovaného tekutého média, aby byly mikroorganismy dostatečně viabilní.

Samotné testování bylo prováděno ředěnými kulturami, aby bylo možné zároveň počítat i KTJ (kolonie tvořící jednotky), tedy počet kolonií. K tomu právě sloužily pevné živné půdy, jež fungovaly zároveň jako pozitivní kontrola. Mikroorganismy byly podrobeny desítkovému ředění, z kterých byly pro samotné očkování na misky vybrány dvě, a to 10^3 a 10^6. Misky byly měsíc ponechány při 25 °C v kultivačním boxu, aby byly simulovány teplotní podmínky běžně uchovávaného balzámu.



Obrázek 22 - Připravené plotny s balzámem pro testování mikrobiální zátěže

Druhý test byl proveden se vzorky starými dva měsíce, které byly připraveny do klasických balzámových tubových aplikátorů. Tento test vycházel z praxe, kde se tímto způsobem testují látky nebo předměty nerozpustné ve vodě [zdroj]. Zkoušce byly podrobeny tři vzorky, a to balzám s obsahem obou aktivních látek, balzám pouze s humátem a kontrolní vzorek. Všechny tuby obsahovaly zhruba 4 g balzámu. Byla připravena sterilní voda a každý ze vzorků byl 24 hodin macerován v 70 ml při laboratorní teplotě za stálého promíchávání na třepačce (rychlost 100 RPM).

Téhož dne, kdy byl tento experiment započat, byly taktéž připraveny agarové misky s tuhou živnou půdou, ovšem v tomto případě bylo využito univerzální živné medium Plate Count Agar, jelikož předmětem zájmu tohoto testu bylo prokázání toho, zda je vzorek 124 biologicky kontaminovaný, a ne přímé stanovení kontaminující kultury.

Po maceraci byl roztok každého vzorku rozředěn desítkovým systémem, aby bylo možné spočítat případné narostlé kolonie (KTJ). Pro očkování na plotny bylo využito ředění 10^3, 10^6 a 10^9, na každou agarovou misku byl pipetován 1 ml příslušného zředěného roztoku a hokejkou rozetřen po celé ploše agaru. Misky byly dány do kultivačního boxu a ponechány ke kultivaci po dobu 1 týdne při 37 °C.

3.7.6 Stabilita barviva

Již první pokusy s balzámem prokázaly, že barvivo v některých případech už po 14 dnech začíná měnit své zabarvení, po zhruba měsíci pak obarvené vzorky změnily svůj odstín úplně. V rámci samotného testování vlastností barviva a stability balzámů tak byly provedeny i pokusy, které měly za cíl objasnit toto chování a případně přijít s řešením situace.

Aby nedošlo k samotné degradaci barviva již po jeho připravení, bylo barvivo uchováváno v plastové nádobce překryté vrstvou buničiny a obalené alobalem tak, aby ke vzorku nemohlo světlo a bylo zabráněno jeho degradaci vlivem slunečního záření. Zároveň se vzorek po celou dobu nacházel v exsikátoru, jelikož byl silně hygroskopický a případná sorbovaná vzdušná vlhkost by mohla mít taktéž degradační vliv.

Protože k degradaci barviva docházelo i nadále po změně složení u finálních vzorků, jak je podrobněji rozebráno ve výsledkové subkapitole 4.1.5, byla zařazena analýza DVS, tedy dynamická sorpce par, kdy bylo cílem ověřit efekt působení vlhkosti na vzorek. Metoda dynamické sorpce par se řadí mezi vážkové metody, kdy se zaznamenává změna hmotnosti vzorku v prostředí, které mění svou relativní vlhkost. V rámci jednoho cyklu se nejprve atmosféra v měřící cele postupně sytí vodní parou a posléze se vzduch opět vysouší. Měření probíhalo na přístroji DVS Advantage společnosti Surface Measurement Systems. Analýza probíhala za izotermálních podmínek při 25 °C, v jednom sorpčním cyklu. Jednotlivé kroky navyšování relativní vlhkosti netrvají stejně dlouho, ale přístroj vyčkává do ustálení hmotnosti nebo do maximální doby kroku, která je automaticky nastavena. Vzorek byl navážen do hliníkové pánvičky s uchem, která byla zavěšena na háček váhy v měřící cele.

Zároveň byly paralelně s tímto chystány vzorky pro měření antioxidační aktivity, kdy jedna sada byla měsíc stará a druhá byla čerstvá, jak zmiňuji v kapitole 3.5.1. Roztoky, které byly připraveny navážením koncentrace řepného barviva a humátu odpovídající té použité v balzámech do MQ vody, byly měsíc uschovány v laboratoři ve skříňce. I díky tomuto mohl být posouzen vliv vody na degradaci samotného barviva a tím určen vliv vodné fáze.

Aby byla vyloučena degradace barviva světlem, byly všechny vzorky balzámu po dobu trvání jejich stabilitní studie uschovány ve skříňce nebo v lednici.

3.8 Senzorická analýza

V lednu roku 2024 byla provedena senzorická analýza s třemi typy vzorků – vzorek obsahující barvivo i humát (označený jako *vzorek A*), vzorek obsahující pouze humát (označený jako *vzorek B*) a kontrolní vzorek bez barviva i humátu (označený jako *vzorek C*). Tyto typy vzorků byly zvoleny záměrně pro srovnání, zda by potenciální spotřebitelé upřednostnili obarvený vzorek, který zakrývá nahnědlý odstín, jež balzámu právě humát propůjčuje. Prázdný vzorek byl zahrnut pro posouzení vlivu obou aktivních látek. Všechny tři typy vzorků jsou zachyceny na obrázku 23. Zde je i jasně patrný rozdíl v barevnostech jednotlivých vzorků, jež je ovlivněn použitými ingrediencemi. Na tento vliv nebyli účastníci senzorické analýzy upozorněni.

Obrázek 23 - Balzámy typu A (uprostřed), B (vpravo) a C (vlevo) v tubách o obsahu 4 g

Pro senzorickou analýzu byly připraveny nové vzorky, které byly v době konání analýzy dva dny staré. Každému z účastníků byly předloženy vzorky (zhruba 1 ml každého) na kartičce a dotazník. Otázky do dotazníkového šetření byly částečně převzaty z dotazníku, který byl využit při Praktiku z kosmetologie pro hodnocení zde připravovaných kosmetických produktů, a upraveny pro hodnocení balzámů na rty.

Celá senzorická analýza byla rozdělena do tří částí, kterými účastníky přiložený dotazník provázel. První část se týkala obecných informací o hodnotitelích a zjištění jejich pohlaví, věkové skupiny a stavu pokožky na vnitřní straně předloktí, kam měly být samotné balzámy aplikovány pro posouzení. Odpovídající parametry, které hodnotící kroužkovali, jsou uvedeny v tabulce 13. Otázky 5 a 9 byly ponechány pro upřesňující otevřené odpovědi.

Tabulka 13 - Obecné informace o hodnotitelích

1) Pohlaví					
Žena				Muž	
2) Věková skupina					
0–20	21–30	31–40	41–50	51–64	65+
3) Typ pokožky na vnitřní straně předloktí					
Suchá	Spíše suchá	Normální	Spíše mastná	Mastná	
4) Máte sklony k podráždění nebo alergiím na pokožce vnitřní strany předloktí?					
Ano				Ne	
5) Pokud ano, uveďte, prosím, jaké:					
6) Trpíte často oparovým onemocněním?					
Nikdy	Jednou za pár let	Jednou ročně	Vícekrát do roka	Několikrát v měsíci	
7) Kde se Vám opary vyskytují?					
Nemívám opary		Na těle		Na obličeji (nos a ústa)	
8) Používáte balzámy na rty? Jak často?					
Nepoužívám	Příležitostně	Denně	Několikrát denně		
9) Uveďte, prosím, důvod, proč balzámy (ne)používáte:					

V návaznosti na otázku č. 5 o alergiích byli účastníci senzorické analýzy na vlastní dotaz obeznámeni s případnými alergeny či dráždivými látkami, které pro ně vzorky mohly obsahovat. Následující část dotazníkového šetření započala hodnocením balzámů před samotnou aplikací.

Hodnocení probíhalo systémem známek 1 (nejlepší) až 5 (nejhorší) pro každý vzorek a vybrané vlastnosti, které jsou vypsány níže. Hodnotil se:

- vzhled,
- barva,
- vůně,
- konzistence,
- lesk,
- lepivost.

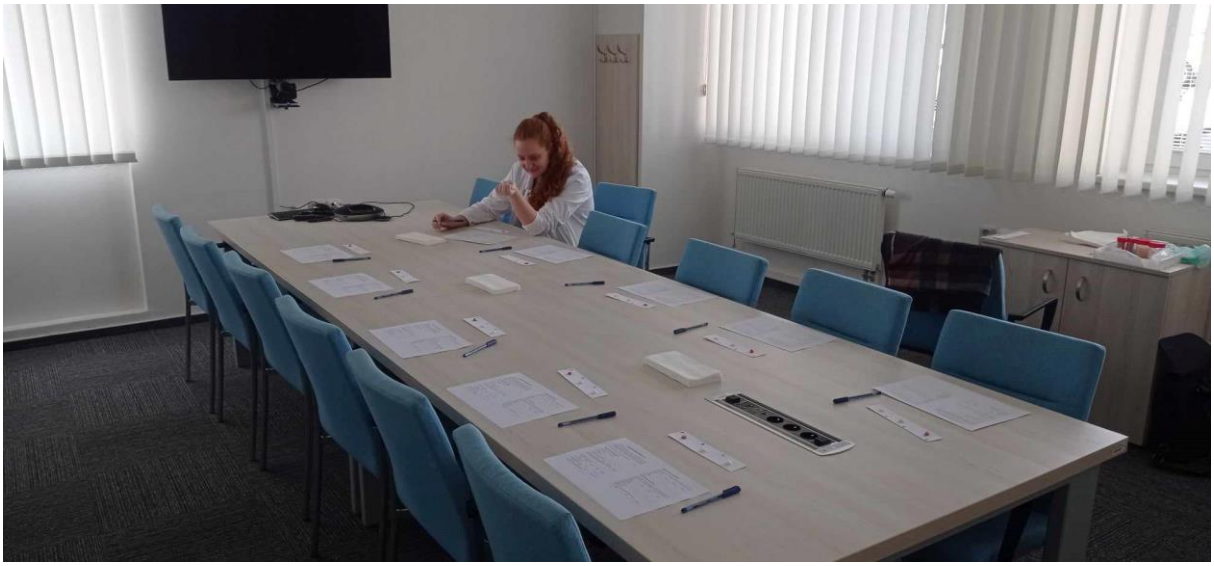
Tyto parametry byly hodnoceny subjektivně jednotlivými účastníky. Známku 1 hodnotitelé udělovali, pokud se jim daný parametr u daného vzorku líbil nebo jim přišel příjemný, známku 5 udělili v případě, že nebyli s vlastností hodnoceného vzorku spokojeni. Účastníci byli požádání, aby si vzorky pořádně prohlédli, přivoněli si k nim a případně je mírně promnuli mezi prsty pro získání svého dojmu.

Poté byli hodnotitelé požádání, aby si vzorek nanesli na pokožku vnitřní strany předloktí, přibližně na plochu 1×4 cm. Měli pozorovat chování vzorku při samotné aplikaci, poté počkat 5 minut a opět ohodnotit dotazované parametry u každého z nich. Dotazovanými parametry v tomto případě byly:

- podráždění,
- roztíratelnost,
- vstřebatelnost,
- hydratace,
- lepivost na kůži,
- pocit na pokožce.

Tyto vlastnosti byly opět známkovány systémem „jako ve škole“, tzn. udělením známky 1, pokud byla vlastnost dle jejich subjektivního vjemu příjemná/dobrá, až do známky 5, pokud nebyli s daným parametrem spokojeni.

Třetí částí byl tzv. pořadový test, kdy měli hodnotitelé za cíl seřadit vzorky od nejlepšího po nejhorší na základě svého dojmu. V koncové části senzorické analýzy byl taktéž ponechán prostor pro vyjádření podrobnějšího názoru k některým vlastnostem produktů, případně k samotnému průběhu senzorické analýzy. Průběh a místnost pro konání analýzy jsou zachyceny na obrázku 24.



Obrázek 24 - Senzorická analýza balzámů na rty

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

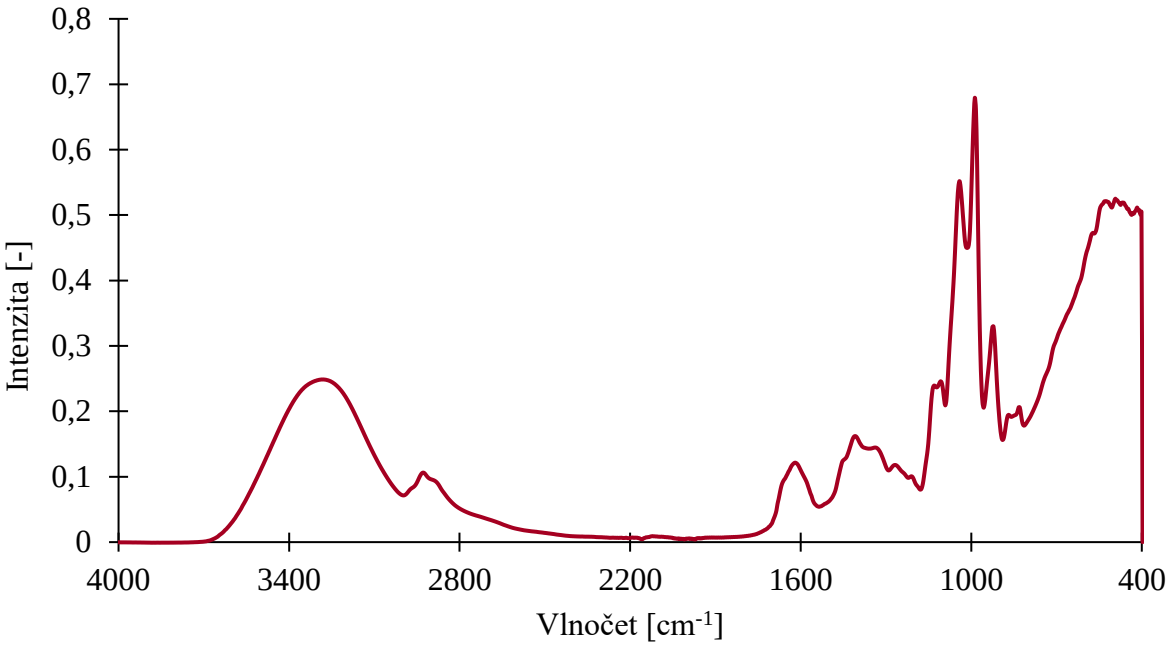
4.1 Analýza barviva z červené řepy

U barviva z červené řepy byla nutná základní fyzikálně chemická charakterizace, jelikož se jednalo o připravenou látku, nikoliv komerčně zakoupenou. Nejjednodušším způsobem identifikace látek je jejich infračervené spektrum. Proto byl lyofilizát změřen pomocí FTIR metodou ATR, bylo taktéž zanalyzováno Ramanovo spektrum jako metoda komplementární k předchozí uvedené. Na tomto místě je nutné podotknout, že Ramanova spektrometrie je velmi citlivá k analýze funkčních skupin velmi nepolárních a prostorově symetrických strukturních jednotek. Tyto strukturní motivy byly identifikovány v FTIR spektrech, ve kterých měly podobu méně intenzivních absorpčních pásů a ramének, a tudíž byla použita Ramanova spektrometrie. Při maceraci barviva se ovšem uvolnily různé skupiny látek, a tak bylo potřeba je alespoň základně oddělit a opět analyzovat. K tomu byla vyžita technika tenkovrstvé chromatografie a následná re-eluce frakcí v mobilních fázích a jejich změření pomocí FTIR.

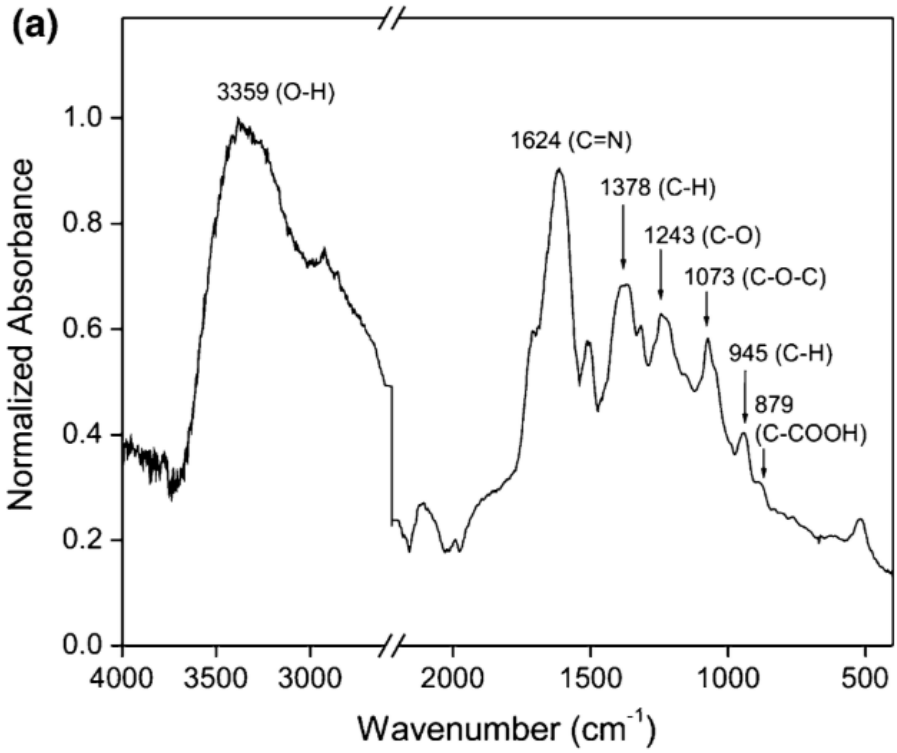
4.1.1 FTIR a Ramanovo spektrum

Infračervené spektrum je zobrazeno na obrázku 25. Jak je vidět na grafech zahrnutých v kapitole 4.1.3, celkové spektrum se téměř vůbec neliší od záznamů jednotlivých frakcí, jejichž rozbor obsahuje podrobnější popis jednotlivých píků.

Obrázek 26 zahrnuje FTIR spektrum barviva z červené řepy extrahované v práci L. Aztatzi-Rugiero a kol. [55], kteří barvivo, konkrétně betalaininy, získávali nejprve odšťavněním červené řepy, do vzniklého roztoku přidali 96% ethanol v objemovém poměru 1:1 a po 10 minutách odstředili vzniklou sraženinu. Supernatant poté ještě zfiltrovali pro odstranění všech částic a ethanol odpařili při 40 °C. Následovalo přečištění a betalaininy byly získány při pH 1, pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 a tento koncentrát byl lyofilizován a skladován při 25 °C, stejně jako vzorek v této diplomové práci.



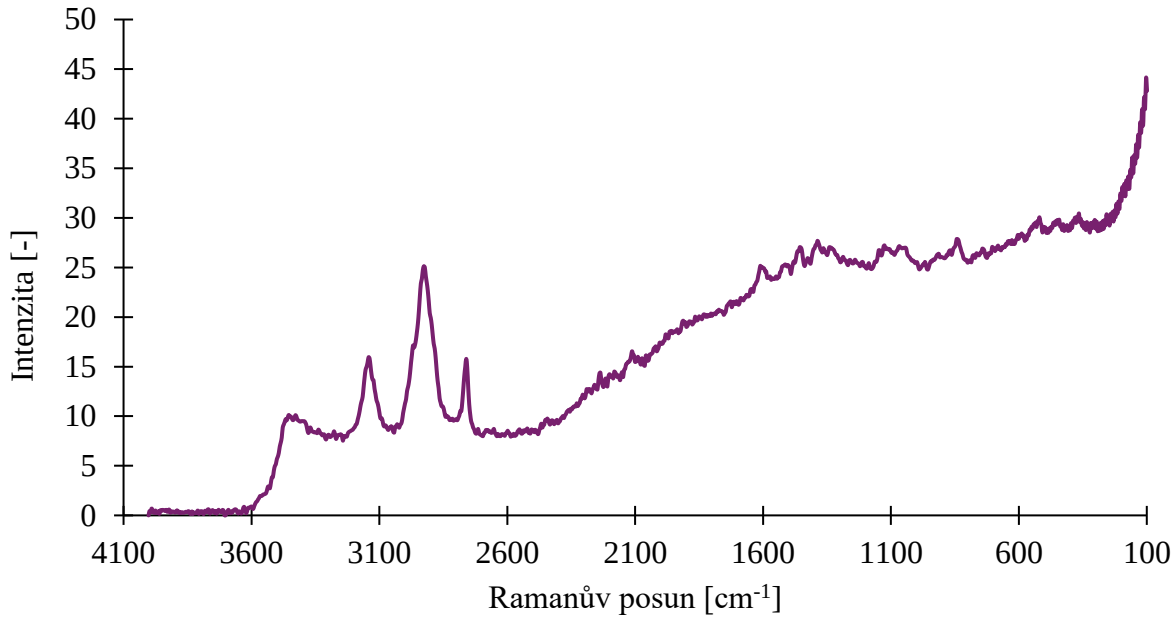
Obrázek 25 - Infračervené spektrum lyofilizátu barviva z červené řepy



Obrázek 26 - FTIR spektrum barviva z červené řepy připravený L. Aztatzi-Rugiero a kol.

Jak je možné vidět již na první pohled, u obou spekter se projevuje valenční vibrace O–H v hydroxylových skupinách okolo 3400 cm^{-1}, za kterou následují vibrace alifatických skupin (zhruba 3000 cm^{-1}). V další části spektra si lze povšimnou píku okolo 1600 cm^{-1}, který souvisí s vibrací sekundárních amidů.

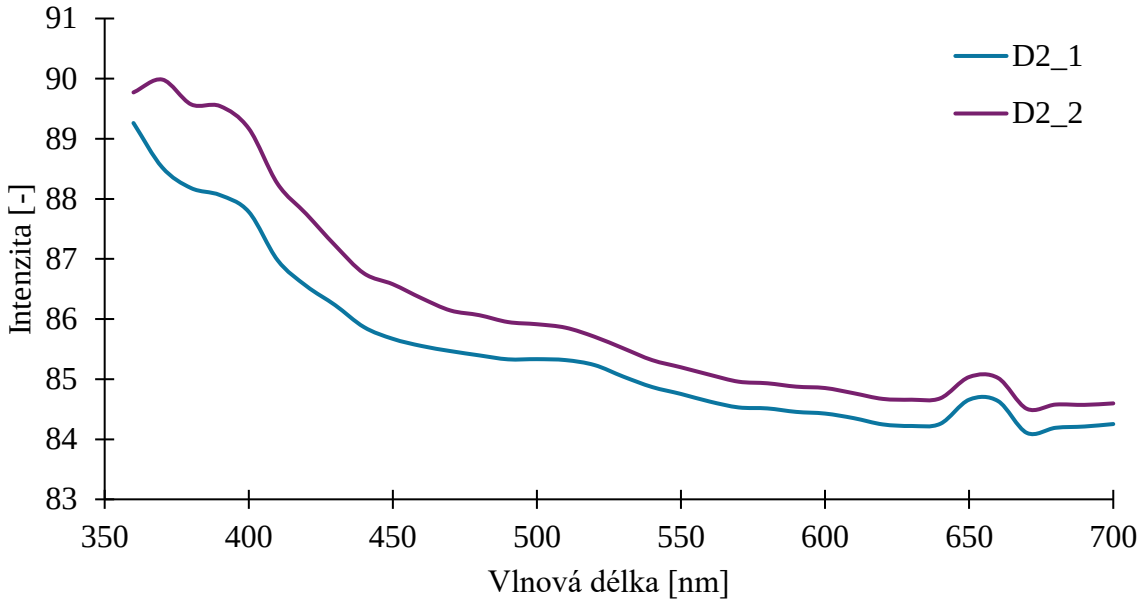
Pro komplementaritu infračerveného spektra bylo taktéž proměřeno Ramanovo spektrum pro lyofilizát barviva, které je na obrázku 27. Ramanovo spektrum je bohaté na absorpční pásy v oblasti Ramanova posunu 3600–2600 cm^{-1}. Dublet absorpčních pásů při 2922 cm^{-1} a 2756 cm^{-1} odpovídá asymetrickým vibracím C–H vazeb v methylenových a methynových funkčních skupinách. Dále absorpční pás při 3134 cm^{-1} pravděpodobně odpovídá valenční vibraci N–H vazeb v sekundárních amidech, tedy sloučeninách bílkovinné povahy. Významným absorpčním pásem, který se nepodařilo identifikovat FTIR spektru je strukturní jednotka pyridinu, která má svůj pás při 3477 cm^{-1} a je projevem valenční symetrické vibrace N–H vazeb v heterocyklu této strukturní jednotky. Dále si ve spektru můžeme povšimnout méně intenzivního absorpčního pásu při 1595 cm^{-1}, který odpovídá valenční symetrické vibraci C=C vazeb v betalainu.



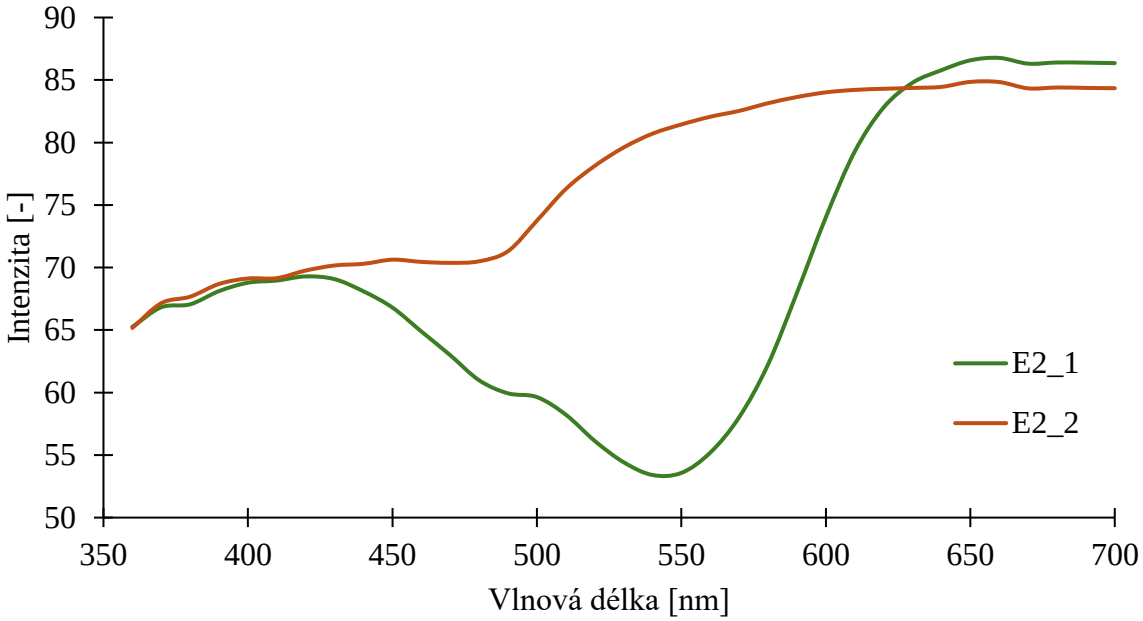
Obrázek 27 - Ramanovo spektrum lyofilizátu barviva z červené řepy

4.1.2 DataColor spektra

Z analyzovaných částí, které byly podrobeny měření na přístroji DataColor, byla vygenerována VIS spektra. Analýza byla původně zamýšlena s účelem definování jednotlivých barevných hranic při definování hranic frakcí na chromatografických vývinech. Použitá měřící štěrbina ovšem zobrazovala příliš velkou plochu, ze které průměrovala výsledné spektrum. Byly tedy změřeny části, které vizuálně s jistotou obsahovaly vždy jednu frakci, vždy na dvou vývinech. Příklady jsou uvedeny na obrázcích 28 pro fázi D, konkrétně frakce D2, a obrázku 29 pro fázi E, konkrétně pro frakce E2.



Obrázek 28 - DataColor spektrum pro frakce D2

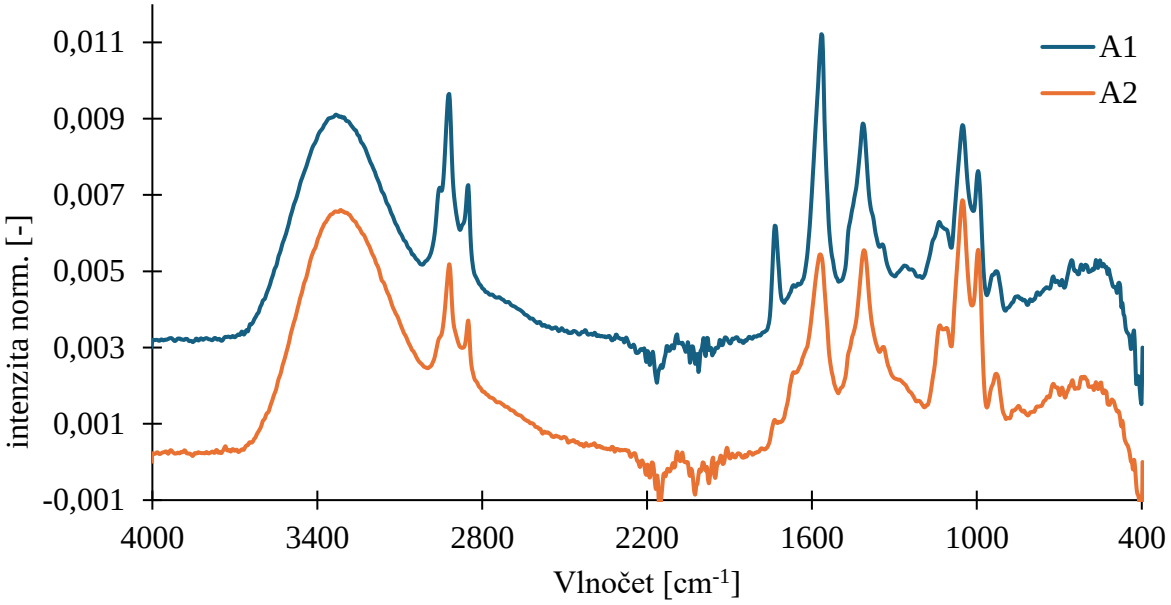


Obrázek 29 - DataColor spektra pro frakce E2

V obou případech je na první pohled patrné, že se jedná o jiné látky, které byly pomocí chromatografie odděleny. Svůj efekt na tom bude mít také použitá mobilní fáze, které uvádí tabulka 4. U frakce E2 (obrázek 29)je také patrné, že v měřícím otvoru se pravděpodobně vyskytoval nějaký barevný předěl, neboť spektra nejsou stejná, jako v případě frakcí D2 (obrázek 28), kde je na první pohled patrné, že jde o měřené oblasti o stejných vlastnostech. Pro rozdělení jednotlivých frakcí nakonec bylo využito UV lampy, jak zachycuje obrázek 6. Ty pak byly po re-eluci v příslušných mobilních fázích analyzovány pomocí infračervené spektrometrie popsané níže. Pro zlepšení měření by bylo vhodné použití menší štěrbiny a přímé určování spekter, aby se dala hranice frakcí vyznačovat již v průběhu měření.

4.1.3 FTIR spektra jednotlivých frakcí po TLC

Roztoky eluovaných frakcí byly nakápnuty na ATR krystal, rozpouštědla byla ponechána k odpaření a poté byly vzorky měřeny. V grafických znázorněních jsou posunuty intenzity, aby mohly být záznamy z téže mobilní fáze porovnávány přímo mezi sebou. Graf pro vývin A (obrázek 30) obsahuje dvě frakce, A1 a A2, jejichž spektra jsou si velmi podobná.

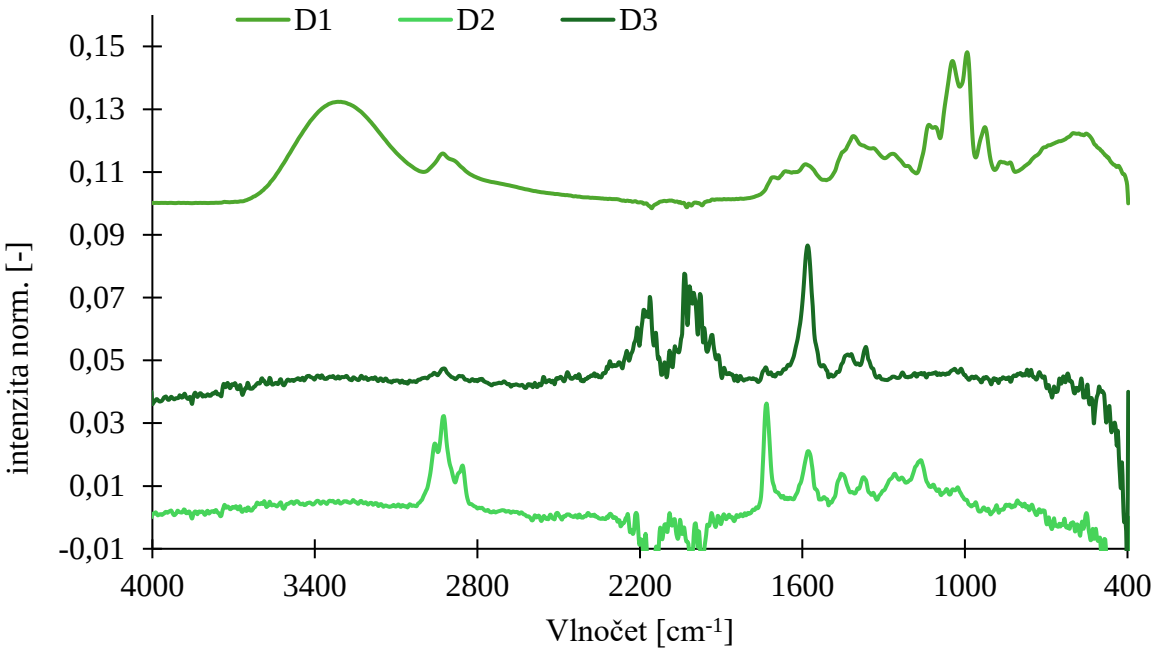


Obrázek 30 - FTIR spektra pro frakce TLC fáze A

U obou záznamů je patrný široký pík u 3300 cm^{-1}, který odpovídá, tak jako v případě záznamu barviva na obrázku 25, valenční vibraci O-H v hydroxylových skupinách. U obou pokračuje vibrace alifatických skupiny, výraznější v případě frakce A1 – 2954 cm^{-1} odpovídá asymetrické vibraci C-H v CH_3 skupinách, 2921 cm^{-1} shodnému typu vibrace, ovšem v CH_2 skupinách, jež je následováno píkem při 2852 cm^{-1}, který je připisován symetrické vibraci v CH_2 skupinách.

Pro frakcí A1 pak při 1733 cm^{-1} lze pozorovat vibraci C=O vazeb v (aryl)esterech, 1565 cm^{-1} značí asymetrickou valenční vibraci karboxylátů, které je při vlnočtu 1414 cm^{-1} symetrická. Při 1344 cm^{-1} dochází k skeletální vibraci C-H vazeb v alkylech, u 1263 cm^{-1} se projevuje valenční vibrace C-C-O v arylesterech, u 1137 cm^{-1} pak symetrická vibrace vazby

C–O–C v etherech, která signalizuje přítomnost sacharidových jednotek a glykosidických vazeb, což vede k úvaze, že jsou zde zastoupeny polysacharidy. O tom svědčí také přítomnost C–O vibrace v primárních alkoholech, kterou lze pozorovat při 1051 cm^{-1}. U frakce A2 značí vibrace při vlnočtu 1735 cm^{-1} menší množství arylesterů ve vzorku a vlnočet 1111 cm^{-1} signalizuje přítomnost glykosidické vazby, což potvrzuje výskyt polysacharidových řetězců.



Obrázek 31 - FTIR spektra pro frakce TLC fáze D

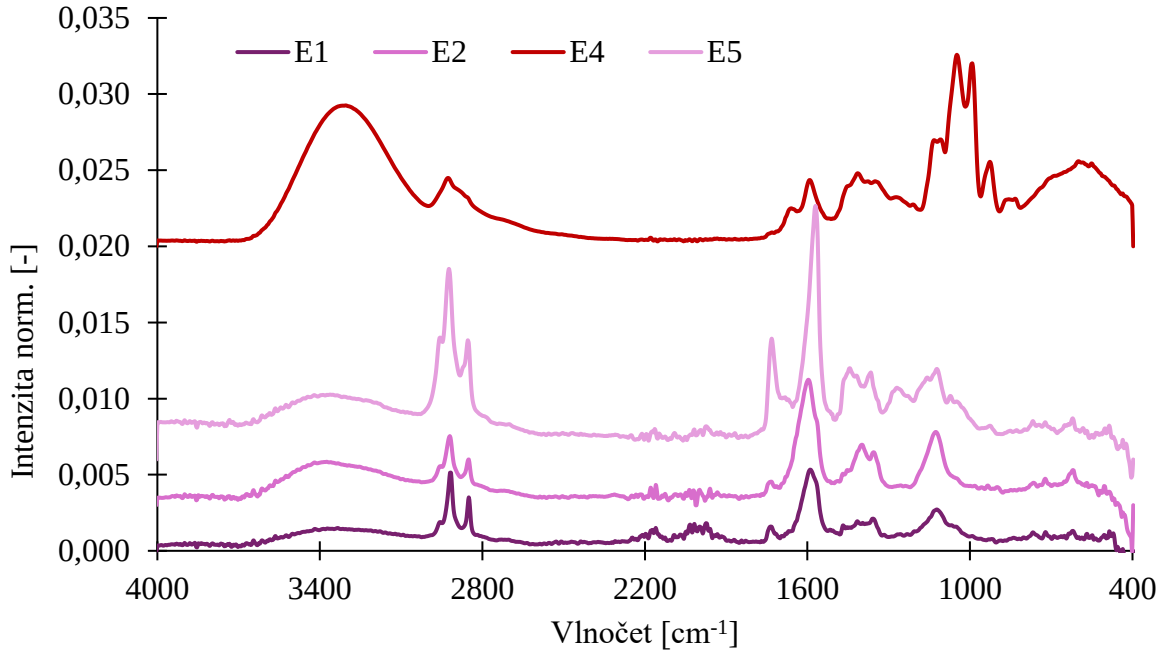
U ostatních frakcí se jisté skupiny a jejich vibrace opakují, pro vzorek D1 je opět patrná přítomnost vibrace O–H při 3300 cm^{-1} a asymetrických vibrací C-H v methylových skupinách při 3000 cm^{-1}, jak ukazuje obrázek 31. Při 1700 cm^{-1} se projevuje vibrace C=O, tentokrát v karboxylových skupinách. Okolo 1660 cm^{-1} se zde vyskytuje vazba C=O v chinonech nebo sekundárních amidech. To odkazuje na přítomnost antioxidačně aktivních látek v barvivu, což následně potvrzují i antioxidační testy rozebrané v kapitole 4.3.1, a proteinů. U 1588 cm^{-1} je patrná deformační vibrace C–N vazeb v amidech jakožto součást peptidových vazeb. 1411 cm^{-1} značí opět výskyt karboxylátů, 1267 cm^{-1} indikuje (aryl)estery a 1133 cm^{-1} přítomnost etherů, které opět souvisí s obsahem sacharidů ve vzorku, což značí i vibrace primárních alkoholů u 1133 cm^{-1}.

U vzorku D2 je na počátku vidět alifatická část (píky okolo 3300–3000 cm^{-1}). Tento vzorek je zajímavý tím, že z něj lze usuzovat přítomnost lipidů nebo vyšších mastných kyselin, jelikož funkční skupiny zde se projevující s tímto typem látek souvisí. Při 1733 cm^{-1} dochází k vibracím alkyl- nebo arylesterů. U 1456 cm^{-} dochází k deformační vibraci C–H vazeb v methylových a methylenových skupinách. Vlnočet 1374 cm^{-1} indikuje tzv. „deštníkovou“ deformační vibraci skupiny CH_3. Taktéž se zde projevuje přítomnost esterů a etherů, a to vibracemi za 1250 cm^{-1}.

U vzorku D3 je patrný v oblasti 2300–1890 cm^{-1} šum ATR krystalu. Je zde opět patrná přítomnost alkyl- nebo arylesterů (1736 cm^{-1}), deformační valenční vibrace C–N vazeb v sekundárních amidech u 1580 cm^{-1} a skeletální vibrace u 1366 cm^{-1}. Výjimkou je zde vibrace mezi uhlíkem a hydroxylovou skupinou v karboxylových funkčních skupinách u 1433 cm^{-1} a také fakt, že u nižších vlnočtů nejsou patrné žádné píky, které by signalizovali přítomnost sacharidů.

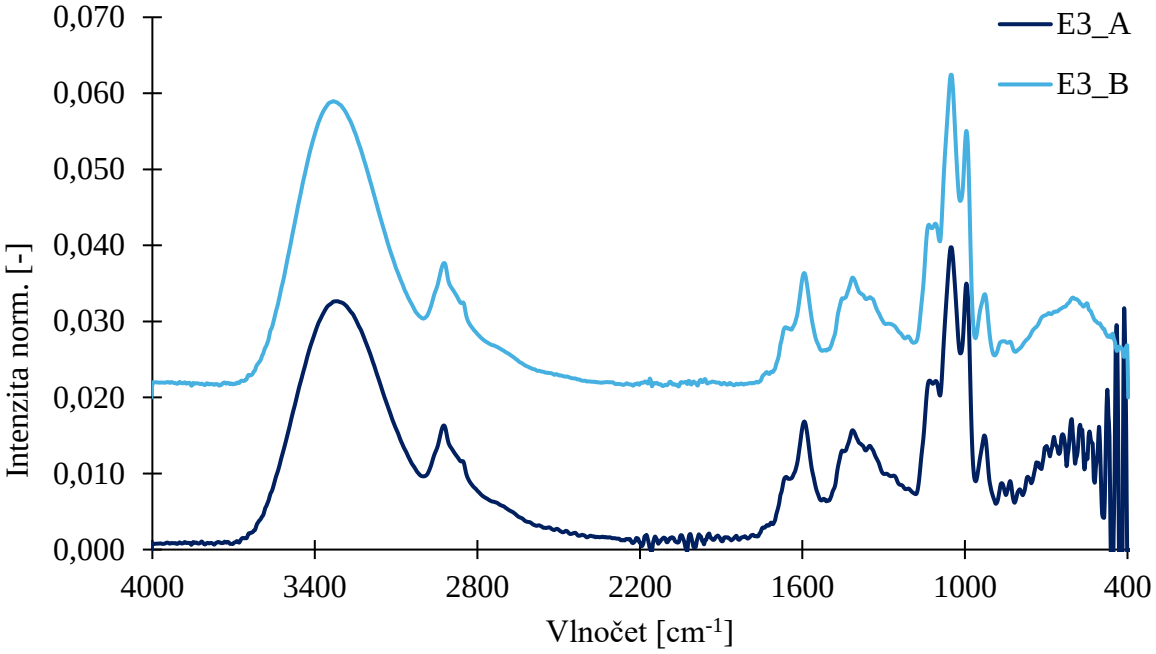
Spektra z chromatografického vývinu E byla rozdělena do 2 částí. V první části na obrázku 32 je patrné, že spektra E1, E2 a částečně E5 jsou si velmi podobná, zatímco spektrum složky E4 se od ostatních odlišuje. Spektrum E1 je přítomností daných vibrací velmi podobné spektru pro frakci D2, je zde také patrný šum pozadí v oblasti okolo 2000 cm^{-1}. Spektrum E2 je také podobné, důležitým píkem, který je pak vidět i ve vzorku E5 je asymetrická vibrace karboxylátů při 1600 cm^{-1} a symetrická vibrace C–O–C vazby v etherech u 1126 cm^{-1}. U frakce E2 má však tento pík tzv. „ramínko“, které odpovídá vibraci C–O v primárních alkoholech, což opět podporuje přítomnost sacharidových látek. Je zde patrná také jedna odlišnost, a to pík při 722 cm^{-1}, který indikuje přítomnost dlouhého lipidického řetězce a je vidět u všech látek s obsahem vyšších mastných kyselin.

Spektrum vzorku E5 odlišuje vibrace „dýchání“, kdy se jedná o smršťování a opětovné roztažení cyklických molekul, jež se projevuje u 1100 cm^{-1}. Spektrum E4 má výrazně viditelnou vibraci v hydroxylových skupinách, což značí široký pík na počátku spektra, který následuje vibrace alifatických skupin. Při 1650 cm^{-1} je patrná opět přítomnost chinonových látek a u 1600 cm^{-1} je viditelné „dýchání“ aromatických cyklů. Jsou zde přítomny arylestery (u 1282 cm^{-1}), deštníková deformační vibrace (u 1377 cm^{-1}) a vibrace indikující přítomnost glykosidických vazeb při 1100 cm^{-1}. Výrazná je také vibrace u 1050 cm^{-1}, která souvisí s primárními alkoholy.



Obrázek 32 - FTIR spektra pro TLC fáze E, 1. část

Na obrázku 33 je pro porovnání vyobrazeno spektrum frakce E3, která byla měřena dvakrát. Při prvním pokusu totiž došlo k nehomogennímu nanesení vzorku na ATR krystal, což se projevilo jako šum ve fingerprintové oblasti. Obě spektra jsou prakticky stejná jako vzorek E4, je zde však patrná přítomnost chinonů (1660 cm^{-1}), „dýchání“ v aromatických cyklech (1600 cm^{-1}), skeletální vibrace (1350 cm^{-1}), přítomnost glykosidických vazeb (1100 cm^{-1}) a vibrace C–O v primárních alkoholech (1050 cm^{-1}). U vzorku E3 je patrný i pík u 722 cm^{-1}, který by indikoval přítomnost vyšších mastných kyselin.



Obrázek 33 - FTIR spektra pro TLC fáze E, 2. část

Z naměřených dat lze tedy konstatovat, že barvivo obsahuje sacharidy, i ve formě polysacharidů, vyšší mastné kyseliny, molekuly bílkovinné povahy a chinonové struktury. Červená řepa, jak je popsáno v kapitole 2.5.8, obsahuje betalaininy, které mají antioxidační účinek a je zdrojem polyfenolických struktur. Taktéž je červená řepa zdrojem jak proteinů, tak tuků, vyšších mastných kyselin, fytosterolů a jiných látek, které uvádí literatura [33].

4.1.4 Zbytkový obsah methanolu

Protože kalibrační řada standardu methanolu byla připravována objemovým ředěním, bylo nutné přepočítat objemová procenta na ta hmotnostní, aby bylo možné sestavit regresní rovnici pro přepočet. **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** obsahuje přepočítaná data objemových procent na hmotnostní, postup výpočtu je zkráceně naznačen v rovnici 1:

$$w = 100 \cdot \frac{m_s}{m} = = \frac{\mathbf{100 \cdot \varphi \cdot \rho(MeOH)}}{\mathbf{\rho(MeOH) \cdot \varphi + \rho(voda) \cdot (1 - \varphi)}} \mathbf{[\%]}, \quad (1)$$

kde w je hmotnostní zlomek methanolu v procentech, V je celkový objem směsi, m_s je hmotnost methanolového podílu, m je celková hmotnost rozpouštědla, φ je objemový zlomek a ρ je hustota.

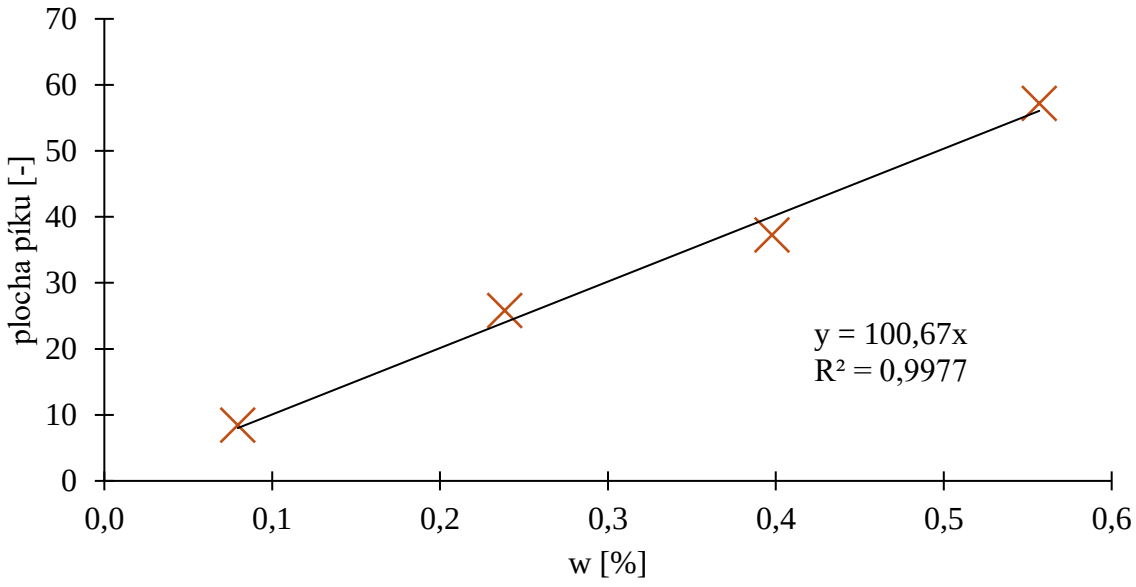
Tabulka 14 - Hodnoty objemových a hmotnostních procent kalibračních roztoků

Vzorek	φ [%]	w [%]
MeOH	0,7	0,56
MeOH	0,5	0,40
MeOH	0,3	0,24
MeOH	0,1	0,08

Tabulka 15 udává naměřené hodnoty ploch píků a příslušné koncentrace daných kalibračních standardů. Z těchto dat byla vytvořena regresní závislost (na obrázku 34), pomocí které byla, jak uvádí rovnice, vypočtena hmotnostní procenta methanolu ve třech navážkách barviva, které uvádí tabulka 16.

Tabulka 15 - Hodnoty koncentrací a ploch píků pro kalibrační řadu a vzorky barviva

Vzorek	w [%]	plocha píku [-]
MeOH	0,56	57,2
MeOH	0,40	37,3
MeOH	0,24	25,8
MeOH	0,08	8,4



Obrázek 34 - Regresní závislost ke kalibraci roztoky methanolu

Tabulka 16 - Plochy píků pro navážky barviva a odpovídající hmotnostní procenta

Navážka	Plocha píku [-]	w [%]
1	14,6	0,14
2	8,9	0,09
3	1,8	0,02
Průměr		**0,08±0,06**

Z hodnot hmotnostního zastoupení je patrné, že žádná z navážek svým obsahem methanolu nepřekračuje 0,15 %, v průměru se tato hodnota dostává pod 0,1 % hm. Dle nařízení Evropského parlamentu č. 1223/2009 je limit pro methanol v kosmetických přípravcích 5 % [56], z čehož vyplývá, že mnou připravené barvivo lze použít pro výrobu kosmetických produktů, jakým je například balzám na rty.

Pokles hodnot ploch ve vzorcích barviva, ačkoliv jsou naváženy z téže zásobní krabičky, ve které bylo barvivo po celou dobu uchováváno v exsikátoru, je pravděpodobně dáno nehomogenitami ve vzorku. Ačkoliv by tato data mohla zavádět na rezidua methanolu v přístroji z měření standardních roztoků, mezi samotnou kalibrací a vzorky byla měřena ještě čistá MQ voda jako slepý vzorek a ta žádnou odezvu odpovídající methanolu nevykazovala. Pokud by tedy zůstala nějaká část methanolu v některé z částí analyzátoru, projevilo by se to už na vzorku vody. A tudíž vliv na obsah methanolu může mít způsob zpracování barviva a s ním spojený vznik koncentračních. Samozřejmě pro prokázání této hypotézy, že se jedná o nehomogenní vzorek, by muselo být provedeno více testů a byla by zapotřebí možná pečlivější optimalizace metody. Nicméně pro základní tvrzení, že ve vzorku se zbytkový methanol nachází, ale je pod zákonem stanovenou hranicí, tato analýza postačuje.

4.1.5 Stabilita barviva

Zásadním problémem při přípravě balzámu a následném vyhodnocování jeho stability byla barevná nestálost použitého řepného barviva. To si svou červenou barvu, resp. růžovou při emulgaci v balzámu na rty, uchovávalo pouze o omezenou dobu. Po 14 dnech se na některých místech balzámu začaly objevovat světlejší skvrny, po zhruba měsíci se celý balzám začal zabarvovat do žluta. Tyto problémy nastávaly již při prvotních pokusech, jak je vyobrazeno výše na obrázku 13.

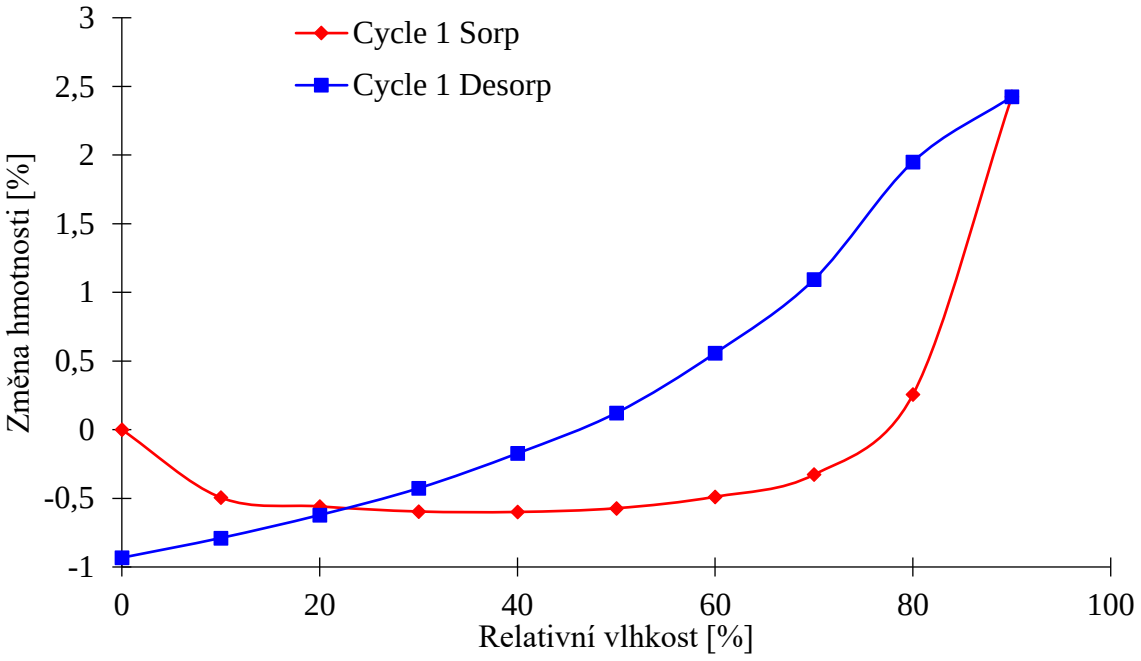
Prvním pokusem o změnu tohoto stavu byla implementace některé látky, jež je známá svými antioxidačními vlastnostmi, do samotné receptury. Tak byly do balzámu přidány vitaminy C a E, které oba fungují preventivně proti oxidaci [48]. Ovšem i toto řešení se nezdálo jako dostatečné, i vzhledem k degradaci vzorků, které byly původně zamýšleny jako finální pro dlouhodobou stabilitu, a tak byl z receptury vyřazen mandlový olej, jež byl pokládán za původce znehodnocení barviva i vzorků. Bylo ověřeno, že než na barvivo, má míra obsahu vitaminu C vliv zásadně spíše na pH celého vzorku, a proto byl jeho hmotnostní obsah upraven tak, aby vzorek po své přípravě splňoval hodnoty stanovené legislativně, a to 4–6,5 [54].

Po přípravě nových vzorků, které jsou předmětem studia dlouhodobé stability této diplomové práce, to vypadalo se samotnou stabilizací barviva nadějněji, ovšem opět po čase

došlo k zažloutnutí vzorků, vliv měly pouze skladovací podmínky, jak je rozebráno níže v kapitole 3.7.1. Podezření padlo na vzdušnou vlhkost nebo vlhkost z vodné fáze, ve které bylo barvivo rozpuštěno. Pro ověření této hypotézy bylo využito dvou postupů – jednak byly připraveny roztoky na stanovení antioxidačních vlastností samotných aktivních látek, jak popisuji v kapitole 3.5.1 (výsledky 4.3.1), ale také byl vzorek balzámu otestován metodou DVS. Předpokladem, že vliv na stabilitu barviva má vlhkost, byl fakt, že lyofilizát barviva byl po dobu trvající přes rok uložen v exsikátoru v nádobce obalené alobalem. Vliv teploty a světla byl vyloučen, neboť samotné vzorky balzámu byly stejně jako lyofilizát uloženy v laboratoři při pokojové teplotě a zároveň uchovávány ve skříňce bez přístupu denního světla.

Při testování antioxidačních vlastností byly roztoky staré 1 měsíc stejně zabarvené jako roztoky připravené čerstvě před měřením. Z toho důvodu bylo usouzeno, že pokud by na stálost barviva měla vliv vodná fáze, projevilo by se to změnou barvy testovaného roztoku. Samotné balzámy barevně degradovaly již po měsíci, kdežto tyto roztoky nikoliv. Zdali by se tak přece jen stalo po delší době, nebylo ověřeno.

Výsledkem testování pomocí dynamické sorpce par také nebyla změna barvy balzámu. Nicméně se projevila jistá hygroskopicita vzorku, neboť na konci sorpčního cyklu narostla hmotnost vzorku o 2,43 %. Zajímavé však je, že při nižších hodnotách relativní vlhkosti atmosféry měl vzorek tendenci spíše desorbovat a „vysoušet“ se. Jak je vidět z grafického záznamu měření (obrázek 35), mezi sorpční a desorpční křivkou se projevuje hystereze, v konečném důsledku je hmotnost vzorku po desorpci nižší téměř o 1 %. Průběh měření spolu s reportem je součástí přílohy 2.



Obrázek 35 - Záznam změny hmotnosti vzorku vůči referenci vztažené na relativní vlhkost atmosféry, červená linie pro sorpční fázi měření, modrá linie pro desorpci

4.2 Posouzení dlouhodobé stability balzámu

V této kapitole jsou zahrnuty výsledky pozorování a studování fyzikálně-chemických vlastností balzámů po dobu 4 měsíců. Organoleptické vlastnosti, roztěrové a reologické chování bylo porovnáno s vlastnostmi vzorků, které měly 2 dny po jejich samotné přípravě, kalorimetrické stanovení bodu tání se odvíjí až od měsíčního stáří vzorků. Doba 2 dnů je literaturou deklarována jako dostatečná pro ustálení struktury a vlastností balzámů po jejich přípravě [20].

Různí autoři studovali dlouhodobou stabilitu svých balzámů na rty v rozličných podmínkách a časových intervalech. Pro příklad Permatananda a kol. [57] sledovali stability připraveného balzámu při pokojové teplotě s intervaly měření v 1, 4, 8 a 12 týdnech. A. Ribeiro-Fernandes a kol. [20] své vzorky skladovali při třech různých teplotních podmínkách po dobu 90 dní. Pawar a kol. [52] zvolili taktéž pokojovou, zvýšenou a sníženou teplotu, ovšem po dobu 1 měsíce.

4.2.1 Posouzení organoleptických vlastností

U organoleptických vlastností byly hodnoceny tyto následující parametry:

- vzhled;
- pH;
- barva;
- vůně;
- hydratační schopnosti;
- dráždivost;
- a vzhled při rozetření, jemuž je věnována následující kapitola.

Způsob hodnocení těchto parametrů byl převzat z jiných studií a upraven pro možnosti a potřeby této diplomové práce [20] [51] [52] [54].

Parametry byly hodnoceny každý specifickým způsobem. U barvy balzámu byla sledována její změna. Na počátku měření měly balzámy s barvivem načervenalý odstín, vzorky pouze s humátem byly béžovo-šedé barvy a kontrolní řada měla bělavý odstín srovnatelný s běžně dostupnými balzámy. Vůně byla hodnocena čichovým vjemem a porovnáním s počátečním stavem, tedy zda není cítit náznaky žluknutí nebo jiných degradačních změn, které by se tímto způsobem ve vzorku mohly projevit. Hodnocení proto pro oba výše zmíněné parametry probíhalo systémem: N – normální, Z – změněná a X – vzorek zlikvidován/zdegradován.

U vzhledu bylo dbáno na to, zda vzorek nepodléhá viditelnému zhoršování své kvality a zda je homogenní nebo nedochází k rozpadu emulze. Opět byl použit systém hodnocení NZX popsaný výše. Hodnota pH byla měřena pomocí indikačních papírků. Hydratace a dráždivé schopnosti byly vyhodnoceny na vlastní pokožce pomocí patch-testů. Hodnotilo se buď ANO nebo NE, v závislosti na projevení hydratace pokožky a alergické reakce nebo podráždění.

Tabulka 17 - Vyhodnocení stability vůně

			Vůně		
Řada	**2 dny**	**1M**	**2M**	**3M**	**4M**
01	N	N	N	N	N
02	N	N	N	N	N
03	N	N	N	N	N
04	N	N	N	N	N
05	N	N	N	N	N

Balzámy měly typickou kokosovou vůni po použitém kokosovém oleji, který byl lisovaný za studena a tím si zachoval své aroma. U vzorků, které měly navíc ve své receptuře barvivo (řady 01, 02 a 05) byla vůně o něco sladší, s nádechem malin. Vůně všech vzorků jednotlivě se během pozorování v průběhu 4 měsíců nezměnila, jak je uvedeno v tabulce 17. Dle pachových vjemů k žádné degradaci balzámů nedošlo, na vůni neměly vliv ani skladovací podmínky. Proto byly v tabulce uvedeny souhrnné údaje vždy pro celou řadu.

Jinak tomu není ani v případě pH, které vzorky vykazovaly stabilně s hodnotou 5, uvedeno v tabulce 18. V případě studie [54] využívali autoři k měření pH metr. V případě této diplomové práce však takový pH metr, který by byl použitelný pro olejové složky nebyl, a proto bylo využito klasických indikačních papírků. Dle literatury je optimální hodnota pH balzámů na rty mezi 4–6,5 [54], což všechny testované vzorky během stabilitní studie splnily.

Tabulka 18 - Vyhodnocení hodnot pH vzorků

			pH		
Řada	**2 dny**	**1M**	**2M**	**3M**	**4M**
01	5	5	5	5	5
02	5	5	5	5	5
03	5	5	5	5	5
04	5	5	5	5	5
05	5	5	5	5	5

U hydratace byl hodnocen pocit pokožky po aplikaci balzámu, jeho ponechání na kůži a následném setření. Aby pokožka prošla testem hydratace, musela být po aplikaci balzámu vláčnější a ve viditelně lepší kondici. Jako reference při tomto pozorování sloužila pokožka na druhé ruce, kdy ani na jedné ruce hodnotícího subjektu není výskyt žádného kožního onemocnění a pokožka má stejné vlastnosti. Podráždění bylo pozorováno podle možného začervenání pokožky. Oba parametry a jejich hodnocení zahrnuje tabulka 19. Všechny vzorky v daných řadách se chovaly stejně, proto jsou výsledky uváděny souhrnně za každý druh vzorků.

Tabulka 19 - Vyhodnocení Hydratačních schopností a podráždění

	Hydratace/Podráždění				
Řada	**2 dny**	**1M**	**2M**	**3M**	**4M**
01	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE
02	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE
03	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE
04	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE
05	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE	ANO/NE

Vzorky spolehlivě hydratovaly a nevyvolávaly na pokožce nežádoucí reakce. Stabilitou během čtyř měsíců tak z hlediska snášenlivosti s pokožkou prošly. Testům, zda balzámy na rty nepodráždí pokožku, se věnovali také ve studii H. Anisa a kol. [53], kde hodnotili podráždění po 10 minutách na pokožce, vždy ve třech opakováních. V práci E. Kusrini a kol. [49] byla dráždivost testována na třech osobách ve věku mezi 20 a 35 lety, kdy balzám na rty nanášeli na pokožku předloktí po dobu dvou dnů. Jimi zpracovaný balzám taktéž nevyvolával žádnou negativní odezvu. V práci P. A. N. K.Permatananda a kol. [57] využili taktéž patch-testy na 12 dobrovolnících, kdy balzám aplikovali na pokožku předloktí třikrát denně po dobu tří dnů.

V téže studii [57] se věnovali také hydratačním vlastnostem svého produktu, kdy skupinu 12 dobrovolníků rozdělili do 6 podskupin a každá z nich používala jinou recepturu. Pokožku rtů analyzovali před provedením testu a poté během a po skončení pomocí přístroje. Celkově měření probíhalo při denní aplikaci po 1, 2, 3 a 4 týdnech. Z měření vyplynulo, že balzám měl vliv na zvýšení hydratace rtů u všech subjektů již po jednom týdnu pravidelného užívání. U A. A. Yusof a kol. [51] byla hydratační schopnost balzámu měřena pomocí digitálního monitoru pokožky (SK-IV), kdy byl změřen rozdíl pokožky rtů před a po aplikaci balzámu u vybraných dobrovolníků.

Vzhled byl hodnocen jak v průhledných lahvičkách, ve kterých byly vzorky skladovány, tak poté také při rozetření na podložní sklo. U všech vzorků nebyly po celou dobu měření pozorovány jakékoliv změny ve struktuře nebo vzhledu, všechny vzorky se zdály být homogenní a nejevily známky degradace emulze, jak je uvedeno v tabulce 20. Homogenitu vzhledu zkoumali také u vzorků připravených v pracích P. A. N. K.Permatananda a kol. [57], J. C. Pawar a kol. [52], S. N. H. M. Azmin a kol. [54] a dalších, kdy u všech došlo ke shodnému výsledku – připravené vzorky byly v čase vzhledově stabilní a homogenní.

Tabulka 20 - Vyhodnocení vzhledu vzorků

	Vzhled				
Řada	**2 dny**	**1M**	**2M**	**3M**	**4M**
01	N	N	N	N	N
02	N	N	N	N	N
03	N	N	N	N	N
04	N	N	N	N	N
05	N	N	N	N	N

Barva byla základním parametrem, který byl hodnocen u všech stabilitních studií, výsledky hodnocení jsou uvedeny v tabulce 21. U vzorků s obsahem barviva z červené řepy bohužel došlo po měsíci ke změně zabarvení z načervenalé na žlutou. U vzorků řady 05, která byla na rozdíl od ostatních skladována v lednici, se odbarvování projevovalo déle, než u řad 01 a 02, vzorky sice na povrchu byly zežloutlé, ovšem uprostřed si stále až do 3. měsíce zachovávaly původní odstín. U vzorků, které neobsahovaly barvivo, ke změně zabarvení po celou dobu studie nedošlo. Možným důvodům degradace barviva a měření jeho stability se věnuje podrobněji kapitola 4.1.5.

A. A. Yusof [51] k porovnání barevnosti a intenzity odstínu vzorků balzámu na rty kolorimetr firmy Lovibond. H. Anisa a kol. [53] využili jako barvivo pro svůj balzám mrkev, jež extrahovali v n-hexanu. V tomto případě nedošlo k odbarvení vzorků po dobu 20 dnů, což by souhlasilo s výsledky stálosti barvy balzámu i v této diplomové práci i vzhledem k podobnosti extrakčního procesu. A. Ribeiro-Fernandes a kol. [20] využili pro barvení balzámu taktéž ovoce s obsahem betainu, stejně jako červená řepa. Po dobu 90 dní se odstín změnil pouze u vzorků skladovaných za vyšší teploty. Červenou řepu jako zdroj barviva pro svůj produkt využili Pawar a kol. [52], kdy jejich balzám na rty měnil zbarvení pouze při skladování za vyšší teploty. Také Azmin a kol. [54] se rozhodli použít červenou řepu, jejíž změnu v odstínu sledovali pomocí chromometru Konica Minolta CR-400. Prokázali souvislost mezi mírou obsahu kokosového oleje a stabilitou betalaininu, neboť vyšší množství oleje způsobuje vyšší transparentnost vzorku, a tím betalainin více vystavuje degradačním vlivům světla, což tvrdí také Cai a kol. [58].

Tabulka 21 - Vyhodnocení změny barvy vzorků

	Barva				
Vzorek	**2D**	**1M**	**2M**	**3M**	**4M**
01-1	N	Z	Z	Z	Z
01-2	N	Z	Z	Z	Z
01-3	N	Z	Z	Z	Z
02-1	N	Z	Z	Z	Z
02-2	N	Z	Z	Z	Z
02-3	N	Z	Z	Z	Z
03-1	N	N	N	N	N
03-2	N	N	N	N	N
03-3	N	N	N	N	N
04-1	N	N	N	N	N
04-2	N	N	N	N	N
04-3	N	N	N	N	N
05-1	N	Z	Z	Z	Z
05-2	N	Z	Z	Z	Z
05-3	N	Z	Z	Z	Z

U A. A. Yusof a kol. [51] byl, na rozdíl od této diplomové práce, proveden i test obsahu vlhkosti balzámu. Měření probíhalo metodou AOAC, kdy byl nejprve zvážen připravený balzám, tato navážka pak byla za pomocí sušárny vysušena za 1 hodinu při 70 °C a znovu převážena. Z toho byla pak procentuálně vypočtena hmotnostní ztráta vlhkosti. Tento parametr porovnávali v závislosti na obsahu aktivní látky, kterou v této práci tvořil med. S vyšším obsahem medu v receptuře docházelo k větší retenci vody ve struktuře produktu.

4.2.2 Roztěrové testy

U roztěrových testů byla hodnocena homogenita z pohledu nanesené vrstvy, zda je vzorek schopen vytvořit jednotný film. Data v tabulce 22 ukazují, že pouze u tří vzorků se v průběhu měření začaly vyskytovat hrudky, ovšem nijak nebránily roztírání vzorku. Všechny vzorky se roztíraly během celé stabilitní studie jednoduše a manipulace s nimi byla jednoduchá.

Tabulka 22 - Vyhodnocení roztěrových testů

	Roztěr				
Vzorek	**2D**	**1M**	**2M**	**3M**	**4M**
01-1	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
01-2	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
01-3	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
02-1	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
02-2	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
02-3	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
03-1	Ok	Ok	Ok	Hrudky	Hrudky
03-2	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
03-3	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
04-1	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
04-2	Ok	Ok	Hrudky	Hrudky	Hrudky
04-3	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
05-1	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
05-2	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
05-3	Ok	Ok	Ok	Ok	Hrudky

Ribeiro-Fernandes a kol. [20] roztěr testovali na podložním skle, kde sledovali uniformitu stopy a fragmentaci. Permatananda a kol. [57] roztěr zkoumali přímo na pokožce ruky. Porovnávali vliv složení receptury na pohodlnost aplikace balzámu. Anisa a kol. [53] se věnovali taktéž studiu homogenity a uniformity při roztěru na podložním skle. Ve všech případech bylo výsledkem, že balzámy jsou pohodlně roztíratelné a homogenní. Ve studii A. A. Yusof a kol. [51] se při roztěrovém porovnání chovaly odlišně pouze vzorky skladované za vyšší teploty.

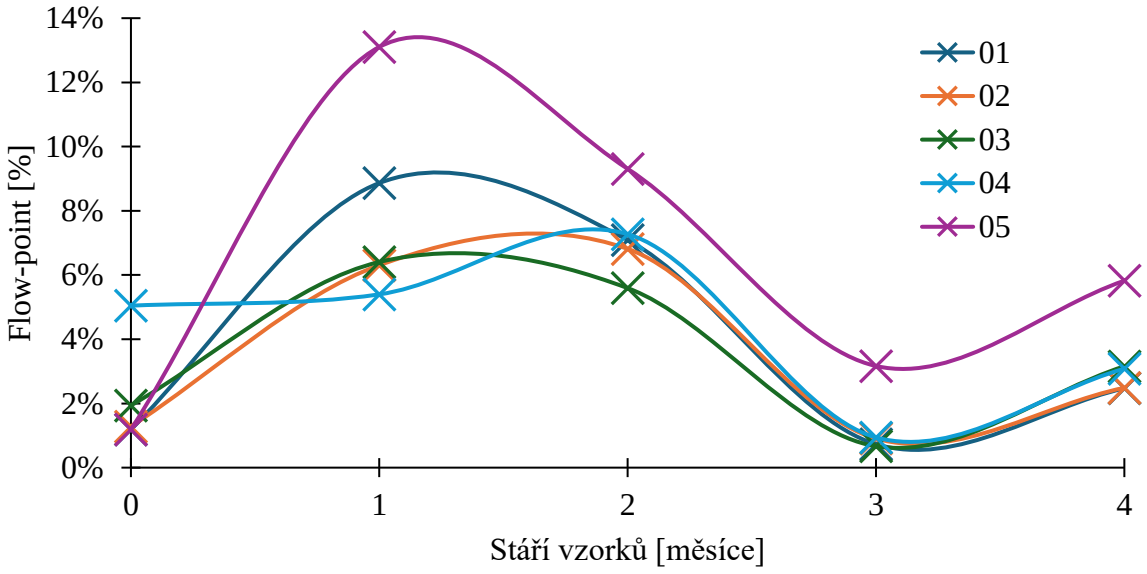
4.2.3 Reologické testy

U reologických testů byly stanovovány dva zásadní parametry, a to flow-point, kdy dochází k překřížení křivek obou modulů G‘ a G‘‘, takže za touto hranicí se vzorek stává zcela tekutým, a lineární viskoelastické oblasti (LVO), které udává pevnost struktury dané látky, tedy do jaké míry je možné ji namáhat, aby byla změna vratná [59].

Flow-point byl vyhodnocen přímo v měřícím systému TRIOS a výsledky jsou uvedeny v tabulce 23. Pro každou řadu vzorků je zde uvedena průměrná hodnota včetně odchylky. Pro lepší představu bylo zpracováno i grafické znázornění na obrázku 36. Řada 05 na počátku nebyla měřena, protože složením je stejná jako řada vzorků 01.

Tabulka 23 - Hodnoty flow-pointu pro jednotlivé vzorkové řady

	Flow point [%]				
Řada	**start**	**1 měsíc**	**2 měsíce**	**3 měsíce**	**4 měsíce**
01	1,19±0,02	8,86±3,78	7,09±4,12	0,73±0,18	2,47±1,31
02	1,28±0,36	6,31±3,01	6,81±4,00	0,91±0,18	2,49±2,59
03	1,94±0,05	6,41±2,50	5,59±1,60	0,67±0,17	3,16±1,62
04	5,04±0,38	5,40±2,24	7,27±3,40	0,94±0,34	3,08±2,40
05	1,19±0,02	13,10±7,80	9,31±4,33	3,17±4,09	5,82±2,96

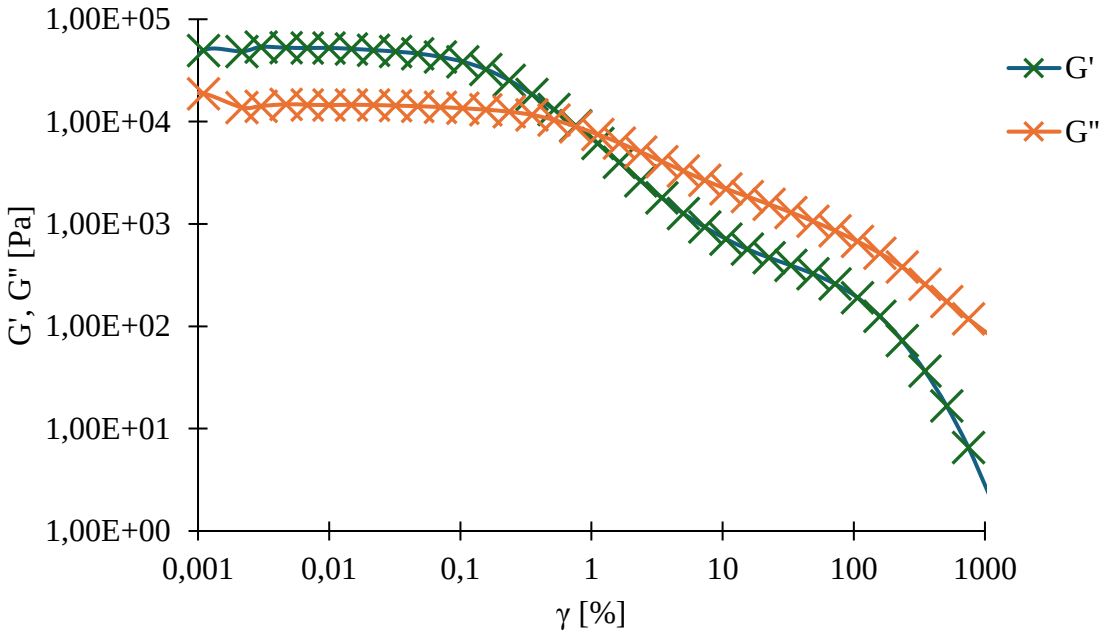


Obrázek 36 - Grafické znázornění průběhu jednotlivých flow-pointů v čase

Jak je z výsledků patrné, hodnota oscilačního napětí, které způsobovalo nevratnou změnu v elasticitě vzorků vykazuje u všech čtyř typů balzámu, jež byly skladovány při laboratorní teplotě, stejný průběh křivky – v 1. měsíci měření je nárůst napětí, které pak klesá, aby opět ve 4. měsíci začalo stoupat, výjimkou je první hodnota pro řadu 04. Zajímavé je sjednocení tohoto napětí při měření ve 3. měsíci stabilit pro všechny 4 typy vzorků. Řada vzorků 05 sice kopíruje tvarem předchozí zmíněné typy, ovšem hodnoty oscilačního napětí jsou téměř dvojnásobné.

To mohlo být zapříčiněno jinými skladovacími podmínkami, jimiž se tato vzorková řada jako jediná odlišuje. Znamenalo by to, že struktura je odolnější vůči namáhání. Celkově lze říci, že největší tendenci stát se tekutými měli všechny vzorky ve 3. měsíci měření, kdy stačilo aplikovat jen velmi malé oscilační napětí.

Lineární viskoelastická oblast by se dala charakterizovat jako oblast, kdy elastický modul G‘ není závislý na oscilačním napětí γ. To představuje konstantní část křivky, příklad takového záznamu je ukázán na obrázku 37. V tabulce 24 jsou uvedena data průměrných hodnot LVO pro dané vzorkové řady v průběhu času. Opět je vyvedeno i grafické zobrazení posunu těchto hodnot v čase, jak znázorňuje obrázek 38.

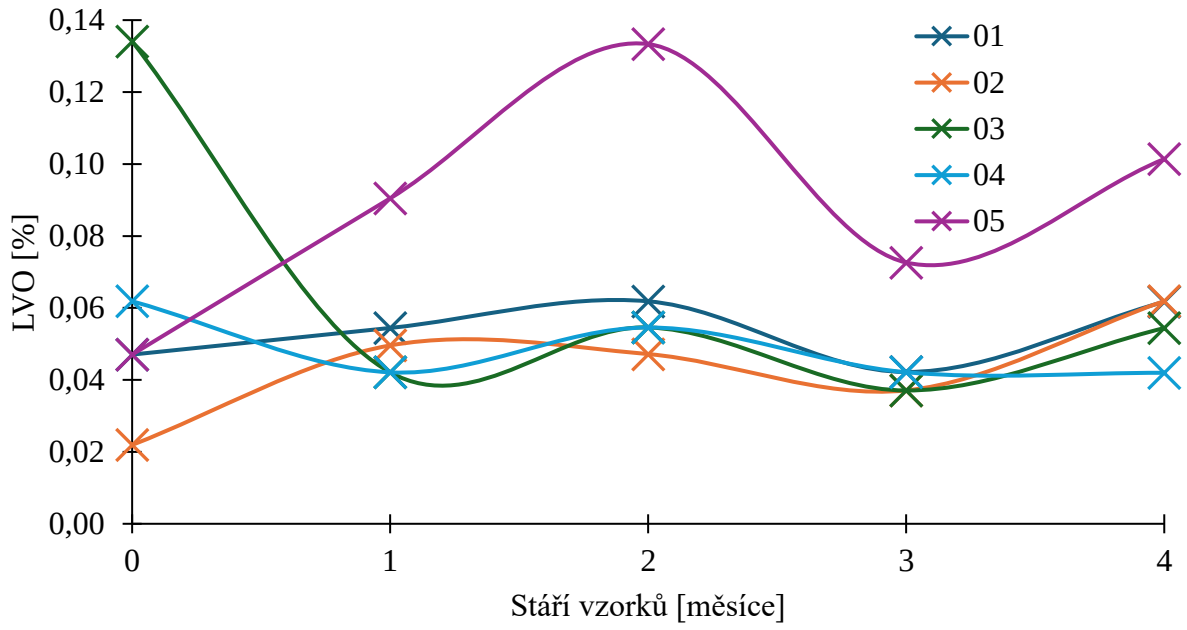


Obrázek 37 - Záznam z oscilačního měření

Tabulka 24 - Hodnoty LVO pro jednotlivé vzorkové řady

	LVO [%]				
Řada	**start**	**1 měsíc**	**2 měsíce**	**3 měsíce**	**4 měsíce**
01	$0{,}047 \pm 2{,}6 \cdot 10^{5}$	$0{,}054 \pm 1{,}3 \cdot 10^{2}$	$0{,}062 \pm 1{,}3 \cdot 10^{2}$	$0{,}042 \pm 8{,}8 \cdot 10^{3}$	$0{,}062 \pm 1{,}3 \cdot 10^{2}$
02	$0{,}022 \pm 4{,}5 \cdot 10^{5}$	$0{,}050 \pm 1{,}9 \cdot 10^{2}$	$0{,}047 \pm 1{,}0 \cdot 10^{4}$	$0{,}037 \pm 8{,}8 \cdot 10^{3}$	$0{,}062 \pm 1{,}3 \cdot 10^{2}$
03	$0{,}134 \pm 2{,}8 \cdot 10^{2}$	$0{,}042 \pm 8{,}8 \cdot 10^{3}$	$0{,}055 \pm 1{,}3 \cdot 10^{2}$	$0{,}037 \pm 8{,}8 \cdot 10^{3}$	$0{,}054 \pm 1{,}3 \cdot 10^{2}$
04	$0{,}062 \pm 1{,}3 \cdot 10^{2}$	$0{,}042 \pm 8{,}8 \cdot 10^{3}$	$0{,}055 \pm 1{,}3 \cdot 10^{2}$	$0{,}042 \pm 8{,}8 \cdot 10^{3}$	$0{,}042 \pm 8{,}6 \cdot 10^{3}$
05	$0{,}047 \pm 2{,}6 \cdot 10^{5}$	$0{,}090 \pm 1{,}8 \cdot 10^{2}$	$0{,}133 \pm 2{,}8 \cdot 10^{2}$	$0{,}073 \pm 6{,}8 \cdot 10^{2}$	$0{,}101 \pm 2{,}9 \cdot 10^{4}$

LVO byla vyhodnocena na základě metody ±5% odchylky hodnot, která se řídí normou ISO 6721-10 [59].



Obrázek 38 - Grafické znázornění průběhu jednotlivých LVO v čase

Jak je patrné z obrázku 38, výsledky se podobají průběhu hodnot flow-pointu – první čtyři vzorkové řady mají výsledky přibližně stejné, pátá řada se odlišuje, ačkoliv dodržuje stejný tvar křivky. To může být opět zapříčiněno rozdílnými skladovacími podmínkami a chováním vzorku. Také je vidět, že struktura vzorků řady 05 je schopna snést větší namáhání bez nevratné změny na rozdíl od ostatních vzorků.

Reologické testování neměla zahrnuto žádná studie, která byla použita pro inspiraci k měření a následné porovnávání výsledků. Proto jsou vlastnosti srovnány se studií, která se zaměřila na termální a mechanické vlastnosti referenční rtěnky [60]. V závislosti na prototypu a tím pádem i složení referenční rtěnky se pohybovaly i hodnoty LVO. Pro všechny vzorky platilo, že dosáhly flow-pointu za hodnotou oscilačního napětím 10 %. Pokud byl vzorek velmi odolný, pohybovala se jeho LVO okolo 15 %, málo odolné vzorky pak měly svou hranici před 0,5 %.

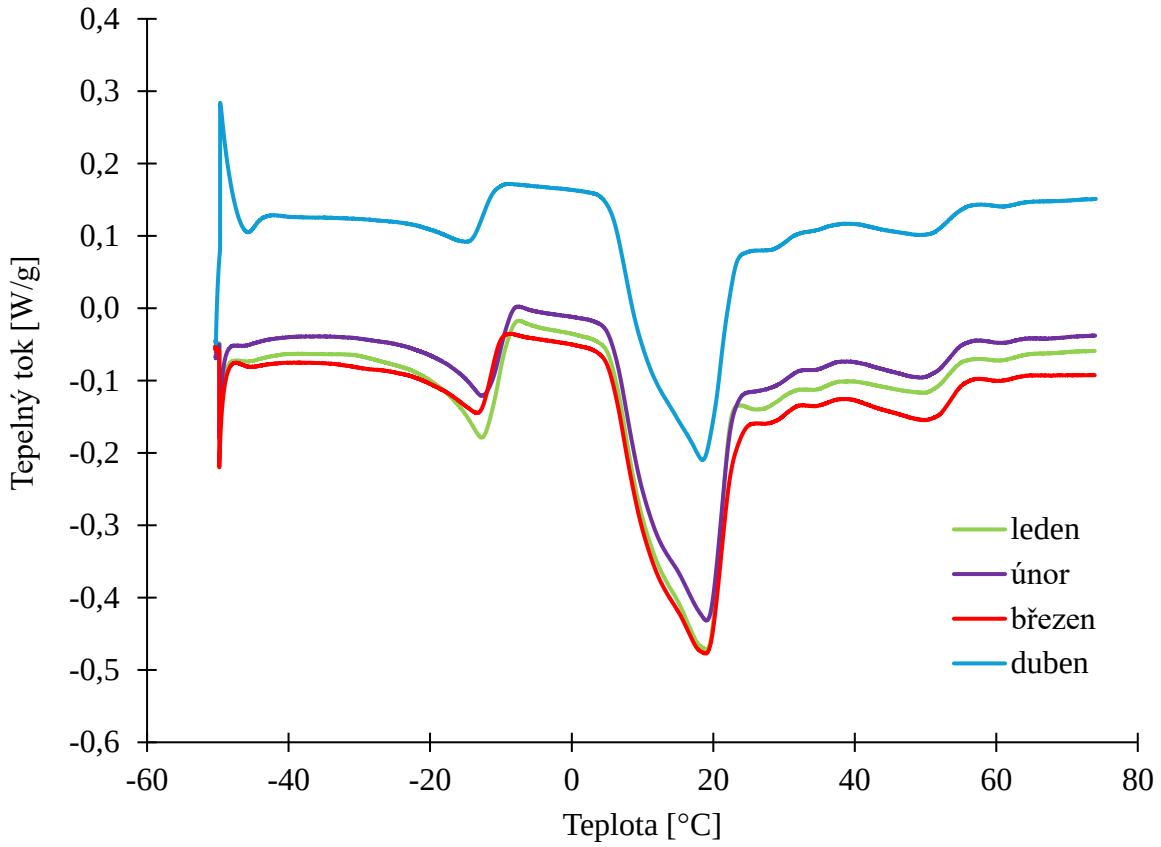
4.2.4 Kalorimetrie – posouzení teploty tání

Výsledky z diferenčního skenovacího kalorimetru poskytly záznamy o tepelných dějích, které se ve vzorku s jeho teplotním namáháním udávaly. V průběhu měrného cyklu se ve vzorcích objevilo několik endotermních procesů, jejichž píky vyjadřují teploty tání. Vyhodnocení probíhalo v softwaru Universal Analysis společnosti TA Instruments.

Tabulka 25 obsahuje přehled teplot píků v měření při stáří vzorků 2 měsíce, tedy provedené v únoru. Jak je vidět, u některých vzorků se objevují i píky mimo tři, které jsou typické pro všechna měření a všechny vzorky, a to teploty označené jako T_3 (okolo 30 °C) a T_5 (okolo 60 °C). Tyto teploty nebyly do celkového hodnocení zahrnuty, neboť nelze posoudit jejich vývin v čase, jelikož se vyskytují sice ve stejné oblasti, ale vždy u jiných vzorků. To je pravděpodobně způsobeno nehomogenitami ve složení a dispergaci vzorku, které ale nejsou vizuálně postřehnutelné. Příklad výsledného záznamu celého průběhu analýzy je na obrázku 39, který zachycuje vývin vzorku 02-3 v čase. Z toho je patrné, že v čase nedocházelo k přílišnému posunu teplot jednotlivých endotermických procesů, jež se při teplotním namáhání v balzámu udávaly.

Tabulka 25 - Teploty píků při měření vzorků ve dvou měsících stáří

Vzorek	T1 [°C]	T2 [°C]	T3 [°C]	T4 [°C]	T5 [°C]
01-1	-21,41	17,16	29,47	50,43	-
01-2	-12,55	18,18	28,03	50,45	-
01-3	-12,26	18,28	28,55	50,66	-
02-1	-26,34	18,63	-	50,8	-
02-2	-17,22	17,72	-	50,54	-
02-3	-12,46	18,81	-	50,08	-
03-1	-12,38	18,29	-	50,75	-
03-2	-11,8	18,17	27,62	50,5	66,64
03-3	-12,48	18,16	27,34	50,44	-
04-1	-11,21	17,48	-	50,58	-
04-2	-18,87	18,44	-	50,75	-
04-3	-9,94	19,06	27,58	50,23	-
05-1	-14,39	18,46	-	50,88	-
05-2	-16,23	18,35	-	50,97	57,77
05-3	-13,15	18,57	30,85	50,59	-



Obrázek 39 - Záznam měření pro vybraný vzorek 02-3

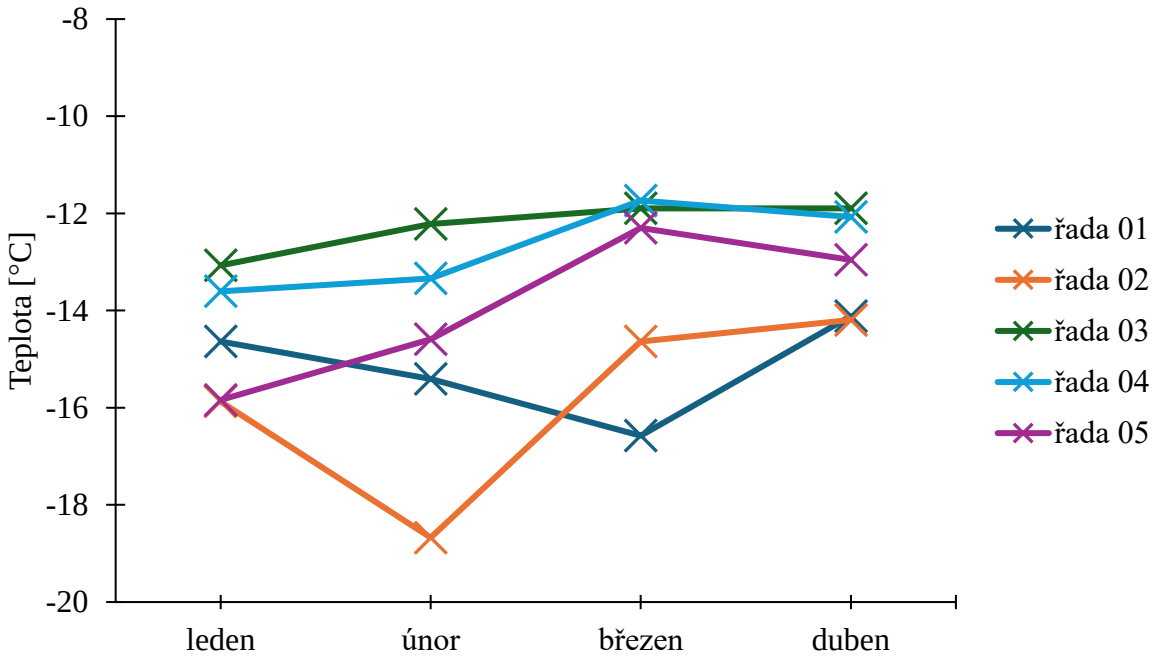
Pro další vyhodnocení výsledků byly vybrány píky T_1 (cca –15 °C), T_2 (cca 18 °C) a T_4 (cca 50 °C). Ty byly pro všechny vzorky z dané řady pro měření v daném měsíci zprůměrovány a zahrnuty do tabulky 26.

Tabulka 26 - Průměrné hodnoty teplot vybraných píků pro posouzení stability

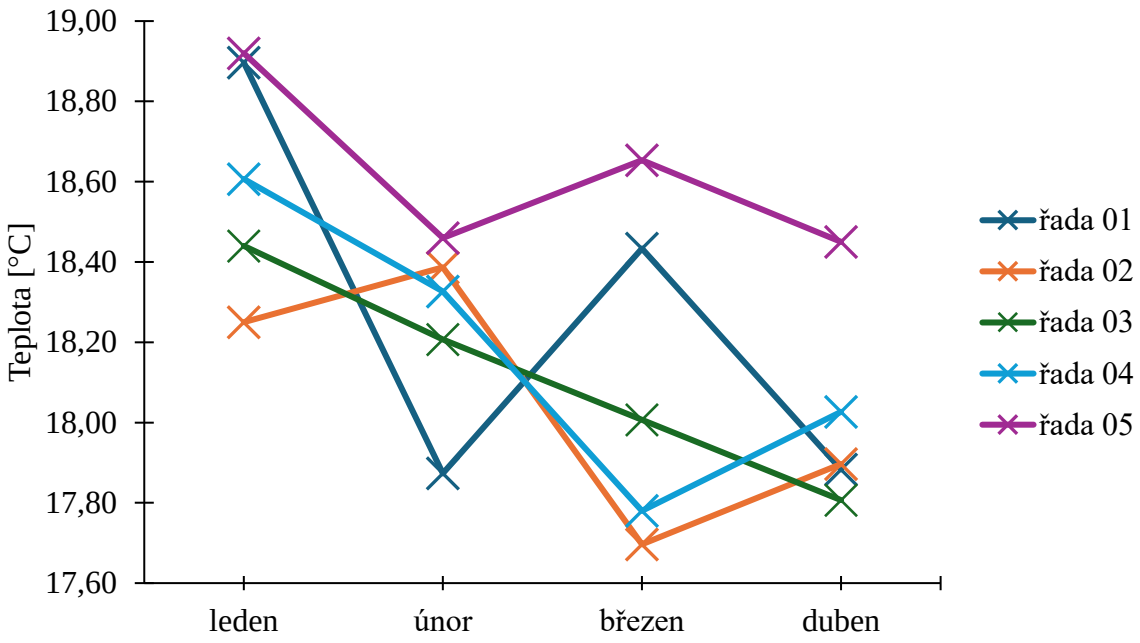
	Řada	**01**	**02**	**03**	**04**	**05**
	T_1 [°C]	-14,64±4,35	-15,87±3,39	-13,07±2,55	-13,61±2,23	-15,84±2,46
1M	T_2 [°C]	18,90±0,32	18,25±0,56	18,44±0,22	18,61±0,33	18,92±0,63
	T_4 [°C]	50,62±0,55	54,07±5,94	50,21±0,57	56,61±10,26	50,46±0,09
	T_1 [°C]	-15,41±5,20	-18,67±7,05	-12,22±0,37	-13,34±4,83	-14,59±1,55
2M	T_2 [°C]	17,87±0,62	18,39±0,58	18,21±0,07	18,33±0,80	18,46±0,11
	T_4 [°C]	50,51±0,13	50,47±0,36	50,56±0,16	50,52±0,27	50,81±020
	T_1 [°C]	-16,58±3,60	-14,64±1,85	-11,90±0,67	-11,74±4,64	-12,30±0,52
3M	T_2 [°C]	18,43±0,79	17,70±0,58	18,01±0,71	17,78±0,45	18,65±0,53
	T_4 [°C]	50,56±0,20	50,36±0,47	50,42±0,42	50,45±0,35	51,24±1,54
	T_1 [°C]	-14,11±1,40	-14,19±1,71	-11,90±1,48	-12,08±2,45	-12,96±1,35
4M	T_2 [°C]	17,88±0,48	17,90±0,43	17,81±0,46	18,03±0,40	18,45±0,33
	T_4 [°C]	50,51±0,23	50,76±0,39	50,38±0,31	50,53±0,31	50,34±0,58

První teploty tání (píky T_1) budou příslušet tání vodné fáze, hlavně její nosná část šťáva z Aloe vera. To však nemá vliv na tání celé struktury balzámu, mnohem zásadnější jsou další hodnoty teplot. U teploty pohybující se okolo 18 °C (píky T_2) budou příslušet glycerinu, jeho bod tání je literaturou udáván jako 17,8 °C [61]. Také se bude pravděpodobně jednat o tání hlavní složky balzámu, a to kokosového oleje, neboť teplota je blízká jeho teplotě tání podle uvedení výrobce, kdy je deklarováno zachování pevného stavu do 25 °C [62]. Tato teplota by zároveň mohla vysvětlovat i výskyt píků T_3, které se pohybují okolo 30 °C. hodnoty teplot píků T_4, jež jsou úzce rozptýleny okolo teploty 50 °C, pravděpodobně souvisí s obsahem lanolinu, jehož teplota tání je uváděna při 40 °C [63]. Zároveň se již pomalu přibližuje k teplotě tání bílého včelího vosku, jež je v balzámu použit, která se pohybuje v rozmezí 60–70 °C [23]. Tato průměrná hodnota tání odpovídá s největší pravděpodobností spojité směsi kokosového oleje, lanolinu a včelího vosku, která byla vytvořena v procesu dispergace hydrofobních složek tohoto balzámu.

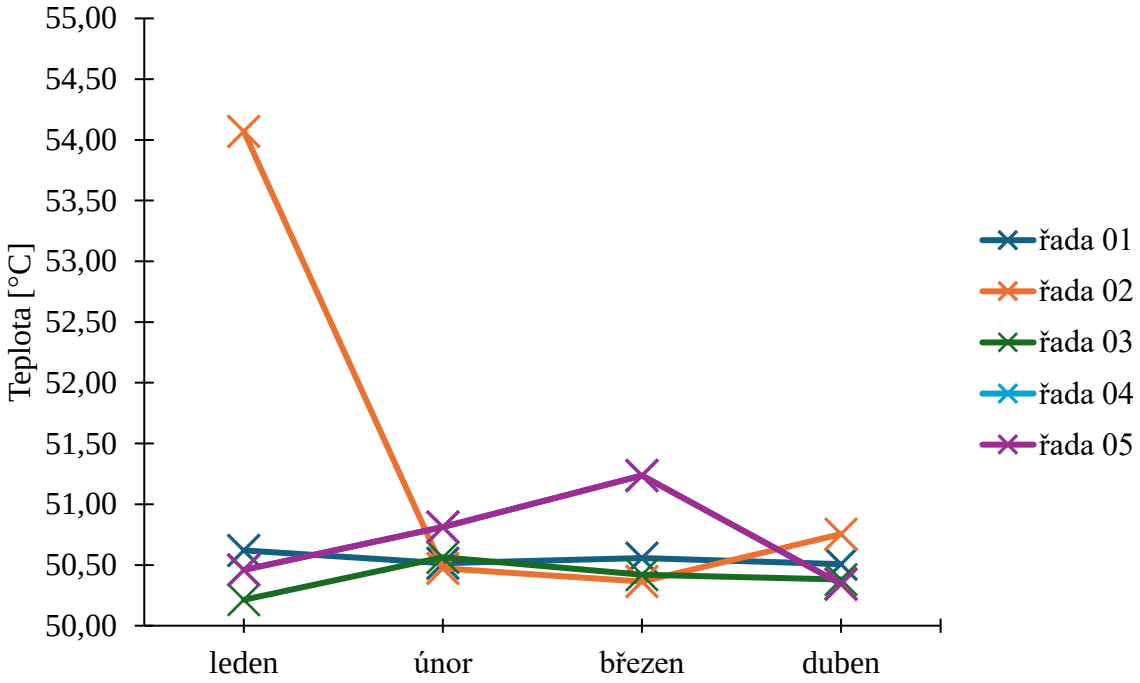
Jelikož však samotný balzám je při pokojové teplotě, tedy okolo 25 °C v pevném stavu, za teplotu tání by dle výsledů měla být pokládána teplota píků T_4 (cca 50 °C), kdy zcela jistě dochází ke zkapalnění hlavních nosných lipofilních složek, kokosového oleje, lanolinu a včelího vosku. Z toho důvodu jsou v tabulce 26 hodnoty teplot píků T_4 zvýrazněny. Pro lepší představu pohybu teplot tání je graficky vývin průměrných teplot pro všech pět řad vzorků znázorněn na obrázcích 40, 41 a 42.



Obrázek 40 - Záznam teplot píků T_1 v průběhu stabilit



Obrázek 41 - Záznam teplot píků T_2 v průběhu stabilit



Obrázek 42 - Záznam teplot píků T_4 v průběhu stabilit

Jak je možné vidět na záznamu pro píky T_1, teplota tohoto tepelného děje se u všech vzorků pohybuje v čase směrem mírně vzhůru. Jelikož tento proces tání je pravděpodobně spjat s přechodem vodného dispergovaného podílu zpět do kapalné formy, na samotnou teplotu tak mohou mít vliv degradační procesy v ní se odehrávající. Ovšem viditelné jsou pouze ve vzorcích, které obsahují barvivo, což jsou vzorky řad 01, 02 a 05. To by mohlo indikovat fakt, že k určitým změnám dochází ve vodné fázi i tak a barvivo je pouze viditelným projevem.

U teplot píků T_2 je naopak vidět pokles průměrných teplot během čtyřměsíčního měření. To by mohlo indikovat taktéž možný degradační proces ve struktuře balzámu. Teplota píků T_4, která je považována za teplotu tání celého balzámu, se ovšem nijak nemění. Hodnoty se stabilně pohybují okolo 50,50 °C pro všechny vzorky v průběhu celého měření dlouhodobé stability. Lze tedy s jistotou říci, že bod tání balzámu je v čase stabilní a víceméně neměnný. Nesplňuje však jediné, a to optimální limit stanovený dle odborné publikace R. Mariani 55–75 °C [64]. To souvisí i s tvrdostí balzámu, který je, ve srovnání s komerčně dostupnými produkty, jak je zmíněno výše, měkčí konzistence. Oba tyto fakty by vyřešilo navýšení obsahu včelího vosku v receptuře balzámu.

Z poznatků při přípravě balzámu lze s jistotou tvrdit, že nad 80 °C by měly být všechny složky balzámu v kapalném stavu, v případě hydrofobních pevných složek již při pokojové teplotě, neboť byly rozpuštěny v Aloe vera šťávě. Zároveň také s rostoucí teplotou a postupnou degradací pevné struktury vzorků jejím vlivem bude docházet k destrukci emulzního systému, neboť kapičky vodného podílu již nebudou drženy i pevnou fází lipofilního prostředí, které bude přecházet do kapalného stavu, a budou tak mít větší prostor k projevům koalescence nebo Ostwaldova zrání. Oba procesy vedou ke zvětšování kapek, jež se v polotekutém nebo tekutém balzámu projeví sedimentací, což již při tvorbě vzorků bylo projevem nedostatečné dispergace. I tyto faktory přispěly k mírně pozměněným hodnotám tání složek, jež se v čistém stavu projevují odlišně.

Ve studii Jayshri C. Pawara a kol. [52] se věnovali stanovení teploty tání balzámu pomocí bodotávku. Hlavní lipofilní surovinou jimi připraveného balzámu, který obsahoval taktéž extrakt barviva z červené řepy, byla na rozdíl od zde použitého kokosového oleje vazelína. Stanovené teploty tání se dle autorů pohybovaly mezi hodnotami 58–60±0,62 °C, což dle nich splňuje rozmezí bodu tání pro balzámy na rty stanovené literaturou, a to 55–75 °C [64].

Bodotávek ke stanovení teploty tání balzámu na rty využívali i jiní. Atiyah A. B. Yusof a kol [51]. Pro balzám použili taktéž kokosový olej, ovšem v kombinaci s bambuckým máslem, za to obarvený barvivem přírodního původu, které sami extrahovali, s obsahem betalaininu, což je srovnatelné s použitou červenou řepou, která tyto látky také obsahuje. Jimi vyhodnocená teplota tání byla taková, při níž došlo k tvorbě prvních kapalných struktur. Ta se pohybovala mezi 58 a 70 °C v závislosti na množství použitého včelího vosku v receptuře. Splnění správných teplot opět odkazovali na literaturu [64].

Průměrná hodnota tání u A. Ribeiro Fernandes a kol. [20] dosahovala hodnoty 72,9±1,7 °C. Sakshi Paithankar a kol. [50] uvádí rozpětí naměřených bodů tání 63–65 °C. Studie E. Kusrini a kol. [49] uvádí bod tání balzámu s obsahem včelího vosku a kokosového oleje okolo 65 °C.

V porovnání s ostatními balzámy je patrné, že jejich vyšší teplota tání je dána v poměru k ostatním surovinám vyšším obsahem včelího vosku, jež zapříčiňuje vyšší tvrdost, ale také vyšší teplotní odolnost výsledných balzámů.

4.2.5 Mikrobiální zátěž a růst

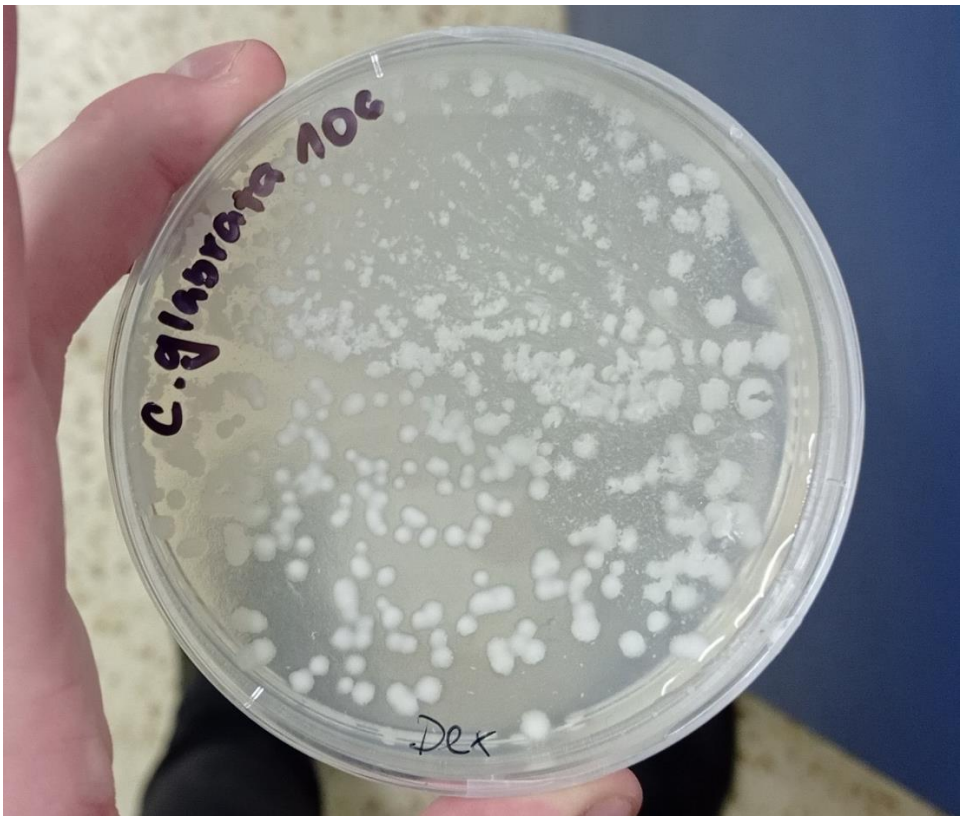
4.2.5.1 První test mikrobiální zátěže

V případě prvního testu byly vzorky ponechány k měsíční inkubaci a jejich kontrola proběhla až po stanoveném časovém intervalu. Teplota kultivace byla 25 °C, tedy pokojová teplota, při které je balzám běžně skladován. Cílem bylo ověřit, zda jsou tři vybrané mikroorganismy schopné být na produktu viabilní a zda tak balzám poskytuje pro ně vhodné rostoucí podmínky, což by znamenalo jeho nemožné dlouhodobé užívání v praxi. Pro kontrolu byly také nachystány plotny s vhodnou živnou půdou pro každou kulturu a také bylo využito ředění 10^3 a 10^6 pro výpočet KTJ.

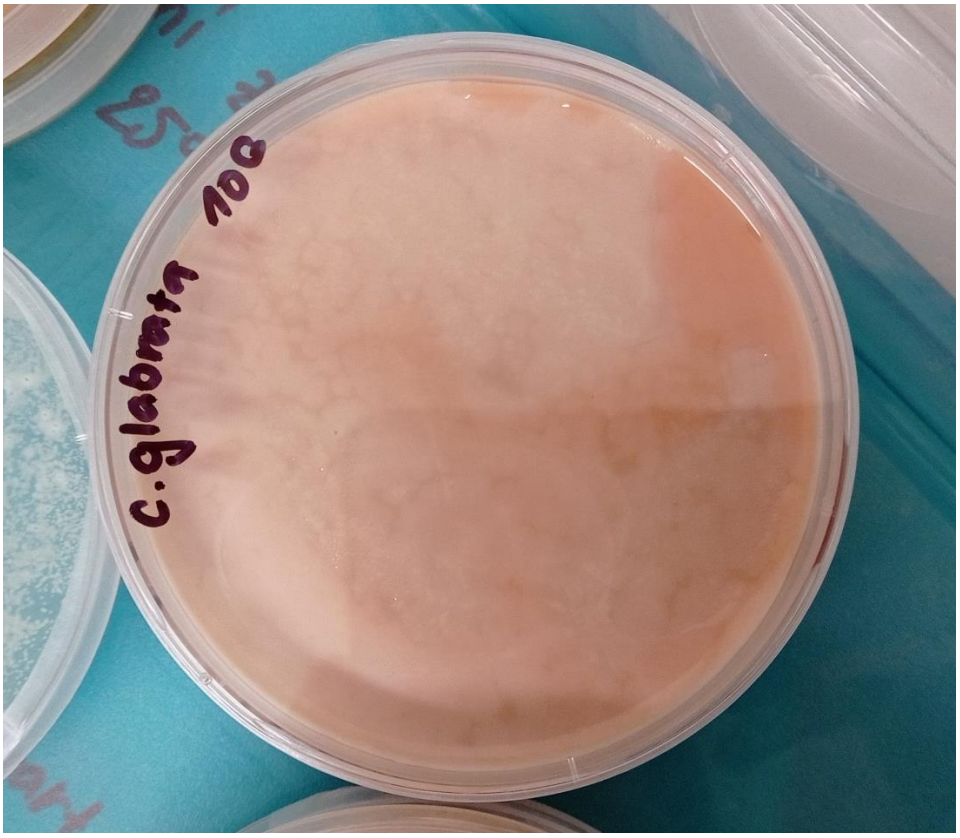
Nevýhodou misek s balzámem byl jejich hydrofobní charakter, který komplikoval samotnou kultivaci. Po naočkování naředěné mikrobiální kultury na misky s balzámem se suspenze s kulturou nevstřebala do balzámu a zůstala na jeho povrchu. Bylo tedy nutné kultivovat misky víčkem nahoru, aby kultura nevytekla do víčka a zůstala v kontaktu s balzámem.

Při tomto experimentu byla podceněna kultivační teplota kontrolních misek s agarem, pro které by bylo vhodnější, aby byly kultivovány při teplotě bližší lidskému tělu, neboť mikroorganismy *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis* při teplotě 25 °C přežívají obtížněji. Jediným organismem, který se na kontrolním agaru ujal dobře, byla kvasinka *Candida glabrata*, které vyhovují nižší kultivační teploty [39], ukázka je na obrázku 43.

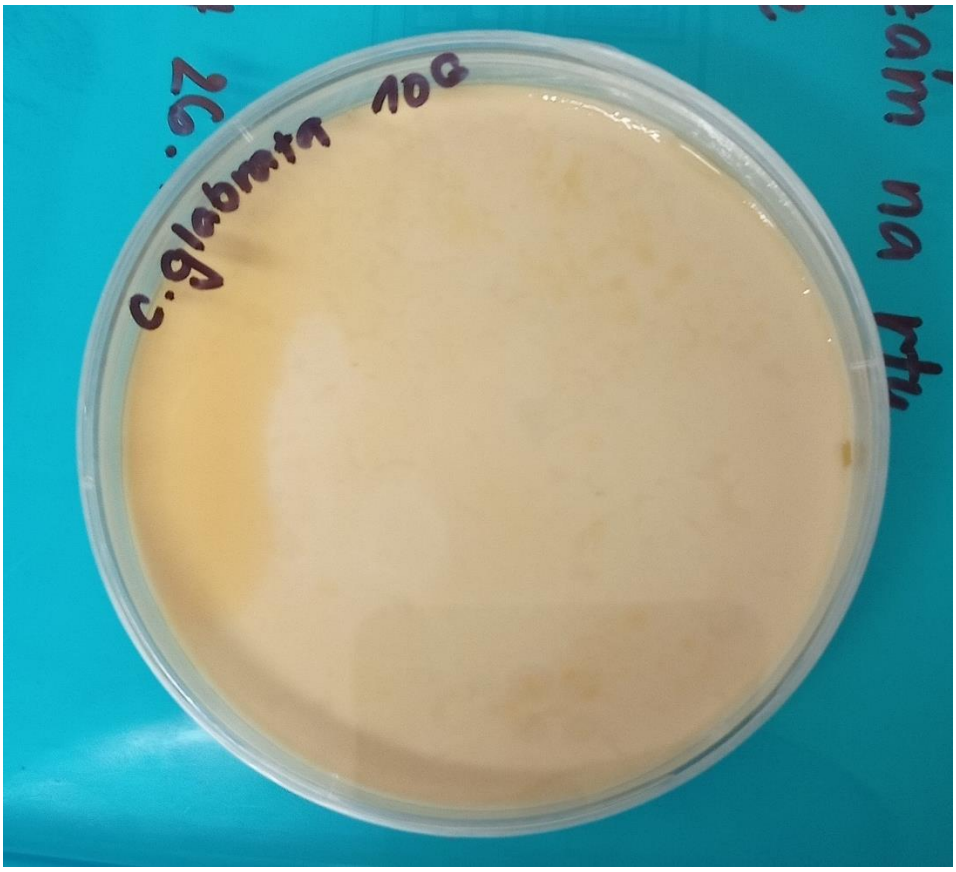
Po měsíci kultivace za daných podmínek experimentu nebyl zjištěn viditelný nárůst ani u jednoho zakultivovaného vzorku. Pro ukázku je níže na obrázku 44 ukázáno ředění 10^6 kvasinky *Candida glabrata* po týdnu a na obrázku 45 po měsíci. Došlo však k postupné degradaci zbarvení balzámu v porovnání s čerstvě připravenými miskami, které zachycuje obrázek 22. Vzhledem ke špatně nastaveným podmínkám experimentu, a k žádnému viditelnému nárůstu zaočkovaných kultur, byl proveden další test, kde byl zvolen jiný postup experimentu, který je uveden v následující kapitole.



Obrázek 43 - Ukázka kultivace kontrolního ředění 10^6 kvasinky Candida glabrata



Obrázek 44 - Kvasinka Candida glabrata na balzámu po týdnu kultivace, ředění 10^6



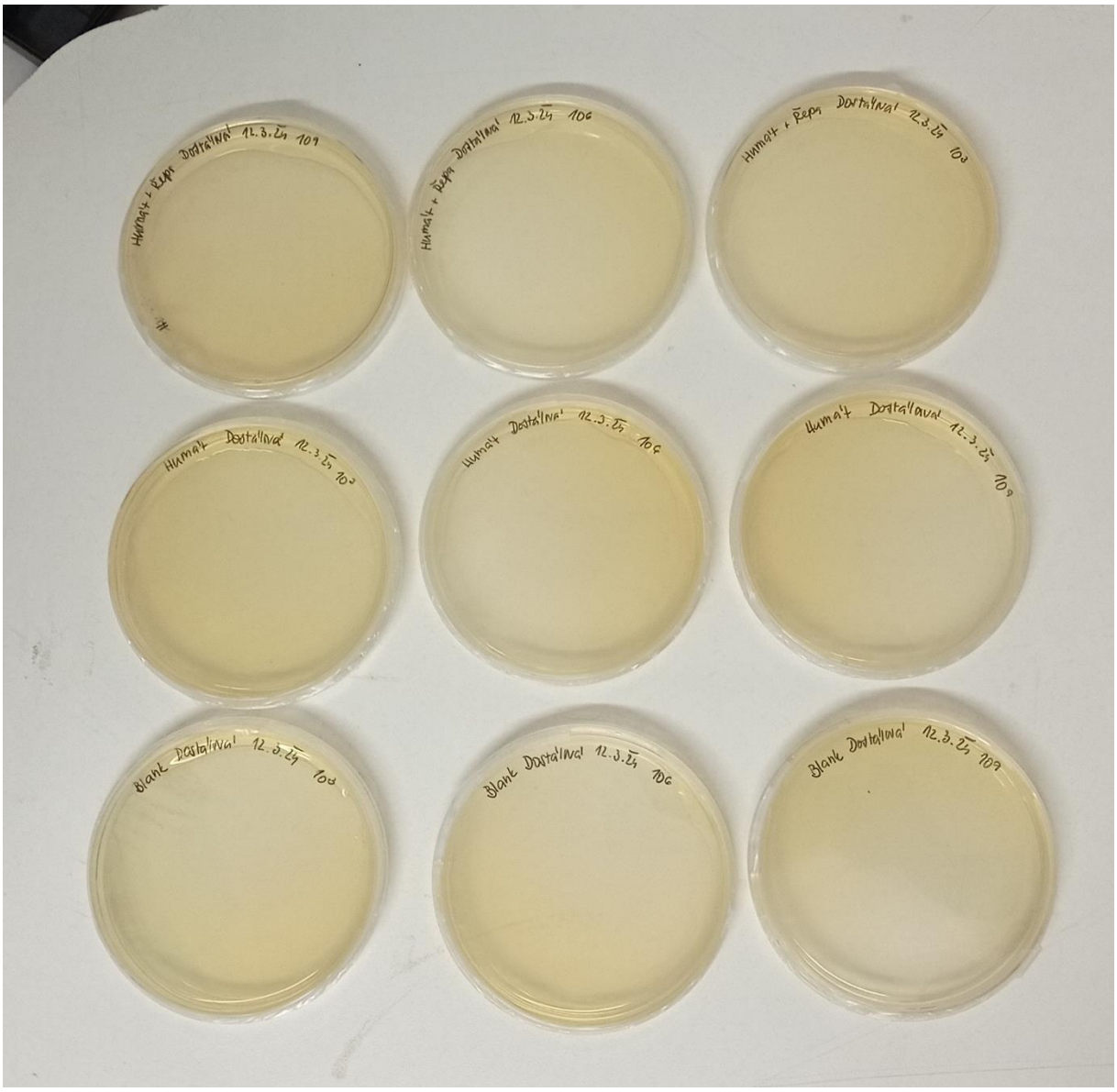
Obrázek 45 - Kvasinka Candida glabrata na balzámu po měsíci kultivace, ředění 10^6

4.2.5.2 Druhý test mikrobiální zátěže

U druhého testování mikrobiální odolnosti byl zvolen odlišný přístup – vzorky, které byly dva měsíce uchovávány v aplikačních tubách, byly 24 hodin macerovány ve sterilní vodě a tato voda byla poté ředěna a očkována na univerzální živnou půdu, aby bylo zjištěno, zda byl balzám během skladování nějak kontaminován, a tím i ověřeno, zda je takto schopen mikroorganismům odolávat.

Po 24 hodinách byly roztoky naředěny desítkovým způsobem devětkrát a pro samotnou analýzu byla vybrána tři ředění (10^3, 10^6 a 10^9). Po týdenní kultivaci, tentokrát při 37 °C, aby byl zajištěn lepší růst mikrobiálních kultur, byly agarové misky vyhodnoceny. Jak je možné vidět na obrázku 46, ani na jedné z misek se neprojevil růst jakéhokoliv mikroorganismu, což značí, že připravené vzorky balzámu nepodlehly mikrobiální degradaci a jsou tak mikrobiálně odolné.

Ve studii Yusof a kol. [51] se hodnocení mikrobiální zátěže věnovali taktéž, využili při tom univerzální živné půdy, na kterou pomocí hokejky rozetřeli množství balzámu a takto upravené agarové misky ponechali ke kultivaci 24 hodin při 30 °C. V jimi připravených vzorcích byl malý výskyt mikrobiálních kultur i přes použití konzervantů v receptuře, což bylo pravděpodobně způsobeno nesterilní přípravou kosmetiky.



Obrázek 46 - Agarové misky pro druhé testování mikrobiální zátěže po týdnu kultivace; horní řada obsahuje balzám s humátem a řepným barvivem, prostřední řada balzám s humátem a spodní řada vzorky slepých pokusů balzámu

4.3 Další měřené parametry

4.3.1 Antioxidační vlastnosti

Každý ze vzorků byl měřen 10 minut po přídavku do 2 ml předem připraveného roztoku radikálu $ABTS^{\cdot+}$, jež byl dopředu nachystán do 10ml zkumavek. Tabulka 27 zahrnuje hodnoty absorbance A_{10} a skutečné absorbance A vypočtené postupem uvedeným v rovnici 2, která zahrnuje i příklad pro roztok o koncentraci 500 µM. Zároveň byl také proveden přepočet koncentrací c roztoků kalibrační řady, a to tak, aby výsledná koncentrace byla uváděna v mg/ml.

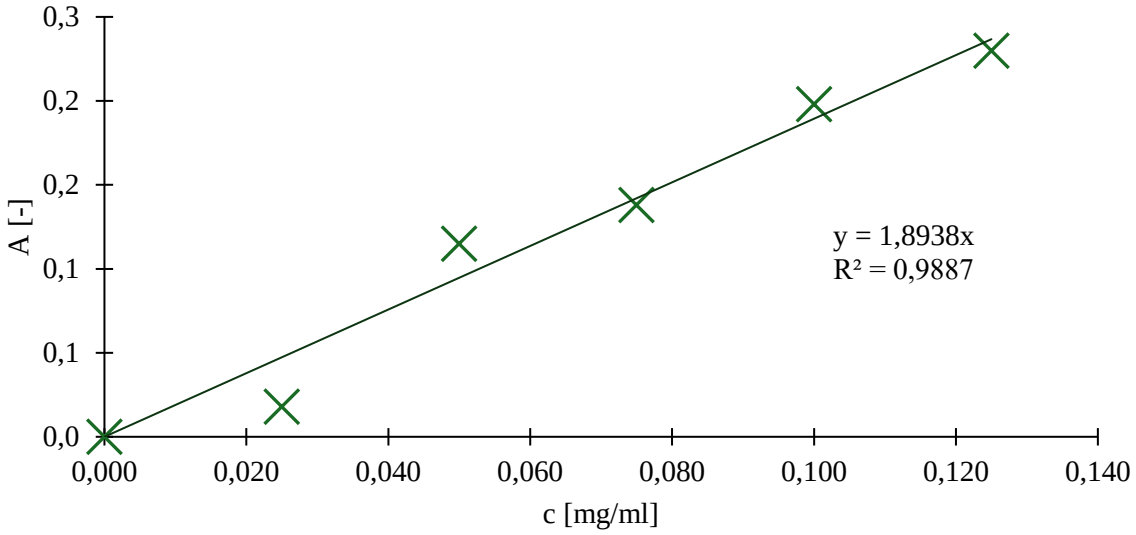
Tabulka 27 - Hodnoty koncentrací a absorbancí pro kalibrační řadu roztoku troloxu

Trolox [µM]	c [mg/ml]	A_{10} [-]	A [-]	A_0 [-]
0	0,000	0,708	0,000	0,708
100	0,025	0,690	0,018	
200	0,050	0,593	0,115	
300	0,075	0,570	0,138	
400	0,100	0,510	0,198	
500	0,125	0,478	0,230	

$$A=A_0-A_{10}=0{,}708-0{,}478=\mathbf{0{,}230} \quad (2)$$

Z těchto dat byla sestavena kalibrační přímka spolu s rovnicí, jež ukazuje graf na obrázku 47. Vyjádření kalibrační přímky poté obsahuje rovnice 3.

$$y=1{,}8938x \sim A=1{,}8938\cdot c$$
$$c=\frac{A}{1{,}8938} \quad (3)$$



Obrázek 47 - Regresní přímka ke kalibrační řadě roztoků troloxu

Tabulka 28 - Naměřené hodnoty absorbance, skutečná absorbance a přepočet na koncentraci

Vzorek	A [-]	Ask [-]	c [mg/ml]	c [mg/ml]	A_0 [-]
Ř₁	0,613	0,093	0,049		
Ř₂	0,611	0,095	0,050	**0,054**	
Ř₃	0,588	0,118	0,062		
H₁	0,688	0,018	0,010		
H₂	0,684	0,022	0,012	**0,011**	
H₃	0,686	0,020	0,011		
B₁	0,53	0,176	0,093		
B₂	0,514	0,192	0,101	**0,101**	
B₃	0,498	0,208	0,110		
Ř₁_1M	0,512	0,194	0,102		
Ř₂_1M	0,498	0,208	0,110	**0,105**	
Ř₃_1M	0,511	0,195	0,103		
H₁_1M	0,658	0,048	0,025		
H₂_1M	0,65	0,056	0,030	**0,023**	
H₃_1M	0,678	0,028	0,015		
B₁_1M	0,536	0,170	0,090		
B₂_1M	0,437	0,269	0,142	**0,114**	
B₃_1M	0,500	0,206	0,109		

Tabulka 28 pak obsahuje naměřené absorbance všech proměřovaných vzorků, jde o roztoky humátu (H), řepného barviva (Ř) a jejich kombinace (B), ve stáří 1 měsíc (1M) a čerstvě připravené. Koncentrace humátu a barviva byla dodržena, aby byla odpovídající té použité v receptuře balzámu, tedy pro humát $4 \cdot 10^{-5}$ g/ml a pro řepné barvivo 0,02 g/ml. Pro každou hodnotu skutečné absorbance (výpočet podle rovnice 2) byla taktéž vypočítána hodnota TEAC, tedy antioxidační kapacita dané látky, a to podle rovnice 3, v jejím množství udávaném v mg/ml.

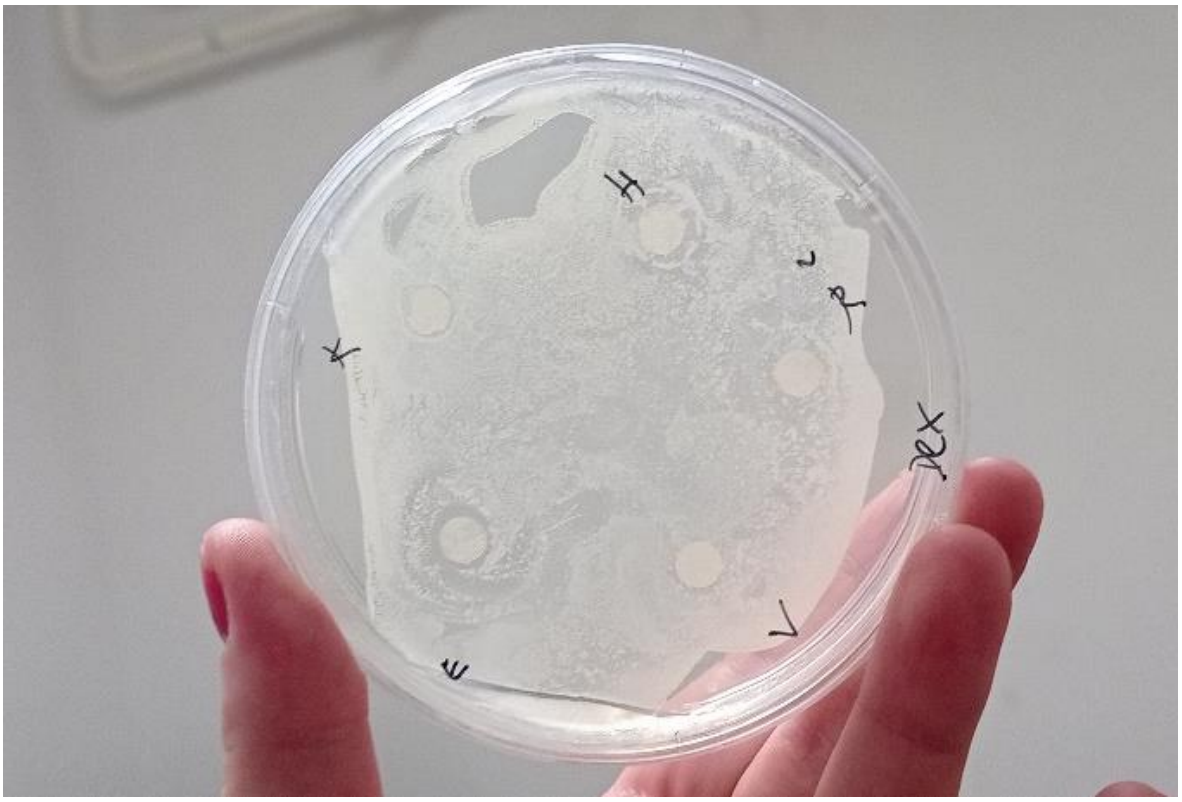
Z dat je patrné, že každý z roztoků vykazoval antioxidační chování, což se vizuálně projevilo odbarvením roztoku a v tomto důsledku i sníženou absorbancí roztoku vzorku. Huminové látky, jak je uvedeno v odborné literatuře, obsahují ve své struktuře i polyfenolické struktury, které mají zásadní vliv na antioxidační chování jiných látek [65]. Huminové látky se taktéž chovají jako blokátory radikálových molekul v půdě a tím přispívají k zachování její funkce. Červená řepa je známá svým obsahem antokyanů, které mají taktéž blahodárné účinky na lidský organismus. Nachází se v ní taktéž, literaturou deklarované, velké množství antioxidačně činných látek [65].

Tato analýza sloužila jako ověření, zda si jak humát, tak barvivo zachovají své antioxidační vlastnosti i ve formě roztoků a tím pádem by se tento jejich účinek projevil i ve formě balzámu. Byla měřena i jejich kombinace, aby byl potvrzen nebo vyvrácen případný synergický účinek. Jak je patrné z výsledků zaznamenaných v tabulce 28, antioxidační vlastnosti roztoku obsahujícího obě látky jsou nejvyšší ze všech měřených variant s mírným nárůstem po 1 měsíci. Antioxidační vlastnosti roztoku řepy se za dobu 4 týdnů téměř zdvojnásobily, stejně jako hodnoty roztoku humátu. To by indikovalo, že antioxidační vlastnosti v průběhu stárnutí balzámu narůstají a zcela si to tak odporuje s faktem, že balzámy na rty postupně od 14 dnů stáří začaly ztrácet své zabarvení což znamenalo možnou oxidaci barviva, ačkoliv byly do receptury zahrnu látky tomuto procesu zabraňující.

4.3.2 Antimikrobiální vlastnosti

U roztoku humátu, barviva z červené řepy a jejich kombinace byla také pomocí difúzních testů měřena míra jejich antimikrobiálních vlastností, neboť jak humát, tak červená řepa jsou na základě literatury označovány jako látky s mikrobicidním účinkem. Po týdnu inkubační doby byly u jednotlivých agarových misek měřeny průměry jednotlivých inhibičních zón. Jak taková agarová miska po týdenní inkubaci vypadala, je vyobrazeno na obrázku 48. Všechny roztoky aktivních látek byly připravovány v koncentracích, v jakých byly dané látky použity při tvorbě balzámu.

Pro každou mikrobiální kulturu, které byly k této analýze použity, byly připraveny tři agarové plotny. Tabulka 29 obsahuje zápis průměrů inhibičních zón pro každý ze tří vzorků spolu se záznamem, zda vyšla pozitivní a negativní kontrola (také v mm), rozdělených podle použitých kultur.



Obrázek 48 - Difúzní test antimikrobiálních vlastností

Tabulka 29 - Průměr inhibičních zón jednotlivých difúzních disků

Kultura	***Průměr inhibiční zóny [mm]***				
	Humát	**Barvivo**	**Kombinace**	**Ethanol**	**Voda**
Staphylococcus epidermidis	12	12	10	10	5
	12	15	7	10	5
	9	10	7	12	5
Escherichia coli	6	6	6	7	5
	6	6	6	15	5
	6	6	7	10	5
Candida glabrata	7	10	6	8	5
	11	11	6	8	5
	6	9	7	7	5

U vody je vždy uváděno 5 mm, což je samotný průměr disku, jelikož nebylo vidět, kde v něm by případně docházelo k nárůstu kultury a tím ohraničení inhibiční zóny. Ovšem voda byla použita jako pozitivní kontrola, která neměla kultury nijak omezovat v jejich růstů a důležitý je zejména fakt, že se okolo difúzních disků nevytvořil žádný prázdný prostor indikující nějakou mikrobiální aktivitu. Ethanol naopak u všech vzorků jako negativní kontrola potvrdil utlumení růstu i mimo plochu difúzního disku.

Všechny ostatní záznamy tak také ve svých údajích počítají s 5mm průměrem difúzních disků. Z dat je patrné, že největší inhibiční schopnosti měly roztoky humátu a barviva u kultury *Staphylococcus epidermidis*. Roztok obsahující kombinaci těchto látek se jevil ve všech případech, u všech mikrobiálních kultur, méně účinný než jeho složky samostatně. Nejslabší inhibiční efekt byl zaznamenán u kmene *Escherichia coli*, kdy velikosti inhibičních zón jsou ve všech třech případech roztoků aktivních látek velmi podobné. U kvasinek *Candida glabrata* se jako nejúčinnější v inhibici mikrobiálního růstu jevil roztok samotného barviva.

Výsledkem této analýzy je tak potvrzení antimikrobiálních vlastností u použitých aktivních látek. V samotném balzámu je antimikrobiální aktivita podpořena přídavkem 1 g CAPB na 40 g balzámu, aby bylo zamezeno možné mikrobiální degradaci. Jak se ukázalo při studiu dlouhodobé stability balzámu, barvivo degradovalo i přes zahrnutí konzervantů do receptury proti jeho znehodnocení, jak je podrobněji rozebráno v kapitolách 4.1.5 a 4.2.1.

4.3.3 Posouzení účinku balzámu

Jelikož testování antivirové aktivity není v laboratorních podmínkách na fakultě možné a po dotázání se na specializovaném virologickém pracovišti taktéž neproveditelné, bylo další možností, která by poskytla objektivnější výsledky, dvojitě zaslepená studie, kdy by část nemocných užívala balzám, část běžně dostupná léčiva vůči oparům (např. Zovirax) a část by využívala kontrolního („prázdného“) vzorku. Tuto skutečnost ovšem znemožňoval fakt nalezení dostatku dobrovolníků, kteří by oparem onemocněli v přibližně stejné době, aby bylo možné vyloučit jiné faktory ovlivňující průběh nemoci, jako třeba jiné roční období. Z toho důvodu bylo testování antivirové aktivity provedeno alespoň na jednom nemocném subjektu.

V případě nakažené osoby se opar projevoval vždy po dobu 10 dní, od fáze brnění a vzniku puchýřků až po jejich prasknutí a následnou tvorbu strupu bez použití jakéhokoliv léčivého přípravku, který měl za cíl léčbu oparu na rtech urychlit a usnadnit jeho hojení.

Pro testování byl použit balzám v tubě s obsahem jak humátu, tak barviva, který byl aplikován na rty zhruba pětkrát denně, zejména po jídle, aby došlo k udržení filmového povlaku na rtech. Po dobu onemocnění byl každý den vývoj oparu na rtech sledován a fotografovala, abych si mohla zaznamenat přechody mezi jednotlivými fázemi průběhu onemocnění.

Z pozorování vyplývá, že se celková doba hojení zkrátila na pouhých 8 dní, kdy v den osmý byl jedinou známkou již malý strup na místě původního oparu. Jednotlivé fáze jsou zaznamenány na obrázcích 49, 50, 51 a 52.

Obrázek 49 - Průběh oparu, den 2.; je patrná tvorba puchýře (vyznačen)

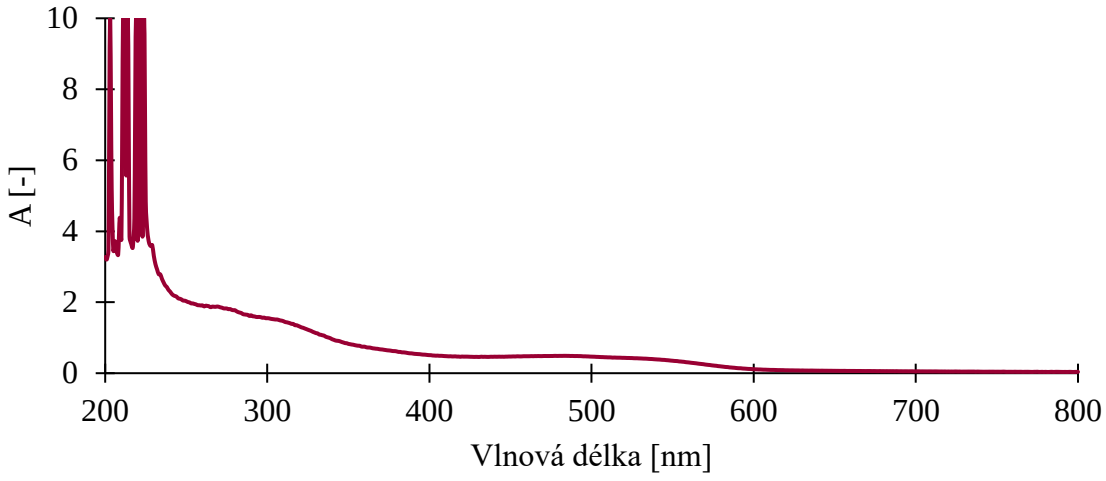
Obrázek 50 - Průběh oparu, den 4.; dochází k perforaci puchýřku a počínající tvorbě strupu

Obrázek 51 - Průběh oparu, den 5.; patrný je již strup

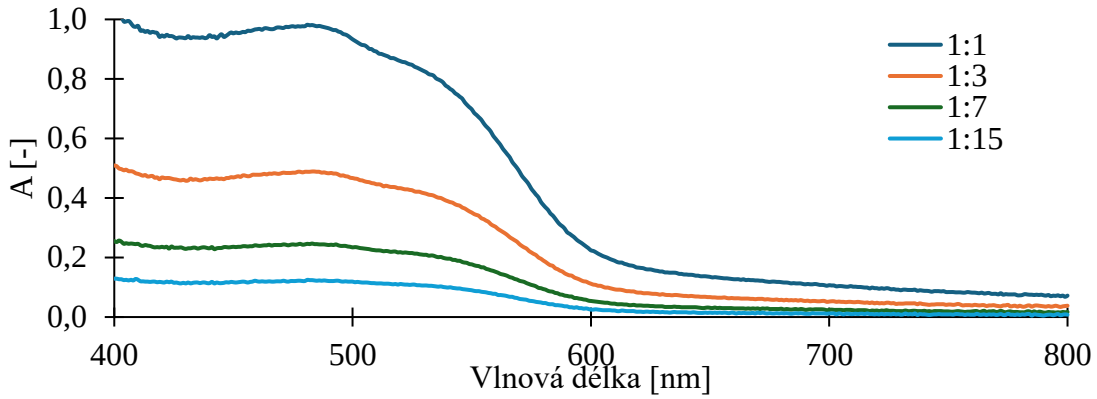
Obrázek 52 - Průběh oparu, den 7.; na místě původního oparu zůstává již jen malý strup

4.3.4 Simulace difúze látek skrze pokožku

U difúzního měření byl nejdůležitějším získaným údajem čas, za který začne fáze s aktivními látkami difundovat skrze membránu. Pro stanovení, zda je roztok v difúzních celách vůbec spektrofotometricky měřitelný, byl nejprve přeměřen původní zásobní roztok o koncentraci látek odpovídající balzámu na spektrofotometru. Pro přímé stanovení však byl příliš koncentrovaný, a tak byl postupně objemově ředěn, jak je vidět na obrázku 53 a 54. Jelikož vzorek silně absorbuje v UV oblasti, pro posouzení množství vzorku, které prošlo membránou bylo vybráno lokální maximum absorbance při 481 nm.



Obrázek 53 - UV-VIS spektrum vodné fáze balzámu



Obrázek 54 - UV-VIS spektra koncentrační řady vodné fáze balzámu

Tímto způsobem také byla vytvořena koncentrační řada, která posloužila pro rychlý a přibližný přepočet prošlého množství skrze membránu. První zaznamenatelná koncentrace prošlé vodné fáze nastala při 24 minutách. Dále byla vyhodnocována spektra v intervalech 30 minut, uvedena jsou v tabulce 30, která zahrnuje přepočtené hodnoty absorbance na koncentraci aktivních látek v roztoku recipientní cely.

Tabulka 30 - Přepočtené hodnoty absorbancí na koncentrační obsah aktivních látek při difúzi

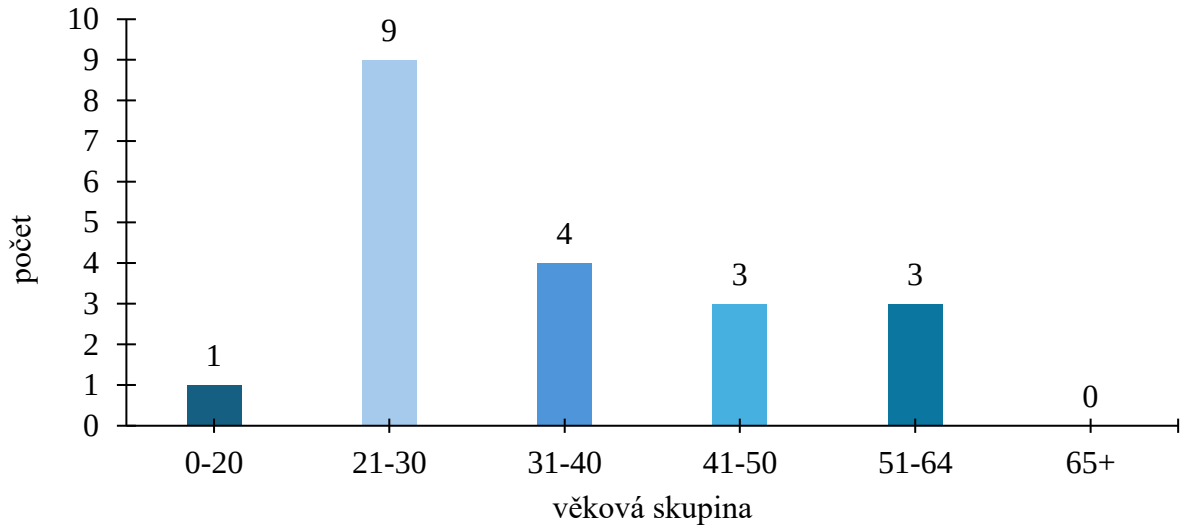
t [min]	A [-]	c [mg/ml]
24	0,04	0,41
54	0,11	1,12
84	0,16	1,63
114	0,24	2,45
144	0,28	2,86
174	0,33	3,37
204	0,37	3,78
234	0,41	4,19
264	0,44	4,49
294	0,47	4,80
324	0,49	5,00
354	0,51	5,21
358	0,52	5,31

Experiment byl cíleně nastaven na maximální dobu 6 hodin, vzhledem k faktu, že balzám na rty by déle na rtech nanesený nevydržel. Koncentrace původního roztoku je 20,04 mg/ml pro humát ($4 \cdot 10^5$ g/ml) a barvivo (0,02 g/ml) dohromady. Jak je vidět dle prošlé koncentrace, v samotné receptuře balzámu by mohlo být použito i vyšší množství humátu, protože ani po šesti hodinách se koncentrace nevyrovnala – a tedy aby bylo docíleno kýžené inhibiční koncentrace humátu IC_{50}=18 µg/ml i v buňkách. To s sebou ovšem nese riziko tmavšího odstínu, a tedy nutnosti navýšit i obsah barviva, což by mohlo být pro některé spotřebitele příliš.

4.4 Senzorická analýza

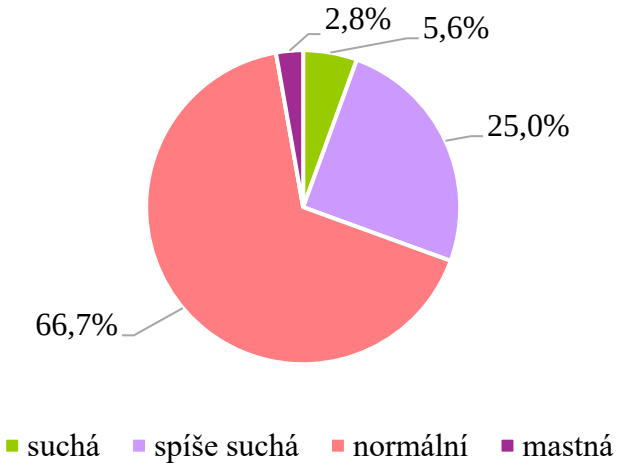
4.4.1 Informace o hodnotící skupině

Senzorické analýzy se účastnil celkový počet 36 osob, 28 z nich byly ženy, zbylých 8 muži. Nejčastěji zastoupená věková skupina byla 21–30 let, věkové rozložení účastníků je demonstrováno na obrázku 55. Toto víceméně stejnorodé zastoupení účastníků je dáno fakty, že senzorická analýza probíhala na fakultě, kde se jí účastnili hlavně studenti, kteří spadají do věkové kategorie mezi 20 a 30 lety, a protože kosmetika je zájmovou doménou především žen. Žádný z účastníků nebyl starší 65 let.



Obrázek 55 - Věkové rozložení účastníků senzorické analýzy

Účastníci sami měli ohodnotit svůj stav pokožky, aby bylo posléze možné zhodnotit hydratační schopnosti jednotlivých vzorků. Jak ukazuje obrázek 57, 66,7 % dotázaných tvrdí, že jejich pokožka se na dotázané škále chová jako „normální“, druhým nejhojněji se vyskytujícím typem pokožky je s 25 % spíše suchá kůže. Alergickou reakci pokožky popsali pouze dva účastníci, ovšem ani jeden z alergenů nebránil účasti na této senzorické analýze.



Obrázek 56 - Zastoupení typů pokožky dle dotázaných

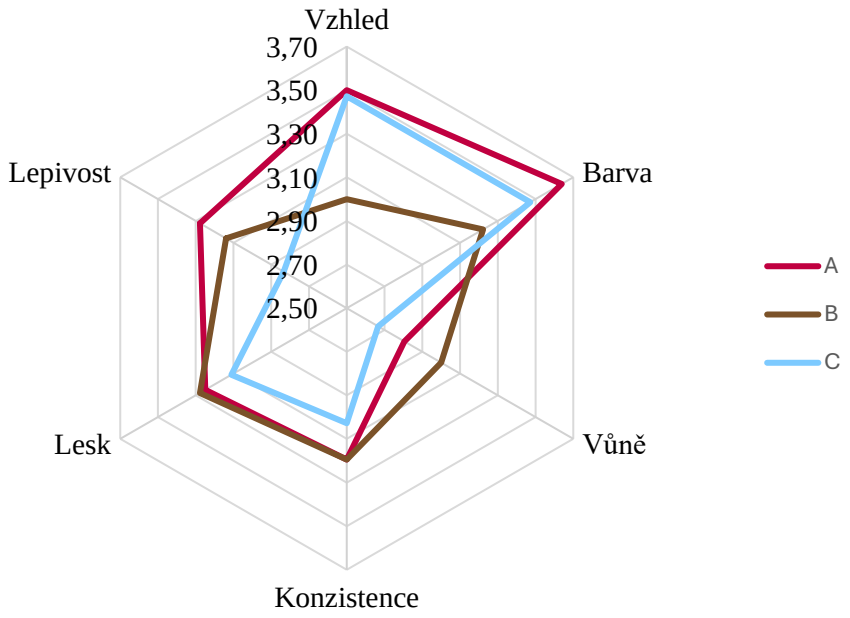
Z celkového počtu hodnotitelů 44,4 % dotázaných nikdy nemělo dle svého tvrzení onemocnění oparového typu, 30,6 % se sním jednou za pár let setká, 8,3 % jím trpí alespoň jednou za rok a u zbylých 13,9 % se vyskytuje i vícekrát během jednoho kalendářního roku. Podle výsledků dotazníkového šetření všech 20 osob, které s oparovým onemocněním do styku přišly nebo přicházejí, mělo opary pouze v oblasti obličeje, nikoliv na těle. Sedm osob uvedlo, že vůbec nepoužívá balzámy na rty. Ze zbylých 29 pak 34,5 % aplikuje balzám na rty příležitostně, 20,7 % jej užívá denně a 44,8 % vícekrát během jednoho dne. Při dotazu, co je důvodem užívání tohoto typu kosmetického produktu 20 hodnotících uvedlo zmírnění pocitu suchých rtů a prevence vysychání pokožky. U osob tento produkt nevyužívající byl nejčastějším důvodem odpor k pocitu, který tento produkt na pokožce vyvolává nebo zapomětlivost.

4.4.2 Hodnocení balzámů před aplikací

Hodnocení probíhalo systémem nejvyšší známka 1 (líbivé vlastnosti) až nejnižší známka 5 (nelíbivé vlastnosti). Tabulka 31 zahrnuje průměrné hodnoty známek, které respondenti udělili třem hodnoceným vzorkům před jejich aplikací na svou pokožku.

Tabulka 31 - Výsledné známky hodnocení před aplikací balzámů

Vzorek	**A**	**B**	**C**
Vzhled	1,50±0,65	2,00±0,75	1,53±0,69
Barva	1,36±0,63	1,78±0,92	1,53±0,90
Vůně	2,19±1,02	2,00±0,94	2,33±1,11
Konzistence	1,81±0,74	1,81±0,94	1,97±0,90
Lesk	1,75±0,89	1,72±0,90	1,89±0,97
Lepivost	1,72±0,84	1,86±1,00	2,17±1,09



Obrázek 57 - Paprskový graf bodové úspěšnosti jednotlivých vzorků před aplikací

Pro grafickou názornost byly tyto vlastnosti zahrnuty do obrázku 58, kde je jasně vidět, u které vlastnosti vynikal příslušný vzorek. Aby se vizuálně hodnotily výsledky jednodušeji, byly hodnoty obráceny na škále 1–5, tedy nejlepší vzorek je nejblíže vrcholu dané vlastnosti.

Barevně měl největší úspěch u hodnotících vzorek A, jež obsahoval jak účinnou látku humát draselný, tak také barvivo z červené řepy, stejně tak uspěl v kategoriích hodnocení konzistence, vzhledu a lepivosti. Vzorek C, tedy slepý vzorek, zaujal nejvíce svým vzhledem, neboť je ze všech tří nejvíce podobný komerčně dostupným produktům v drogeriích. Vzorek B, který obsahoval pouze humát draselný a vyznačoval se tak nahnědlou barvou, dle předpokladů získal nejnižší hodnocení právě v této kategorii ze všech tří. Naopak hodnotitele zaujala jeho vůně, ačkoliv ta by měla být shodná s vůní blanku (C), který naopak v této kategorii dopadl nejhůře.

Míra odchylky jednotlivých známek, uvedených v tabulce 31, je ukazatelem (ne)jednoty názoru hodnotící skupiny. U odchylek přesahujících hodnotu 0,90 lze říci, že diverzita názorů skupiny byla velmi výrazná, například v hodnocení vůně vzorku C je míra odlišnosti 1,11, což je o více než jeden stupeň známky. Naproti tomu nejvyšší shodu, tedy skóre s nejnižší odchylkou, prokázali účastníci jednoznačně v hodnocení barvy vzorku A, který tím zaujal a byl na základě toho i pozitivně hodnocen.

4.4.3 Hodnocení balzámů po aplikaci

Po pětiminutovém působení všech tří vzorků na pokožce vnitřní strany předloktí byli hodnotitelé dotázání na oznámkování uvedených vlastností. Výsledné známky zaznamenává tabulka 32.

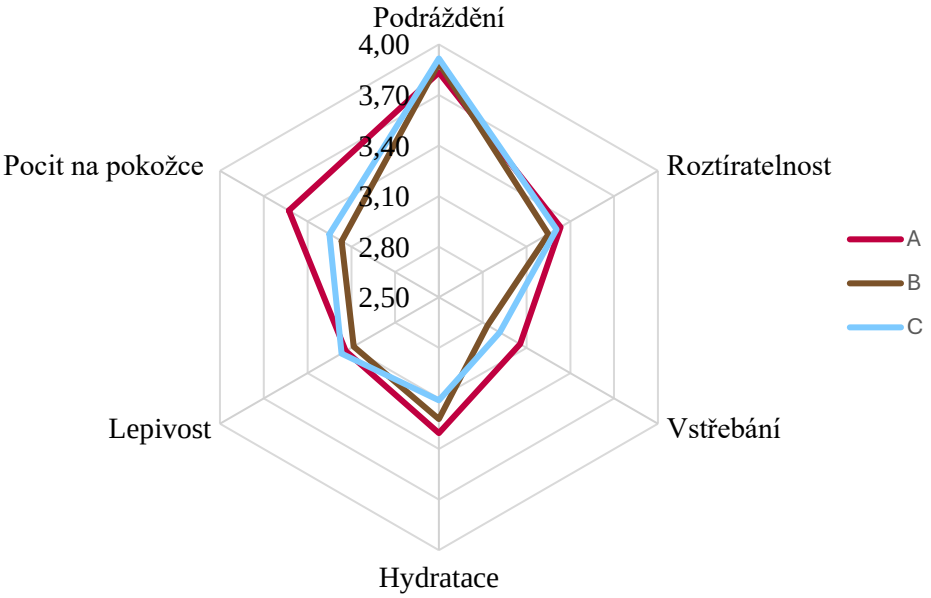
Tabulka 32 - Výsledné známky hodnocení po aplikací balzámů

Vzorek	**A**	**B**	**C**
Podráždění	1,17±0,73	1,11±0,52	1,08±0,36
Roztíratelnost	1,67±0,82	1,75±0,79	1,69±0,91
Vstřebání	1,94±0,91	2,17±0,83	2,08±1,11
Hydratace	1,69±0,88	1,78±0,85	1,89±0,91
Lepivost	1,86±0,95	1,92±0,86	1,83±0,96
Pocit na pokožce	1,47±0,87	1,83±0,90	1,75±0,92

I zde byl po převedení bodového hodnocení vypracován graf pro lepší demonstraci výsledků, který je na obrázku 59. U vzorku A s obsahem barviva i humátu lze pozorovat nejvyšší hodnocení v kategoriích pocitu na pokožce, hydratace a míry vstřebání. Všechny tři vzorky byly vysoce hodnoceny jako nedráždivé, čemuž odpovídají i známky v tabulce 32, zejména slepý vzorek C je hodnocen nejlépe a s nejmenší odchylkou, tedy vysokou shodou hodnotící skupiny na tomto výsledku. Vzorky B a C jsou pak nejhůře hodnoceny, co se jejich vstřebávání týče, kdy oba obdržely známku nad 2 body stupnice hodnocení.

Vzorek C překonává všechny ostatní dále pouze v kategorii lepivosti, kdy z výsledků senzorické analýzy má v průměru nejmenší lepivý pocit na pokožce. Vzorek B je nejhůře hodnocený v kategoriích lepivost na pokožce, celkového pocitu na kůži a roztíratelnosti, kdy

se dle respondentů neroztíral tak dobře, jako ostatní vzorky. Přesto vyjma známky za vstřebatelnost žádná ze známek nepřekračuje průměrnou hodnotu 2 body a odchylky se taktéž drží pod hranicí 0,90.



Obrázek 58 - Paprskový graf bodové úspěšnosti jednotlivých vzorků po aplikaci

4.4.4 Celkové zhodnocení

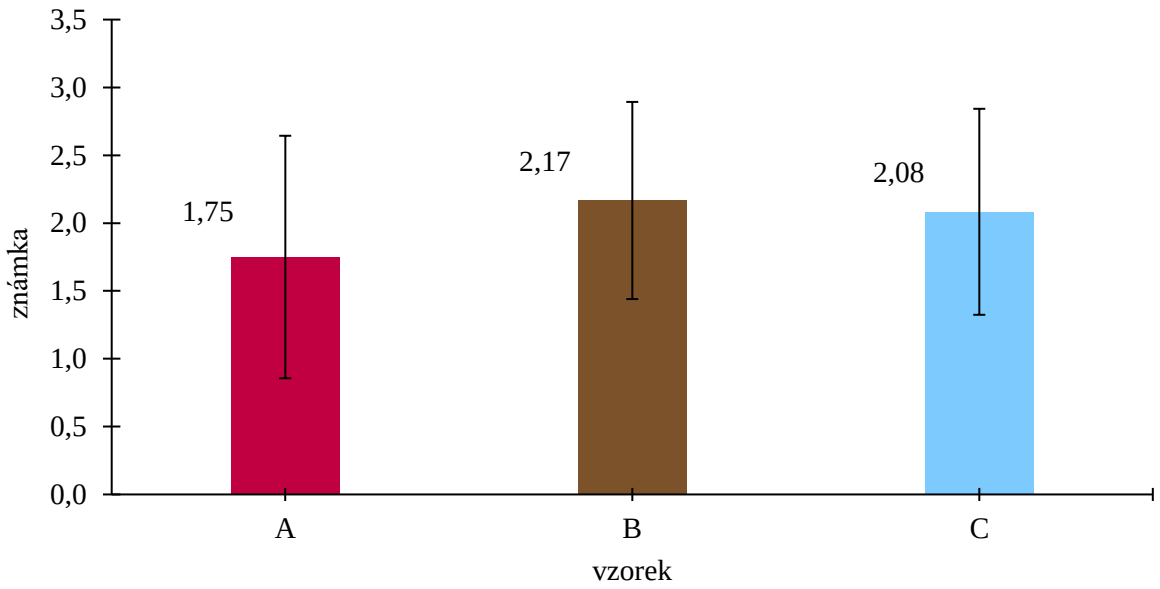
V poslední části byli respondenti požádáni o seřazení vzorků na základě jejich celkového dojmu. Tabulka pro zhodnocení je vyobrazena na obrázku 60. Z průměrných hodnot pak byl sestaven následující graf (obrázek 61), který zachycuje výši konečné známky. Pokud byl balzám označen za nejlepší, byla mu udělena známka 1, pokud byl označen jako nejhorší ze tří hodnocených, byla mu přidělena známka 3 a pokud byl hodnocen neutrálně, mezi nimi, byl označen 2 body.

Pořadový test

Seřaďte vzorky od nejlepšího po nejhorší dle Vašich preferencí:

Nejlepší	Průměr	Nejhorší

Obrázek 59 - Ukázka celkového hodnocení vzorků



Obrázek 60 - Celková známka pro všechny tři vzorky

Nejlépe v celkovém hodnocení dopadl vzorek A, tedy produkt s kompletním obsahem všech látek, což je i cílový produkt této diplomové práce. Dle dodatečných komentářů hodnotitelů je zaujal především svou barvou a vůní, neboť barvivo z červené řepy, i podle výsledků hodnocení organoleptických vlastností dodává balzámu na rty sladší nádech vůně. Zároveň jde o potvrzení hypotézy, že z hlediska komerční prodejnosti by se balzám s čistým obsahem humátu neuchytil kvůli svému zabarvení (i v porovnání s konečnou známkou vůči slepému vzorku). Lze tedy s jistotou tvrdit, že barvený balzám je zajímavým vizuálním počinem, který by po úpravě receptury pro zlepšení vlastností a zajištění stability jeho barevnosti mohl mít na trhu úspěch.

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce si kladla za cíl vytvořit a charakterizovat inovativní balzám na rty, který by svým antivirovým účinkem vůči *Herpes siplex* viru rozšířil řady možné léčby tohoto běžně rozšířeného onemocnění. Aby bylo zakryto použití humátu, který je silně tmavě hnědě zabarven, bylo extrahováno a lyofilizováno barvivo z červené řepy, jež bylo podrobeno samostatné charakterizaci. Při maceraci řepy byl využit methanol, proto bylo nutné stanovit jeho zbytkový obsah pomocí plynové chromatografie, jež činí v průměru 0,08 hm. %. Tato hodnota je pod legislativně stanovenou hodnotou 5 %, jež je stanovena pro methanol. Pro další specifikaci bylo využito tenkovrstvé chromatografie a různých kombinací rozpouštědel mobilní fáze pro separaci jednotlivých frakcí, ze kterých byly posléze po re-eluci pomocí infračervené spektrometrie identifikovány funkční skupiny a molekulární struktury nacházející se v lyofilizátu. Byla prokázána přítomnost bílkovin, polysacharidů, ale i tuků a polyfenolických struktur s antioxidačním účinkem. Aby byla identifikace jednotlivých frakcí jednodušší, bylo využito přístroje DataColor, který je schopen kolorimetrické analýzy.

Pro ověření účinnosti aktivní látky a barviva v balzámu byly obě tyto sloučeniny podrobeny zkoušce antioxidačních vlastností, kdy se tento vliv potvrdil jak u humátu, tak u barviva, zjišťování antimikrobiálních vlastností a difúznímu testu. U obou látek byl prokázán antimikrobiální účinek a v difúzním testu bylo demonstrováno, že skrze membránu o velikosti póru 1 μm, což je méně než velikost pórů lidské pokožky, projde během 6 hodin $5 \cdot 10^{-3}$ g/ml barviva a humátu dohromady.

Samotná studie balzámu na rty zahrnovala jeho kompletaci a optimalizaci receptury i přípravného postupu. Primární stability byla ověřována na analytické odstředivce. Po několika problémech se složením, konzistencí a strukturou i degradací vzorků byly připraveny 4 druhy vzorků: vzorky obsahující humát a barvivo, vzorky čistě jen s barvivem nebo humátem a „prázdné“ slepé vzorky. Všechny byl po celou dobu čtyřměsíční stability uchovávány v laboratoři ve skříňce. Vzorky prvního typu byly připraveny ještě jednou a uchovávány v lednici pro posouzení vlivu skladovacích podmínek na stabilitu produktu. Sledovanými parametry byly organoleptické vlastnosti jako vzhled, vůně, barva, pH, hydratační schopnosti a dráždivost, roztíratelnost, bod tání a reologická analýza. Po dobu čtyř měsíců si všechny vzorky zachovaly svou vůni, pH a hydratační schopnosti, neprojevily žádné podráždění pokožky a vzhledem konzistence zůstaly homogenní. Odstín změnily asi po měsíci vzorky obsahující barviv z červené řepy, kde i přes veškeré snahy o zabránění degradaci, ať už přídavkem vitaminu C a E nebo konzervantu CAPB, došlo k zežloutnutí z původní načervenalé barvy. Vzorky bez barviva si zachovaly své zbarvení po celou dobu studie. U roztěrových testů byly po 4 měsících zjištěny u tří vzorků hrudky v jejich struktuře, které ovšem nebránily dobrému roztírání vzorků.

Bod tání balzámů byl pomocí diferenční skenovací kalorimetrie stanoven na 50 °C, což je o 5 stupňů pod limitem, který stanovuje literatura. To je ovšem řešitelné navýšením koncentrace včelího vosku. U reologických testů byla pozornost soustředěna na stanovení flow-pointu, tedy bodu překřížení modulů a lineární viskoelastické oblasti, která určuje míru namáhání vzorku bez trvalých změn. Hodnoty oscilačního napětí pro flow-point se pohybovaly mezi 2 a 3 %,

vyjma vzorků řady 05, u které byly vyšší, což je pravděpodobně způsobeno jinými skladovacími podmínkami. Hodnoty hranice LVO jsou o poznání nižší, v rozmezí 0,04–0,06 %, opět ale s výjimkou řady vzorků uchovávané v lednici. Balzám byl také podroben testu mikrobiální zátěže, kdy byly prokázáno, že ani na jeho povrchu, ani v jeho struktuře za dobu dvou měsíců žádné mikrobiální kultury nenarostly.

V závěru celé práce byla provedena senzorická analýza, které se účastnilo 37 osob, jež byly převážně ženy ve věkové kategorii 21–30 let. Cílem bylo potvrzení hypotézy, že balzám pouze s humátem potřebuje dobarvit, aby byl spotřebitelsky přijat lépe. Tuto hypotézu senzorická analýza potvrdila. Zároveň také respondenty oslovila vůně produktu a jeho celkový pocit na pokožce. Byl otestován i samotný antivirový účinek balzámu na nemocném subjektu, u kterého se díky jeho aplikaci povedlo zkrátit dobu rekonvalescence o 3 dny oproti průměru.

Výsledkem je funkční a stabilní balzám s antivirovým efektem, který by díky navýšení koncentrace účinné látky a včelího vosku mohl dosáhnout ještě lepších fyzikálně chemických vlastností. Zároveň se také nabízí jako alternativa použití jiného barviva na přírodní bázi, aby bylo předejito barevné degradaci produktu a tím si balzám zachoval nejen stabilní vlastnosti, ale i vzhled.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1] ISLAM, Zahidul, Mümin DIZMAN, Omer TUTAR a Ahmet TUTAR. *Conference: 19th International Conference of Humic Substances and their Contribution to the Climate Change Mitigation*. 1. 2019.

2] FERNANDES, Andreia, Marcelo GIOVANELA, Valdemar ESTEVES a Maria SIERRA. Elemental and spectral properties of peat and soil samples and their respective humic substances. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2010, **971**(1-3), 33-38 [cit. 2024-04-18]. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2010.02.069

3] JARUKAS, Laurynas, Liudas IVANAUSKAS, Giedre KASPARAVICIENE, Juste BARANAUSKAITE, Mindaugas MARKSA a Jurga BERNATONIENE. Determination of Organic Compounds, Fulvic Acid, Humic Acid, and Humin in Peat and Sapropel Alkaline Extracts. *Molecules* [online]. 2021, **26**(10) [cit. 2024-04-18]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26102995

4] WOLLINA, Uwe. Peat: A natural source for dermatocosmetics and dermatotherapeutics. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* [online]. 2009, **2**(1), 17-20 [cit. 2024-04-18]. ISSN 0974-2077. Dostupné z: doi:10.4103/0974-2077.53094

5] JACOB, KALA, PRASHOB KJ a CHANDRAMOHANAKUMAR N. HUMIC SUBSTANCES AS A POTENT BIOMATERIALS FOR THERAPEUTIC AND DRUG DELIVERY SYSTEM-A REVIEW. *International Journal of Applied Pharmaceutics* [online]. 2019, 1-4 [cit. 2022-12-29]. ISSN 0975-7058. Dostupné z: doi:10.22159/ijap.2019v11i3.31421

6] LÜTTIG, Gerd W. The touch of peat – inherent healing power of nature. In: FARRELL, Catherine a John FEEHAN. *After Wise Use – The Future of Peatlands, Proceedings of the 13th International Peat Congress: Chemical, Physical and Biological Characteristics of Peat*. Tullamore, Ireland: International Peat Society, 2008, s. 289-293. ISBN 0-9514890-4-6. ISSN 9780951489048.

7] KLÖCKING, Renate a Björn HELBIG. Medical Aspects and Application of Humic Substances. In: *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*. 1. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, s. 3-16. ISBN 3-527-31154-8.

8] HÁJKOVÁ, Simona, Leoš NAVRÁTIL a Renata HAVRÁNKOVÁ. Local application of pelloids. *Kontakt* [online]. 2006, **8**(1), 163-167 [cit. 2024-04-18]. ISSN 12124117. Dostupné z: doi:10.32725/kont.2006.028

9] GHOLAMI, Hossein, Mohammad SAHARKHIZ, Fatemeh RAOUF FARD, Askar GHANI a Fatemeh NADAF. Humic acid and vermicompost increased bioactive components, antioxidant activity and herb yield of Chicory (Cichorium intybus L.).

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology [online]. 2018, **14**, 286-292 [cit. 2024-04-28]. ISSN 18788181. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcab.2018.03.021

10 BOVEIRI DEHSHEIKH, Anahita, Mohammad MAHMOODI SOURESTANI, Maryam ZOLFAGHARI a Naeimeh ENAYATIZAMIR. Changes in soil microbial activity, essential oil quantity, and quality of Thai basil as response to biofertilizers and humic acid. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2020, **256** [cit. 2024-04-28]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2020.120439

11 MOTTA, F.L., B.A.G. MELO a M.H.A. SANTANA. Deprotonation and protonation of humic acids as a strategy for the technological development of pH-responsive nanoparticles with fungicidal potential. *New Biotechnology* [online]. 2016, **33**(6), 773-780 [cit. 2024-04-28]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2016.07.003

12 DE MELO, Bruna, Fernanda MOTTA a Maria SANTANA. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **62**, 967-974 [cit. 2024-04-18]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2015.12.001

13 TERRATOL, L. L. C. Effects of humic acid on animals and humans. *Literature Review and Current Research*. 2002, 1-12.

14 KLÖCKING, R., Y. FELBER, M. GUHR, G. MEYER, R. SCHUBERT a J. SCHOENHERR. Development of an innovative peat lipstick based on the UV-B protective effect of humic substances. *Mires and Peat*. 2013, **11**(3), 1-9. ISSN 1819-754X.

15 HELBIG, B., R. KLÖCKING a P. WUTZLER. Anti-herpes simplex virus type 1 activity of humic acid-like polymers and their o-diphenolic starting compounds. *Antiviral chemistry and chemotherapy*. 1997, **8**(3), 265-273.

16 THIEL, K., R. KLÖCKING, H. SCHWEIZER a M. SPRÖSSIG. In vitro studies of the antiviral activity of ammonium humate against herpes simplex virus type 1 and type 2. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*. 1977, **239**(3), 304-321.

17 WHITLEY, Richard, David KIMBERLIN a Bernard ROIZMAN. Herpes simplex viruses. In: SCHELD, W., Richard WHITLEY a Christina MARRA. *Infections of the central nervous system*. 3. Lippincott Wiliams & Wilkins, 2004, s. 541-553. ISBN 9780781743273.

18 TAYLOR, Travis, J. Herpes Simplex Virus. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2002, **7**(1-3) [cit. 2022-12-29]. ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/taylor

19 WIDENER, Rebecca a Richard WHITLEY. Herpes simplex virus. In: *Neurovirology* [online]. 123. Elsevier, 2014, s. 251-263 [cit. 2024-04-28]. Handbook of Clinical

Neurology. ISBN 9780444534880. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53488-0.00011-0

RIBEIRO FERNADES, Alessanda, Michelli FERRERA DARIO, Claudinéia SALES DE OLIVEIRA PINTO, Telma KANEKO, André BABY a Maria ROBLES
20 VELASCO. Stability evaluation of organic Lip Balm. *Brazilian Journal of Pharmaceutical sciences*. 2013, **49**(2), 293-299.

KADU, Mayuri, Suruchi VISHWASRAO a Sonia SINGH. Review on Natural Lip
21 Balm. *International Journal of Research in Cosmetic Science*. 2015, **5**(1), 1-7. ISSN 2277–7172.

ISO. *Guidelines on the stability testing of cosmetic products*. 1.
22

TITĚRA, Dalibor, František KAMLER, Ondřej PROCHÁZKA, Peter ČERNOCH a
23 Pavel HYRŠL. *Vosk nad zlato*. 1. Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., 2017. ISBN 978-80-87196-25-0.

NONG, Yvonne, Jessica MALOH, Nicole NATARELLI, Hemali GUNT, Esther TRISTANI a Raja SIVAMANI. A review of the use of beeswax in skincare. *Journal of*
24 *Cosmetic Dermatology* [online]. 2023, **22**(8), 2166-2173 [cit. 2024-04-23]. ISSN 1473-2130. Dostupné z: doi:10.1111/jocd.15718

STEEL, Ian. Lanolin and the Skin. In: RAWLINGS, Anthony V. a James J. LEYDEN, ed., Anthony RAWLINGS, James LEYDEN. *Skin Moisturization* [online]. Informa
25 Healthcare, 2009, s. 295-308 [cit. 2024-04-23]. Basic and Clinical Dermatology. ISBN 1-4200-7094-0. Dostupné z: doi:10.3109/9781420070958.018

JACOB, Sharon a Sadegh AMINI. Cocamidopropyl Betaine. *Dermatitis* [online]. 2008,
26 **19**(3), 157-160 [cit. 2024-04-28]. ISSN 1710-3568. Dostupné z: doi:10.2310/6620.2008.06043

BECKER, Lillian, Wilma BERGFELD, Donald BELSITO et al. Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology* [online]. 2019,
27 **38**(3), 6-22 [cit. 2024-04-28]. ISSN 1091-5818. Dostupné z: doi:10.1177/1091581819883820

SURJUSHE, Amar, Resham VASANI a DG SAPLE. Aloe vera: A short review. *Indian*
28 *Journal of Dermatology*. 2008, **53**(4). ISSN 0019-5154. Dostupné z: doi:10.4103/0019-5154.44785

SHELTON, Ronald M. Aloe Vera: Its Chemical and Therapeutical Properties.
29 *International Journal of Dermatology*. 1991, **30**(10), 679-683.

HEMILÄ, Harri. Vitamin C and Infections. *Nutrients* [online]. 2017, **9**(4), 1-28 [cit.
30 2024-04-28]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu9040339

31 SCHNEIDER, Claus. Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2005, **49**(1), 7-30 [cit. 2024-04-28]. ISSN 16134125. Dostupné z: doi:10.1002/mnfr.200400049

32 KAPPALLY, Shijna, Arun SHIRWAIKAR a Annie SHIRWAIKAR. COCONUT OIL – A REVIEW OF POTENTIAL APPLICATIONS. *Hygeia:: journal for drugs and medicines*. 2015, **7**(2), 34-41. ISSN 2229-3590.

33 CHEN, Liping, Yuankang ZHU, Zijing HU, Shengjie WU a Chengtao JIN. Beetroot as a functional food with huge health benefits: Antioxidant, antitumor, physical function, and chronic metabolomics activity. *Food Science & Nutrition* [online]. 2021, **9**(11), 6406-6420 [cit. 2024-04-25]. ISSN 2048-7177. Dostupné z: doi:10.1002/fsn3.2577

34 ADENAM, Norfatihah, Nur PIRDAUS, Muhamad YUNIN, Ku AZMIE, Khairul WONG, Hasyiya ADLI a Hasiah SALLEH. Study of Beta vulgaris (Beetroot) Extraction in Polar Solvents as Photoabsorber in Dye-Sensitized Solar Cells Application. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [online]. 2020, **596**(1) [cit. 2024-04-28]. ISSN 1755-1307. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/596/1/012014

35 Methanol. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2024 [cit. 2024-04-19]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Methanol

36 ENEV, Vojtěch. *Další zkušenosti s rozborem huminových výrobků: "dnes v sypkém stavu"*. 1. 2020.

37 LAMAR, Richard, Daniel OLK, Lawrence MAYHEW a Paul BLOOM. A New Standardized Method for Quantification of Humic and Fulvic Acids in Humic Ores and Commercial Products. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* [online]. 2014, **97**(3), 721-730 [cit. 2024-04-04]. ISSN 1060-3271. Dostupné z: doi:10.5740/jaoacint.13-393

38 TBIO CROP SCIENCE. *HumiKey* [online]. 2015 [cit. 2024-04-22]. Dostupné z: http://www.tbio.cn/humikey.html

39 FIDEL, Paul, Jose VAZQUEZ a Jack SOBEL. Candida glabrata C. albicans: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to C. albicans. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1999, **12**(1), 80-96 [cit. 2024-04-25]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.12.1.80

40 BRAZ, Vânia, Karine MELCHIOR a Cristiano MOREIRA. Escherichia coli as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2020, **10** [cit. 2024-04-25]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2020.548492

41 OTTO, Michael. Staphylococcus epidermidis — the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2009, **7**(8), 555-567 [cit. 2024-04-25]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2182

42 MULIYATI, D, D SUMARDANI, D AMBARWULAN, S SISWOYO, E HANDOKO, E FITRIANI a S VIRIDI. The 3-D visualization of the granular particle on various diameter porous surfaces. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2019, **1402**(7) [cit. 2024-04-22]. ISSN 1742-6588. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/1402/7/077026

43 SCHRAMM, Laurier Lincoln. *Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 35-273-0743-5.

44 FELTON, Linda A. *Remington: Essentials of Pharmaceutics*. 1. vydání. London: Pharmaceutical Press, 2012. ISBN 978-0-85711-105-0.

45 HLB calculator. In: *Crafters's choice* [online]. 2024 [cit. 2024-04-28]. Dostupné z: https://www.crafters-choice.com/calculators/HLBCalculator.aspx

46 HLB Balance. In: *Hawkins Watts* [online]. Australia: Hawkins Watts, 2016 [cit. 2021-05-06]. Dostupné z: https://www.hawkinswatts.com/wp-content/uploads/2016/01/Hawkins-Watts-HLB-Balance.pdf

47 AULTON, Michael a Kevin TAYLOR. In: *Aulton's pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. 5. London: Elsevier, 2018, s. 282-299. ISBN 978-0-7020-7005-1.

48 DOBA, Takahisa, Graham BURTON a Keith INGOLD. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* [online]. 1985, **835**(2), 298-303 [cit. 2024-04-28]. ISSN 00052760. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2760(85)90285-1

49 KUSRINI, Eny, Dias MAWARNI, Dwi WULANDARI, Karina AYUNINGTYAS a Anwar USMAN. *Formulation and characterization of lip balm made from beeswax, almond oil, virgin coconut oil and honey* [online]. In: . s. 070008- [cit. 2024-04-23]. Dostupné z: doi:10.1063/5.0014367

50 PAITHANKAR, Sakshi, Kaveri PANSARE, Anil PAWAR a Dhanashri JADHAV. Formulation of natural lip balm. *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)*. 2023, **10**(01), 1009-1014. ISSN 2395-0056.

51 YUSOF, Atuyah, Azilah AJIT, Ahmad SULAIMAN a Aishath NAILA. Production of lip balm from stingless bee honey. *The Maldives National Journal of Research*. 2018, **6**(1), 57-72. ISSN 2382-0373.

52 PAWAR, Jayshri, Ujjwala KANDEKAR, Vijaya VICHARE a Pranali GHAVANE. Production and Analysis of Lip Balm using Herbal Resources. *Journal of Pharmaceutical Research International* [online]. 2021, 540-546 [cit. 2024-04-23]. ISSN 2456-9119. Dostupné z: doi:10.9734/jpri/2021/v33i59A34303

53 ANISA, H, Y SUKMAWARDANI a N WINDAYANI. A simple formulation of lip balm using carrot extract as a natural coloring agent. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2019, **1402**(5) [cit. 2024-04-23]. ISSN 1742-6588. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/1402/5/055070

54 AZMIN, Siti, Nurshafieera JAINE, Mohd NOR a Harvey ARELLANO-GARCIA. Physicochemical and sensory evaluations of moisturising lip balm using natural pigment from Beta vulgaris. *Cogent Engineering* [online]. 2020, **7**(1) [cit. 2024-04-23]. ISSN 2331-1916. Dostupné z: doi:10.1080/23311916.2020.1788297

55 AZTATZI-RUGERIO, Lucia, Sulem GRANADOS-BALBUENA, Yimi ZAINOS-CUAPIO, Erik OCARANZA-SÁNCHEZ a Marlon ROJAS-LÓPEZ. Analysis of the degradation of betanin obtained from beetroot using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2019, **56**(8), 3677-3686 [cit. 2024-04-25]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-019-03826-2

56 *NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích: Úřední věstník Evropské unie*. In: . 2009.

57 PERMATANANDA, Pande Ayu Naya Kasih. Lip Balm Formulation Based on Balinese Grape seed Oil (Vitis vinifera l. Var Alphonso Lavallee). *International Journal of Current Science Research and Review* [online]. 2021, **04**(07), 633-639 [cit. 2024-04-25]. ISSN 25818341. Dostupné z: doi:10.47191/ijcsrr/V4-i7-03

58 CAI, Yizhong, Mei SUN a Harold CORKE. Colorant Properties and Stability of Amaranthus Betacyanin Pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1998, **46**(11), 4491-4495 [cit. 2024-04-25]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf980457g

59 METZGER, Thomas G. *Applied Rheology: With Joe Flow on Rheology Road*. 2. Graz, Austria: Anton Paar GmbH, 2018. ISBN 9783950401608.

60 PAN, Sharadwata a Natalie GERMANN. Thermal and mechanical properties of industrial benchmark lipstick prototypes. *Thermochimica Acta* [online]. 2019, **679** [cit. 2024-04-26]. ISSN 00406031. Dostupné z: doi:10.1016/j.tca.2019.178332

61 Glycerol. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2024 [cit. 2024-04-23]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Glycerol

62 DM DROGERIE MARKT S.R.O. DmBio Kokosový olej, 620 ml. In: DM DROGERIE MARKT S.R.O. *Dm* [online]. 2024 [cit. 2024-04-23]. Dostupné z: https://www.dm.cz/dmbio-bio-kokosovy-olej-p4058172801389.html?appPageType=productdetails&appProductId=4058172801389&wt_mc=sea.google.ads_shopping.19636456744..&gad_source=1&gclid=CjwKCAjwuJ2xBhA3EiwAMVjkVGTh2RZus41DJgEHJH2pemoF2gJdfjokChaDE9ETiHkkcpY7NFAnMhoCtPUQAvD_BwE

63 Lanolin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2024 [cit. 2024-04-23]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Lanolin

64 MARIANI, Rajin, Bono AWANG a Chong HO. Optimisation of Natural Ingredient Based Lipstick Formulation by Using Mixture Design. *Journal of Applied Sciences* [online]. 2007, **7**(15), 2099-2103 [cit. 2024-04-23]. ISSN 18125654. Dostupné z: doi:10.3923/jas.2007.2099.2103

65 GEORGIEV, Vasil, Jost WEBER, Eva-Maria KNESCHKE, Petko DENEV, Thomas BLEY a Atanas PAVLOV. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Betalain Extracts from Intact Plants and Hairy Root Cultures of the Red Beetroot Beta vulgaris cv. Detroit Dark Red. *Plant Foods for Human Nutrition* [online]. 2010, **65**(2), 105-111 [cit. 2024-04-25]. ISSN 0921-9668. Dostupné z: doi:10.1007/s11130-010-0156-6

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné spektrum světla
DSC	Diferenční skenovací kalorimetrie
FTIR	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
HLB	Hydrofilně-lipofilní balanc
EA	Elementární analýza
TGA	Termogravimetrická analýza
V/O	Emulze voda v oleji
ATR	Attenuated total reflectance=zeslabený úplný odraz
NZX	Systém hodnocení organoleptických vlastností

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Jednoduché znázornění struktury huminových látek, R=základ supra molekuly, převzato [1] 9

Obrázek 2 - Příklad produktu s obsahem rašeliny: rašelinové mýdlo, typicky zabarvené díky obsahu huminových látek; převzato z balneotrade.cz 11

Obrázek 3 - Lyofilizát barviva z červené řepy 23

Obrázek 4 - Aparatura pro chromatografii na tenké vrstvě 26

Obrázek 5 - Chromatografické vývviny na denním světle 27

Obrázek 6 - Chromatografické vývviny pod UV světlem 27

Obrázek 7 - Lyofilizáty fulvinových (vlevo) a huminových kyselin, převzato [36] 30

Obrázek 8 - Difúzní cely při zahájení měření prostupu vodné fáze s účinnými látkami 33

Obrázek 9 - Difúzní cely při ukončení měření 33

Obrázek 10 - Typy emulzí, převzato a upraveno [43] 34

Obrázek 11 - První vzorky balzámů 36

Obrázek 12 - Nedostatečná dispergace vodné složky balzámu a její následná sedimentace 38

Obrázek 13 - Změna barvy balzámu 38

Obrázek 14 - První finální vzorky, které podlehly degradaci vlivem složení a defektům obalového materiálu 40

Obrázek 15 - Vzorek balzámu po nadměrné mechanické dispergaci 42

Obrázek 16 - Kyvety před analýzou na LUMiSizeru 43

Obrázek 17 - Kyveta po analýze na LUMiSizeru 44

Obrázek 18 - Průměrné hodnoty indexů nestability jednotlivých řad 44

Obrázek 19 - Krabičky pro uchování finálních vzorků během měření jejich stability 46

Obrázek 20 - Patch test pro určení dráždivosti balzámů a schopnosti hydratovat, stáří balzámu 3 měsíce 47

Obrázek 21 - Roztěrové a pH testování vzorků, stáří balzámu 3 měsíce 48

Obrázek 22 - Připravené plotny s balzámem pro testování mikrobiální zátěže 50

Obrázek 23 - Balzámy typu A (uprostřed), B (vpravo) a C (vlevo) v tubách o obsahu 4 g 52

Obrázek 24 - Senzorická analýza balzámů na rty 54

Obrázek 25 - Infračervené spektrum lyofilizátu barviva z červené řepy 56

Obrázek 26 - FTIR spektrum barviva z červené řepy připravený L. Aztatzi-Rugiero a kol. 56

Obrázek 27 - Ramanovo spektrum lyofilizátu barviva z červené řepy 57

Obrázek 28 - DataColor spektrum pro frakce D2 58
Obrázek 29 - DataColor spektra pro frakce E2 58
Obrázek 30 - FTIR spektra pro frakce TLC fáze A 59
Obrázek 31 - FTIR spektra pro frakce TLC fáze D 60
Obrázek 32 - FTIR spektra pro TLC fáze E, 1. část 61
Obrázek 33 - FTIR spektra pro TLC fáze E, 2. část 62
Obrázek 34 - Regresní závislost ke kalibraci roztoky methanolu 63
Obrázek 35 - Záznam změny hmotnosti vzorku vůči referenci vztažené na relativní vlhkost atmosféry, červená linie pro sorpční fázi měření, modrá linie pro desorpci 65
Obrázek 36 - Grafické znázornění průběhu jednotlivých flow-pointů v čase 72
Obrázek 37 - Záznam z oscilačního měření 73
Obrázek 38 - Grafické znázornění průběhu jednotlivých LVO v čase 74
Obrázek 39 - Záznam měření pro vybraný vzorek 02-3 76
Obrázek 40 - Záznam teplot píků T_1 v průběhu stabilit 77
Obrázek 41 - Záznam teplot píků T_2 v průběhu stabilit 78
Obrázek 42 - Záznam teplot píků T_4 v průběhu stabilit 78
Obrázek 43 - Ukázka kultivace kontrolního ředění 10^6 kvasinky Candida glabrata 81
Obrázek 44 - Kvasinka Candida glabrata na balzámu po týdnu kultivace, ředění 10^6 81
Obrázek 45 - Kvasinka Candida glabrata na balzámu po měsíci kultivace, ředění 10^6 82
Obrázek 46 - Agarové misky pro druhé testování mikrobiální zátěže po týdnu kultivace; horní řada obsahuje balzám s humátem a řepným barvivem, prostřední řada balzám s humátem a spodní řada vzorky slepých pokusů balzámu 83
Obrázek 47 - Regresní přímka ke kalibrační řadě roztoků troloxu 84
Obrázek 48 - Difúzní test antimikrobiálních vlastností 86
Obrázek 49 - Průběh oparu, den 2.; je patrná tvorba puchýře (vyznačen) 88
Obrázek 50 - Průběh oparu, den 4.; dochází k perforaci puchýřku a počínající tvorbě strupu 88
Obrázek 51 - Průběh oparu, den 5.; patrný je již strup 89
Obrázek 52 - Průběh oparu, den 7.; na místě původního oparu zůstává již jen malý strup 89
Obrázek 53 - UV-VIS spektrum vodné fáze balzámu 89
Obrázek 54 - UV-VIS spektra koncentrační řady vodné fáze balzámu 90
Obrázek 56 - Věkové rozložení účastníků senzorické analýzy 91
Obrázek 57 - Zastoupení typů pokožky dle dotázaných 91

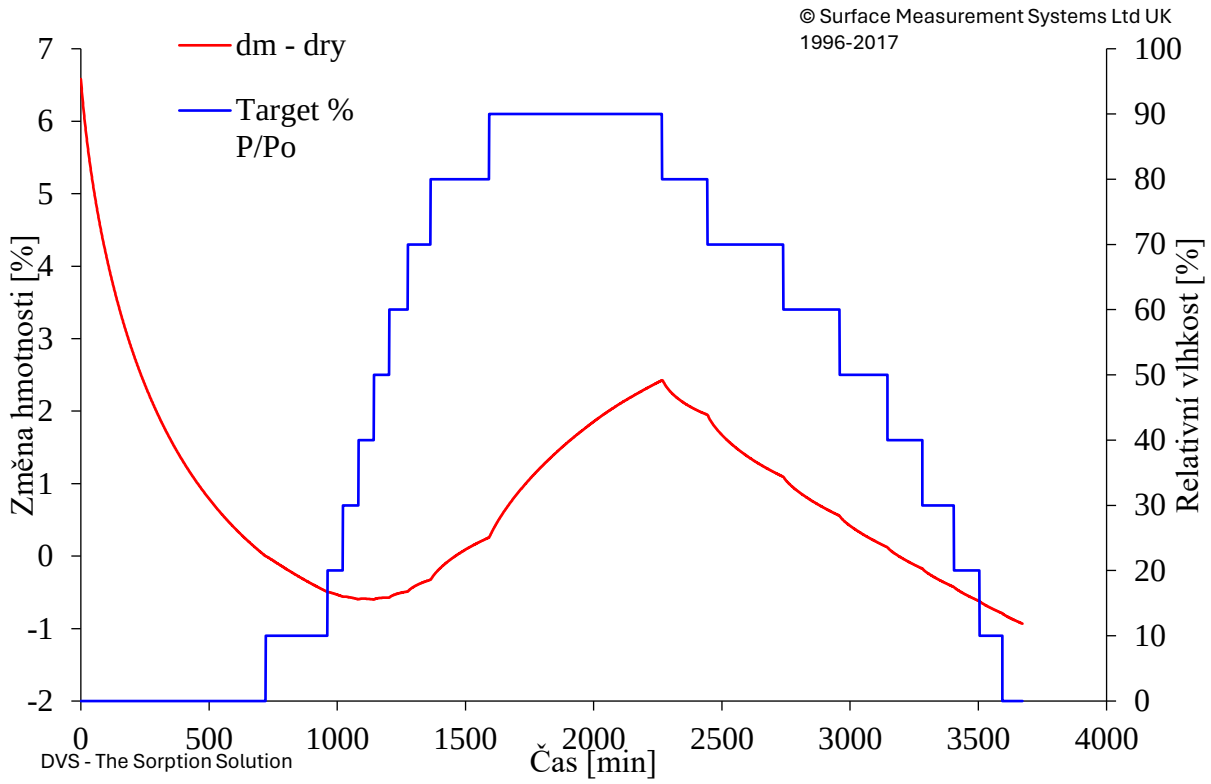
Obrázek 58 - Paprskový graf bodové úspěšnosti jednotlivých vzorků před aplikací 92
Obrázek 59 - Paprskový graf bodové úspěšnosti jednotlivých vzorků po aplikaci..... 94
Obrázek 60 - Ukázka celkového hodnocení vzorků..... 94
Obrázek 61 - Celková známka pro všechny tři vzorky 95

9 PŘÍLOHY

Příloha 1 - Složení finálních vzorků

Složka	Plán	01-1	01-2	01-3	02-1	02-2	02-3	03-1
Kokosový olej [g]	18,8	18,92	18,78	19,81	19,17	18,7	19,13	19,35
Lanolin [g]	5,0	5,01	5,14	5,11	4,93	5,19	4,9	4,8
Včelí vosk [g]	4,0	4,05	4,01	3,95	4,18	3,93	3,96	3,99
CAPB [g]	1,0	0,94	0,93	0,97	1,1	1,03	1,08	0,91
Aloe Vera šťáva [g]	5,0	4,98	4,97	4,82	4,92	4,95	5,06	5,16
Humát draselný [g]	0,0016	0,0018	0,0024	0,0028	-	-	-	0,0017
Glycerin [g]	1,2	1,7	1,07	1,24	1,34	1,67	1,11	1,3
Barvivo [g]	0,8	0,78	0,83	0,74	0,83	1,11	0,79	-
Vitamin C [g]	0,5	0,45	0,44	0,44	0,52	0,45	0,48	0,44
Vitamin E [g]	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Složka	**03-2**	**03-3**	**04-1**	**04-2**	**04-3**	**05-1**	**05-2**	**05-3**
Kokosový olej [g]	19,15	18,71	19,37	18,93	19,49	19,01	19,36	18,72
Lanolin [g]	5,46	5,3	5,26	5,07	5,48	4,79	5,5	5
Včelí vosk [g]	4,01	3,97	4,14	4,11	4,15	4,22	3,97	3,98
CAPB [g]	1,12	0,98	1,09	1,02	1	0,99	1,04	1,03
Aloe Vera šťáva [g]	5,03	4,94	5,34	5,27	4,97	4,96	5,15	5,03
Humát draselný [g]	0,0036	0,0025	-	-	-	0,0032	0,0026	0,0035
Glycerin [g]	1,29	1,38	1,17	1,87	1,11	1,19	1,29	1,21
Barvivo [g]	-	-	-	-	-	0,91	0,91	0,92
Vitamin C [g]	0,42	0,47	0,51	0,48	0,43	0,46	0,48	0,47
Vitamin E [g]	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Příloha 2 - Záznam z měření DVS



DVS Isotherm Analysis Report

Date: 25 Mar 2024
Time: 10:23 dop.
File: C:\DVS-Advantage\data\balzam_dostalova - Mon 25 Mar 2024 10-23-59.xls
Meth: C:\DVS-Advantage\method\Isotherm_0-90RH dmdt0.002 step10 60-720min 1-cycle.sao
Sample: balzam_dostalova
Temp: 24.9 °C
MRef: 118.6752 from Mass at end of first 0.0 P/Po stage

	Target % P/Po	Change In Mass (%) - ref Sorption	Desorption	Hysteresis
Cycle 1	0,0	0,000	-0,933	
	10,0	-0,494	-0,789	-0,295
	20,0	-0,559	-0,622	-0,063
	30,0	-0,596	-0,427	0,169
	40,0	-0,599	-0,173	0,426
	50,0	-0,572	0,122	0,694
	60,0	-0,489	0,558	1,046
	70,0	-0,327	1,094	1,421
	80,0	0,256	1,950	1,694
	90,0	2,425	2,425	