



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

STANOVENÍ AUTENTICITY PŘÍRODNÍ ROSTLINNÉ SLOŽKY V KOSMETICKÝCH VÝROBCÍCH

AUTHENTICITY OF NATURAL PLANT COMPONENT IN COSMETICS PRODUCTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michaela Kubalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1648/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Michaela Kubalová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Němcová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Stanovení autenticity přírodní rostlinné složky v kosmetických výrobcích

Zadání bakalářské práce:

1. Přehled kosmetických výrobků s přírodními rostlinnými a bylinnými složkami
2. Optimalizace extrakce a PCR metod stanovení rostlinné DNA v kosmetickém výrobku
3. Stanovení přírodní rostlinné složky ve vybrané sérii modelových a reálných kosmetických výrobků
4. Vyhodnocení a diskuse výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Michaela Kubalová
student(ka)

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Náplňou tejto práce bolo štúdium autenticity vybraných prírodných zložiek v kozmetických výrobkoch. Jednalo sa konkrétne o kozmetické výrobky s obsahom citrusov, mäty a levandule. Pre izoláciu DNA boli použité komerčne dostupné izolačné kity. Prítomnosť DNA rastlinného pôvodu bola overená metódou PCR pomocou primerov špecifických pre ITS2 región rastlín. Pomocou PCR bola vo vzorkách sledovaná prítomnosť génu pre limonén syntázu, pre potvrdenie prítomnosti limonénu, ktorý je významným alergénom, obsiahnutým v spomenutých rastlinách. Zároveň bola prítomnosť limonénu overovaná metódou HPLC. Ďalej boli testované dvojce primery pre stanovenie prítomnosti levandule vo vybraných vzorkách a bola sledovaná účinnosť PCR, nebol však pozorovaný významný rozdiel.

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to study the authenticity of selected natural ingredients in cosmetic products. These were specifically cosmetic products that contained citrus, mint or lavender. Commercially available isolation kits were used for DNA isolation. The presence of plant origin DNA was verified by PCR method using primers specific for the ITS2 region of plants. The presence of limonene, a significant allergen contained in said plants, was determined in the samples by PCR method using primers for limonene synthase. At the same time, its presence was verified by HPLC method. In addition, two primers were tested for lavender and monitored for their efficacy, with no significant difference in the usage.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Kozmetické výrobky, autenticita, izolácia DNA, PCR, limonén, linalool

KEY WORDS

Cosmetic products, authenticity, DNA isolation, PCR, limonene, linalool

KUBALOVÁ, Michaela. *Stanovení autenticity přírodní rostlinné složky v kosmetických výrobcích*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131876>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Andrea Němcová.

PROHLÁŠENÍ

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

podpis studentky

Pod'akovanie

Týmto by som rada poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce Ing. Andrei Němcovej Ph.D. a Ing. Denise Langovej za cenné rady a pripomienky. Najmä ďakujem za ich trpezlivosť, poskytnutý čas a za pomoc pri meraní tejto bakalárskej práce. V poslednom rade ďakujem rodine a blízkym za ich podporu.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická časť	9
2.1	Kozmetika a kozmetológia.....	9
2.2	Prírodná kozmetika.....	9
2.3	Základné zložky kozmetiky	9
2.3.1	Vonné kompozície	10
2.4	Legislatíva	11
2.5	Koža	12
2.5.1	Pokožka	13
2.5.2	Zamša	13
2.5.3	Podkožné väzivo	13
2.6	Analýza kozmetických výrobkov pomocou biologických metód založených na DNA.....	13
2.7	Extrakcia DNA	13
2.7.1	Homogenizácia a lýza buniek.....	14
2.7.2	Extrakcia a purifikácia DNA	14
2.7.3	Fenol-chloroformová extrakcia.....	15
2.7.4	DNA – izolačné kity.....	15
2.8	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA	15
2.9	Polymerázová reťazová reakcia)	16
2.9.1	Princíp reakcie PCR	16
2.10	Analýza kriviek tavenia ampliconov (MELT analýza).....	18
2.11	Agarózová elektroforéza.....	19
2.12	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia	20
3	Experimentálna časť	21
3.1	Rastlinný materiál.....	21
3.2	Analyzované kozmetické výrobky	21
3.2.1	Kozmetické výrobky z komerčnej siete drogérií	21
3.2.2	Produkty vlastnej prípravy.....	30
3.3	Prístroje a pomôcky	30
3.4	Chemikálie	31

3.5	Roztoky	31
3.6	Metódy	32
3.6.1	Príprava analyzovaných vzoriek	32
3.6.2	Brief protokol z izolačného kitu	32
3.6.3	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA	33
3.6.4	Polymerázové reťazové reakcie	33
3.6.5	Detekcia produktov PCR agarózovou gélovou elektroforézou	35
3.6.6	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia	36
4	Výsledky a diskusia	38
4.1	Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie DNA	38
4.2	Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA pomocou primerov špecifických pre ITS2 región rastlín	40
4.2.1	Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z rastlín	40
4.2.2	Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z modelových a komerčných vzoriek	42
4.3	Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA pomocou primerov Lim2F/R špecifických pre limonén	45
4.3.1	Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z rastlín	46
4.3.2	Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z modelových a komerčných vzoriek	48
4.4	Výber vhodných primerov a overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA pomocou primerov lav1FR a lav1modFR špecifických pre levanduľu	54
4.4.1	Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z rastlín a modelových vzoriek pomocou primerov lav1FR	54
4.4.2	Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z komerčných vzoriek pomocou primerov lav1FR	57
4.4.3	Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z rastlín a modelových vzoriek pomocou primerov Lav1modFR	59
4.4.4	Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z komerčných vzoriek pomocou primerov Lav1modFR	61
4.5	Zhrnutie výsledkov metódy PCR	63
4.6	Stanovenie prítomnosti alergénov metódou HPLC	64
4.7	Zhrnutie výsledkov	66
5	Záver	70

6	Zdroje	71
7	Zoznam použitých skratiek	75
8	Zoznam použitých symbolov	75
9	Zoznam príloh	75
10	Prílohy	76

1 ÚVOD

Snahou a zároveň marketingom dnešnej doby je používanie prírodných komponentov, či už sa jedná o kozmetické prípravky, potravinárske výrobky alebo iné. Bohužiaľ, niektorí výrobcovia týchto produktov sa snažia dosiahnuť čo najnižšie výrobné náklady, čo môže mať za následok „falšovanie“ niektorých surovín, v horších prípadoch aj celého výrobku. Toto falšovanie kozmetických výrobkov môže zásadne znižovať ich účinnosť.

V predloženej bakalárskej práci bola analyzovaná prítomnosť a autenticita prírodných zložiek v sérii kozmetických výrobkov. Bola použitá metóda polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), ktorou bola stanovovaná prítomnosť rastlinnej matrice v týchto vzorkách. V prípade, že danou metódou nebola detekovaná prítomnosť rastlinnej matrice, mohlo ísť práve o falšovanie. V takom prípade do kozmetického výrobku nebola pravdepodobne pridaná rastlinná zložka, iba rastlinná vôňa.

Rastlinné zložky v kozmetických výrobkoch bývajú často nahradené vonnými zložkami, najmä esenciálnymi olejmi a silicami, ktoré obsahujú celý rad alergénnych látok. Čím vyššia je koncentrácia obsiahnutých vonných zložiek, tým vyššia je aj koncentrácia alergénov. To, v niektorých prípadoch, môže mať zdravotný dopad na spotrebiteľa, u ktorého sa môžu prejavovať alergické reakcie. Prítomnosť alergénov je možné stanoviť metódou plynovej chromatografie (GC) alebo vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC). Metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) je však možné zistiť, či bola pridaná prírodná zložka v podobe celej rastliny alebo iba jej vôňa.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Kozmetika a kozmetológia

Názov kozmetika pochádza z gréckeho slova „*cosmetae*“, ktoré v preklade znamená „zdobiť, krášliť sa.“ Toto slovo používali už rímski otroci, ktorých úlohou bolo kúpať ženy a mužov v parfémoch. Používalo sa aj 10 000 rokov pred našim letopočtom v Egypte, kde ženy a muži používali vonné oleje a masti na zjemnenie pokožky, zamaskovanie telesného pachu a taktiež pri používaní farbív na zafarbenie pokožky tela a vlasov. Jedným z prvých farbív bola látka nazývaná kohl. Kohl bol prášok vyrobený z drveného antionu, spálených mandlí, olova, oxidovanej medi, popola, malachitu, chryzokolu alebo ich rôznych kombinácií. Egypťania si tento prášok nanášali na oči a verili, že takto nakreslené očné linky môžu zlepšiť zrak. Okrem Grécka a Ríma bol veľký rozvoj kozmetiky v tomto období zaznamenaný aj v Číne a Perzii, kde boli používané rôzne masti, oleje a rastlinné výťažky. Najviac využívané boli suroviny ako myrta, tymian, majorán, kamilky, levanduľa, rozmarín, cédrové drevo, ruža, aloe vera, olivový a sezamový olej a mnoho iných [1, 2].

Moderná kozmetika, v podobe akéj je známa aj teraz, prišla až v 19. storočí počas priemyselnej revolúcie. Kozmetológia ako samostatná vedná disciplína vznikla až v 30-tych rokoch 20. storočia. Tento vedný odbor spája dermatológiu, biológiu, fyziológiu, mikrobiológiu, chémiu, fyzikálnu chémiu a mnoho ďalších pododborov. Pojem kozmetológia je často zamenávaný so slovom kozmetika, avšak medzi týmito dvoma pojmami je veľké množstvo rozdielov. Kozmetológia je definovaná ako veda, ktorá zahŕňa výskum a prípravu kozmetických výrobkov, overenie ich použitia a spôsob ich využitia. Využíva pri tom najmä znalosti biológie kože a vyššie spomenutých vedných odborov. Kozmetika nie je definovaná ako vedný odbor, ale len ako praktická činnosť využívajúca kozmetológiu k svojmu prospechu. Jej činnosť je skôr estetická. Aj keď je definícia každého slova iná, obe spolu súvisia [1, 3].

2.2 Prírodná kozmetika

V dnešnej dobe je kladený veľký dôraz na používanie prírodných látok takmer v každom odvetví, platí to i pre kozmetiku. Pojem „prírodná kozmetika“ nezahŕňa iba používanie prírodných látok, ale tiež procesy pre udržateľnú výrobu. Na to, aby mohla byť kozmetika klasifikovaná ako prírodná, musí sa riadiť týmito podmienkami:

- Využívanie produktov ekologického poľnohospodárstva a rešpektovanie biodiverzity.
- Zodpovedné využívanie prírodných zdrojov a ochrana životného prostredia.
- Spracovanie a výroba, ktorá je šetrná k životnému prostrediu.

Zároveň je zakázané používať rastliny, rastlinný materiál a mikroorganizmy, ktoré boli geneticky modifikované a materiály extrahované zo živých organizmov a nie je na nich testovaná [4].

2.3 Základné zložky kozmetiky

Kozmetika je veľmi široký pojem, rovnako je vysoký aj počet použiteľných kozmetických surovín, ktorý sa syntetizovaním rôznych nových zlúčenín neustále zvyšuje. Niektoré suroviny

však tvoria základ kozmetických prípravkov už po niekoľko tisíc rokov a sú považované za látky účinné a bezpečné na používanie.

Z počiatku boli v kozmetike používané iba prírodné suroviny rastlinného a živočíšneho pôvodu, ako napríklad rastlinné oleje, včelí vosk, sadlo a iné, s malým množstvom nerastných látok, ktoré boli využívané ako pigment. Neskôr sa začali využívať aj syntetické zložky a vône.

Medzi prírodné zložky kozmetiky patrí celý rad látok, medzi hlavné patrí voda, rastlinné oleje, extrakty a vodné alebo olejové výluhy bylín, éterické oleje ako prirodzená vonná kompozícia, včelí vosk a vitamíny. Voda je veľmi dôležitou surovinou, pre kozmetické účely sa využíva voda pitná, morská, minerálna, destilovaná alebo získaná osmózou. Rastlinné oleje sú často získavané šetrnými spôsobmi, ako napríklad lisovaním za studena. Medzi najvyužívanejšie patria napríklad kokosový, argánový, olivový, slnečnicový, avokádový a ružový olej alebo bambucké maslo. Vodné a olejové výluhy sa získavajú extrakciou z príslušných bylín, pričom éterické oleje sú zväčša získavané destiláciou. Pre tieto účely najpoužívanejšie byliny sú napríklad levanduľa, mäta, citrusy, kamilka, aloa pravá, nechtík, jahoda a mnoho iných. Včelí vosk a vitamíny (napr. vitamín E) okrem iného môžu slúžiť aj ako antioxidanty a prírodné konzervanty. V niektorých kozmetických výrobkoch sa môžu, pre lepšiu účinnosť, vyskytovať drobné časti bylín alebo plodov, čo je využívané najmä pri prírodných peelungoch [1, 4, 5].

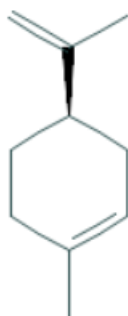
2.3.1 Vonné kompozície

Vonné látky sa v kozmetike používajú už po stáročia. Najväčší rozkvet zaznamenali vonné látky v 17. storočí v Francúzsku. Pôvodne boli využívané iba látky prírodného charakteru, rastlinného (silice) aj živočíšneho pôvodu (ambra, cibet). Pôvodným spôsobom prípravy vonných látok bolo vylúhovanie prírodnej zložky v oleji. Až neskôr bola objavená destilácia s vodnou parou z rôznych častí rastlín. Takto pripravené vonné látky nachádzajú uplatnenie ako v kozmetike, tak aj v potravinárstve. Platí, že tieto vône v čistom stave, akým je napríklad aromatický olej, nie sú príliš stále, ľahko sa odparujú, sú príliš aromatické a môžu byť alergénne. Tieto alergénne látky sa v koncentrovanom stave nesmú dostať do styku s kožou, preto sa v kozmetike miešajú s inými zložkami (napr. krémami a pod.). Jednými z najviac zastúpenými látkami v aromatických olejoch sú limonén a linalool [1].

2.3.1.1 Limonén

Limonén je monoterpén, ktorý sa vo forme d-limonénu a svojej racemickej zmesi vyskytuje v mnohých esenciálnych olejoch. Najčastejšie sa vyskytuje v citrusových šupkách a olejoch z týchto šupiek, vo forme D-limonénu, a to až v koncentrácií nad 90%. V nižšej koncentrácií a vo forme racemickej zmesi D- a L-limonénu, ho je možné nájsť v rôznych druhoch mäty, levandule a ihličnanov [6, 7].

Ide o bezfarebnú tekutinu s citrusovou vôňou, jeho štruktúra je znázornená na Obrázku 1. D- a L- limonén patria do triedy optických antipódov, čo má zásadný význam vo farmaceutickom priemysle a aj kozmetike, pretože každá konformácia sa môže vyznačovať inými fyzikálnymi vlastnosťami, ako je napríklad kryštalická štruktúra, rozpustnosť a stabilita, čo môže ovplyvniť výsledný účinok syntetizovaného liečiva/kozmetického produktu. Je to významný alergén, dráždi kožu a dýchacie cesty [8].

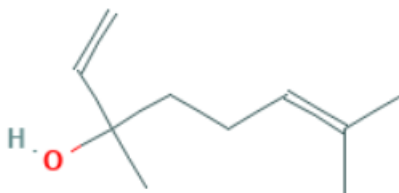


Obrázok 1 – Štruktúra limonénu (prevzaté z[6])

Vo veľkom sa získava ako vedľajší produkt pri výrobe pomarančových džúsov. Je ho možné izolovať z éterických olejov. Limonény sa využívajú predovšetkým ako vonné materiály pre parfumáciu kozmetiky, umelých éterických olejov a potravín [6, 7, 8].

2.3.1.2 Linalool

Linalool je monoterpénový alkohol kvetinovej vône, ktorý je izolovaný z rastlín koriandru, bazalky, levandule a citrusov. Jeho štruktúra je znázornená na Obrázku 2. Vyskytuje sa v dvoch enantioméroch, prvým je (+)-linalool, nazývaný tiež koriadrol, druhým (-)-linalool, nazývaný tiež likerol. Má charakter prchavej olejovej zložky a antimikrobiálnej látky. Využíva sa ako vôňa, je prirodzene prítomný takmer vo všetkých éterických olejoch. Najväčšie zastúpenie má v levanduľovom éterickom oleji vo forme likerolu, ale nachádza sa aj v éterických olejoch pomaranča a citróna vo forme koriadrolu [9, 10].



Obrázok 2 – Štruktúra linaloolu (prevzaté z [9])

2.4 Legislatíva

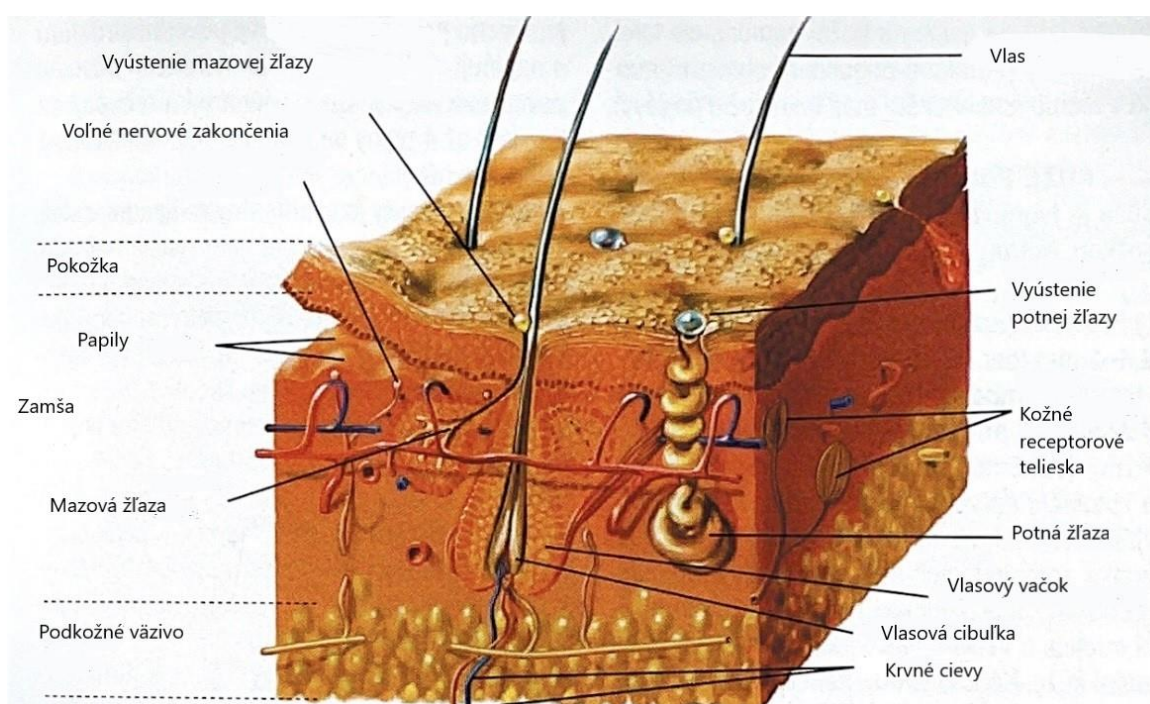
Keďže bezpečnosť spotrebiteľa je veľmi dôležitá, prijímanie nových výrobkov na trh je prísne kontrolované. Na európskej úrovni je regulovaná Nariadením Európskeho parlamentu a Rady č. 1233/2009 o kozmetických prípravkoch. Toto nariadenie hovorí napríklad o prísnych bezpečnostných požiadavkách pred uvedením produktu na trh, nutnosti informovať spotrebiteľa o nežiadúcich účinkoch, zodpovednosti výrobcu za produkt a iné. V Českej republike je toto nariadenie upravené zákonom č. 258/2000 Sb. o ochrane verejného zdravia a o zmene niektorých súvisiacich zákonov, § 27 Kozmetické prípravky, ktorý okrem iného spomína povinnosť uvedenia údajov v českom jazyku. Legislatíva tiež uvádza maximálne množstvo obsiahnutých alergénnych látok a povinnosť uvádzať upozornenie na obale produktov [11, 12].

2.5 Koža

Koža dospelého človeka má v priemerne plochu 1,75 m² a tvorí približne 7–10 % hmotnosti, takže je možné ju označiť za najväčší orgán ľudského tela. Na a v nej sa odohrávajú rôzne chemické a fyziologické procesy.

Má obrannú, imunitnú, dýchaciu, resorbčnú, metabolickú, vylučovaciu, regulačnú a zmyslovú funkciu. Koža pôsobí ako mechanická bariéra proti infekciám a parazitom, čím prispieva k imunite organizmu. Chráni proti slnečnému žiareniu a stratám tepla, čo má značný význam pre reguláciu telesnej teploty, a tiež bráni stratám vody z organizmu, čo by mohlo viesť k vysušeniu vnútorných orgánov. Je poprepletaná veľkým množstvom ciev, takže môže slúžiť aj ako zásobáreň krvi, ktorej sa nachádza v koži až jedna tretina celkového objemu. Okrem ciev sa v koži nachádzajú aj zmyslové receptory. V neposlednom rade je schopná vstrebávať, takže je významná pre aplikáciu kožných výrobkov, napr. krémov, ideálne na lipidickej báze, a vstrebávanie liečiv.

Je možné rozlíšiť 3 základné časti kože: pokožku (*epidermis*), zamšu (*dermis*) a podkožné väzivo (*hypodermis*). Jednotlivé časti sú znázornené na Obrázku 3. Každá z týchto častí sa svojim zložením líši. Koža môže svojou histologickou stavbou pripomínať sliznicu tvoriacu vnútornú výstelku telových dutín, avšak na rozdiel od slizníc má koža vrchnú časť pokrytú keratocytmi, ktoré odumierajú a odlupujú sa. K ich odlupovaniu dochádza každé 3 až 4 týždne, čo je teda doba, za ktorú sa celý povrch pokožky vymení [13, 14].



Obrázok 3 – Rez kožou so znázornením jednotlivých vrstiev (prevzaté z [13])

2.5.1 Pokožka

Pokožka je vonkajšia vrstva kože, tvorená mnohvrstvomým dlaždicovým epitelom s hrúbkou od 0,4 do 1 mm. Obsahuje 3 typy buniek – keratinocyty, melanocyty a Langerhansove bunky.

Keratynocyty obsahujú bielkovinu keratín a ich úlohou je najmä mechanická ochrana proti infekciám a zabránenie vysychaniu kože. Tieto bunky vznikajú v bazálnej vrstve pokožky, kde dochádza k ich neustálemu mitotickému deleniu a tým k vytváraniu nových vrstiev epitelových buniek. Najvrchnejšia časť takýchto buniek odumiera a obmieňa sa každé 3 až 4 týždne za nové, ktoré sú posúvané z bazálnej vrstvy po ukončení mitotického delenia. Druhým typom buniek sú melanocyty, prítomné v spodnej vrstve pokožky. Melanocyty sú schopné vytvárať pigmentovú clonu, ktorá absorbuje škodlivé ultrafialové žiarenie zo slnečných lúčov. Posledným typom buniek sú Langerhansove bunky, ktoré sú v prípade poranenia pokožky zodpovedné za primárnu imunitnú reakciu – fagocytujú antigénové častice dostávajúce sa do rany [13, 15].

2.5.2 Zamša

Zamša je väzivová vrstva, nachádzajúca sa medzi pokožkou a podkožným väzivom. Na pokožku naväzuje zvlhčenou, ale presne určenou papilárnou hranicou. Hranica medzi zamšou a podkožným väzivom nie je presne určená. Hrúbka zamše je približne 3 mm. Je veľmi odolná a pružná, čo sú vlastnosti podmienené prítomnosťou bielkovín kolagén a elastín, podieľajúce sa na vzhľade a starnutí kože. Medzibunkový priestor je vyplnený kyselinou hyaluronovou. Prívod a odvod krvi a metabolitov v zamši zaisťujú krvné a miazgové cievy, ktoré ňou prechádzajú. V zamši sa nachádzajú mazové, potné a pachové žľazy, vlasové vačky, nervové zakončenia a receptory dotyku, chladu a zvýšenej teploty [1, 13].

2.5.3 Podkožné väzivo

Podkožnú vrstvu tvorí riedke väzivové tkanivo a tukové bunky. Jej funkciou je predovšetkým ochrana tkanív a orgánov, uložených pod podkožnou vrstvou, pred chladom a mechanickým poškodením a zásoba energie uloženej v tuku [13].

2.6 Analýza kozmetických výrobkov pomocou biologických metód založených na DNA

Pre analýzu kozmetických výrobkov je v súčasnosti používaných veľmi veľa metód. Výrobcovia si, samozrejme, svoje produkty testujú sami, jedná sa však iba o testy stability (napr. termické alebo mikrobiologické). Avšak je možné sledovať aj iné parametre. Napríklad, pre stanovenie alergénov v kozmetike je najčastejšie využívaná metóda plynovej chromatografie (GC), ale je možné využiť aj vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu (HPLC). Kozmetické výrobky, ktoré obsahujú DNA je možné analyzovať aj pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) a je možné tiež využiť analýzu kriviek tavenia (MELT analýza) produktov PCR. Aby mohla byť táto DNA analyzovaná, musí byť najskôr extrahovaná z analyzovaných kozmetických výrobkov.

2.7 Extrakcia DNA

Extrakcia nukleových kyselín proteínov je v súčasnej dobe jednou z najpoužívanejších metód molekulárnej biológie, chémie, medicínskej diagnostiky a terapie. Cieľom extrakcie DNA je izolácia DNA dostatočnej kvantity a vysokej čistoty pre diagnostické účely. Kvalita a integrita izolovanej nukleovej kyseliny je dôležitá, pretože priamo ovplyvňuje výsledky všetkých nasledujúcich vedeckých výskumov. Takto izolovaná DNA je vhodná na následnú analýzu

rôznymi metódami, napríklad metódo PCR. DNA, RNA a proteíny môžu byť izolované z rôznych biologických materiálov, ktorými sú napr. tkanivá, bunky alebo vírusové častice [16, 18].

Izolácia nukleovej kyseliny je viackrokový proces, pri ktorom sa zo vzorky biologického materiálu postupne odstránia proteíny, lipidy a inhibítory. Hlavné kroky izolácie zahŕňajú lýzu buniek, inaktiváciu bunkových nukleáz, extrakciu a následné prečistenie DNA. Pre izoláciu a purifikáciu DNA existujú rôzne techniky. Tieto techniky môžu využívať rôzne fyzikálne, chemické a biologické javy, ako var, hydrolýzu proteinázami a inkubáciu s detergentmi. Rovnako môžu byť využívané dostupné komerčné kity pre extrakciu DNA. Výber vhodnej metódy je vždy závislý na matrici skúmanej vzorky [16, 18].

2.7.1 Homogenizácia a lýza buniek

Prvým krokom k izolácii DNA je homogenizácia buniek. Ide o rozrušenie bunkových stien, pletív, tkanív a ich súčastí, čím je pripravená homogénna zmes tkanív/pletív a buniek. Metóda môže byť volená podľa typu buniek alebo podľa ich veľkosti. Homogenizácia buniek môže byť prevedená fyzikálno-chemicky alebo enzymaticky. Pri fyzikálno-chemickom procese môže byť homogenizácia spôsobená rozotrením buniek v tretej miske, použitím ultrazvuku, zmrazovaním tekutým dusíkom alebo rozotrením buniek s tvrdými materiálmi, akými sú napr. morský piesok. Pri enzymatickej homogenizácii sú bunkové steny rozrušované enzýmami, napr. celulóza pre narušenie bunkových stien rastlín alebo lyzozým pre narušenie bakteriálnej bunkovej steny [19].

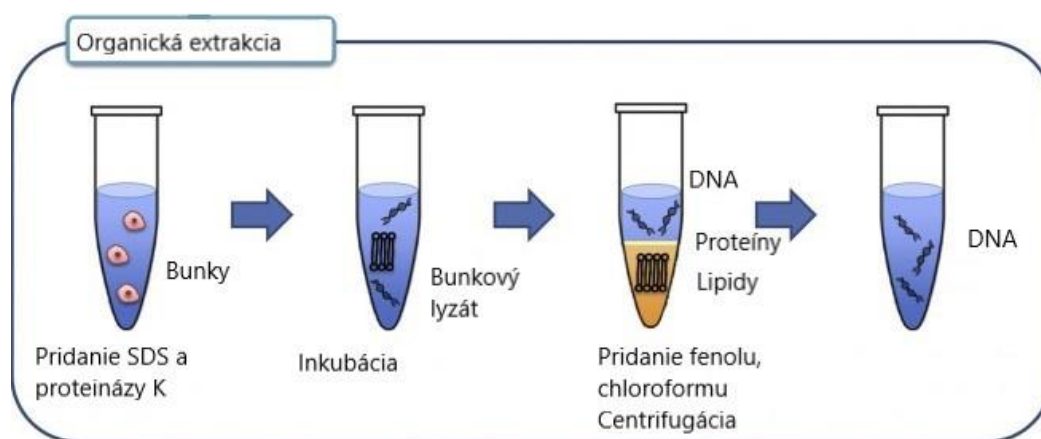
Homogenizované bunky je potrebné ďalej lýzovať, nakoľko sa genetická informácia nachádza až v samotnom jadre buniek. K lýzovaniu sa najčastejšie používajú detergenty ako napríklad dodecylsulfát sodný (SDS), ktorého úlohou je narušenie bunkovej steny alebo dithiothreitol (DTT), ktorý naruša disulfidické mostíky. Inaktiváciu proteínov zabezpečuje zmena teploty alebo enzýmy – najčastejšie proteináza K. Dôležitá je prítomnosť chelačných činidiel, akým je napríklad EDTA (kyselina etyléndiamíntetraoctová), ktoré slúžia na záchyt kationov Mg^{2+} , Ca^{2+} , čo spôsobuje inaktiváciu bunkových DNáz a okrem iného znižuje stabilitu vonkajšej membrány [20, 21].

2.7.2 Extrakcia a purifikácia DNA

Po homogenizácii a lýze buniek je potrebné izolovanú DNA vyčistiť odstránením nebielkovinových častí bunky. Na extrakciu sa v dnešnej dobe najčastejšie používajú dostupné extrakčné kity, najpoužívanejším predchodcom izolačných kitov bola fenol-chloroformová extrakcia, avšak pre používanie nebezpečných a toxických chemikálií sa táto metóda používa stále menej. K odstráneniu polysacharidov je možné použiť cetyltrimethylamónium bromid (CTAB). DNA, ktorá je rozpustná vo vodnej fáze, sa z tejto fázy vyzráža pridaním čistého ethanolu. Takto koncentrovaný alkohol rozpustí posledné časti nežiadúcich solí a bielkovín, samotná DNA sa však pri tomto kroku neporušuje. Tento krok je významný pre ďalšiu manipuláciu s DNA [20, 22].

2.7.3 Fenol-chloroformová extrakcia

Fenol-chloroformová extrakcia (inak nazývaná aj organická extrakcia) je najdlhšie používanou a mnoho rokov aj najbežnejšie používanou a najefektívnejšou metódou extrakcie DNA. Táto forma zahŕňa postupné pridávanie viacerých látok. Ako prvý je pridávaný dodecylsulfát sodný (SDS) a proteínáza K. Tieto látky zabezpečujú narušenie membrán a denaturáciu proteínov chrániacich molekuly DNA v chromozómoch. Ďalej je pridávaná zmes fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu, ktorá slúži na oddelenie proteínov od molekúl DNA. K oddeleniu proteínov dochádza z dôvodu, že nie sú rozpustné vo vodnej fáze chloroformu. Molekuly DNA je možné izolovať z vodnej fázy etanolovým zrážaním alebo centrifugáciou. Aj napriek spoľahlivosti a efektívnosti tejto metódy používaná menej. Dôvodom je časová náročnosť, používanie nebezpečných chemikálií a vyžaduje sa viacnásobné prenášanie vzorky medzi skúmavkami, čo zvyšuje riziko kontaminácie. Schéma tejto extrakcie je znázornená na Obrázku 4 [23, 24].



Obrázok 4 – Schéma fenol-chloroformovej extrakcie (dostupné z[23])

2.7.4 DNA – izolačné kity

Aj keď fenol-chloroformová extrakcia a iné môžu poskytnúť vysokokvalitnú DNA, sú tieto metódy veľmi časovo náročné. Práve preto je dnes preferované používanie DNA – izolačných kitov – dostupných komerčných súprav na izoláciu DNA. Tieto kity sú rýchlou a bezpečnou metódou, veľmi jednoducho sa používajú a poskytujú kvalitnú DNA.

Komerčné kity obsahujú viaceré komponenty, presne očíslované v poradí, v akom je nutné ich použiť, aj s návodom na použitie. Môžu obsahovať mechanický disruptor na jemné narušenie tkaniva (ten nie je nutnosťou súčasťou všetkých kitov), lýzu, pufre, RNázu a ďalšie. Proteíny a polysacharidy sú odstránené vyzrážaním pomocou solí a následnou purifikáciou. Väčšina týchto súprav používa živice alebo jednorazové chromatografické stĺpce s rôznymi elučnými protokolmi. Pri purifikácii sa využívajú zmiešané iónmenničové a adsorpčné interakcie. Používa sa silica gél, na ktorý sa DNA reverzibilne viaže v prítomnosti chaotropných solí a eluuje sa v kolóne po premytí príslušným pufrom. Čistú DNA je takýmto kitom možné získať už približne do hodiny [16, 23].

2.8 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

Koncentrácia a čistota izolovaných nukleových kyselín je kľúčovým parametrom, ktorý priamo ovplyvňuje úspešnosť ďalších analytických metód. Obe, koncentrácia aj čistota môžu byť

zist'ované spektrofotometricky. Pri spektrofotometrickom stanovovaní je meraná hodnota absorpcie (A), ktorá je závislá na koncentrácii. Rôzne látky absorbujú pri rôznych vlnových dĺžkach. Nukleové kyseliny, ktoré absorbujú ultrafialové žiarenie, majú absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke 260 nm, absorpčné maximum proteínov je 280 nm a absorpčné maximum fenolických látok je 230 nm [25, 26].

Izolovaná nukleová kyselina môže byť kontaminovaná, čo môže negatívne ovplyvniť ďalšiu analýzu (napr. pri PCR). Znečistenie nukleových kyselín sa udáva pomerom absorpcie A₂₆₀/A₂₈₀ a A₂₆₀/A₂₃₀. Vzorka DNA sa považuje za čistú, ak pomer absorpcie A₂₆₀/A₂₈₀ je približne 1,8. Nižšia hodnota naznačuje kontamináciu proteínmi, ktoré absorbujú pri vlnovej dĺžke 280 nm. Vyššia hodnota taktiež indukuje znečistenie, ale zároveň toto znečistenie nie je prekážkou pre ďalšiu analýzu vzoriek. Pomer A₂₆₀/A₂₃₀ udáva sekundárnu mieru čistoty a jeho hodnota by mala byť v rozmedzí 1,8 – 2,2. Nižšia hodnota napovedá o znečistení izolovanej DNA fenolickými látkami alebo aromatickými zložkami [26, 50].

2.9 Polymerázová reťazová reakcia)

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je všadeprítomná technika využívaná vo veľkej miere pre diagnostické účely a výskum molekulárnej biológie. PCR je *in vitro* amplifikácia špecifických sekvencií nukleovej kyseliny (NK) pomocou enzýmu DNA polymerázy. V roku 1983 bola táto technika predstavená Karym Mullisom, keď rozšíril teplotne stabilné polymerázy s teplotným cyklom. Univerzálna využiteľnosť PCR spočíva v tom, že amplifikuje (množí) malé množstvo produktu, ktoré je detekované následnými metódami, ako je napríklad vizualizácia nukleových kyselín na agarózovom gély [28, 29].

2.9.1 Princíp reakcie PCR

PCR reakcie amplifikujú cieľové sekvencie nukleových kyselín pomocou DNA polymerázy, primerov a nukleotidov. Templátom pre reakciu PCR môže byť akákoľvek sledovaná sekvencia nukleovej kyseliny a zdrojom NK môže byť DNA, RNA alebo cDNA.

2.9.1.1 Primery

Primery sú krátke sekvencie nukleotidov syntetizovaných *in vitro*. Sú určené k nasadeniu na protiahlé vlákna špecifického cieľa šablóny NK. Väčšinou sa skladajú z 15–25 nukleotidov a majú vyvážený obsah GC a AT párov (približne 50 – 60%). Každý z dvoch primerov je komplementárny k rôznym častiam cieľovej sekvencie ampikonu. V ideálnom prípade primery nie sú navzájom komplementárne, vďaka čomu je zabránené tvorbe diméru. Častou metódou pre identifikáciu napríklad baktérii z reálnych vzoriek je i druhovo–špecifická PCR nasledovaná analýzou PCR produktu, prípadne PCR v kombinácii s denaturačnou gradientovou elektroforézou (PCR – DGGE) [28, 29, 30].

Navrhnutie primerov

Pre štandardnú PCR sú primery navrhované v pároch – predný, tzv. „forward“ primer a zadný, tzv. „reverse“ primer. Primery môžu byť navrhnuté pomocou niektorého zo softvérov voľne dostupných na internete, napríklad pomocou programu Primer Blast [31].

Primery sú navrhnuté podľa sekvencie horného vlákna, t.j. sekvencie, ktorá sa pri bežnom zápise DNA používa. Sekvencia predného („forward“) primeru je totožná so sekvenciou bežne

zapisovaného (horného) vlákna. Zadný („reverse“) primer sa navrhuje ako komplementárna sekvencia k hornému vláknu, ktorá je navyše v reverznej orientácii, čiže je zapisovaná v smere 3'→5'. takže pri navrhovaní sekvencie „reverse“ primeru, podľa horného reťazca, musí byť sekvencia primeru čítaná odzadu.

Pri navrhovaní sekvencie primeru musí byť dodržané, že oba primery musia mať aspoň približne rovnakú teplotu nasadenia. Túto teplotu je možné ovplyvniť samotnou sekvenciou primerov, respektíve GC/AT obsahom a dĺžkou primerov.

2.9.1.2 DNA polymerázy

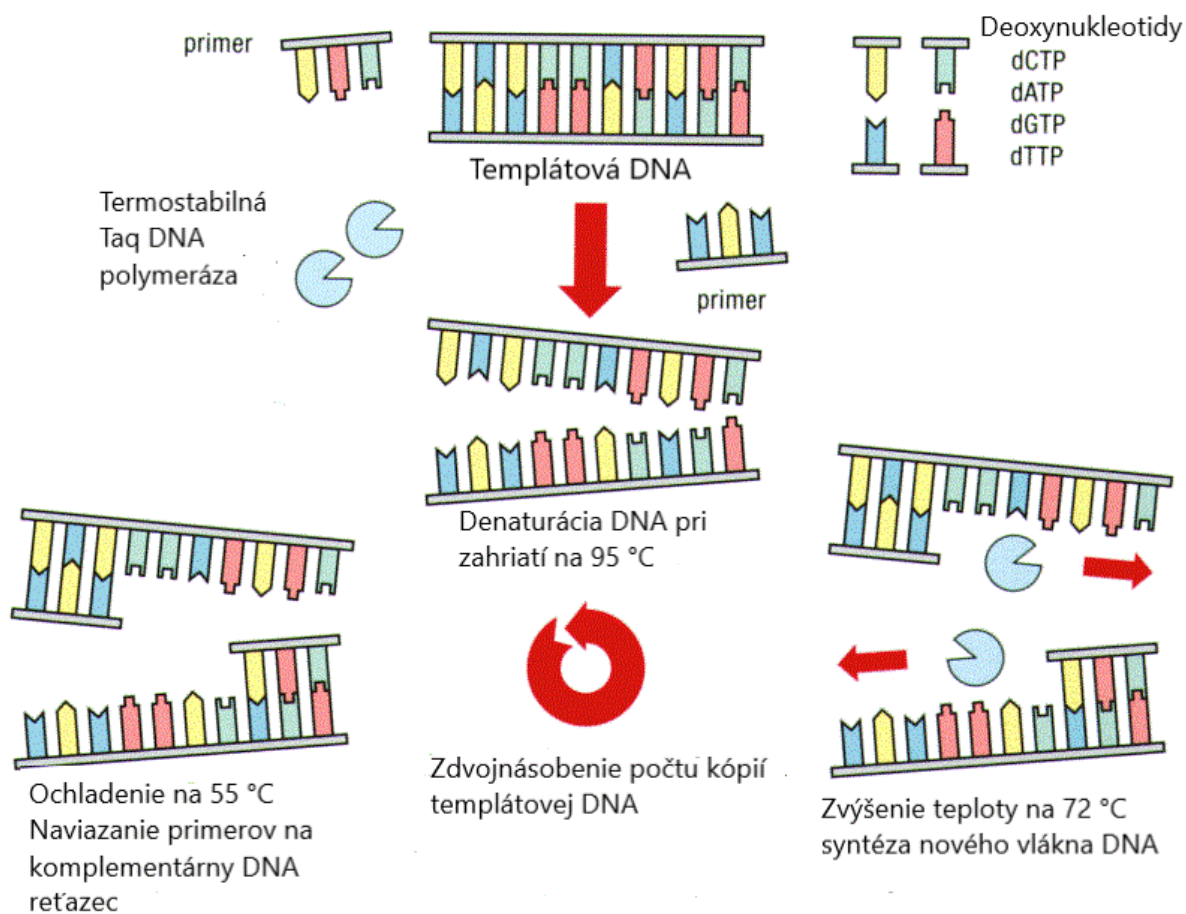
Pre PCR je používaná celá rada DNA polymeráz, ale najrozšírenejšia je pravdepodobne termostabilná Taq DNA polymeráza. Tento enzým pridáva deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP) alebo nukleotidy na konce primerov pre predĺženie NK na základe templátovej NK sekvencie. Reakčná zmes PCR sa cyklí teplotou, obvykle 20 až 40-krát. Denaturácia sekvencie NK šablóny sa dosiahne pri teplote 95 °C. Nasleduje ochladenie na 55 - 65 °C, aby primery nasadli na cieľovú sekvenciu. Predĺženie primerov o nukleotidy DNA polymerázou je dosiahnuté pri teplotách v rozmedzí 60-72 °C. Konvenčné podmienky cyklenia 3 krokovej PCR sú spočiatku 95 °C po dobu 5 – minút, aby sa denaturovali všetky NK, nasleduje 20-40 opakovaní pri 95 °C, 60 °C a 72 °C a predĺžená syntéza po dobu 5 – 10 minúty. Schéma reakcie je znázornená na Obrázku 5. Čas strávený pri každej teplote je možné optimalizovať pre konkrétne PCR komponenty. Napríklad amplifikácia veľmi krátkych cieľových sekvencií vyžaduje omnoho kratšiu inkubáciu pri každom kroku, ako amplifikácia veľmi veľkých cieľových sekvencií. Každé kolo teplotného cyklenia má za následok dvakrát väčšie množstvo cieľovej sekvencie než v predchádzajúcom cykle. To vedie k exponenciálnemu zosilneniu pôvodnej šablóny, čo môže viesť k miliónom alebo miliardám kópií pôvodného cieľa NK. Základné reakcie PCR prebiehajú v troch fázach:

- Baseline – vyznačuje sa malým množstvom amplikonov a nízkou intenzitou fluorescenčného signálu, preto ju nie je možné detekovať.
- Exponenciálna fáza – dochádza k nárastu amplikonov a tým i fluorescencie, ktorú je možné detekovať.
- Plató fáza – systém je plne saturovaný produktom, intenzita fluorescencie sa už ďalej nemení [28].

Ako už bolo zmienené, pre PCR metódu sú typické jednotlivé kroky, ktoré umožňujú vznik nových amplikonov. Kroky reakcie sú znázornené na Obrázku 5 Medzi tieto kroky patrí:

- Iniciácia (96 °C) – predhriatie reakčnej zmesi na 94 – 98 °C. Krok je potrebný pri použití konkrétnych DNA polymeráz, ktoré sú extrémne termostabilné a týmto krokom sú aktivované.
- Denaturácia (96 °C) – počiatočný krok cyklu. Reakčná zmes je zahriatá na vysokú teplotu, pri ktorej disociujú dve vlákna dvojšrobovice DNA.
- Nasadenie (60 °C) – nasadenie primerov.

- Polymerácia (72 °C) – DNA polymeráza syntetizuje novú DNA v smere nasadá na primery a ďalej syntetizuje podľa templátovej DNA. Denaturácia, nasadenie a polymerácia sa cyklicky opakujú 20 – 40krát.
- Elongácia (72 °C) – čas a teplota, pri ktorej má DNA polymeráza možnosť dosyntetizovať prípadné nedosyntetizované jednovláknové úseky DNA.
- Ukončenie (4 °C) – reakčná zmes sa na konci PCR reakcie schladí a pri tejto teplote môže byť krátku dobu skladovaná [32].

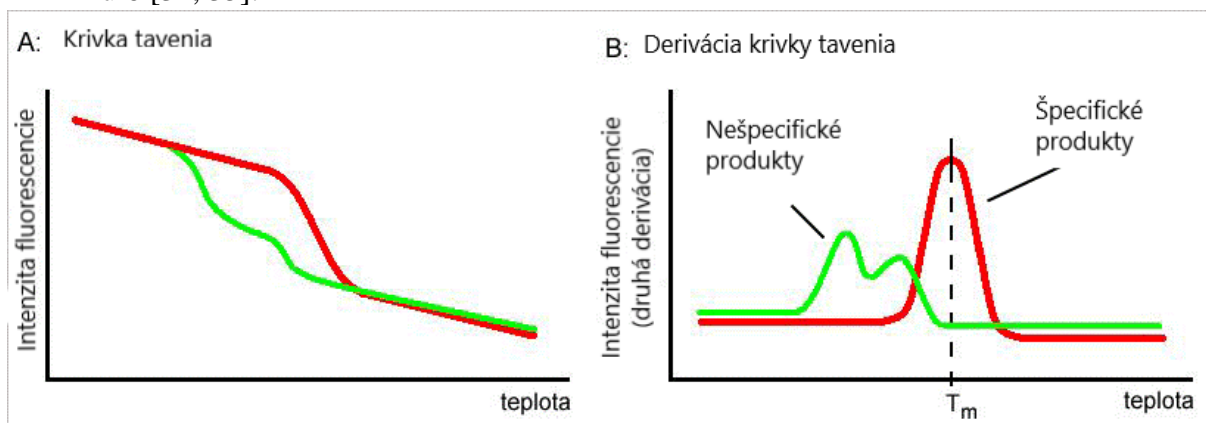


Obrázok 5 – Schéma PCR (prevzaté z [33])

2.10 Analýza kriviek tavenia amplikonov (MELT analýza)

Analýza kriviek tavenia amplikonov umožňuje zistenie povahy produktov PCR a porovnanie teplôt tavenia amplifikovaných produktov s produktami nešpecifickými. Ako tavenie DNA je označovaný proces separácie komplementárnych reťazcov dvojitých vlákien DNA (dsDNA) urýchlený zvyšovaním teploty.

Pre vytvorenie kriviek tavenia je finálny produkt polymerázovej reťazovej reakcie vystavený teplote nižšej, ako je očakávaná teplota tavenia produktov (T_m). Produkty sú následne postupne ohrievané na teplotu vyššiu, ako je očakávaná T_m a je pri tom meraná intenzita fluorescencie. Pozorovaný je bod, v ktorom sa dvojvláknová DNA (dsDNA) taví v jednovláknovú DNA (ssDNA), čo sa prejaví ako pokles fluorescencie pri uvoľnení interkalačného farbiva. Interkalačné farbivo je nevyhnutnou súčasťou analýzy. Krivky tavenia sú prevedené na zretelné vrcholy topenia vynesением zápornej derivácie fluorescencie ako funkcie teploty ($-dF/dT$). Platí, že produkty rôznych dĺžok, sekvencií a obsahov GC-párov (guanín – cytozín) v sekvencii DNA sa topia pri rôznych teplotách, takže budú pozorované rôzne vrcholy. Príklad krivky tavenia ako aj príklad jej druhej derivácie sú znázornené na Obrázku 6 [34, 35].



Obrázok 6 – Ukážka krivky tavenia a jej derivácie (prevzaté z [36])

2.11 Agarózová elektroforéza

Produkty PCR môžu byť detekované gélovou elektroforézou. Elektroforéza je proces separácie elektricky nabitých častíc (napr. DNA) v elektrickom poli. K rozdeleniu ampliconov dochádza ich migráciou gélom. Amplicony sú separované podľa dĺžky [37, 38].

Gél je pripravený z agarózy, čo je polysacharid, ktorý je tvorený špirálovitými mlekulami. Jej teplota tavenia je 80 – 95 °C, gelovatie pri teplote 35 – 42 °C. Gél, ktorý vzniká, tvorí sieť s rôznymi kanálmi a pórm. Jednotlivé polyméry sú viazané nekovalentnými väzbami, vodíkovými mostíkmi a hydrofóbnymi väzbami. Koncentrácia agarózy ovplyvňuje veľkosť pórov (vyššia koncentrácia agarózy vytvára menšie póry) [38, 39, 40].

Pripravený gél s vhodnou koncentráciou agarózy je umiestnený do elektroforetickej komory a tá je následne pripojená k zdroju elektrického napätia. V elektrickom poli s konštantným jednosmerným napätím putujú tieto nabité častice od jednej elektódy k druhej, v závislosti na ich náboji (záporne nabitá DNA sa pohybuje od záporne nabitej elektródy ku kladnej). Na častice pôsobia dvojité sily, a to elektrická sila, ktorá ich uvádza do pohybu a odporová sila prostredia, ktorá ich brzdí. Platí, že veľké molekuly sa pohybujú pomalšie a molekuly menšie sa pohybujú rýchlejšie. Častice rôznych veľkostí vytvoria na gély pruhy (tzv. bandy) v odlišných vzdialenostiach od miesta nanosenia. Pre vizualizáciu týchto bendov je nutné do gélu pridať vhodné interkalačné farbivo (napr. propidium bromid, GelRed, MidoriGreen) [37].

2.12 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC, z anglického *High performance liquid chromatography*) patrí medzi separačné a súčasne analytické metódy, čiže poskytuje ako kvalitatívne tak aj kvantitatívne informácie o vzorke. Je to metóda veľmi rýchla, automatizovaná a vysoko presná. Využíva delenie látok medzi dve fázy-mobilnú a stacionárnu. Mobilná fáza je kvapalná a stacionárna fáza je pevná. Rôzne komponenty majú rozdielnu afinitu k mobilnej a stacionárnej fáze, pohybujú sa systémom rôznymi rýchlosťami a tak dochádza k ich separácii. Kolónou najrýchlejšie prechádzajú látky, ktoré so stacionárnou fázou reagujú najmenej, najpomalšie ňou prechádzajú látky, ktoré s ňou reagujú silno, čiže sú v stacionárnej fáze zadržované najdlhšie. Ak je použitá polárna stacionárna fáza a nepolárna mobilná fáza, ide o chromatografiu s normálnymi fázami, ak je však polarita opačná, teda nepolárna je mobilná fáza a fáza stacionárna je polárna, ide o systém s obrátenými fázami. V súčasnej dobe je systém s reverznými fázami využívaný častejšie pre jeho širšiu oblasť použitia.

Stacionárna fáza je umiestnená v kolóne, ktorá ma tvar rovnej trubice s priemerom približne 3–5 mm. Ako stacionárna fáza sa najčastejšie využíva silikagel (oxid kremičitý), alumina (oxid hlinitý) alebo aktívne uhlie. Ako mobilná fáza sú v prípade systému normálnych fáz používané organické rozpúšťadlá (napr. hexán, benzén, acetón, acetonitril, ethanol a iné), pre systém s obrátenými fázami sa ako mobilná fáza najčastejšie používa zmes organického rozpúšťadla s vodou (napr. acetonitril – voda alebo methanol – voda). Gradient mobilnej fázy sa môže meniť v priebehu separácie a to zmenou zloženia mobilnej fázy, čo zapríčini, že aj zložky silne naviazané na stacionárnu fázou sa začnú rýchlejšie eluovať. To značne skráti priebeh analýzy.

Jednotlivé zložky eluátu prechádzajú detektorom, ktorý sleduje určitú jeho vlastnosť a prevádza ju na elektrický signál, ktorý je spracovaný počítačom. Výsledkom merania je graf nazývaný chromatogram [41, 42, 43, 44, 45].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Rastlinný materiál

Rastlinný materiál bol lyofilizovaný alebo usušený, uchovávaný v mraziacom boxe pri teplote -20 °C. Boli použité nasledovné byliny:

- Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon"
- Mentha Piperita "citaro"
- Mentha pycnanthemum pilosum
- Mentha almira strawberry pepermint
- Biocitrón – kôra
- Levanduľa – kvet , list

Pre porovnanie koncentrácie DNA bola DNA izolovaná aj z čerstvých listov odrody Mentha almira strawberry pepermint a z levanduľových listov.

3.2 Analyzované kozmetické výrobky

Pre analýzu boli použité dostupné kozmetické výrobky zakúpené v komerčnej sieti drogérií a rada vzoriek vlastnej prípravy. Príprava vlastných modelových vzoriek je popísaná v kapitole 3.2.2.

3.2.1 Kozmetické výrobky z komerčnej siete drogérií

- *Dr. Konopka's Hydratačný pleťový peeling (Face Gommage Moisturizing)*

Kozmetický výrobok

Pleťový peeling

Výrobca: Eurobio Lab OU, Leiva str. 5, 12618 Tallinn, Estonia

Distribútor: OrganicMarket s.r.o., Hladnovská 83/93, Ostrava 712 00,

IČ: 09117288; www.siberica.cz

Šarža: 9201E

Charakteristika: Pleťový peeling na tvár využíva špeciálnu organickú bylinnú esenciu č. 49 Dr. Konopka's, jemne čistí a prekrvuje pokožku. V kombinácii s výťažkami z kamilky a lekna zanecháva pokožku hladkú, hydratovanú a hebkú na dotyk.

Zloženie: Voda, Glyceryl stearát, coco-caprylate/caprinate, cetearyl alkohol, marhuľa – prášok, Caprylic/Capric Triglyceride, oktyldodekanol, bambucké maslo, glycerín, kamilková voda, leknina žltá – extrakt z koreňa, fialka – extrakt, komonica biela – extrakt, raž – extrakt,



Obrázok 7 – Výrobok Dr. Konopka's Hydratačný pleťový peeling

amaranthus spinosus – olej, cédrové drevo – olej, ľanový olej, ríbezl'a – extrakt, malina – extrakt, malinový olej, čajovníkový olej, ružový olej, ruža – extrakt, Caprylyl/Capryl glykozidy z pšeničných stebiel, Polyglyceryl-5 Oleát, Sódium Cocoyl Glutamát, glyceryl caprylát, tokoferol, xantánová guma, sódium stearyl glutamát, benzyl alkohol, benzoát sodný, sorbát draselný, parfém, kyselina citrónová, CI 77492, limonén, linalool

Objem balenia: 75 ml

- **Balea krém na ruky protect s vitamínom C (Handcreme protect)**

Kozmetický výrobok

Krém

Výrobca: dm-drogerie markt Am dm-Platz 1,
DE-76227 Karlsruhe, Tel. 0800 3658633,
www.dm.de

Distribútor pre ČR: dm drogerie markt s.r.o.,

Jeronymova 1485/19, 370 01 České Budějovice

Šarža: 973882

Charakteristika: Krém na ruky s výťažkom z pomaranča, vitamínom C a ochranným faktorom 10 Dodáva rukám dlhodobú hydratáciu a pocit hebkosti. S vôňou pomaranča. Receptúra neobsahuje mikroplasty ani rozpustné plne syntetické polyméry.

Zloženie: voda, C12-15 Alkyl Benzoát, Caprylic/Capril Triglycerid, Dibutyl Adipát, Polyglyceryl-3

Methylglukóza Distearát, Glyceryl Stearát, Glycerín, Cetaryl Alkohol, Dicaprylyl Carbonát, Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoát, Ethylhexyl Triazon, Methylén Bis-Benzotriazolyl tetramethylbutylpentol (Nano), Myristyl Myristát, Xantánová guma, Phenoxyethanol, Benzyl Alkohol, Caprylyl Glycol, Parfém, Sódium-ascorbyl fosfát, Decyl Glucosid, Carrageenan, Kyselina Citrónová, Ethyléndiamín Disuccinát, Propylén Glykol, Tokoferol, Citrus Sinensis - ovocný extrakt, Limonén, Hexyl Cinamal, Linalool, Geraniol, Citronellol, Citral.

Objem balenia: 75 ml



Obrázok 8 – Výrobok Balea krém na ruky protect s vitamínom C

- **Alverde telové maslo Skin food pre suchú pokožku**

Kozmetický výrobok

Krém

Výrobca: dm-drogerie markt Am dm-Platz 1, DE-76227 Karlsruhe, Tel. 0800 3658633, www.dm.de

Distribútor pre ČR: dm drogerie markt s.r.o., Jeronýmova 1485/19, 370 01 České Budějovice

Šarža: 211082961.1

Charakteristika: Zloženie s obsahom limety a bambuckého masla sa stará o suchú pokožku a poskytuje jej intenzívnu hydratáciu. Neobsahuje syntetické, farbivce, konzervačné látky, ani látky na báze minerálnych olejov.

Zloženie: voda, alkohol, slnečnicový olej (*helianthus annuus*), glyceryl stearát citrát, kakaové maslo, dicaprylyl éter, maslo z maslovníka afrického, glycerín, kyselina palmitová, kyselina steárová, betaín, sodium laktát, Citrus aurantifolia – ovocný extrakt, tokoferol, parfém, xantánova guma, carrageenan, kyselina levulová, sodium levulinate, hydroxid sodný, 4-methoxybenzoová kyselina, limonén, linalool, citronellol, geraniol

Objem balenia: 200 ml

- **Balea cukrový pleťový peeling s vitamínom C**

Kozmetický výrobok

Pleťový peeling

Výrobca: dm-drogerie markt Am dm-Platz 1, DE-76227 Karlsruhe, Tel. 0800 3658633, www.dm.de

Distribútor pre ČR: dm drogerie markt s.r.o.,

Jeronýmova 1485/19, 370 01 České Budějovice

Charakteristika: Pleťový peeling s jemným cukrom a pomarančovými šupkami rozjasní pleť a zanechá ju zamatovo hebkú. Jemné zloženie s citrusovou vôňou odstráni odumreté kožné bunky. Vhodné na tvár a pery.

Zloženie: glycerín, sacharóza, sójový olej, propylén glykol, voda, hydrogenovaný ricínový olej, sodium askorbyl fosfát, Citrus aurantium dulcis – prášok z kôry, sacharóza stearát, parfém, chlorid sodný, sodium sulfát, disódium EDTA, limonén, CI 47005, CI 45100

Objem balenia: 2x8 ml (16 ml)



Obrázok 9 – Alverde telové maslo Skin food pre suchú pokožku



Obrázok 10 – Balea cukrový pleťový peeling s vitamínom C

- **Alverde – mlieko na opaľovanie BIO mandarinka, OF 30**

Kozmetický výrobok

Krém

Výrobca: dm-drogerie markt Am dm-Platz 1, DE-76227 Karlsruhe, Tel. 0800 3658633, www.dm.de

Distribútor pre ČR: dm drogerie markt s.r.o., Jeronýmova 1485/19, 370 01 České Budějovice

Šarža: 19AV67

Charakteristika: Vodoodolné mlieko na opaľovanie značky alverde s vitamínom E a F spoľahlivo chráni pokožku pred spálením. Pravidelné používanie opaľovacieho krému alverde chráni pokožku pred predčasným starnutím pokožky a neželanou pigmentáciou. Bohatá prírodná starostlivosť so slnečnicovým olejom a mandarínkovým extraktom zanecháva pocit hodvábne jemnej pokožky.

Zloženie: voda, dioxid titaničitý, cocoglyceridy, slnečnicový olej, izoamyl laurát, polyglyceryl – 2 dipolhydroxystearát, polyglyceryl – 3 polyrincinoleát, olivový olej, magnézium sulfát, alumina, kyselina steárová, limonén, kyselina linolová, tokoferol, glyceryl caprylát, kyselina levulinová, kyselina p-anisiová, levulinát sodný, geraniol, linalool, citral, ascorbyl palmitát, kyselina linolénová, parfém, CI 75130, Citrus reticulata – ovocný extakt

Objem balenia: 200 ml

- **Alverde sprchový gél s mäťou a bergamotom**

Kozmetický výrobok

Sprchový gél

Výrobca: dm-drogerie markt Am dm-Platz 1, DE- 76227 Karlsruhe, Tel. 0800 3658633,

www.dm.de

Distribútor pre ČR: dm drogerie markt s.r.o., Jeronýmova 1485/19, 370 01 České Budějovice

Šarža: 24122664

Charakteristika: Účinné zloženie bio bergamontu, bio extraktu z limetky a jemných tenzidov čistí pokožku a zabraňuje jej vysušeniu. Morská soľ stimuluje a vitalizuje pokožku. Neobsahuje vonné syntetické látky



Obrázok 11 – Alverde – mlieko na opaľovanie BIO mandarinka



Obrázok 12 – Alverde sprchový gél s mäťou a bergamotom

na báze minerálnych olejov. Suroviny z biologického poľnohospodárstva.

Zloženie: voda, sodium coco-sulfát, lauryl glukozid, glycerín, sodium laktát, morská soľ, mentha piperita – olej, Citrus Limon – ovocný extrakt, sodium cocoyl glutamát, disódium cocoyl glutamát, Citrus aurantium bergamia – šťava z kôry, Mentha piperita – šťava z listu, alkohol, parfém, linalool, limonén, citral, geraniol

Objem balenia: 250 ml

- **N.A.E. – tuhý šampón Equilibrio**

Kozmetický výrobok

Tuhý šampón

Výrobca: Henkel ČR, spol s.r.o., U Průhonu 10, 17400 Praha 7

Šarža: 690670

Charakteristika: N.A.E. čistiaci tuhý šampón s obsahom extraktu z organickej šalvie a mäty jemne čistí vlasy a pokožku hlavy. Vlasy ostávajú svieže s pocitom ľahkosti – bez pocitu mastnoty.

Zloženie: pšeničný škrob, lauryl sulfát draselný, lauryl sulfát sodný, cetaryl alkohol, voda, glycerín, maslo z maslovníka afrického, kyselina palmitová, kyselina steárová, parfém, kyselina mliečna, hydrolyzovaný jojobový ester, biosacharidová guma, Mentha piperita – extrakt z listov, Salvia officinalis – extrakt z listu, sodium levulinát, glyceryl caprylát, sodium anisát,



Obrázok 13 – N.A.E. – tuhý šampón Equilibrio

Objem balenia: 85 g

- **Planeta organica – telový peeling C + citrón**

Kozmetický výrobok

Telový peeling

Výrobca: Planeta Organica LLC, Eurobio Lab OÜ, Leiva str. 3, 12618 Tallinn, Estonia; www.eurobiolab.com

Distribútor pre ČR: OrganicMarket s.r.o., Hladnovská 83/93, Ostrava 712 00, IČ: 09117288; www.siberica.cz

Šarža: 1552E

Charakteristika: Organické výtázky z mandarínok, citrónov a limetiek pomáhajú vyhladiť pokožku a zanechávajú dokonale vzhľad. Organické extrakty



Obrázok 14 – Planeta organica – telový peeling C + citrón

z pomaranča a ružového grepu oživujú pokožku a dodávajú vôňu. Vitamín C tonizuje a vyživuje pokožku.

Zloženie: chlorid sodný, glycerín, sacharóza, voda, slnečnicový olej, Citrus aurantifolia – ovocný extrakt, Citrus aurantium dulcis – ovocný extrakt, Citrus nobilis – ovocný extrakt, Citrus limon – ovocný extrakt, Citrus grandis – ovocný extrakt, sódium askorbyl fosfát, xantánová guma, kyselina citrónová, sódium benzoát, sorbát draselný, parfém, CI15985, hexyl cinnamal, limonén, linalool

Objem balenia: 360 ml

- **Naturalis – Cukrový telový scrub limetka a mäta**

Kozmetický výrobok

Telový peeling

Výrobca: UNION COSMETIC ČR

Charakteristika: Cukrový telový scrub jemne namasíruje vašu pokožku a odstráni jej odumreté kožné bunky. Obsahuje vitamín E, slnečnicový a olivový olej, ktorý dokonalo pokožku zvláčni a zanechá ju dokonalo čistú a hodvábne jemnou.

Zloženie: Sacharóza, caprylic/capric triglycerid, olivový olej, slnečnicový olej, tekutý parafín, hydroxid uhličitý horečnatý, phenoxyethanol, silica, parfém, tokoferol, glycerín, Citrus aurantifolia – extrakt, voda, limonén, hexyl cinamal, Mentha piperita – extrakt, kyselina mliečna, hydroxid sodný, sorbát draselný, benzoát sodný, CI 47005, CI 42090

Objem balenia: 300 g

- **Cosmos natural – feel free hand cream bio**

Kozmetický výrobok

Krém

Výrobca: BIO BRANDING S.L., Calle Cavite 3, Torrent 46901 Valencia, Španielsko; www.feelfreebio.com

Charakteristika: Cosmos feel free je obnovujúci krém na ruky, ktorý vyživuje a upokojuje podráždené ruky, ktoré sú suché.

Zloženie: Voda, Aloa pravá – extrakt, olivový olej, coco-caprylate/caprinate, glycerín, caprylic/capric triglycerid, polyglyceryl-6 distearát, stearyl alkohol, mandľový olej, citrusový olej, kamilka – extrakt, tokoferol, sorbát



Obrázok 15 – Naturalis – Cukrový telový scrub limetka a mäta



Obrázok 16 – Cosmos natural – feel free hand cream bio

draselný, benzoát sodný, benzyl alkohol, beta-sitosterol, squalán, kyselina dehydroacetová, kyselina citrónová, xantánová guma

Objem balenia: 75 ml

- **Natura Siberica, Organic Shop – Jahody a čokoláda – hydratačná telová pena**

Kozmetický výrobok

Krém

Výrobca: Planeta Organica LLC, Eurobio Lab OÜ,
Leiva str. 3, 12618 Tallinn, Estonia;
www.eurobiolab.com

Distribútor pre ČR: OrganicMarket s.r.o., Hladnovská
83/93, Ostrava 712 00, IČ: 09117288; www.siberica.cz

Šarža: 2035E

Charakteristika: Hydratačná pena vyživuje pokožku a poskytuje jej pevnosť. Organické jahody vyživujú pokožku, zároveň poskytujú vôňu letných bobúľ. Zjemňujúci kokosový olej, organický olej z borovice a kakao poskytujú pokožke pružnosť a tonizujú ju. Manoahový olej pokožku hydratuje, chráni a zabraňuje jej šúpaniu.



Obrázok 17 – Natura Siberica, Organic Shop – Jahody a čokoláda

Zloženie: voda, isopropyl palmitát, cetyl palmitát, glyceryl stearát, jojobový olej, cetearyl alkohol, jahoda (*Fragaria vesca*) – ovocný extrakt, carbomer, kakaové maslo, olej zo semien borovice, kokosový olej, výťažok z kvetov *Gardenia tahitensis*, benzyl alkohol, ethylénglycerín, parfém, hydroxid sodný, CI 16255

Objem balenia: 450 ml

- **Organic Shop – Telový cukrový peeling Jahoda**

Kozmetický výrobok

Telový peeling

Výrobca: Planeta Organica LLC, Eurobio Lab OÜ,
Leiva str. 3, 12618 Tallinn, Estonia;
www.eurobiolab.com

Distribútor pre ČR: OrganicMarket s.r.o., Hladnovská
83/93, Ostrava 712 00, IČ: 09117288; www.siberica.cz

Šarža: 2103E

Charakteristika: Cukrový prírodný peeling je výborný spôsob ako sa zbaviť starej, odumretej a šupinatej pokožky. Tento peeling v sebe navyše obsahuje kusy



Obrázok 18 – Organic Shop – Telový cukrový peeling Jahoda

jahôd, ktoré v sebe majú malé zrníčka, ktoré tiež pomáhajú odstraňovať starú pokožku.

Zloženie: glycerín, sacharóza, MIPA – laureth sulfát, laureth – 3, slnečnicový olej, cetearyl, alkohol, cocomide DEA, propylén glykol, tokoferyl acetát, kokosový prášok, maliny, brusnicový olej, ríbezľa – šťava z listu, jahoda (*Fragaria vesca*) – ovocný extrakt, malina – olej zo semien, bobule acai – ovocný extrakt, parfém, CI 42090, CI 19140, CI 14720

Objem balenia: 450 ml

- ***Herbs of Bulgaria – Hydratačný krém na tvár levanduľa***

Kozmetický výrobok

Krém

Výrobca:

Distribútor pre ČR: Advans Vts, s.r.o.

Šarža: L24078

Charakteristika: Krém na tvár s obsahom levanduľovej vody, jojobového oleja, D-panthenolu a vitamínu E je určený pre normálnu a mastnú pleť. Zloženie krému obsahuje ochranné a hydratačné zložky. Neobsahuje parabény.

Zloženie: voda, glycerín, caprylic/capric triglycerid, glyceryl stearát citrát, dimethicone, glyceryl stearát, kokosový olej, cerearyl atylhexanoát, cetearylalkohol, kvetinová voda, *lavandula angustifolia*, hydroxymetán, kyselina steárová, kreatín, parfum, panthenol, tokoferylacetát, metylizotiazolinón, BHT, butylfenylmetylpropión, kumarín, hexyl cinnamal, limonén

Objem balenia: 100 ml

- ***Kvitok – Šľahaný telový krém, Levanduľový sen***

Kozmetický výrobok

Krém

Výrobca a distribútor: Janka Kráľ 416/17, 066 01 Humenné; www.kvitok.sk

Charakteristika: Krém s obsahom levandule zabraňuje dehydratácii pokožky. Vďaka vysokému obsahu bambuckého masla, mandľového a avokádového oleja ju regeneruje a zmäkčuje zhrubnutú pokožku na chodidlách a lakt'och. Ľahko sa natiera.

Zloženie: Bambucké maslo, Mandľový olej, Avokádový olej, Vitamín E, Esenciálny olej Levanduľa, Linalool, Limonén, Geraniol

Objem balenia: 60 ml



Obrázok 19 – *Herbs of Bulgaria – Hydratačný krém na tvár levanduľa*



Obrázok 20 – *Kvitok – Šľahaný telový krém, Levanduľový sen*

- **Nobilis Tilia – Levanduľový krém**

Kozmetický výrobok

Krém

Výrobca a dodávateľ: Nobilis Tilia s.r.o., Vlčí hor 147, 407 46 Krásná Lípa, Česká republika

Šarža: N0102

Charakteristika: Levanduľový krém s aloe vera je vhodný pre normálnu, zmiešanú pleť, citlivú aj problematickú pleť. Má regeneračné a upokojujúce účinky, výborne ošetruje pokožku po opaľovaní. Obsiahnuté oleje dodávajú pleti výživu a hydratáciu a levanduľový éterický olej zvyšuje vitalitu pleti.

Zloženie: voda, mandľový olej, maslo karité, Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate, glycerín, anisát sodný, levulinát sodný, cetyl alkohol, caprylic/capric triglycerid, kyselina steárová, aloe pravá – extrakt z listov, sójový olej, včelí vosk, xantánová guma, panthenol, lecitín, tocoferyl acetát, avandula *Angustifolia* – olej, Retinyl Palmitát, Sodium Stearoyl Lactylát, kyselina citrónová, linalool, geraniol, limonén

Objem balenia: 50 ml

- **Ryor – Hydratačný krém s levanduľou**

Kozmetický výrobok

Krém

Výrobca: RYOR a.s., Pod Spiritkou 4, 150 00 Praha 5, Česká republika; www.ryor.cz

Distribútor: RYOR Bratislava s.r.o., Novomestského 42, 902 01 Pezinok, Slovenská republika; www.ryor.sk

Šarža: 15001

Charakteristika: Jemný, ľahko vstrebateľný krém na báze tekutých kryštálov s obsahom prírodnej levanduľovej silice z francúzskeho Provensálska, ktorá je ideálna na relaxáciu, upokojenie mysle i unavenej pleti.

Zloženie: voda, izopropyl myristát, caprylic/capric triglycerid, diethylhexyl karbonát, hydrolizovaný pšeničný proteín, cetearyl alkohol, glyceryl oleát, glyceryl stearát, macadamiový olej, glycerín, cetyl palmitát, sorbitan palmitát, sorbitan oleát, jojobový olej, panthenol, tokoferyl acetát, xylitylglukozid, metylparabén, etylparabén, propylparabén, butylparabén, *Lavandula officinalis* – olej z kvetov, linalool, limonén, polyakrylát, crossspolymér – 6, kyselina mliečna

Objem balenia: 50 ml



Obrázok 21 – Nobilis Tilia – Levanduľový krém



Obrázok 22 – Ryor Hydratačný krém s levanduľou

3.2.2 Produkty vlastnej prípravy

Pomôcky a doplnky (pre prípravu 300 g produktu):

- 270 g destilovanej vody
- 9 g glycerínu
- 3 g gelinolu
- 6 g vitis vinifera seed oil (hroznové jadrá)
- 3 g glyceryl stearate
- 9 g capralic/capril triglyceride
- 2,4 g konzervant – Euxyl k 703

Postup prípravy:

- Boli pripravené dve fázy, ktoré boli zahrievané vo vodnom kúpeli na teplotu 80 °C. Pre prípravu vodnej fázy bola použitá destilovaná voda s glycerínom, pre prípravu olejovej fázy bol použitý gelinol, olej zo semien vitis vinifera, glyceryl stearát a capralic/capril triglyceride (v množstvách uvedených vyššie).
- Po dosiahnutí teploty 80 °C boli obe fázy vybrané z vodného kúpeľa. Následne bola olejová fáza postupne pridávaná do vodnej fázy za neustáleho miešania.
- Po zhutnutí bol k zmesi pridaný konzervant K703 a zmes bola premiešavaná ešte niekoľko minút.
- Následne bol produkt rozdelený do trinástich nádob, do každej bolo navážených približne 20 g krému a pridaná vonná silica (0,1 g), lyofilizovaná mäta (0,05 g) alebo citrónová kôra (0,05 g).

3.3 Prístroje a pomôcky

- Centrifúga miniSpin plus 14 500 ot/min. (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Combi-spin FVL-2400N (Biosan)
- Vortex MS2 Minishaker, IKA, Works (NNC, USA)
- Detekčný systém pre dokumentáciu gélu (Azure biosystems C200, Dublin, Irsko)
- Eppendorfove skúmavky (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Laboratorné váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New Jersey, USA)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikropipety Finnpiptette (Thermo Scientific – Finnpiptette)
- Mikrovlnná rúra PROLINE SM117
- Mini Incubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- Nanodrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)

- Termocyklér – Rotor–Gene 6000 (Corbett Research UK Ltd, Cambridge, United Kingdom)
- Zariadenie pre elektroforézu (OWL Buffer Puffer™ , Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Mikroskúmavky Eppendorf
- Homogenizačné guľičky
- Laboratórne sklo
- Špičky z umelej hmoty
- Ďalšie laboratórne vybavenie (špachtle, lyžička, buničina a iné)

3.4 Chemikálie

- Eligene Plant DNA isolation kit, Elisabeth Pharmacon, ČR
- Agaróza pre elektroforézu (Top-Bio, Praha, ČR)
- Interkalačné farbivo Gel–Red (Top-Bio, Praha, ČR)
- Nanášací pufer (Top–Bio, Praha, ČR)
- SYTO–9 qPCR 2x Master mix (Top–Bio, Praha, ČR)
- Voda pre PCR (Top–Bio, Praha, ČR)
- Acetonitril (HPLC Grade)
- Miliq voda
- Tris – báza
- EDTA
- Kyselina boritá
- p – anisaldehyde analytical standard (sigma)

3.5 Roztoky

- **0,5 x TBE pufer**

Ako prvý bol pripravený 5x TBE pufer, na čo bolo zmiešaných 54 g Tris–bázy a 27,5 g kyseliny boritej s 600 ml destilovanej vody. Následne bolo pridaných 20 ml 0,5 M EDTA a doplnené destilovanou vodou na 1000 ml. Následne bolo 100 ml takto pripraveného 5xTBE pufru doplnených destilovanou vodou na objem 1 liter, čím bol získaný pufer s požadovanou koncentráciou.

- **Agarózový gél pre elektroforézu**

Návážka 1,8 g agarózy bola rozpustená v 100 ml 0,5x koncentrovanom roztoku TBE.

- **Nanášací pufer**

Roztok nanášacieho pufru bol zmiešaný s produktami PCR v pomere 1:5 (5 µl Gel-Red s 25 µl produktu PCR).

- **DNA štandard**

Bol použitý DNA štandar 100 bp, ktorý obsahoval fragmenty o veľkosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 párov báz alebo štandar 50 bp, ktorý obsahoval fragmenty o veľkosti 50, 100 párov báz.

3.6 Metódy

3.6.1 Príprava analyzovaných vzoriek

Bol použitý rastlinný materiál (mäta, citrónová kôra a levanduľa), modelové vzorky krémov (pripravené podľa 3.2.2) a komerčné vzorky kozmetických výrobkov. Zo všetkých vzoriek, rastlinných, modelových a komerčných vzoriek, bola izolovaná DNA pomocou izolačného kitu. Postup izolácie je popísaný v kapitole 3.6.2.

DNA z rastlinného materiálu bola izolovaná z rastlín čerstvých, sušených a lyofilizovaných. Pre izoláciu bolo použitých vždy približne 0,02 gramu rastlinných častí.

DNA zo vzoriek modelových a komerčných kozmetických výrobkov bola izolovaná buď priamo, alebo pre vybrané vzorky, izolovaná zo sedimentu po centrifugácii. Pre izoláciu DNA z kozmetických výrobkov bolo použitých 0,1 gramu z každého produktu. Sediment bol pripravený zmiešaním 0,5 g vzorky krému bolo zmiešaných s 5 ml vody. Zmes bola vortexovaná do zhomogenizovania a následne centrifugovaná pri 6 000 rpm po dobu 6 minút, čím vznikla usadenina.

Všetok materiál bol uchovávaný v mraziacom boxe pri teplote -20 °C, aby nedošlo k znehodnoteniu vzoriek.

3.6.2 Brief protokol z izolačného kitu

Pre izoláciu rastlinnej DNA z rastlín bola použitý EliGene Plant DNA Isolation Kit. Postup bol prevedený podľa návodu priloženého ku kitu. Rovnako boli dodržiavané množstvá vzoriek a použité objemy pufrů. Vzorky jednotlivých rastlín a krémů boli izolované vždy vo dvoch alebo viacerých opakovaniach.

Boli pripravené návážky približne 0,02 gramů z rastlinného materiálu a 0,1 gramu z modelových a komerčných vzoriek. K homogenizácii vzorky rastlinného materiálu bolo použitých 0,2 g homogenizačného piesku a mechanický tlčik, pre mechanické roztlačenie vzorky, k vzorkám komerčných a modelových kozmetických vzoriek nebol pridávaný homogenizačný piesok. Po roztlačení bol k vzorke pridaný homogenizačný pufr, ktorý zabraňoval degradácii nukleových kyselín a pomáhal odstraňovať proteíny a fenolické látky [46].

Nasledovala lýza buniek, ktorá bola dosiahnutá pridaním lyzačného pufru. Ten, okrem iného, obsahuje dodecylsírán sodný (SDS), ktorý je potrebný pre kompletnú lýzu buniek. Lyzačný pufer môže pri nízkych teplotách vytvárať biely precipitát, preto bola zmes inkubovaná po dobu 10 minút pri teplote 70 °C [46].

Vzorky boli centrifugované a supernatant bol odobratý. Následne bol k nemu pridaný pufer obsahujúci činidlo na vyzrážanie organických non-DNA a anorganických zložiek, akými sú napríklad proteíny, fenolické látky a polysacharidy. Tieto non-DNA látky bol odstránené centrifugáciou [46].

Supernatant bol odobraný a boli k nemu pridané dva pufre. Prvý, viazací pufer, obsahoval chaotropné soli a druhý, obsahoval ethanol. Táto kombinácia pufrov poskytuje optimálne podmienky pre väzbu DNA, avšak nie pre väzbu organických non-DNA a anorganických zložiek. DNA vďaka chaotropným soliam prilne k silikátovej membráne spin filtra. Tekutá zložka prejde skrz membránu a je odstránená [46].

Membrána spin filtra bola premývaná premývacími roztokmi na báze ethanolu, ktoré prečistili DNA, naviazanú na spin filtri, od nečistôt. Membrána bola vysušená dvojminútovou centrifugáciou pri vysokých otáčkach. K uvoľneniu DNA, naviazanej na spin filtri, bol použitý elučný pufer [46].

3.6.3 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

- Absorbancia izolovanej DNA bola meraná spektrofotometricky pomocou prístroja NanoDrop 2000 v elučnom puffri oproti čistému elučnému puffru. Objem meranej vzorky bol 2 μ l.
- Absorbancia bola meraná pre vlnové dĺžky 230 nm (minimum absorbancie pre DNA), 260 nm (maximum absorbancie pre DNA, z tejto hodnoty bola stanovená koncentrácia DNA vo vzorkách) a 280 nm (maximum absorbancie pre proteíny).
- Z podielu A260 nm/A280 nm bola určená čistota izolovanej DNA vo vzorkách.

3.6.4 Polymerázové reťazové reakcie

Boli pripravené zmesi pre PCR s rôznymi primermi, prevedené polymerázové reťazové reakcie a detekované a analyzované produkty PCR.

3.6.4.1 Primery pre PCR

- Pre PCR boli použité primery ITS2, Lim2F/R, Lav1FR a Lav1modFR.
- Sekvencia primerov sa nachádza v *Tabulke 1*, príklad výsledku overovania veľkosti produktov PCR za použitia uvedených primerov a špecifity primerov pomocou databázy NCBI je ukázaný na *Obrázku 23*.

Tabuľka 1 Primery PCR

Primer	Sekvencia primerov (5'– 3')	Veľkosť PCR produktov
Rastliny (ITS2) [49]		
1	S2F	500
2	S3R	
Limonene synthase (Lim2F/R) [47]		
1	Lim 2_Forward	122
2	Lim 2_Reverse	
Levandul'a (Lav1FR) [48]		
1	Lav1-F	154
2	Lav1-R	
Levandul'a (Lav1modFR) (upravené podľa [48])		
1	Lav1mod-R	154
2	Lav1mod-F	

Primer pair 1

	Sequence (5->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACAAAAGACGAGCAGAAGAG	20	55.73	45.00	2.00	0.00
Reverse primer	AAAACGATGAGCCAATCCAA	20	55.92	40.00	4.00	0.00

Products on target templates

>[XM_006494973.3](#) PREDICTED: Citrus sinensis (R)-limonene synthase 1, chloroplastic-like (LOC102620897), mRNA

product length = 122

Forward primer 1 ACAAAAAGACGAGCAGAAGAG 20
 Template 290 309

Reverse primer 1 AAAACGATGAGCCAATCCAA 20
 Template 411 392

>[XM_006495201.1](#) PREDICTED: Citrus sinensis (R)-limonene synthase 1, chloroplastic-like (LOC102618511), mRNA

product length = 122

Forward primer 1 ACAAAAAGACGAGCAGAAGAG 20
 Template 293 312

Reverse primer 1 AAAACGATGAGCCAATCCAA 20
 Template 414 395

Obrázok 23 – Výsledok overovania primerov Lim2FR pomocou programu Primer Blast [31]

3.6.4.2 Príprava zmesi pre PCR

- Komponenty pre PCR boli pred použitím rozmrazené, premiešané a krátko zcentrifugované.
- Bola pripravená zmes pre konvenčnú PCR s celkovým objemom 25 µl. Komponenty do zmesi boli pridávané postupne v poradí uvedenom v Tabuľke 2. Ako negatívna kontrola bolo použitých 25 µl uvedenej zmesi bez matrice DNA.

- Ako matrice bol použitý 1 µl roztoku izolovanej DNA rozpustenej v elučnom pufri.

Tabuľka 2 Príprava zmesi pre PCR v reálnom čase podľa doporučení výrobcu Master Mix

Krok	Komponent	Objem [[µl]]
1	Voda pre PCR	9,5
2	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3	Primer 1	1
4	Primer 2	1
5	Matrica DNA	1
Celkom		25

3.6.4.3 Programy amplifikácie DNA

- Bola prevedená amplifikácia izolovanej DNA. Teplotné programy boli zvolené v závislosti na použitých primeroch, ktoré sú uvedené v *Tabuľke 1*.
- Teplotné programy pre použité DNA primery sa nachádzajú v *Tabuľke 3*

Tabuľka 3 Teplotné programy

Predĺžená denaturácia DNA	Denaturácia DNA	Hybridizácia primerov	Syntéza nových reťazcov DNA	Dosyntetizovanie DNA
ITS2				
95°C/5 min	95 °C/30 s	62 °C/30 s	72° C/30 s	72 °C/5 min
	34 cyklov			
Lim2F/R				
94°C/5 min	94 °C/30 s	54 °C/30 s	72° C/30 s	72 °C/5 min
	37 cyklov			
Lav1FR				
95°C/5 min	95 °C/30 s	50 °C/30 s	72° C/30 s	72 °C/5 min
	35 cyklov			
Lav1modFR				
95°C/5 min	95 °C/30 s	50 °C/30 s	72° C/30 s	72 °C/5 min
	35 cyklov			

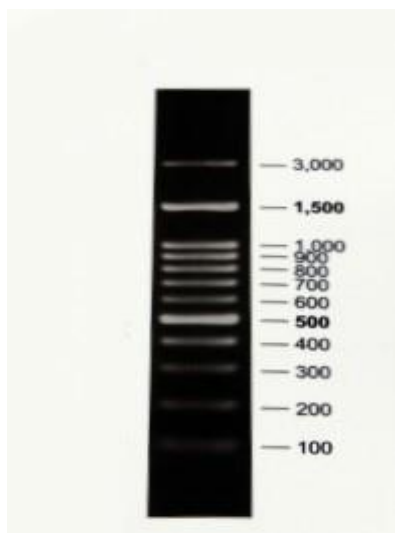
3.6.4.4 Melt analýza

- Ihneď po amplifikácii DNA polymerázovou reťazovou reakciou v reálnom čase bola prevedená MELT analýza produktov PCR.
- Pred melt analýzou bol zaradený pre-melt krok (50 °C po dobu 90 s).

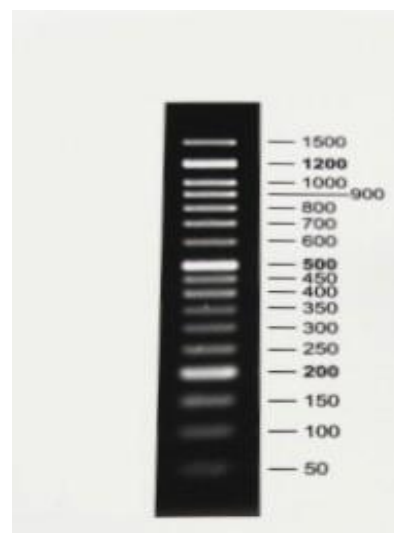
- Melt analýza bola meraná v rozmedzí 50 až 99 °C s teplotným krokom 1 °C po dobu 5 sekúnd.
- Amplifikačné krivky a krivky tavenia boli zaznamenávané a analyzované programom RotorGene 6000 Series Software.

3.6.5 Detekcia produktov PCR agarózovou gélovou elektroforézou

- Bol pripravený 1,8 % gél, na čo bola použitá návážka 1,8 g agarózy, rozpustená v 100 ml 0,5x TBE pufri. Zmes bola zahriata k varu v mikrovlnnej rúre približne päťkrát, aby došlo k úplnému rozpusteniu agarózy.
- Po vychladnutí na teplotu 60 °C bolo pridaných 5 µl fluorescenčného/interkalačného farbiva, suspenzia bola premiešaná a naliata do pripravenej formy s hrebienkom.
- Gél bol ponechaný na rovnej podložke do zatuhnutia (cca 30 minút – 1 hodinu).
- Hrebienok bol opatrne vytiahnutý, do vzniknutých jamiek boli pipetované produkty PCR s 6x koncentrovaným nanášacím pufrom (25µl Vzorky, 5 µl nanášacieho pufri).
- Do každej jamky bolo pipetovaných 10 µl vzorky PCR produktov, 10 µl pozitívna a negatívna kontrola tiež s objemom 10 µl. Do jednej jamky bolo pipetovaných 5 µl veľkostného DNA štandardu značky FastGene, ktorý slúži na zistenie veľkosti amplifikovaných produktov. Boli použité dva veľkostné štandardy. Prvým bol veľkostný DNA štandard 50 bp, ktorého rebríček obsahoval fragmenty o veľkosti 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200 a 1 500 bp, pričom fragmenty o veľkosti 200, 500 a 1 200 bp sú výraznejšie, než ostatné (viz. Obrázok 25). Druhým bol veľkostný DNA štandard 100 bp, pričom jeho rebríček obsahoval fragmenty 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 500 a 3 000 bp, pričom výraznejšie ako ostatné sú 500 a 1 500 bp (viď Obrázok 24).



Obrázok 24 – Veľkostný štandard 100 bp FastGene (prevzaté z [7]).



Obrázok 25 – Veľkostný štandard 50 bp, Fast Gene (prevzaté z [7]).

Forma s géлом bola vložená do elektroforetickej vane a zaliata 0,5x TBE pufrom.

- Elektroforetická vaňa bola pripojená k zdroju, na ktorom bolo nastavené konštantné napätie 60-80 V a elektroforéza prebiehala 1,5 – 3 hodiny (v závislosti na veľkosti vane).
- Po skončení bol gél vybratý z vane a vyhodnocovaný v UV svetle na prístroji Azure™ c 200.

3.6.6 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie boli analyzované produkty modelových a komerčných krémov. Kalibračné krivky, analýza štandardov vybraných alergénov, postupy pri týchto meraniach ako aj parametre merania boli spracované Ing. Denisou Langovou podľa článku [50] High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. a budú uvedené v jej dizertačnej práci. Vzorky boli vyhodnocované pomocou programu Chromaleon.

- Všetky vzorky modelových aj komerčných krémov boli analyzované pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Z každého krému bolo do skúmaviek navážených približne 0,2 g.
- Do každej skúmavky bol pridaný 1 ml acetonitrilu a približne 0,2 g sklenených guľčiek, ktoré slúžia na lepšiu homogenizáciu vzorky.
- Takto pripravené skúmavky boli vortexované po dobu 15 minút.
- Suspenzia bola prefiltrovaná cez 0,45 µm nylónovú membránu pomocou injekčnej striekačky. Vzorky boli následne analyzované pomocou HPLC, ako mobilná fáza bol použitý acetonitril a miliQ voda. Prietok a zloženie mobilnej fázy je uvedené v Tabuľke 4.

Tabuľka 4 Podmienky prietoku mobilnej fázy pre HPLC

Čas [min]	Prietok [ml/min]	Acetonitril [%]	MiliQ voda [%]
0	1	40	60
5		50	50
15		60	40
24		60	40
40		90	10
49		90	10
51		40	60

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Predložená bakalárska práca bola zameraná na analýzu autenticity prírodných rastlinných a bylinných zložiek v sérii modelových a komerčných kozmetických výrobkov. Skúmané boli výrobky s obsahom mäty, citrusov a levandule, izolovaná DNA z týchto výrobkov bola porovnávaná s DNA izolovanou z príslušných bylín.

Bola zisťovaná prítomnosť DNA pomocou primerov špecifických pre ITS2 región rastlín. Vzorky, v ktorých bola potvrdená prítomnosť rastlinnej alebo bylinnej DNA, boli analyzované pomocou primerov špecifických pre limonén syntázu, pre stanovenie limonénu, ktorý je významným alergénom.

Ďalej boli vybrané vhodné špecifické primery pre stanovenie levandule, ktorá obsahuje alergény limonén a linalool.

Pomocou HPLC boli detekované vybrané alergény vo vzorkách. Táto metóda slúžila ako porovnanie s prevedenou PCR metódou.

4.1 Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie DNA

Koncentrácia a čistota izolovanej rastlinnej DNA bola stanovená spektrofotometricky pri vlnových dĺžkach 220 až 350 nm. Pre meranie bol použitý prístroj NanoDrop. Postup merania je opísaný v kapitole 3.6.3. Výsledky spektrofotometrického merania sú uvedené v Tabuľke 5, Tabuľke 6, Tabuľke 7 a Tabuľke 8.

Tabuľka 5 Namerané koncentrácie a čistota izolovanej DNA z rastlín

DNA zo vzorky	c [ng/μl]	A 260	A 280	A 260/ A 280	A 260/ A 230
Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon" 1	30,0	0,600	0,319	1,88	1,29
Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon" 2	24,5	0,489	0,262	1,87	1,26
Mentha Piperita "citaro" 1	8,7	0,174	0,097	1,80	0,50
Mentha Piperita "citaro" 2	14,8	0,296	0,151	1,96	0,77
Mentha pycnanthemum pilosum 1	12,8	0,255	0,137	1,87	0,80
Mentha pycnanthemum pilosum 2	11,9	0,238	0,122	1,95	0,69
Mentha almira strawberry peppermint 1	11,8	0,236	0,113	2,09	0,75
Mentha almira strawberry peppermint 2	14,9	0,297	0,156	1,90	1,31
Biocitrón 1	20,3	0,407	0,237	1,71	1,21
Biocitrón 2	19,3	0,387	0,227	1,7	1,09

DNA z mäty bola izolovaná v dvoch opakovaníach, pretože výsledky koncentrácie a čistoty z prvej izolácie sa od seba značne líšili. Pomery absorbancií 260/280 (iné ako 1,8) indikujú kontamináciu proteínmi, prípadne činidlami použitými pri izolácii DNA. Výsledky z druhej izolácie sú uvedené v Tabuľke 5. Pomery absorbancií 260/280 sú 1,8 a vyššie, čo naznačuje menšiu, prípadne žiadnu kontamináciu proteínmi. Preto pre ďalšiu prácu boli používané len vzorky z druhej izolácie DNA.

Tabuľka 6 Namerané koncentrácie a čistota izolovanej DNA zo silíc

DNA zo vzorky	c [ng/μl]	A 260	A 280	A 260/ A 280	A 260/ A 230
silica levanduľa	1,5	0,030	0,021	1,44	0,08
silica peppermint	2,1	0,043	0,032	1,33	0,26
silica chamomile	2,4	0,048	0,007	6,57	0,12
silica cinamon	3,2	0,064	0,084	0,75	0,38
silica rosemary	1,4	0,029	0,024	1,17	0,19
silica ginger	1,5	0,029	0,014	2,11	1,36
Mentha Piperita "citaro" čerstvá 1	62,5	1,250	0,619	2,02	2,33
Mentha Piperita "citaro" čerstvá 2	53,0	1,061	0,527	2,01	2,50
Mentha Piperita "citaro" čerstvá 3	38,2	0,765	0,387	1,98	1,69

V Tabuľke 6 sú uvedené koncentrácie DNA izolovanej z prírodných silíc a z čerstvých listov Menthy Piperita "citaro." Izolovaná DNA z čerstvej mäty je v desiatkach vyššia ako koncentrácia mäty lyofilizovanej (Tabuľka 5). To naznačuje, že procesom lyofilizácie a uskladnením v mraziacom boxe dochádza k degradácii DNA v bylinách.

Mentha Piperita "citaro" bola tiež použitá ako pozitívna kontrola pre určenie správnosti meraní, jej koncentrácie sú v porovnaní so silicami oveľa vyššie, ako je aj väčšia čistota daná pomermi absorbancií 260/280. Koncentrácie silíc boli nízke, blízke sa k nule, čiže mohlo dochádzať k nepresnostiam v meraniach. Nízka koncentrácia DNA v siliciach mohla byť pravdepodobne spôsobená procesom výroby silíc. Keďže silice sa vyrábajú destiláciou, nemala by byť genetická informácia prenesená do výsledného produktu. Vzorky boli ďalej analyzované pomocou PCR.

Tabuľka 7 Namerané koncentrácie a čistota izolovanej DNA z modelových vzoriek krémov

DNA zo vzorky	c [ng/μl]	A 260	A 280	A 260/ A 280	A 260/ A 230
Krém + Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon" 1	1,2	0,024	0,028	0,88	0,21
Krém + Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon" 2	1,0	0,020	0,032	0,63	0,19
Krém + silica "tangerinka" 1	0,9	0,017	0,007	2,47	0,05
Krém + silica "tangerinka" 2	1,1	0,021	0,027	0,80	0,40
Silica "tangerinka" 1	0	0	0	0	0
Silica "tangerinka" 2	1,6	0,032	0,041	0,78	0,21
Krém + Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon" 1 (usadenina)	3,7	0,074	0,059	1,25	0,80
Krém + Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon" 2 (usadenina)	3,6	0,073	0,045	1,60	0,34

Koncentrácia DNA izolovanej z modelových vzoriek krémov vlastnej prípravy, do ktorých boli pridávané bylinné zložky je uvedená v Tabuľke 7 a Tabuľke 8. Pre krém s prídavkom Menthy Gentilis varieta citrata "lemon" bola izolácia zopakovaná a DNA bola izolovaná zo sedimentu po centrifugácii, postup uvedený v 3.6.1. DNA izolovaná z usadeniny ako aj čistota tejto DNA sa javia byť vyššie, preto bol tento postup opakovaný aj pri vybraných komerčných vzorkách. Tabuľka 8 tiež uvádza koncentrácie a čistotu DNA izolovanej z levandule.

Tabuľka 8 Namerané koncentrácie a čistota izolovanej DNA z levandule a modelových vzoriek krémov s levanduľou

DNA zo vzorky	c [ng/μl]	A 260	A 280	A 260/ A 280	A 260/ A 230
Levanduľa mrazená 1	10,2	0,203	0,121	1,68	0,80
Levanduľa mrazená 2	7,8	0,156	0,088	1,78	0,84
Levanduľa sušená 1	6,3	0,127	0,082	1,55	0,43
Levanduľa sušená 2	6,1	0,122	0,091	1,33	0,30
Levanduľa čerstvá (list) 1	84,5	1,690	0,830	2,04	1,83
Levanduľa čerstvá (list) 2	80,4	1,608	0,791	2,03	1,70
Levanduľová silica 1	10,7	0,214	0,110	1,94	0,43
Levanduľová silica 2	5,9	0,118	0,019	6,34	0,46
Krém + Levanduľová silica 1	2,5	0,050	0,002	24,02	0,21
Krém + Levanduľová silica 2	2,3	0,046	0,008	5,83	0,14
Krém + Levanduľa 1	1,6	0,031	0,006	4,86	0,32
Krém + Levanduľa 2	2,8	0,057	0,021	2,68	0,38
Krém + Levanduľa + Silica 1	6,6	0,132	0,033	4,01	0,46
Krém + Levanduľa + Silica 2	4,3	0,086	0,035	2,45	0,25

Bola zmeraná aj koncentrácia izolovanej DNA z komerčných vzoriek kozmetických výrobkov. Avšak, koncentrácia izolovanej DNA bola pod hranicou detekcie stanovenia spektrofotometrickou metódou, preto nie sú výsledky uvedené. Aj napriek tomu boli ďalej analyzované pomocou PCR.

4.2 Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA pomocou primerov špecifických pre ITS2 región rastlín

U všetkých vzoriek (bylinné vzorky, silice, modelové a komerčné vzorky krémov) bola amplifikovateľnosť izolovanej DNA overovaná pomocou primerov ITS2 špecifických pre ITS2 región rastlín. Postup amplifikácie ako aj teplotný profil sú uvedené v kapitole 3.6.4.

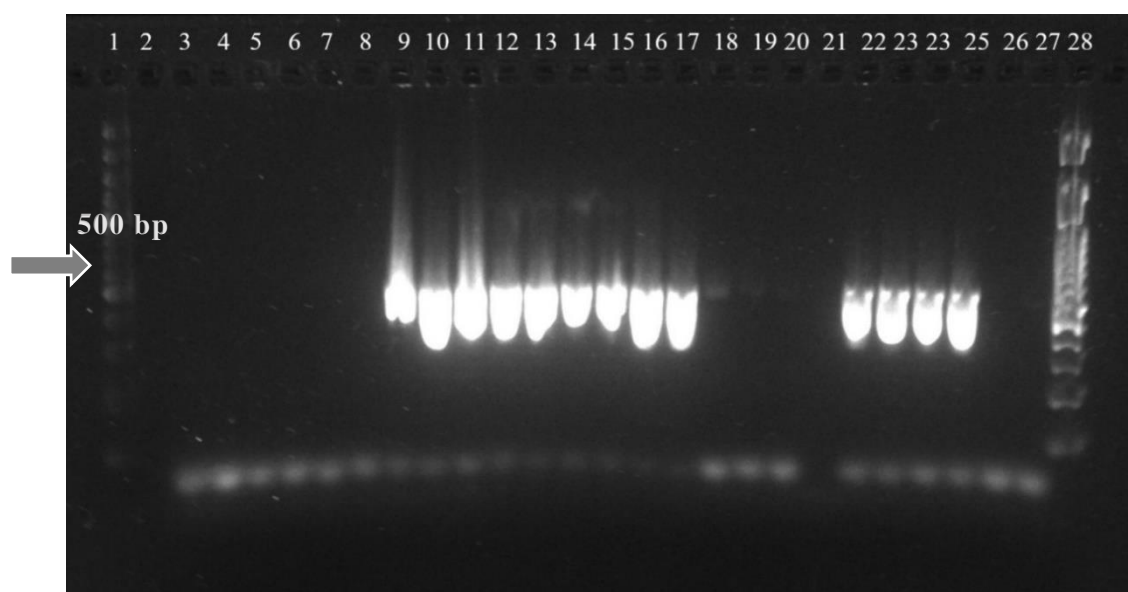
4.2.1 Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z rastlín

Bola skúmaná prítomnosť DNA vo vzorkách silíc, bylín a modelových vzoriek krémov s prídavkom príslušných bylín.

Produkty PCR analýzy boli nanosené na 1,8 % agarózový gél (Obrázok 26). Bola dokázaná prítomnosť izolovanej DNA pomocou primerov špecifických pre ITS2 región rastlín, amplifikované úseky DNA mali dĺžku fragmentov 500 bp, čo odpovedá hodnotám uvedeným pri vyhľadávaní pomocou programu Primer Blast [31].

Z každej vzorky bolo na gél pipetovaných 15µl, čo sa ukázalo ako príliš mnoho, preto pre ďalšie merania bol zvolený menší objem vzoriek pipetovaných na gél (10 µl).

Agarózová gélová elektroforéza (Obrázok 26) potvrdila prítomnosť rastlinnej DNA vo vzorkách DNA izolovaných z bylín, ako aj vo vzorkách modelových krémov s prídavkom bylín. Všetky amplifikované úseky mali veľkosť 500 bp. DNA izolovaná zo silíc a modelového krému s prídavkom silice nebola potvrdená, čo odpovedá aj nízkym koncentráciám uvedeným v Tabuľke 6 a Tabuľke 8. Pri levanduľovej silici (vzorka 18 a 19) bol detekovaný slabý bend, vzorky boli ďalej analyzované na prítomnosť DNA pomocou PCR pre vylúčenie možnosti kontaminácie vzoriek rastlinnou DNA v procese výroby silice.



Beh číslo	DNA	PCR produkt	Beh číslo	DNA	PCR produkt
1	DNA štandard 100 bp		15	Levanduľa sušená 2	+++
2	x		16	Levanduľa čerstvá - list 1	+++
3	Silica levanduľa	-	17	Levanduľa čerstvá - list 2	+++
4	Silica pepermint	-	18	Levanduľová silica (zn. Talus) 1	+
5	Silica chomomille	-	19	Levanduľová silica (zn. Talus) 2	+
6	Silica cinamon	-	20	Krém, levanduľová silica 1	-
7	Silica rosemary	-	21	Krém, levanduľová silica 2	-
8	Silica ginger	-	22	Krém, levanduľa sušená 1	++
9	Mentha Piperita "citaro" - čerstvá 1	+++	23	Krém, levanduľa sušená 2	++
10	Mentha Piperita "citaro" - čerstvá 2	+++	24	Krém, levanduľa sušená, levanduľová silica 1	++

Obrázok 26 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, použitie primerov špecifických pre ITS2 región rastlín (500 bp) (x-medzera, - nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

Beh číslo	DNA	PCR produkt	Beh číslo	DNA	PCR produkt
11	Mentha Piperita "citaro" - čerstvá 3	+++	25	Krém, levanduľa sušená, levanduľová silica 2	++
12	Levanduľa mrazená 1	+++	26	Negatívna kontrola 1	-
13	Levanduľa mrazená 2	+++	27	Negatívna kontrola 2	-
14	Levanduľa sušená 1	+++	28	DNA štandard 100 bp	

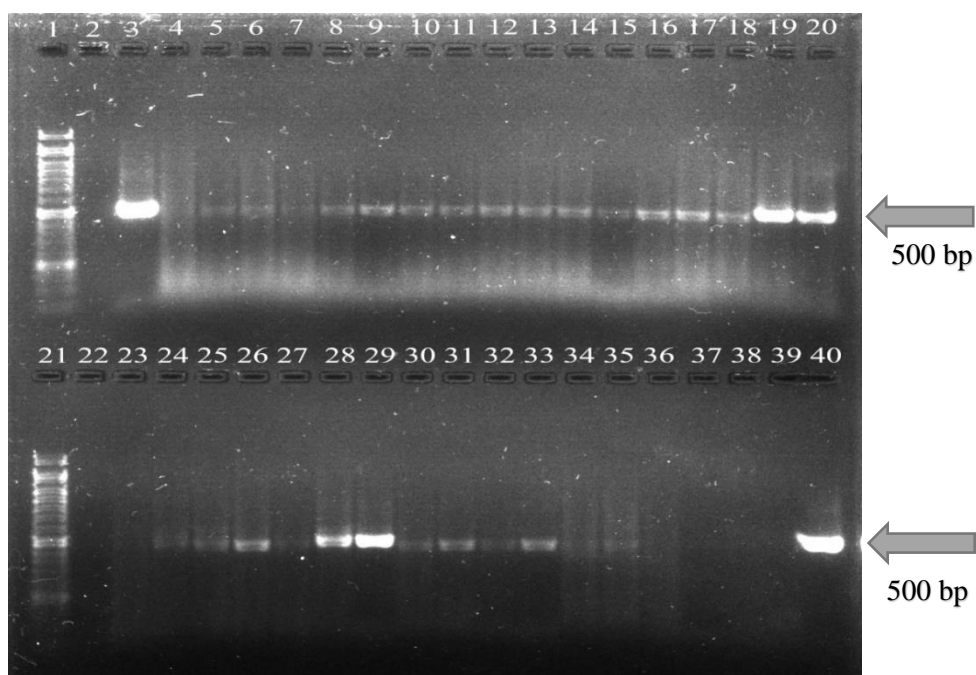
Pokračovanie Obr. 26 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, použitie primerov špecifických pre ITS2 región rastlín (500 bp) (x-medzera, - nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

4.2.2 Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z modelových a komerčných vzoriek

Boli pripravené PCR zmesi a PCR podľa 3.6.4. Bola skúmaná prítomnosť DNA v modelových vzorkách krémov s prídavkom príslušných bylín a v komerčných krémoch. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA izolovaná z lyofilizovanej kôry citróna s koncentráciou 20 ng/μl.

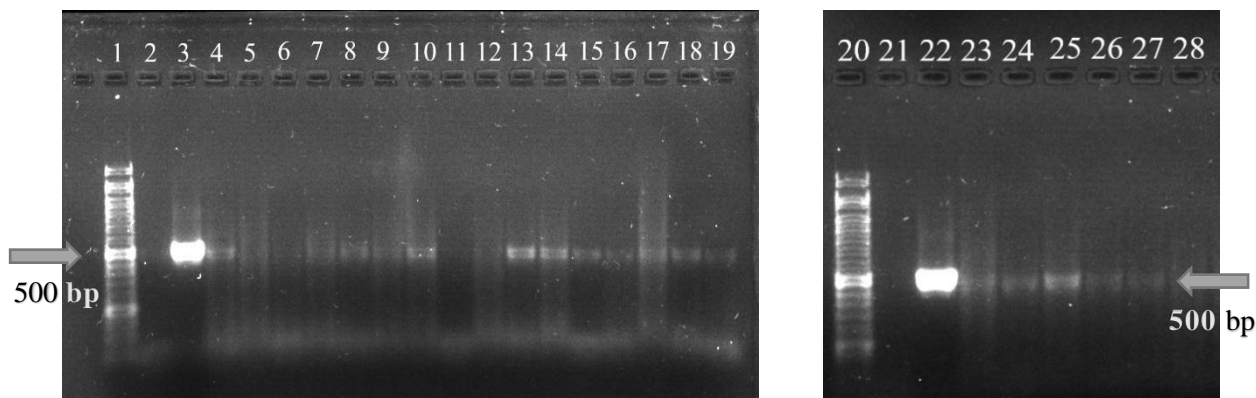
Produkty PCR analýzy boli nanesené na 1,8 % agarózový gél (Obrázok 27 a Obrázok 28). Bola dokázaná prítomnosť izolovanej DNA pomocou primerov špecifických pre ITS2 región rastlín. Z každej vzorky bolo na gél pipetovaných 10 μl. Agarózová gélová elektroforéza potvrdila prítomnosť rastlinnej DNA takmer všetkých analyzovaných vzorkách. Všetky amplifikované úseky mali veľkosť 500 bp, čo odpovedá hodnotám uvedeným pri overení veľkosti produktu pomocou programu Primer Blast.

Z modelových krémov s prídavkom silíc alebo bylín nebola prítomnosť DNA dokázaná iba vo vzorke „Silica citrónová tráva.“ Z komerčných prípravkov nebola prítomnosť DNA dokázaná vo vzorkách „Konopka´s face commage moist, Planeta organica natural body scrub, N.A.E. shampoo bar, Naturalis sugar body scrub a Alverde pflge–dusche bio–minze.“ Najväčšiu intenzitu mal z modelových vzoriek krém s prídavkom citrónovej kôry a s prídavkom Menthy almira strawberry peppermint, čo odpovedá aj najvyšším koncentráciám izolovanej DNA z príslušných rastlín uvedeným v Tabuľke 5.



Beh číslo	Vz.	DNA	Označenie	PCR produkt	Beh číslo	Vz.	DNA	Označenie	PCR produkt		
1		štandard 50 bp			21		štandard 50 bp				
2		x			22		x		-		
3		pozitívna kontrola		+++	23		negatívna kontrola		-		
4		negatívna kontrola		-	24						
5	Modelové krémy vlastnej prípravy	Silica červený pomaranč	1A	+	25	Modelové krémy	Mentha Piperita "citaro"	11A	+		
6			1B	+	26		Mentha pycnanthemum pilosum	12A	++		
7		Silica citrónová tráva	2A	-	27		Mentha almira strawberry peppermint	12B	+		
8			2B	+	28			13A	+++		
9		Silica mäta	3A	++	29		Balea handcreme protect	13B	+++		
10		prieporná	3B	++	30			17A	+		
11		Modelové krémy vlastnej prípravy	Peprno-mätová silica	4A	+		31	Komerčné produkty	17B	++	
12				4B	++		32		Cosmos natural repairing hand protect	18A	+
13			Pomarančová silica španielská	5A	++		33		Konopka´s face commage moist	18B	++
14			5B	++	34		19A			-	
15	Mandarinková silica		6A	+	35	Planeta organica natural body scrub	19B		-		
16	6B		++	36	20A		-				
17	Grapefruitová silica		7A	++	37	N.A.E. shampoo bar	20B		-		
18			7B	+	38		21A		-		
19	Citrónová kôra	9A	+++	39		x		-			
20		9B	+++	40		Pozitívna kontrola		+++			

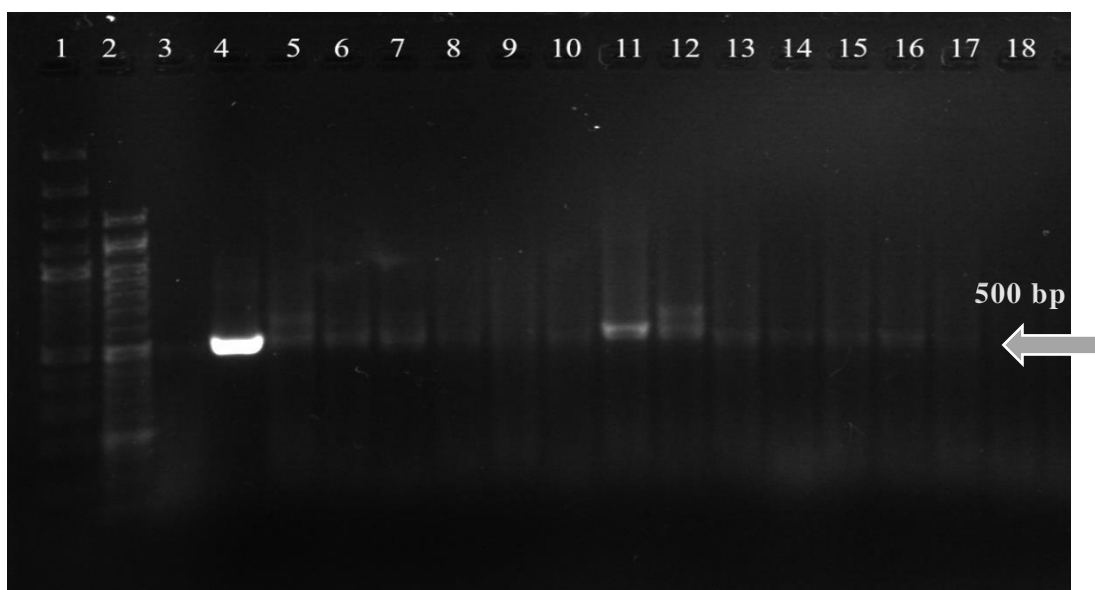
Obrázok 27 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR modelových a komerčných vzoriek krémov, použitie primerov špecifických pre ITS2 región rastlín (500 bp) (x medzera, - nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)



Beh číslo	Vz.	DNA	Označenie	PCR produkt	Beh číslo	Vz.	DNA	Označenie	PCR produkt	
1		štandard 50 bp			15		Organic shop strawberry body mousse	27A	+	
2		negatívna kontrola		-	16		Levandulový krém	27B	+	
3		pozitívna kontrola		+++	17		Levandulový sen	28A	+	
4	Komerčné produkty	N.A.E. shampoo bar	21B	+	18	Komerčné produkty	štandard 50 bp			
5		Naturalis sugar body scrub	22A	-	19		negatívna kontrola	-		
6		Balea sugar scrub	22B	-	20		pozitívna kontrola	+++		
7			23A	+	21		Levandulový sen	29B	+	
8			23B	+	22		Herbs of Bulgaria face cream	30A	+	
9		Alverde skinfood	24A	+	23			30B	++	
10		Bio-limette	24B	++	24		Ryor hydratačný krém	31A	+	
11		Alverde pflagedusche bio-minze	25A	-	25			31B	+	
12			25B	-	26					
13		Organic shop strawberry body scrub	26A	++	27					
14			26B	++	28					
									x	-

Obrázok 28 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, DNA izolovaná z komerčných vzoriek, použitie primerov špecifických pre ITS2 región rastlín(500 bp) (x medzera, - nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy produktov PCR, vybraných vzoriek modelových a komerčných krémov, ktorých DNA bola izolovaná zo sedimentu po centrifugácii podľa postupu uvedeného v 3.6.1 sú zobrazené na Obrázku 29. Týmto postupom nebola detekovaná prítomnosť DNA v komerčnej vzorke „Organic shop strawberry body mousse.“ Vo všetkých zvyšných vzorkách bola detekovaná DNA s veľkosťou 500 bp. Gélová elektroforéza vzoriek izolácie DNA zo sedimentu po centrifugácii a zo vzoriek DNA izolovaných priamo z modelových a komerčných produktov neukázala významný rozdiel.



Beh číslo	Vzorky	DNA	Označenie	PCR produkt
1		DNA štandard 50 bp		
2		DNA štandard 100 bp		
3		Negatívna kontrola		-
4		Pozitívna kontrola		+++
5	Krémy vlastnej prípravy	Citrónová kôra	9A	+
6			9B	+
7		Mentha Piperita "citaro"	11A	+
8			11B	+
9		Mentha pycnanthemum pilosum	12A	+
10			12B	+
11		Mentha almira strawberry pepermint	13A	++
12			13B	++
13	Komerčné produkty	Konopka's face commage moist	19A	+
14			19B	+
15		Organic shop strawberry body scrub	26A	+
16			26B	+
17		Organic shop strawberry body mousse	27A	-
18			27B	-

Obrázok 29 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, DNA izolovaná zo sedimentu po centrifugácii podľa postupu uvedeného v 3.6.1, použitie primerov špecifických pre ITS2 región rastlín (500 bp) (- nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

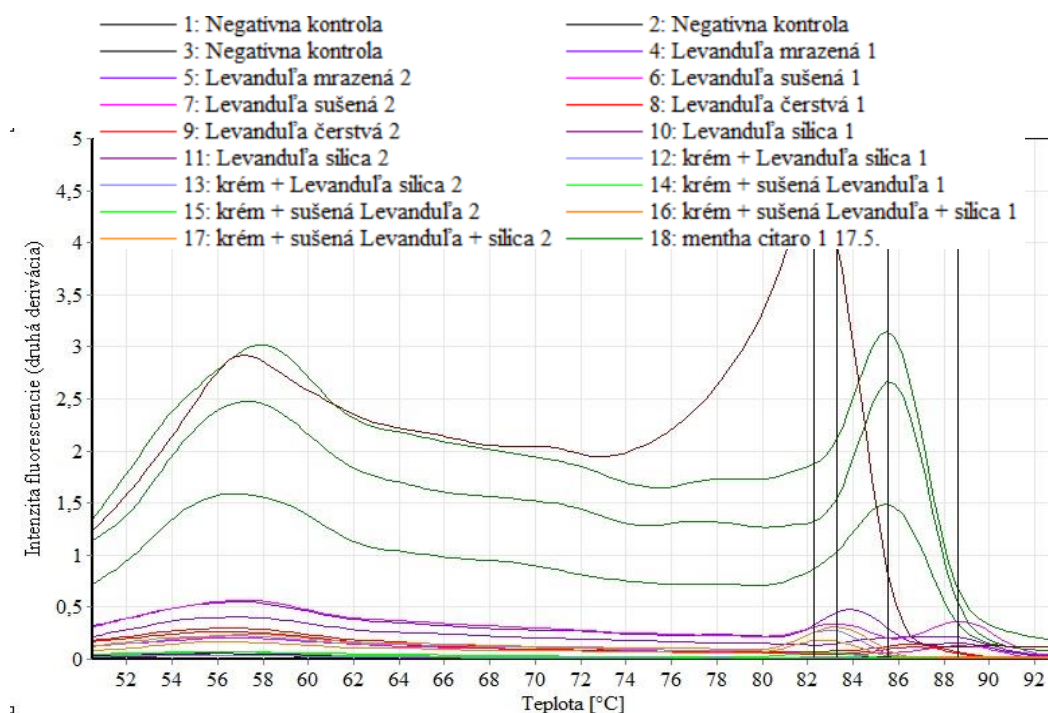
4.3 Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA pomocou primerov Lim2F/R špecifických pre limonén syntázu

U všetkých vzoriek, u ktorých bola preukázaná prítomnosť DNA pomocou primerov špecifických pre ITS2 región rastlín (bylinné vzorky, modelové a komerčné vzorky krémov),

bola prevedená PCR analýza s použitím primerov Lim2F/R špecifických pre limonén syntázu. Ako pozitívna kontrola bola použitá, v každej analýze, DNA izolovaná z lyofilizovanej kôry biocitróna. Postup amplifikácie ako aj teplotný profil sú uvedené v kapitole 3.6.4. Krivky amplifikácie sú uvedené v prílohe.

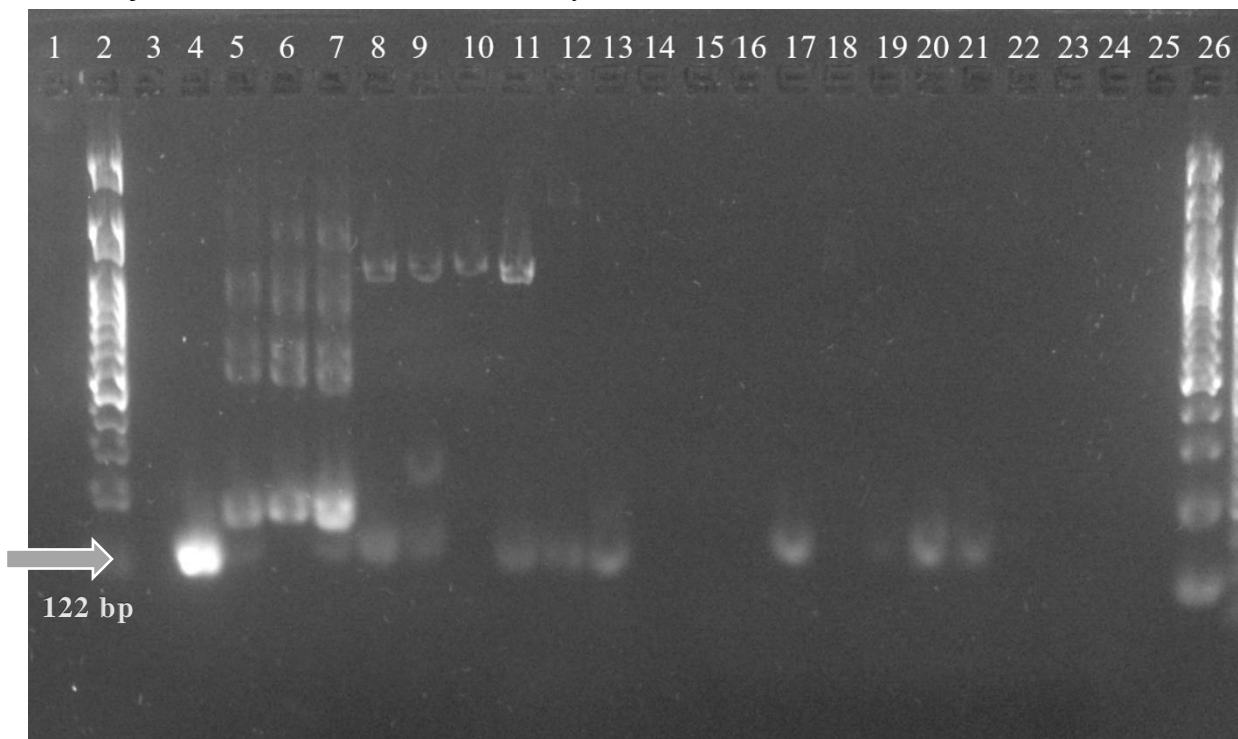
4.3.1 Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z rastlín

Bola skúmaná prítomnosť DNA vo vzorkách silíc, bylín a modelových vzoriek krémov s prídavkom príslušných bylín. Pozitívnu kontrolou bola DNA izolovaná z kôry biocitróna s koncentráciou 20 ng/μl. DNA izolovaná z mäty sa amplifikovala úspešne, v porovnaní s mäťou a pozitívnu kontrolou sa vzorky obsahujúce levanduľu amplifikovala výrazne menej. Analýza kriviek tavenia amplikonov (Obrázok 30, amplifikačné krivky viz. Príloha 11) obsahujú DNA izolovanú z levandule, sa neamplifikovali úplne všetky. Tvar kriviek amplifikácie a melt analýzy neodpovedá predchádzajúcim dvom, to mohlo byť spôsobené buď nižším alebo žiadnym obsahom limonénu v levanduli a v produktoch obsahujúcich levanduľu, v porovnaní s obsahom levandule v citrusoch, mäte a v produktoch s ich obsahom.



Obrázok 30 – Analýza kriviek tavenia, použité primery Lim2F/R špecifické pre limonén syntázu (Bin A: $T_m = 82,3$ °C, Bin B: $T_m = 83,3$ °C, Bin C: $T_m = 85,5$ °C, Bin D: $T_m = 88,8$ °C)

Produkty PCR boli nanosené v množstve 10 μ l na 1,8 % agarózový gél a bola prevedená elektroforéza. Výsledky sú zobrazené na Obrázku 31. Z gélu je vidieť, že amplifikované produkty PCR obsahujúce DNA z citrónu, majú veľkosť 122 bp, čo odpovedá hodnotám zisteným pomocou programu primer blast. Veľkosti produktov PCR obsahujúcich DNA z mäty sú v porovnaní s pozitívnou kontrolou väčšie. Môže to byť pravdepodobne spôsobené tým, že DNA z kôry citróna a DNA z mäty môžu mať rozdiely v géne pre limonén synthasu, na ktorú primer cielil. Tento jav mohol ovplyvniť aj teplotu tavenia amplikonov. Pre produkty, obsahujúce DNA z levandule, ktoré boli amplifikované, je veľkosť produktov odpovedajúca veľkosti produktov pozitívnej kontroly, teda 122 bp, avšak intenzita je trochu nižšia, čo môže byť spôsobené tým, že sekvencia génov levandule nemusí odpovedať sekvencii génu citrusov a teda primery. Intenzita jednotlivých PCR produktov je uvedená na Obrázku 31. Vzorka 17 (modelová vzorka krému s prídavkom levanduľovej silice) vyšla pozitívne, avšak samotná silica ani druhá vzorka takto pripraveného krému (vz. 16) nevykazovala prítomnosti DNA, čo naznačuje, že vzorka tohto krému mohla byť kontaminovaná.



Beh číslo	DNA		PCR produkt	Beh číslo	DNA		PCR produkt
1	x			14	Levanduľová silica 1		-
2	DNA štandard 100 bp			15	Levanduľová silica 2		-
3	x			16	Krém, levanduľová silica 1		-
4	Pozitívna kontrola		+++	17	Krém, levanduľ'a sušená1		++
5	Mentha Piperita "citaro" čerstvá 1	++		18	Krém, levanduľová silica 2		-

Obrázok 31 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, použitie primerov Lim2FR špecifických pre limonén (122 bp) (x medzera, - nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

Beh číslo	DNA	PCR produkt	Beh číslo	DNA	PCR produkt
6	Mentha Piperita "citaro" čerstvá 2	++	19	Krém, levanduľa sušená 2	+
7	Mentha Piperita "citaro" čerstvá 3	+++	20	Krém, levanduľa sušená, levanduľová silica 1	++
8	Levanduľa mrazená 1	+	21	Krém, levanduľa sušená, levanduľová silica 2	+
9	Levanduľa mrazená 2	+	22	Negatívna kontrola 1	
10	Levanduľa sušená 1	-	23	Negatívna kontrola 2	
11	Levanduľa sušená 2	+	24	Negatívna kontrola 3	
12	Levanduľa čerstvá - list 1	+	25	x	
13	Levanduľa čerstvá - list 2	++	26	Štandard 100 bp	

Pokračovanie Obr. 31 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, použitie primerov Lim2FR špecifických pre limonén (122 bp) (x medzera, - nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

4.3.2 Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z modelových a komerčných vzoriek

Bola skúmaná prítomnosť limonénu vo vzorkách modelových a komerčných krémov pomocou primerov Lim2F/R špecifických pre limonén syntázu. PCR zmesi ako aj podmienky PCR reakcie sú opísané v kapitole 3.6.4. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA izolovaná z kôry biocitróna s koncentráciou 20 ng/μl. Krivky amplifikácie sú uvedené v prílohe.

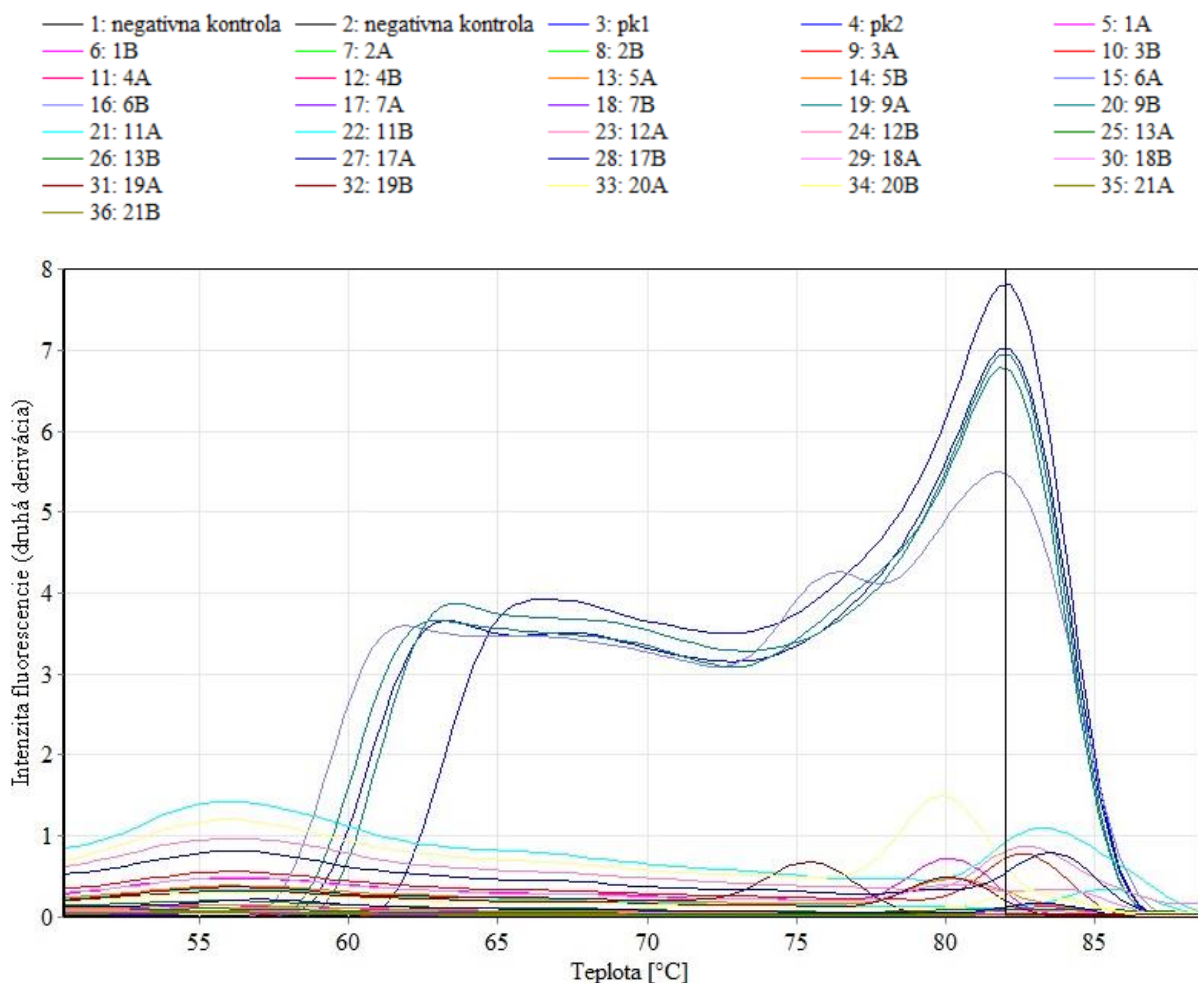
Amplifikačnej krivke a krivke tavenia pozitívnej kontroly najviac odpovedajú vzorky modelových krémov s prímiesou citrónovej kôry (Vzorky 9A a 9B) a silice tangerinka (Vzorka 6A a 6B). Rovnako pri MELT analýze odpovedajú aj teploty tavenia amplikonov týchto dvoch modelových vzoriek a teda teplota $T_m = 82$ °C. Krivka analýzy MELT je znázornená na Obrázku 32 (amplifikačné krivky viz. *Príloha 12*). Označenie modelových a komerčných vzoriek krémov je uvedené v Tabuľke 9.

Tabuľka 9 Označenie vzoriek modelových a komerčných výrobkov

Ozn	Testované výrobky	Ozn	Testované výrobky
1A	Silica červený pomaranč	17A	Balea handcreme protect
1B		17B	
2A	Silica citrónová tráva	18A	Cosmos natural repairing hand protect
2B		18B	
3A	Silica mäta prieporná	19A	Konopka's face commage moist
3B		19B	
4A	Peprno-mätová silica	20A	Planeta organica natural body scrub
4B		20B	
5A	Pomarančová silica španielská	21A	N.A.E. shampoo bar
5B		21B	
6A	Mandarinková silica	22A	Naturalis sugar body scrub
6B		22B	
7A	Grapefruitová silica	23A	Balea sugar scrub
7B		23B	
8A	Silica "Tangerinka"	24A	Alverde skinfood Bio-limette
8B		24B	
9A	Citrónová kôra	25A	Alverde pflege-dusche bio-minze
9B		25B	
10A	Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon"	26A	Organic shop strawberry body scrub
10B		26B	
11A	Mentha Piperita "citaro"	27A	Organic shop strawberry body mousse
11B		27B	
12A	Mentha pycnanthemum pilosum	28A	Levandul'ový krém
12B		28B	
13A	Mentha almira strawberry peppermint	29A	Levandul'ový sen
13B		29B	
14A	Sušená levanduľa	30A	Herbs of Bulgaria face cream
14B		30B	
15A	Levandul'ová silica	31A	Ryor hydratačný krém
15B		31B	
16A	Sušená levanduľa + levandul'ová silica		
16B			

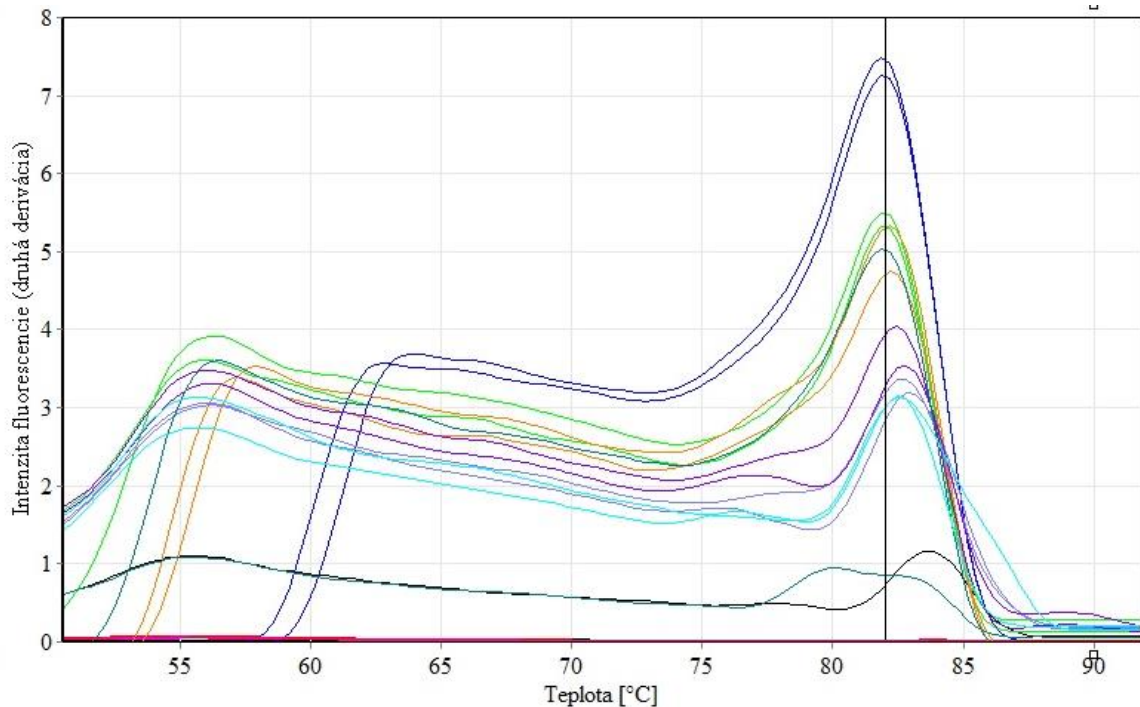
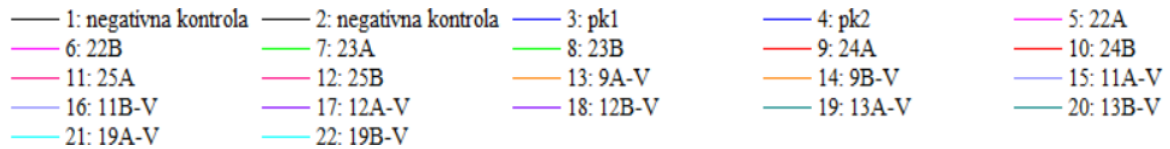
Modelové vzorky krémov vlastnej prípravy

Komerčné produkty



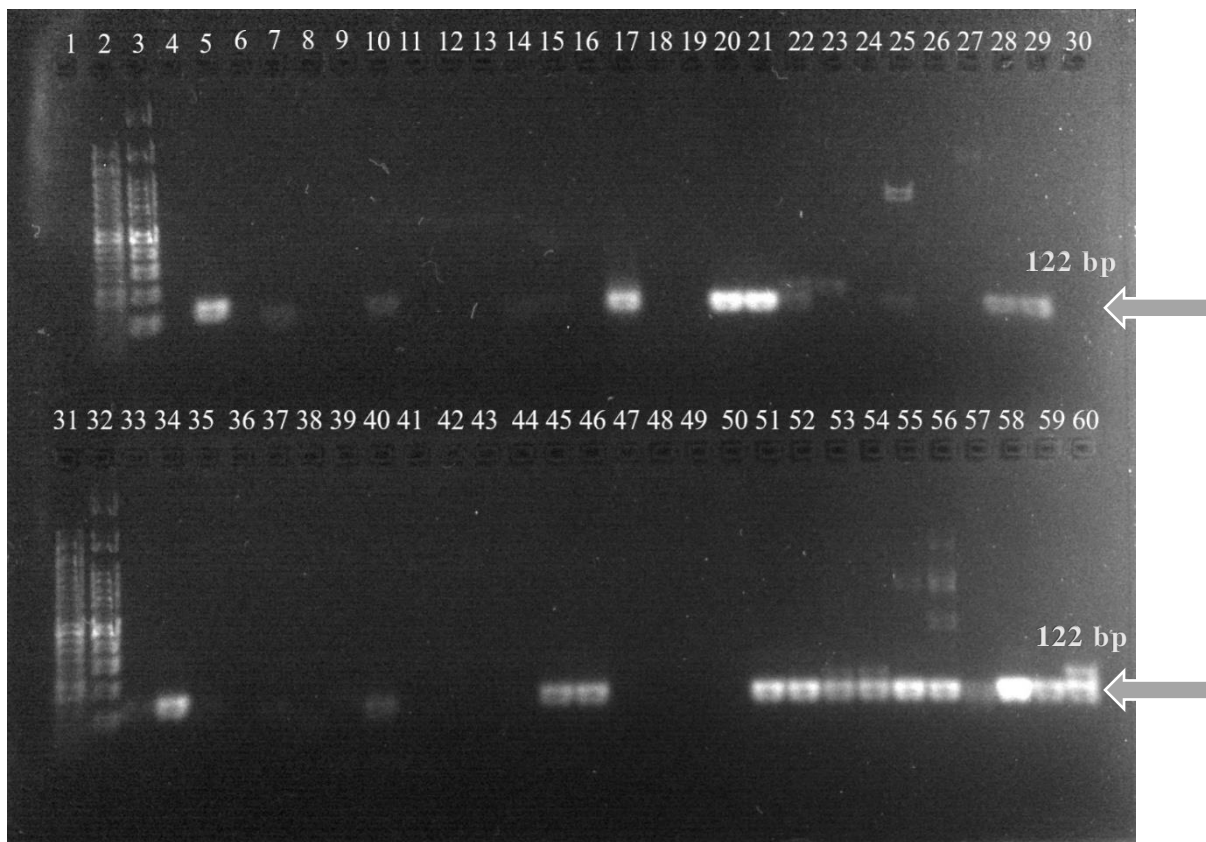
Obrázok 32 – Analýza kriviek tavenia, použité primery Lim2F/R špecifické pre limonén syntázu, modelové a komerčné vzorky krémov ($T_m = 82^\circ\text{C}$)

Na Obrázku 33 (amplifikačné krivky viz. Príloha 13) je znázornená druhá sada vzoriek modelových a komerčných produktov. Negatívna kontrola vyšla čisto. Amplifikovali sa všetky vzorky okrem vzoriek izolovaných z komerčného produktu „Alverde pflage-dusche bio-minze,“ krivka analýzy MELT aj amplifikačná krivka takmer odpovedajú krivkám negatívnej kontroly, čo značí o minimálnej alebo žiadnej prítomnosti genetickej informácie vo vzorke. Boli analyzované aj produkty, ktorých DNA bola izolovaná zo sedimentu po centrifugácii, tieto produkty sa tiež všetky amplifikovali, hodnoty sú čistejšie ako pri priamej izolácii z krémov. Teplota tavenia amplikonov je 82°C .



Obrázok 33 – Analýza kriviek tavenia, použité primery *Lim2F/R* špecifické pre limonén syntázu, modelové a komerčné vzorky krémov ($T_m = 82\text{ °C}$)

Bola prevedená agarózová gélová elektroforéza produktov amplifikácie PCR. Produkty boli nanosené na 1,8 % agarózový gél v množstve 10 μl . Výsledky a intenzita zobrazovaných PCR produktov sú uvedené na Obrázku 35 a v Tabuľke 10. Pozitívnou kontrolou bola DNA izolovaná z kôry citróna. Z gélu je možné pozorovať, že nie všetky analyzované produkty boli amplifikované pomocou primerov *Lim2F/R* špecifických pre limonén syntázu. Najsilnejšiu intenzitu signálu majú vzorky modelových krémov obsahujúcich citrónovú kôru a vzorky, ktorých DNA bola izolovaná zo sedimentu po centrifugácii (postup prípravy týchto vzoriek je popísaný v 3.6.1). Slabú intenzitu signálu ukazujú aj vzorky modelových krémov s prídavkom silice červený pomaranč a s mandarinkovou silicou. To môže byť spôsobené pravdepodobne tým, že ich výroba nie je prevedená destiláciou, ako pri ostatných silicách, ale je prevedená lisovaním kôry z citrusov. Veľkosť produktov amplifikácie je 122 bp, čo odpovedá hodnotám zisteným pomocou programu Primer Blast, ktoré sú uvedené v Tabuľke 1.



Obrázok 35 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, použitie primerov *Lim2FR* špecifických pre limonén (122 bp) (x medzera, - nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

Beh číslo	DNA	Označenie	PCR produkt	Beh číslo	DNA	Označenie	PCR produkt		
1	x			31	štandard 50 bp				
2	štandard 50 bp			32	štandard 100 bp				
3	štandard 100 bp			33	negatívna kontrola		-		
4	negatívna kontrola		-	34	pozitívna kontrola		+++		
5	pozitívna kontrola		+++	35					
6	Modelové vzorky krémov vlastnej prípravy	Silica červený pomaranč	1A	-	36	Komerčné produkty	Cosmos natural repairing hand protect	18A	-
7			1B	+	37		18B	-	
8		Silica citrónová tráva	2A	-	38		Konopka's face commage moist	19A	-
9			2B	-	39		19B	-	
10		Silica mäta prieporná	3A	+	40		Planeta organica natural body scrub	20A	-
11			3B	-	41		20B	+	
12		Peprno-mätová silica	4A	-	42		N.A.E. shampoo bar	21A	-
13			4B	-	43		21B	-	
14		Pomarančová silica španielská	5A	+	44		Naturalis sugar body scrub	22A	-
15			5B	+	45		22B	-	
16		Mandarinková silica	6A	-	46		Balea sugar scrub	23A	++
17			6B	++	47		23B	++	
18		Grapefruitová silica	7A	-	48		Alverde skinfood Bio-limette	24A	-
19			7B	-	49		24B	-	
20		Citrónová kôra	9A	+++	50		Alverde pflege-dusche bio-minze	25A	-
21			9B	+++	51		25B	-	
22		Mentha Piperita "citaro"	11A	+	52		Citrónová kôra	9A-V	+++
23			11B	+	53			9B-V	+++
24		Mentha pycnanthemum pilosum	12A	-	54		Mentha Piperita "citaro"	11A-V	++
25			12B	+	55			11B-V	++
26	Mentha almira strawberry peppermint	13A	-	56	Mentha pycnanthemum pilosum	12A-V	+++		
27		13B	-	57		12B-V	+++		
28	Komerčné produkty	Balea handcreme protect	17A	++	58	Mentha almira strawberry peppermint	13A-V	+	
29			17B	++	59		13B-V	+++	
30	x		-	60	Konopka's face commage moist	19A-V	+++		
					19B-V	+++			

Tabuľka 10 Detekcia produktov PCR agarózovou gélovou elektroforézou, modelové a komerčné vzorky kozmetických produktov (- nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

4.4 Výber vhodných primerov a overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA pomocou primerov lav1FR a lav1modFR špecifických pre levanduľu

Boli vybrané vzorky, u ktorých bola preukázaná prítomnosť DNA pomocou primerov špecifických pre ITS2 región rastlín (bylinné vzorky, modelové a komerčné vzorky krémov) a obsahovali levanduľu, bola prevedená PCR analýza s použitím primerov Lav1FR a Lav1modFR špecifických pre levanduľu. Ako pozitívna kontrola slúžili analyzované vzorky DNA izolované zo sušenej levandule, použitá bola v každej analýze aspoň jedna pozitívna kontrola. Postup amplifikácie ako aj teplotný profil sú uvedené v kapitole 3.6.4. Krivky amplifikácie sú uvedené v prílohe.

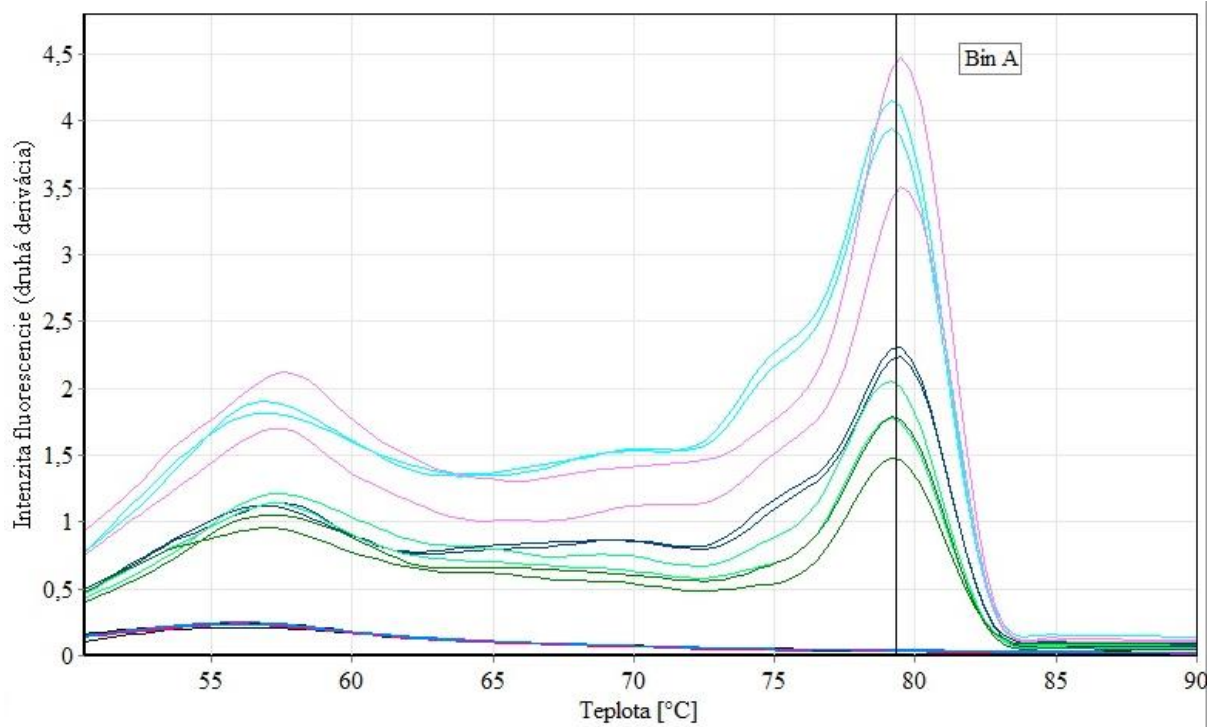
4.4.1 Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z rastlín a modelových vzoriek pomocou primerov lav1FR

Bola skúmaná prítomnosť DNA vo vzorkách izolovanej genetickej informácie z levandule a modelových vzoriek krémov s prídavkom sušenej levandule, použitím primerov Lav1FR.

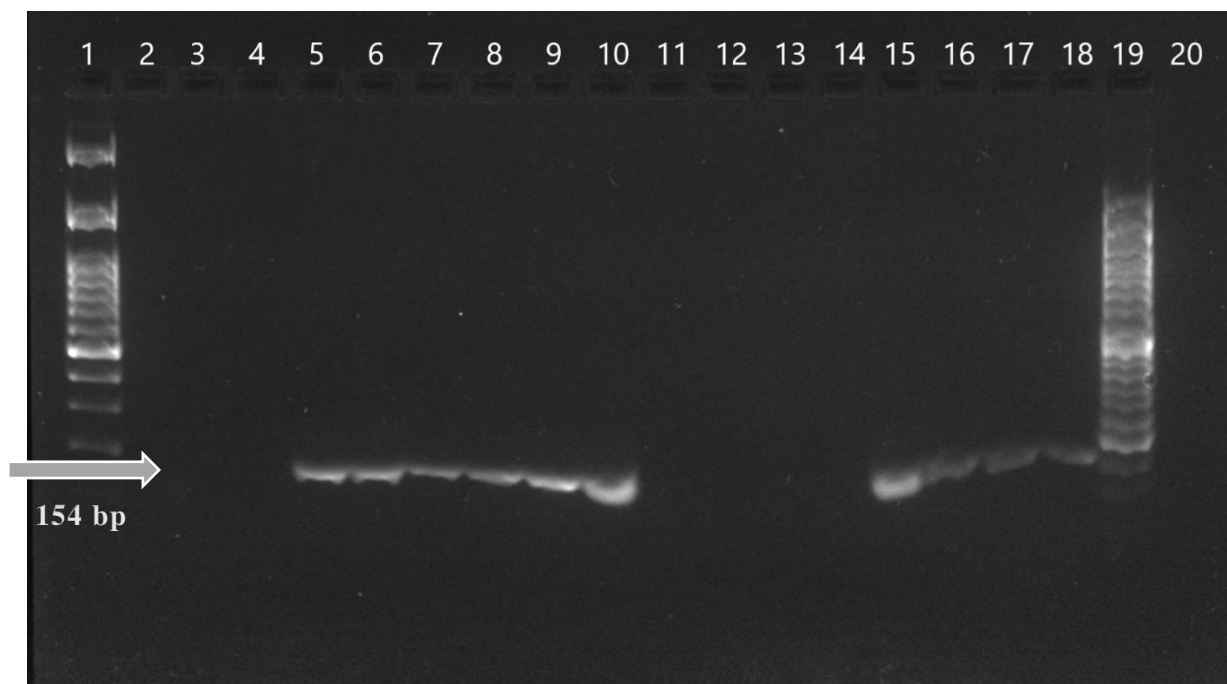
Krivky analýzy tavenia amplikonov sú znázornené na Obrázku 36 (amplifikačné krivky viz. *Príloha 14*). Teplota tavenia amplikonov bola 79,3 °C. Najlepšie sa amplifikovala DNA izolovaná z čerstvých listov levandule a z lyofilizovaných kvetov. Negatívne kontroly boli čisté a neamplifikovali sa. Rovnako sa neamplifikovala DNA izolovaná z levanduľovej silice a modelovej vzorky krému s touto silicou.

Produkty PCR boli nanosené na 1,8% agarózový gél a bola prevedená elektroforéza, zobrazená je na Obrázok 39. Touto metódou bolo potvrdené, že vo vzorke levanduľovej silice a krému s prídavkom tejto silice sa nenachádzala DNA. Zvyšné produkty boli všetky amplifikované a veľkosť týchto produktov bola 154 bp, ako je uvedené v Tabuľke 1.

- | | |
|--|--|
| 1: Negatívna kontrola | 2: Negatívna kontrola |
| 3: Negatívna kontrola | 4: Levandula mrazena 1 |
| 5: Levandula mrazena 2 | 6: Levandula sušená 1 |
| 7: Levandula sušená 2 | 8: Levandula čerstvá list 1 |
| 9: Levandula čerstvá list 2 | 10: Levandula silica 1 |
| 11: Levandula silica 2 | 12: krém + Levandula silica 1 |
| 13: krém + Levandula silica 2 | 14: krém + Levandula sušená 1 |
| 15: krém + Levandula sušená 2 | 16: krém + Levandula sušená + levandula silica 1 |
| 17: krém + Levandula sušená + levandula silica 2 | |



Obrázok 36 – Analýza kriviek tavenia, použité primery LavIFR špecifické pre levanduľu (Bin A: $T_m = 79,3$ °C)



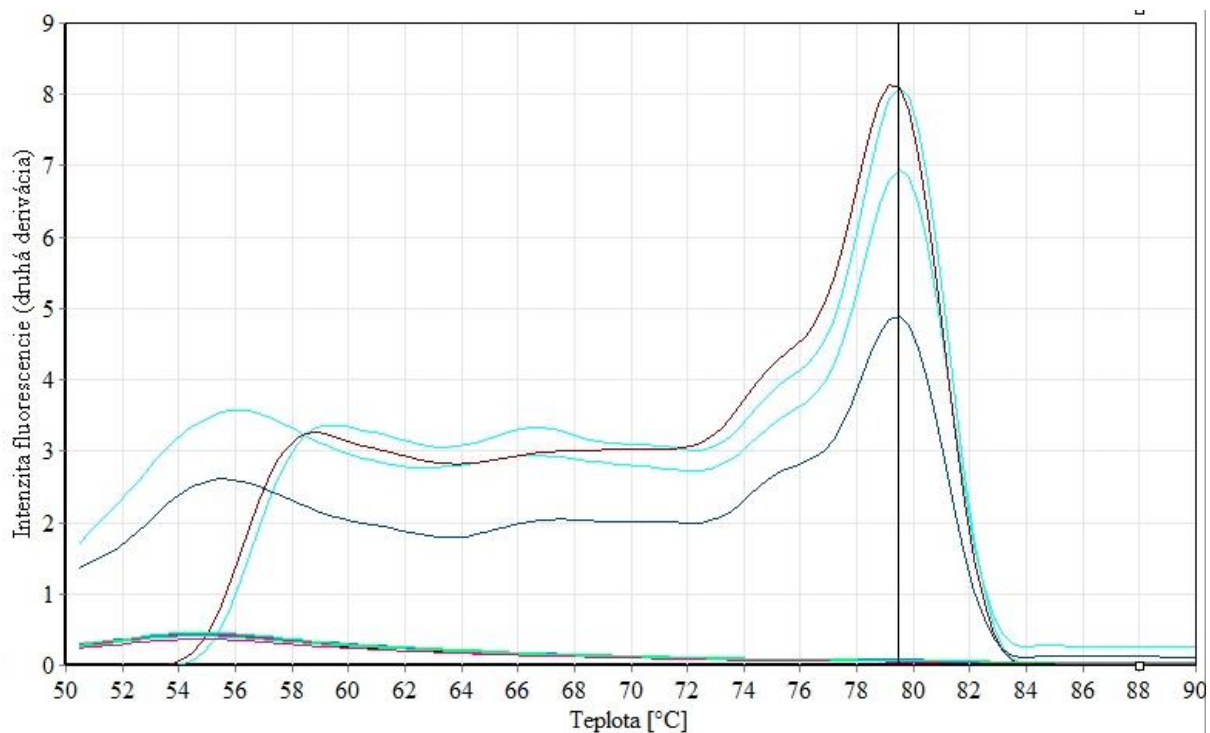
Beh číslo	DNA	PCR produkt
1	DNA štandard 100 bp	
2	Negatívna kontrola 1	-
3	Negatívna kontrola 2	-
4	Negatívna kontrola 3	-
5	Levanduľa mrazená 1	+++
6	Levanduľa mrazená 2	+++
7	Levanduľa sušená 1	++
8	Levanduľa sušená 2	++
9	Levanduľa čerstvá list 1	+++
10	Levanduľa čerstvá list 2	+++
11	Levanduľová silica 1	-
12	Levanduľová silica 2	-
13	Krém s levanduľovou silicou 1	-
14	Krém s levanduľovou silicou 2	-
15	Krém so sušenou levanduľou 1	+++
16	Krém so sušenou levanduľou 2	+
17	Krém so sušenou levanduľou a levanduľovou silicou 1	+
18	Krém so sušenou levanduľou a levanduľovou silicou 2	+
19	DNA štandard 50 bp	
20	x	x

Obrázok 37 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, použitie primerov *Lav1FR* špecifických pre levanduľu (154 bp) (x medzera, - nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

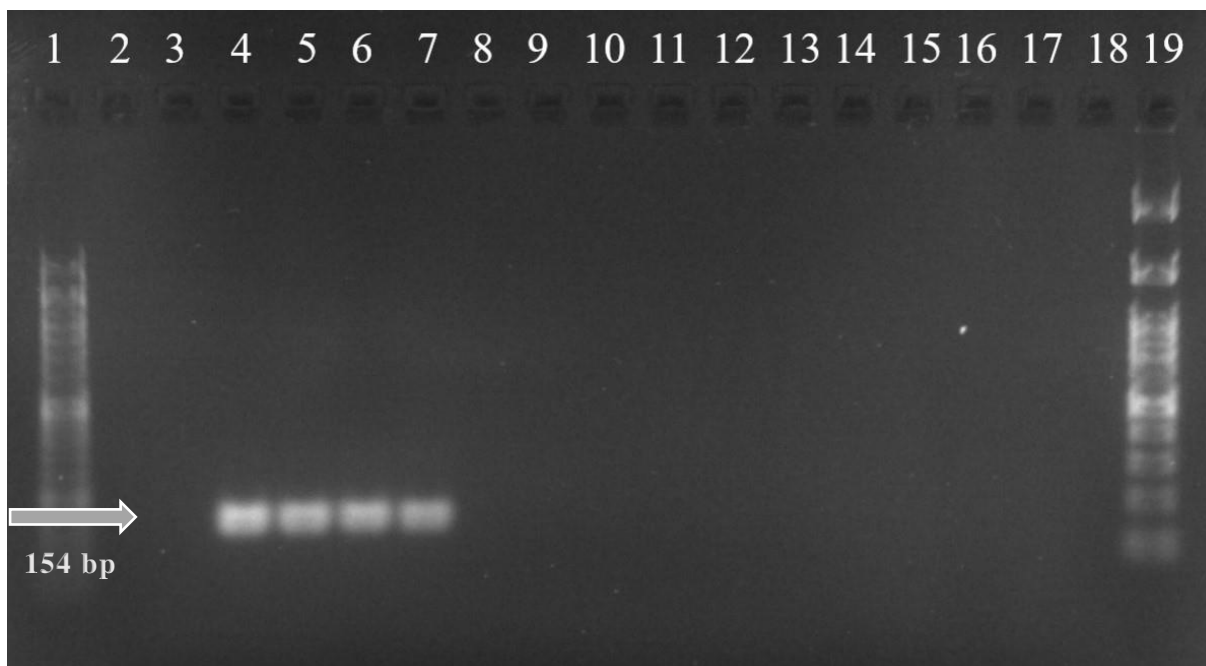
4.4.2 Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z komerčných vzoriek pomocou primerov lav1FR

Boli pripravené PCR zmesi a PCR podľa 3.6.4. Bola skúmaná prítomnosť DNA vo vzorkách izolovanej genetickej informácie z komerčných vzoriek krémov, použitím primerov Lav1FR. Krivky MELT sú uvedené na Obrázku 38 (amplifikačné krivky viz *Príloha 15*). Ako pozitívna kontrola bola použitá sušená a mrazená levanduľa. Amplifikovali sa iba pozitívne kontroly, ani jedna vzorka komerčných produktov, čo naznačuje, že v komerčných výrobkoch sa nenachádzala DNA levandule. To bolo potvrdené aj agarózovou gélovou elektroforézou, zobrazenie aj s popisom je na Obrázku 41.

— 1: Negatívna kontrola — 2: Negatívna kontrola — 3: levanduľa sušená 1 — 4: Levanduľa sušená 2 — 5: Levandula mrazena
— 6: Levanduľa sušená — 8: 28B — 9: 29A — 10: 29B — 11: 30A
— 12: 30B — 13: 31A — 14: 31B



Obrázok 38 – Analýza kriviek tavenia, použité primery Lav1FR špecifické pre levanduľu, vzorky krémov ($T_m = 79,5\text{ }^{\circ}\text{C}$)



Beh číslo	DNA	Označenie	PCR produkt		
1	štandard 50 bp				
2	x		-		
3	negatívna kontrola		-		
4	Rastlinná DNA	Pozitívna kontrola	PK1	+	
5		Pozitívna kontrola	PK2	+	
6		Pozitívna kontrola	LM	+	
7		Pozitívna kontrola	LS	+	
8	Komerčné produkty	Levanduľový krém		28A	-
9				28B	-
10		Levanduľový sen		29A	-
11				29B	-
12		Herbs of Bulgaria face cream		30A	-
13				30B	-
14		Ryor hydratačný krém		31A	-
15				31B	-
16	x		-		
17	negatívna kontrola		-		
18	x		-		
19	štandard 100 bp				

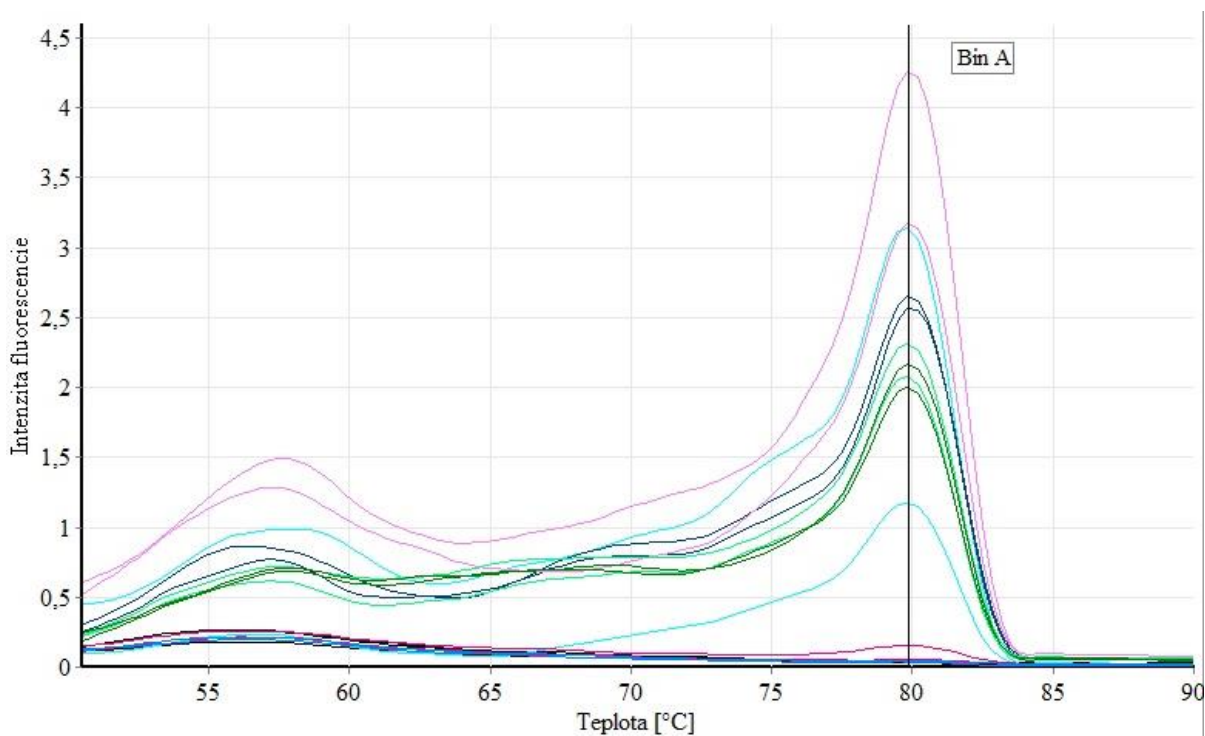
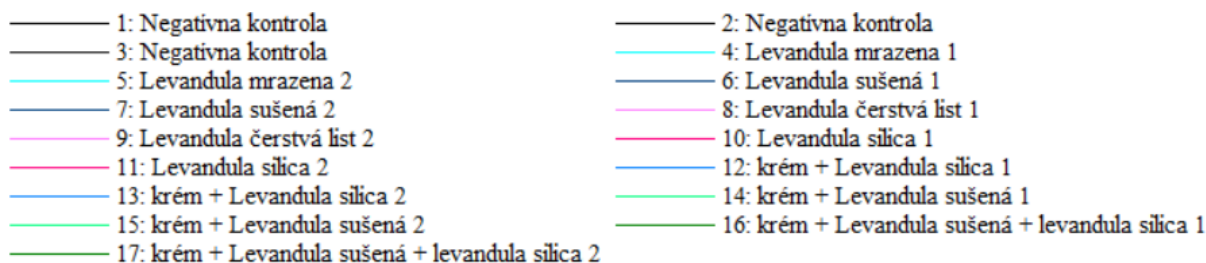
Obrázok 39 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, použitie primerov *Lav1FR* špecifických pre levanduľu (154 bp) (x medzera, - nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

4.4.3 Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z rastlín a modelových vzoriek pomocou primerov Lav1modFR

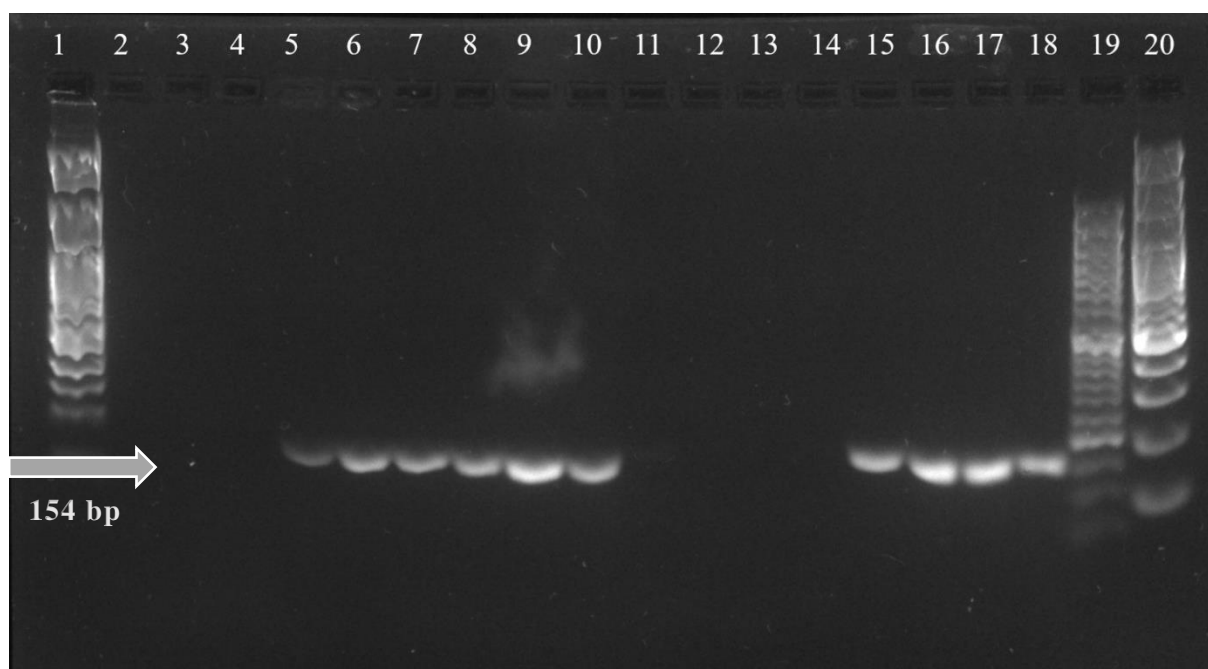
Boli pripravené PCR zmesi a PCR podľa 3.6.4. Bola skúmaná prítomnosť DNA vo vzorkách izolovanej genetickej informácie z levandule a modelových vzoriek krémov s prídavkom sušenej levandule, použitím primerov Lav1modFR.

Teplota tavenia amplikonov bola $T_m = 79,8\text{ }^\circ\text{C}$, krivky tavenia amplikonov sú znázornené na Obrázku 40 (amplifikačné krivky viz. Príloha 16). Najlepšie sa amplifikovala DNA izolovaná z listov čerstvej levandule, neamplifikovala sa DNA izolovaná z levanduľovej silice, ani DNA izolovaná z modelovej vzorky krému s prídavkom tejto silice.

Produkty PCR boli nanosené na 1,8 % agarózový gél a bola prevedená elektroforéza, výsledky elektroforézy sú uvedené na Obrázku 43. Negatívne kontroly boli čisté, potvrdila sa neprítomnosť DNA vo vzorkách levanduľovej silice a modelovom kréme s prídavkom tejto silice. Ostatné produkty sa amplifikovali, ich veľkosť bola 154 bp, čiže sa potvrdila veľkosť, ktorú udáva program PrimerBlast a je uvedená v Tabuľke 1.



Obrázok 40 – Analýza kriviek tavenia, použité primery Lav1modFR špecifické pre levanduľu (Bin A: $T_m = 79,8\text{ }^\circ\text{C}$)



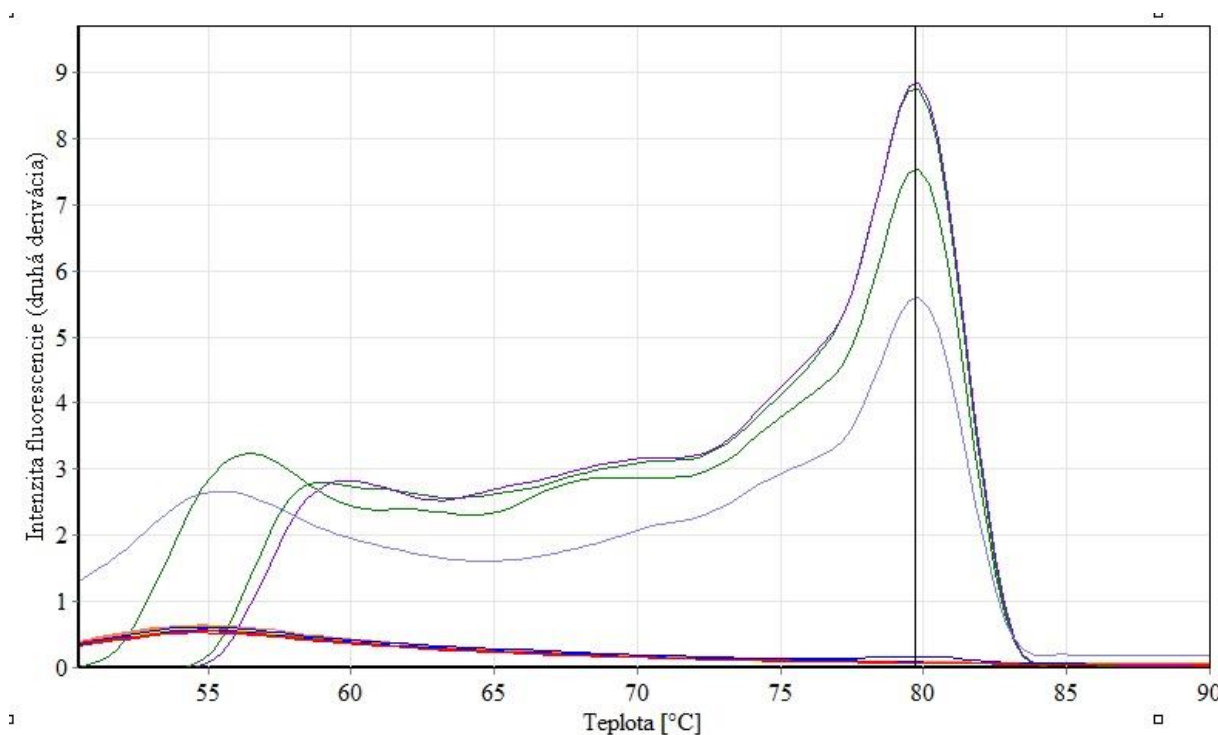
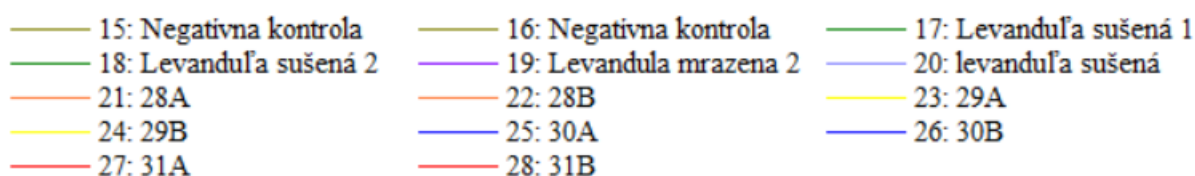
Beh číslo	Vzorky	DNA	PCR produkt
1		DNA štandard 100 bp	
2		Negatívna kontrola 1	-
3		Negatívna kontrola 2	-
4		Negatívna kontrola 3	-
5	Rastlinná DNA	Levanduľa mrazená 1	+
6		Levanduľa mrazená 2	+
7		Levanduľa sušená 1	+
8		Levanduľa sušená 2	+
9		Levanduľa čerstvá list 1	+
10		Levanduľa čerstvá list 2	+
11		Levanduľová silica 1	-
12		Levanduľová silica 2	-
13	Modelové krémy	Krém s levanduľovou silicou 1	-
14		Krém s levanduľovou silicou 2	-
15		Krém so sušenou levanduľou 1	+
16		Krém so sušenou levanduľou 2	+
17		Krém so sušenou levanduľou a levanduľovou silicou 1	+
18		Krém so sušenou levanduľou a levanduľovou silicou 2	+
19		DNA štandard 50 bp	
20		DNA štandard 100 bp	

Obrázok 41 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, použitie primerov *Lav1modFR* špecifických pre levanduľu (154 bp) (x medzera, - nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

4.4.4 Overenie amplifikovateľnosti izolovanej DNA z komerčných vzoriek pomocou primerov Lav1modFR

Bola prevedená PCR podľa 3.6.4. Skúmaná bola prítomnosť DNA vo vzorkách izolovanej genetickej informácie z komerčných vzoriek krémov, použitím primerov Lav1modFR, špecifických pre levanduľu. Krivky tavenia ampikonov sú uvedené na Obrázku 42 (amplifikačné krivky viz. Príloha 17). Ako pozitívna kontrola bola použitá sušená a mrazená levanduľa. Amplifikovali sa iba pozitívne kontroly, ani jedna vzorka komerčných produktov, čo naznačuje, že v komerčných výrobkoch sa nenachádzala genetická informácia levandule. Že sa DNA v komerčných vzorkách nenachádza bolo potvrdené aj agarózovou gélovou elektroforézou, zobrazenie aj s popisom je na Obrázku 45.

Bola prevedená elektroforéza produktov PCR, výsledky sú uvedené na Obrázku 45. Vo vzorkách komerčných produktov neboli detekované žiadne špecifické produkty. Výsledky hodnoty PCR pri použití primerov Lav1FR sa zhodujú s výsledkami PCR pri použití primerov Lav1FR (uvedené v 4.4.2).



Obrázok 42 – Analýza kriviek tavenia, použité primery Lav1modFR špecifické pre levanduľu, vzorky krémov ($T_m = 79,5\text{ °C}$)



Beh číslo	DNA	Označenie	PCR Produkt
1	štandard 50 bp		
2	x		-
3	negatívna kontrola		-
4	Pozitívna kontrola	PK1	+
5	Pozitívna kontrola	PK2	+
6	Levandul'a mrazená	LM	+
7	Levandul'a sušená	LS	+
8	Levandul'ový krém	28A	-
9		28B	-
10	Levandul'ový sen	29A	-
11		29B	-
12	Herbs of Bulgaria face cream	30A	-
13		30B	-
14	Ryor hydratačný krém	31A	-
15		31B	-
16	x		-
17	negatívna kontrola		-
18	x		-
19	DNA štandard 100 bp		

Obrázok 43 – Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, použitie primerov Lav1modFR špecifických pre levandul'u (154 bp) (x medzera, - nedetekované, PCR produkt: + slabej, ++ strednej, +++ silnej intenzity)

4.5 Zhrnutie výsledkov metódy PCR

V Tabuľke 11 a Tabuľke 12 je možné vidieť porovnanie výsledkov analýzy metódou PCR pri primery ITS2, Lim2F/R, Lav1FR a Lav1modFR.

Tabuľka 11 Zhrnutie nameraných výsledkov metódou PCR pre modelové vzorky krémov (+ detekované, - nedetekované, x neanalyzované)

Ozn.	Testované výrobky	Primery Lim2FR		Primery Lav1FR		Primery Lav1modFR	
		PCR	Gél	PCR	Gél	PCR	Gél
1A	Silica červený pomaranč	-	-	x	x	x	x
1B		+	+	x	x	x	x
2A	Silica citrónová tráva	-	-	x	x	x	x
2B		-	-	x	x	x	x
3A	Silica mäta prieporná	+	+	x	x	x	x
3B		-	-	x	x	x	x
4A	Peprno-mätová silica	-	-	x	x	x	x
4B		-	-	x	x	x	x
5A	Pomarančová silica španielská	+	+	x	x	x	x
5B		+	+	x	x	x	x
6A	Mandarinková silica	-	-	x	x	x	x
6B		+	+	x	x	x	x
7A	Grapefruitová silica	-	-	x	x	x	x
7B		-	-	x	x	x	x
9A	Citrónová kôra	+	+	x	x	x	x
9B		+	+	x	x	x	x
11A	Mentha Piperita "citaro"	+	+	x	x	x	x
11B		+	+	x	x	x	x
12A	Mentha pycnanthemum pilosum	-	-	x	x	x	x
12B		+	+	x	x	x	x
13A	Mentha almira strawberry peppermint	-	-	x	x	x	x
13B		-	-	x	x	x	x
14A	Sušená levanduľa	+	+	+	+	+	+
14B		+	+	+	+	+	+
15A	Levanduľová silica	-	-	-	-	-	-
15B		-	-	-	-	-	-

Modelové vzorky krémov vlastnej prípravy

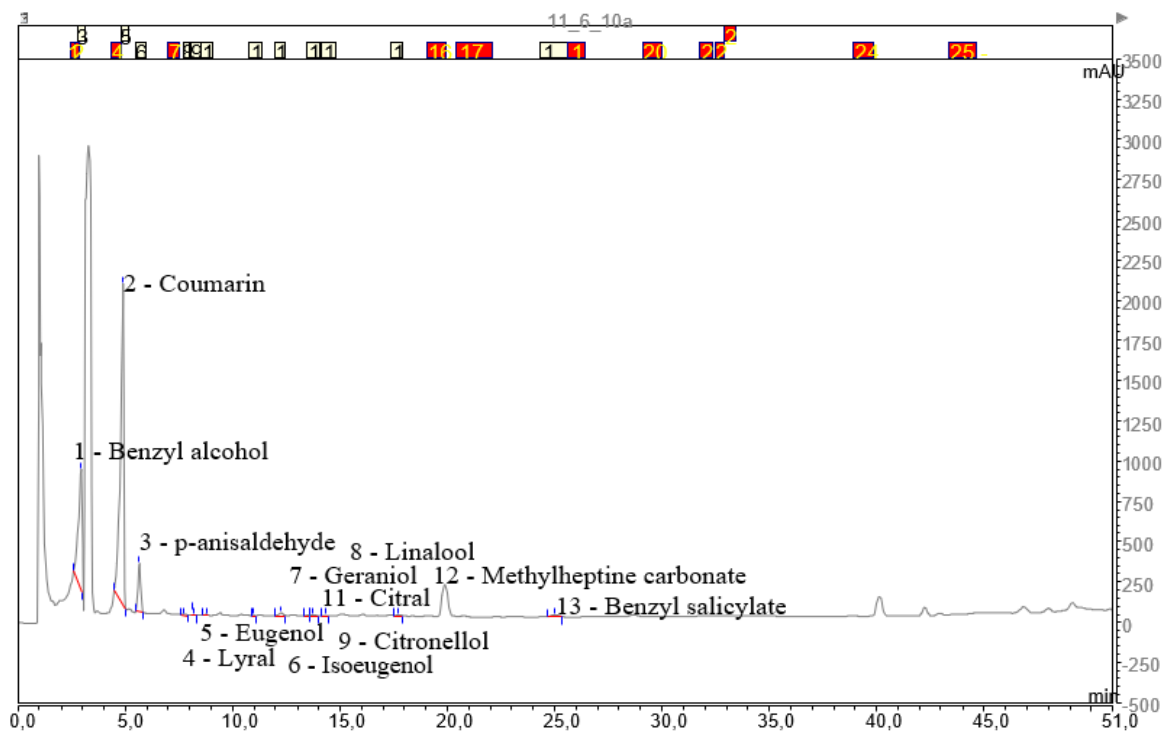
Tabuľka 12 Zhrnutie nameraných výsledkov metódou PCR pre komerčné vzorky krémov (+ detekované, - nedetekované, x neanalyzované)

Ozn.	Testované výrobky	Primery ITS2		Primery Lim2F/R		Primery Lav1FR		Primery Lav1modFR	
		PCR	Gél	PCR	Gél	PCR	Gél	PCR	Gél
17A	Balea handcreme protect	+	+	+	+	x	x	x	x
17B		+	+	+	+	x	x	x	x
18A	Cosmos natural repairing hand protect	+	+	-	-	x	x	x	x
18B		+	+	-	-	x	x	x	x
19A	Konopka's face commage moist	-	-	-	-	x	x	x	x
19B		-	-	-	-	x	x	x	x
20A	Planeta organica natural body scrub	-	-	-	-	x	x	x	x
20B		-	-	+	+	x	x	x	x
21A	N.A.E. shampoo bar	-	-	-	-	x	x	x	x
21B		-	-	-	-	x	x	x	x
22A	Naturalis sugar body scrub	-	-	-	-	x	x	x	x
22B		-	-	-	-	x	x	x	x
23A	Balea sugar scrub	+	+	+	+	x	x	x	x
23B		+	+	+	+	x	x	x	x
24A	Alverde skinfood Bio-limette	+	+	-	-	x	x	x	x
24B		+	+	-	-	x	x	x	x
25A	Alverde pflge-dusche bio-minze	-	-	-	-	x	x	x	x
25B		-	-	-	-	x	x	x	x
26A	Organic shop strawberry body scrub	+	+	x	x	x	x	x	x
26B		+	+	x	x	x	x	x	x
27A	Organic shop strawberry body mousse	+	+	x	x	x	x	x	x
27B		+	+	x	x	x	x	x	x
28A	Levandul'ový krém	+	+	x	x	-	-	-	-
28B		+	+	x	x	-	-	-	-
29A	Levandul'ový sen	+	+	x	x	-	-	-	-
29B		+	+	x	x	-	-	-	-
30A	Herbs of Bulgaria face cream	+	+	x	x	-	-	-	-
30B		+	+	x	x	-	-	-	-
31A	Ryor hydratačný krém	+	+	x	x	-	-	-	-
31B		+	+	x	x	-	-	-	-

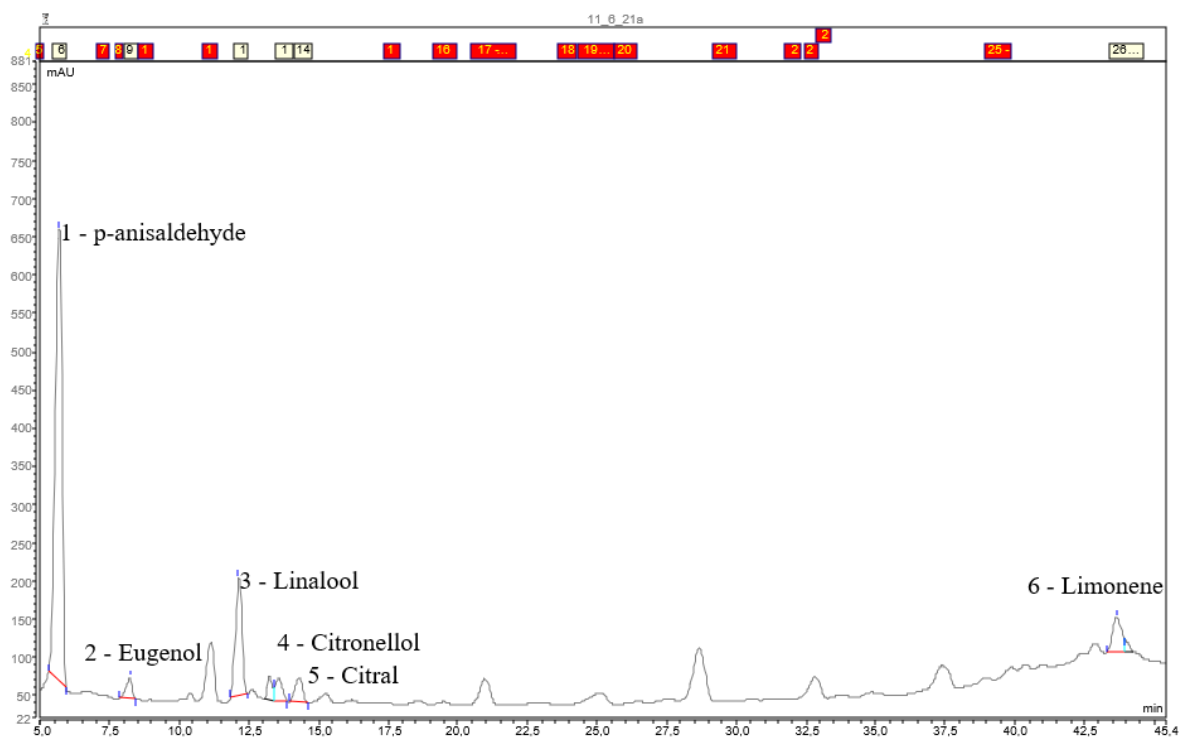
Komerčné produkty

4.6 Stanovenie prítomnosti alergénov metódou HPLC

Obsah alergénov v modelových a komerčných vzorkách kozmetických výrobkov bol analyzovaný pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Postup merania je opísaný v kapitole 3.6.6. Táto metóda bola prevedená ako porovnanie k metóde PCR, ktorou bola stanovovaná prítomnosť limonén syntázy. Prítomnosť vybraných alergénov je uvedená v Tabuľke 13 a Tabuľke 14. Ukážka grafov merania pomocou HPLC je znázornená na Obrázku 44 a Obrázku 45. Z uvedených výsledkov je možné vidieť, že v prípade modelových krémov so silicami bolo nájdené pomerne veľké množstvo alergénov v porovnaní s krémami s obsahom celých rastlinných častí.



Obrázok 454 – Graf merania pomocou metódy HPLC, vzorka modelového krému s prídavkom *Mentha Gentilis Varieta Citrata* "lemon"



Obrázok 445 - Graf merania pomocou metódy HPLC, vzorka komerčného produktu „N.A.E. shampoo bar“

Tabuľka 13 Prehľad prítomných alergénov vo vzorkách analyzovaných pomocou metódy HPLC (1 – Coumarin, 2 – 6-p-anisaldehyde, 3 – Cinnamal, 4 – Lyrál, 5 – Eugenol, 6 – Isoeugenol, 7 – Geraniol, 8 – Linalool, 9 – Citronellol, 10 – Citral, 11 – Methylheptine carbonate, 12 – Amylcinnamyl alcohol, 13 – Lilial, 14 – Limonene), (+ detekované, - nedetekované)

Označenie	Vzorky krémov	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1A	Silica červený pomaranč	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
1B		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
2A	Silica citrónová tráva	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2B		+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
3A	Silica mäta prieporná	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3B		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
4A	Peprno-mätová silica	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
4B		-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
5A	Pomarančová silica španielska	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
5B		-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
6A	Mandarinková silica	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
6B		-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
7A	Grapefruitová silica	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
7B		-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
8A	Silica "Tangerinka"	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
8B		-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
9A	Citrónová kôra	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
9B		-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
10A	Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon"	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10B		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
11A	Mentha Piperita "citaro"	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11B		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12A	Mentha pycnanthemum pilosum	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12B		-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
13A	Mentha almira strawberry peppermint	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
13B		-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14A	Sušená levanduľa	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14B		-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
15A	Levanduľová silica	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
15B		-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
16A	Sušená levanduľa + levanduľová silica	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
16B		-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
17A	Balea handcreme protect	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
17B		-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
18A	Cosmos natural repairing hand protect	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
18B		-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
19A	Konopka's face commage moist	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
19B		-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
20A	Planeta organica natural body scrub	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
20B		-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Tabuľka 14 Prehľad prítomných alergénov vo vzorkách analyzovaných pomocou metódy HPLC (1 – Coumarin, 2 – 6-p-anisaldehyde, 3 – Cinnamal, 4 – Lyrál, 5 – Eugenol, 6 – Isoeugenol, 7 – Geraniol, 8 – Linalool, 9 – Citronello, 10 – Citral, 11 – Methylheptine carbonate, 12 – Amylcinnamyl alcohol, 13 – Liliál, 14 – Limonene), (+ detekované, - nedetekované)

Označenie	Vzorky krémov	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
21A	N.A.E. shampoo bar	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
21B		-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
22A	Naturalis sugar body scrub	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
22B		-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
23A	Balea sugar scrub	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
23B		-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
24A	Alverde skinfood Bio-limette	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
24B		-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
25A	Alverde pflege-dusche bio-minze	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
25B		-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
26A	Organic shop strawberry body scrub	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
26B		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
27A	Organic shop strawberry body mousse	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27B		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28A	Levandul'ový krém	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
28B		-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
29A	Levandul'ový sen	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
29B		+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
30A	Herbs of Bulgaria face cream	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
30B		+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
31A	Ryor hydratačný krém	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
31B		-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-

4.7 Zhrnutie výsledkov

Výsledky analýzy PCR a HPLC vzoriek modelových a komerčných vzoriek sú uvedené v Tabuľke 15, 16 a 17. V prípade vzoriek s obsahom mätovej a citrusovej zložky bola overená prítomnosť génu pre limonén syntázu pre modelové zmesi s pomarančovou silicou, citrónovou kôrou a mäťou piperita citaro. Pomarančová silica je vyrábaná lisovaním pomarančovej kôry, čo vysvetľuje prítomnosť DNA vo vzorke, prítomnosť samotného limonénu bola potvrdená i pomocou HPLC, rovnako ako v prípade citrónovej kôry. Porovnanie medzi detekcie oboch metód v prípade týchto vzoriek nebolo z časových dôvodov prevedené. V prípade modelových zmesí s prídavkom bylín *M. pycnanthemum pilosum* a *M. almira* strawberry peppermint nebola potvrdená prítomnosť génu pre limonén syntázu a nebol nájdený žiaden limonén ani pomocou metódy HPLC. Nie všetky byliny spadajúce do rodu *Mentha* sú teda schopné produkovať limonén, ale tie, ktoré sú schopné limonén produkovať, ho obsahujú iba veľmi malé množstvo, ktoré bolo možné detekovať iba pomocou molekulárne biologických metód. V prípade komerčných vzoriek stojí za zmienku Balea krém na ruky, ktorý obsahoval amplifikovateľnú DNA aj pomocou HPLC detekovateľné množstvo limonénu. To potvrdzuje tvrdenie výrobcu,

že výrobok obsahuje výťažok z Citrus Sinensis. Rovnako je možné potvrdiť z výsledkov PCR prítomnosť Citrus aurantium dulcis – prášku z kôry vo vzorke Balea sugar scrub. Naopak u ostatných vzoriek nebola potvrdená prítomnosť hľadanej DNA vo vzorke, ale boli identifikované sledované alergény pomocou HPLC, čo ukazuje na prídanie aróm do výrobku.

Tabuľka 15 Porovnanie výsledkov analýzy PCR a HPLC pre limonén, vzorky modelových kozmetických výrobkov (+ detekované, - nedetekované)

Ozn.	Testované výrobky	Primery Lim2FR		HPLC	
		PCR	Gél	Linalool	Limonén
1A	Silica červený pomaranč	-	-	+	+
1B		+	+	+	+
2A	Silica citrónová tráva	-	-	-	-
2B		-	-	-	-
3A	Silica mäta prieporná	+	+	+	+
3B		-	-	+	+
4A	Peprno-mätová silica	-	-	-	+
4B		-	-	-	+
5A	Pomarančová silica španielská	+	+	+	+
5B		+	+	+	+
6A	Mandarinková silica	-	-	-	+
6B		+	+	-	+
7A	Grapefruitová silica	-	-	+	+
7B		-	-	+	+
9A	Citrónová kôra	+	+	+	+
9B		+	+	+	+
11A	Mentha Piperita "citaro"	+	+	-	-
11B		+	+	-	-
12A	Mentha pycnanthemum pilosum	-	-	+	-
12B		+	+	+	-
13A	Mentha almira strawberry peppermint	-	-	+	-
13B		-	-	+	-

Modelové vzorky krémov vlastnej prípravy

Tabuľka 16 - Porovnanie výsledkov analýzy PCR a HPLC pre limonén, vzorky modelových kozmetických výrobkov (+ detekované, - nedetekované)

Ozn.	Testované výrobky		Primery Lim2FR		HPLC	
			PCR	Gél	Linalool	Limonén
17A	Balea handcreme protect	Komerčné produkty	+	+	+	+
17B			+	+	+	+
18A	Cosmos natural repairing hand protect		-	-	+	+
18B			-	-	+	+
19A	Konopka´s face commage moist		-	-	+	-
19B			-	-	+	-
20A	Planeta organica natural body scrub		-	-	+	+
20B			+	+	+	+
21A	N.A.E. shampoo bar		-	-	+	+
21B			-	-	+	+
22A	Naturalis sugar body scrub		-	-	+	+
22B			-	-	+	+
23A	Balea sugar scrub		+	+	+	+
23B			+	+	+	+
24A	Alverde skinfood Bio-limette		-	-	+	+
24B			-	-	+	+
25A	Alverde pflge-dusche bio-minze		-	-	+	+
25B			-	-	+	+

Tabuľka 17 - Porovnanie výsledkov analýzy PCR a HPLC pre levanduľu, vzorky modelových a komerčných kozmetických výrobkov (+ detekované, - nedetekované, x neanalyzované)

Ozn.	Testované výrobky		Primery Lim2FR		Primery Lav1FR		Primery Lav1modFR		HPLC		
			PCR	Gél	PCR	Gél	PCR	Gél	Linalool	Limonén	
14A	Sušená levanduľa	Modelové vzorky	+	+	+	+	+	+	+	-	
14B			+	+	+	+	+	+	+	+	-
15A	Levanduľová silica		-	-	-	-	-	-	+	+	
15B			-	-	-	-	-	-	+	+	
16A	Sušená levanduľa + levanduľová silica		+	+	+	+	+	+	+	-	
16B			+	+	+	+	+	+	+	-	
28A	Levanduľový krém		Komerčné vzorky	x	x	-	-	-	-	+	-
28B				x	x	-	-	-	-	+	-
29A	Levanduľový sen			x	x	-	-	-	-	+	+
29B				x	x	-	-	-	-	+	+
30A	Herbs of Bulgaria face cream			x	x	-	-	-	-	+	+
30B				x	x	-	-	-	-	+	+
31A	Ryor hydratačný krém	x		x	-	-	-	-	+	-	
31B		x		x	-	-	-	-	+	-	

V modelových zmesiach s obsahom levandule bola detekovaná prítomnosť DNA v oboch vzorkách s prídavkom levandule, ale nebola detekovaná vo vzorke, kde bola pridaná iba silica. Vo vzorke s levanduľovou silicou bola pomocou HPLC, oproti ostatným dvom modelovým

zmesiam, potvrdená aj prítomnosť limonénu. Vo všetkých komerčných vzorkách s prídavkom levandule bola detekovaná iba prítomnosť alergénov pomocou HPLC, ani v jednom prípade nebola dokázaná prítomnosť rastlinnej zložky metódou PCR, čo tiež svedčí iba o použití vonných silíc v týchto vzorkách.

5 ZÁVER

Bakalárska práca bola zameraná na analýzu kozmetických výrobkov obsahujúcich prírodné zložky a stanovenie ich autenticity.

Bola izolovaná DNA z mäty, citrónovej kôry, levandule, kozmetických produktov vlastnej výroby a komerčne dostupných kozmetických produktov obsahujúcich zložku zo spomenutých rastlín. Pre izoláciu bol použitý komerčný izolačný kit EliGene pre izoláciu rastlinnej DNA.

Amplifikovateľnosť izolovanej DNA bola overená pomocou primerov špecifických pre ITS2 región rastlín. Bola amplifikovaná DNA zo všetkých rastlinných zložiek, aj DNA izolovaná z modelových vzoriek krémov, s prídavkom bylenných zložiek. Z komerčných vzoriek sa prítomnosť rastlinnej DNA nepotvrdila vo vzorkách „*Dr. Konopka's Hydratačný pleťový peeling (Face Gommage Moisturizing)*“, „*Alverde sprchový gél s mäťou a bergamotom*“, „*N.A.E. – tuhý šampón Equilibrio*“, „*Planeta organica – telový peeling C + citrón*“ a „*Naturalis - Cukrový telový scrub limetka a mäta*“.

Vo všetkých ostatných bola overená prítomnosť rastlinnej DNA, detekované PCR produkty mali dĺžku amplikonov 500 bp.

Ďalej bola metódou PCR dokázaná prítomnosť génu pre limonén syntázu, pre dokázanie limonénu, ako jedného z najviac zastúpených alergénov vo výrobkoch s obsahom citrusov, mäty a levandule. Pre stanovenie boli použité primery Lim2F/R. Veľkosť produktov zistená agarózovou gélovou elektroforézou bola 122 bp. Výsledky stanovovania limonénu metódou PCR boli porovnané s výsledkami získanými metódou HPLC.

Vzorky s obsahom levandule boli stanovované pomocou dvoch primerov – Lav1FR a Lav1modFR. Dosiahnuté výsledky sa v prípade oboch primerov príliš nelíšia, preto nie je možné určiť, ktoré z primerov sú vhodnejšie pre použitie. Tieto primery boli použité aj pre analýzu modelových a komerčných produktov s obsahom levandule. Pre modelové produkty bola prítomnosť levandule potvrdená, veľkosť amplikonov DNA bola 155 bp pre oba primery. Pre komerčné vzorky sa prítomnosť levandule nepotvrdila.

Obecne platí, že vo výrobkoch, v ktorých nebola detekovaná prítomnosť rastlinnej matrice pomocou metódy PCR, bola detekovaná prítomnosť alergénov metódou HPLC. To svedčí o pridaní rastlinných silíc do vybraných vzoriek. Ak bola detekovaná rastlinná matrica pomocou metódy PCR, nebola detekovaná prítomnosť alergénov pomocou metódy HPLC, čo svedčí o použití rastlinných častí vo vybraných vzorkách.

6 ZDROJE

- [1] FEŘTEKOVÁ, V., O. FEŘTEK, P. STRÁNSKÝ, Z. ŠEDIVÝ a D. ŠRÁMEK. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 3. rozš. vyd. Praha: Maxdorf, 2000. ISBN 80-859-1219-8.
- [2] CHAUDHRI, S. K. a N.K. JAIN. History of cosmetics. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2009, 3(July-September), 164-167. ISSN 0973-8398. Dostupné z: doi:10.22377/ajp.v3i3.260
- [3] MILLIKAN, Larry E. Cosmetology, cosmetics, cosmeceuticals: definitions and regulations. *Clinics in Dermatology*. 2001, 19(4), 371-374. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/S0738-081X(01)00195-X
- [4] COSMOS-standard AISBL. COSMOS-standard. Cosmetics Organic and Natural Standard. Verze 3.1. Publikováno 1. 6. 2020. Dostupné z: https://a7e08fa4-7e84-472f86dd95a19f777744.filesusr.com/ugd/0bbe4a_7af6a7f98e7f4a21a429ea27863d0da5.pdf
- [5] ORTH, D. S. Handbook of cosmetic microbiology. 1. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. Cosmetic science and technology series, v. 12. ISBN 08-247-9012-X
- [6] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 22311, Limonene; [2021-06-18]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Limonene>
- [7] FastGene DNA Ladder [online]. Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o., [cit. 2021-7-16]. Dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/produkt-fastgene-dnaladder.html?page=faq#tabs>
- [8] GALLIS, Hannah E., J. CEES VAN MILTENBURG a Harry A. J. OONK. Polymorphism of mixtures of enantiomers: A thermodynamic study of mixtures of D- and L-limonene. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2(24), 5619-5623. ISSN 14639076. Dostupné z: doi:10.1039/b005603k
- [9] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 22311, Linalool; [2021-07-18]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linalool>
- [10] LETIZIA, C.S, J COCCHIARA, J LALKO a A.M API. Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*. 2003, 41(7). ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/S0278-6915(03)00015-2
- [11] European Commission [online]. Brusel: European Commission, 2009 [cit. 2021-07-19]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/legislation_en
- [12] Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský [online]. Brno: Ministerstvo zemědělství, 2009 [cit. 2021-07-19]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/legislativa/legislativa-cr/pripravky-na-ochranurostlin/100060144.html>

- [13]KOČÁREK, Eduard. *Biologie člověka*. Praha: Scientia, 2010. Biologie pro gymnázia. ISBN 978-80-86960-47-0.
- [14]MICHALUN, M. Varinia a Joseph C. DINARDO. *Milady skin care and cosmetic ingredients dictionary*. Fourth edition. Clifton Park, NJ: Cengage Learning, [2015]. ISBN 978-1285060798.
- [15]ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003. ISBN 978-80-86960-23-4.
- [16]VARMA, A., et al. Plant genomic DNA isolation: *An art or a science*. *Biotechnology Journal* [online]. 2007, 2(3), 386-392 [cit. 2021-04-07]. DOI: 10.1002/biot.200600195. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200600195>
- [17]TAN, Siun Chee a Beow Chin YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, **2009**, 1-10. ISSN 1110-7243. Dostupné z: [doi:10.1155/2009/574398](https://doi.org/10.1155/2009/574398)
- [18]RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science*. 2013, 36(15), 2472-2485. ISSN 16159306. Dostupné z: [doi:10.1002/jssc.201300331](https://doi.org/10.1002/jssc.201300331)
- [19]KITNER, Miloslav. Odběr a uchovávání vzorků pro extrakci DNA [prezentace]. Olomouc: Katedra botaniky PřF UP, 2014, 67 s. Dostupné z: <http://www.moloch.upol.cz/uploads/vyukovy-portal/molek-2-odbe-r-vzorku-extrakcedna.pdf>
- [20]BRABEC, Viktor. Izolace genomové DNA ze savčích buněk, stanovení koncentrace DNA pomocí absorpční spektrofotometrie: KBF/PZLM Laboratorní cvičení 4. Olomouc: Katedra biofyziky PřF UPOL, 2017, 6 s. Dostupné z: http://biofyzika.upol.cz/userfiles/file/4_Izolace%20genomov%C3%A9%20DNA.pdf
- [21]ELKINS, Kelly M. DNA Extraction. *Forensic DNA Biology*. Elsevier, 2013, 39-52. ISBN 9780123945853. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-394585-3.00004-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394585-3.00004-3)
- [22]CARVALHO, Joana, Gema PUERTAS, João GASPARGAS, et al. Highly efficient DNA extraction and purification from olive oil on a washable and reusable miniaturized device. *Analytica Chimica Acta*. 2018, **1020**, 30-40. ISSN 00032670. Dostupné z: [doi:10.1016/j.aca.2018.02.079](https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.079)
- [23]PATRINOS, George P, Wilhelm ANSORGE a Phillip B. DANIELSON. *Molecular Diagnostics*. 3. Academic Press, 2017. ISBN 978-0-12-802971-8. Dostupné z: [doi:10.1016/C2014-0-03451-X](https://doi.org/10.1016/C2014-0-03451-X)
- [24]BUTLER, John M. DNA Extraction Methods. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*. Elsevier, 2012, 2012, , 29-47. ISBN 9780123745132. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-374513-2.00002-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374513-2.00002-6)
- [25]ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. První. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.

- [26] NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer: V1.0 User Manual. Wilmington: Thermo Fisher Scientific Inc., 2009, 97 s. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>
- [27] Zhang, Jinfa & Mcd, James & Stewart,. (2000). Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. *The Journal of Cotton Science*. 4. 193-201.
- [28] *Materials and Methods*, 2012. 2. ISSN 2329-5139. Dostupné také z: <http://www.labome.com/method/Current-PCR-Methods.html>
- [29] VALONES, Marcela Agne Alves, Rafael Lima GUIMARÃES, Lucas André Cavalcanti BRANDÃO, Paulo Roberto Eleutério de SOUZA, Alessandra de Albuquerque Tavares CARVALHO a Sergio CROVELA, 2009. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(1), 1-11. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi:10.1590/S1517-83822009000100001
- [30] DUBERNET, Ségolène, Nathalie DESMASURES a Micheline GUÉGUEN, 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 214(2), 271-275. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11358.x
- [31] Primer-BLAST: A tool for finding specific primers. NCBI: National Center for Biotechnology Information [online]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine [cit. 2021-07-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- [32] AU - LORENZ T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *JoVE* 2012:e3998.
- [33] PRŮŠA, Richard, Jan LÁNY, Jan VEJVALKA, Václav KARGER a Karel KOTAŠKA. Multimediální učebnice DNA diagnostiky: Určeno pro studenty lékařských fakult [online]. 1. vydání. Praha: 2. lékařská fakulta UK, 1998 [cit. 2021-03-28]. Dostupné z: <http://kolweb.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/>
- [34] SIGMA-ALDRICH CO. QPCR Technical Guide. Sigma-Aldrich, 2008, 42 s. Dostupné z: <https://www.gene-quantification.de/SIAL-qPCR-Technical-Guide.pdf>
- [35] QPCR: Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR). VŠCHT: Ústav mléka, tuků a kosmetiky [online]. Praha: VŠCHT UMTK, 2016 [cit. 2021-06-9]. Dostupné z: <http://umtk.vscht.cz/miniatlas-vad/metody/qpcr/>
- [36] TRACHTOVÁ, Š. Praktikum z molekulární biotechnologie: Teoretické podklady – úloha č. 4. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ZS 2014–2015.
- [37] DRABIK, A., A. BODZOŃ-KUŁAKOWSKA a J. SILBERRING. Gel Electrophoresis. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*. Elsevier, 2016, 2016, 115-143. ISBN 9780444636881. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63688-1.00007-0

- [38]SAMBROOK, Joseph a David W. RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory guide*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 978-0-87969-577-4.
- [39]ARAKI, Choji. Structure of the Agarose Constituent of Agar-agar. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1956, **29**(4), 543-544. ISSN 0009-2673. Dostupné z: doi:10.1246/bcsj.29.543
- [40]EFENDI, Ferry, Retno HANDAJANI a Nursalam NURSALAM. Searching for the best agarose candidate from genus Gracilaria, Eucheuma, Gelidium and local brands. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015, **5**(10), 865-869. ISSN 22211691. Dostupné z: doi:10.1016/j.apjtb.2015.06.009
- [41]COUFAL, Pavel. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova [online]. Praha [cit. 2020-07-14]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [42]SMITH, Clare. Disadvantages & Advantages of an HPLC. Sciencing [online]. Santa Monica: Leaf Group Media, 2020 [cit. 2021-05-14]. Dostupné z: <https://sciencing.com/disadvantages-advantages-hplc-5911530.html>
- [43]JANDERA, Pavel a Jaroslav CHURÁČEK. Gradient elution in column liquid chromatography: theory and practice. Amsterdam: Elsevier, 1985. Journal of chromatography library. ISBN 04-444-2124-6. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=0WfYjrb2VgsC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [44]PARRIS, N. A. *Instrumental liquid chromatography: a practical manual on high-performance liquid chromatographic methods*. 2nd completely rev. ed. Amsterdam: Elsevier, 1984. ISBN 04-444-2061-4.
- [45]SNYDER, Lloyd, Joseph GLAJCH a J. KIRKLAND. Practical HPLC method development. 2ND ED. New York: WILEY, 1997. ISBN 9781118592014.
- [46]EliGene® Plant DNA Isolation Kit: Návod k použití. Brno-Židenice: ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o., 2021, 8 s. Dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/produkteligene-plant-dna-isolation-extraction-kit.html>
- [47]ROMANOVSKÁ, D.; FIALOVÁ, L.; MÁROVÁ, I. *Newly designed primers targeting limonene synthase*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, Special Issue:European Biotechnology Congress 2020. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 35. Prague: Taylor and Francis, 2021. p. 119-119. ISBN: 1310-2818. ISSN: 1314-3530.
- [48]SOARES, Sónia, Liliana GRAZINA, Joana COSTA, Joana S. AMARAL, Maria B.P.P. OLIVEIRA a Isabel MAFRA. Botanical authentication of lavender (*Lavandula* spp.) honey by a novel DNA-barcoding approach coupled to high resolution melting analysis. *Food Control*. 2018, 86(47), 367-373. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2017.11.046

- [49]CHEN, Shilin, Hui YAO, Jianping HAN, et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE*. 2010, **5**(1). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0008613
- [50]VILLA, C., R. GAMBARO, E. MARIANI a S. DORATO. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007, 44(3), 755-762. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2007.03.020

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

HPLC	High-Performance Liquid Chromatography – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
PCR	Polymerase Chain Reaction – polymerázová reťazová reakcia
PK	Pozitívna kontrola
NK	Nukleova kyselina
UV	UltraViolet – ultrafialový
UV/VIS	Ultrafialová a viditeľná spektroskopia
bp	base pair – počet párov báz

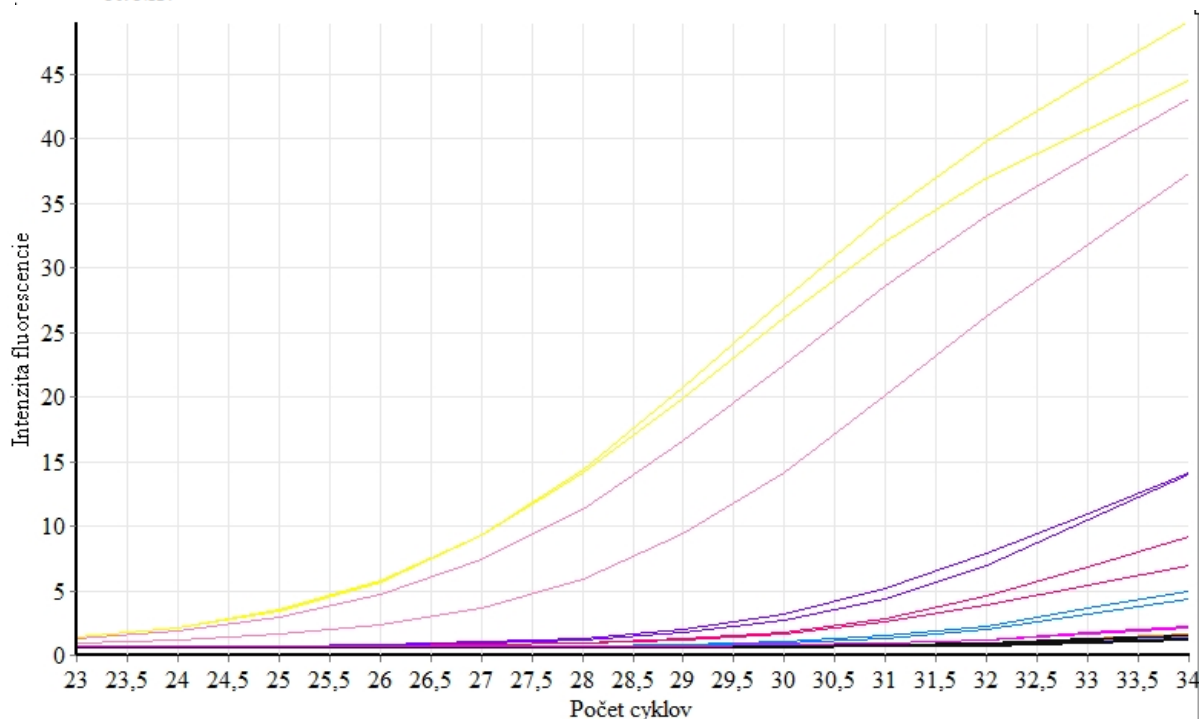
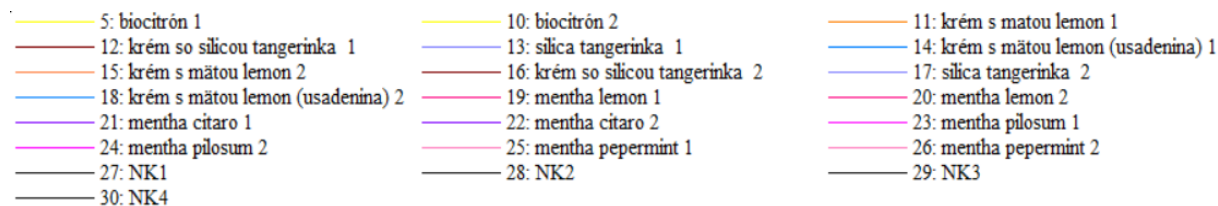
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV

A	absorbancia
C	koncentrácia roztoku
T _m	teplota tavenia

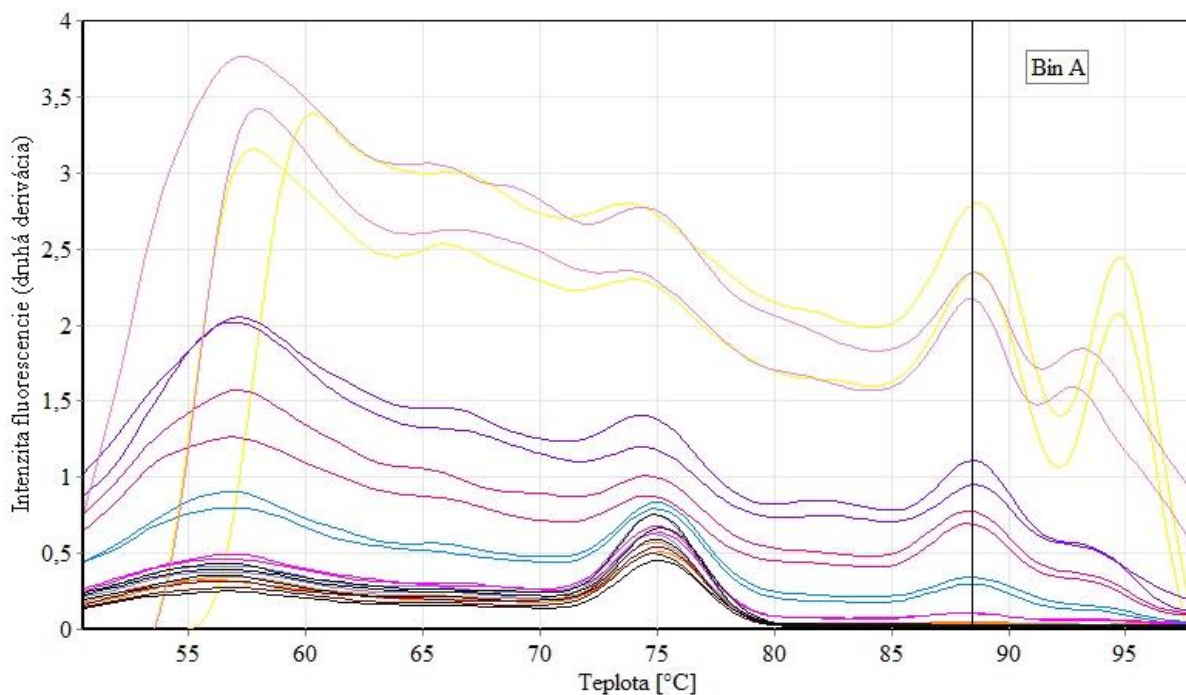
9 ZOZNAM PRÍLOH

- Príloha 1 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA z rastlín pri použití primerov ITS2
- Príloha 2 - Analýza krivky tavenia, DNA izolovaná z rastlín, primery ITS2 ($T_m = 88,5\text{ °C}$)
- Príloha 3 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA z rastlín, primery ITS2
- Príloha 4 - Analýza kriviek tavenia, DNA izolovaná z rastlín, primery ITS2 ($T_m = 88,1\text{ °C}$)
- Príloha 5 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA z modelových a komerčných kozmetických výrobkov pri použití primerov ITS2, vzorky 1A -21B
- Príloha 6 - Analýza kriviek tavenia DNA izolovanej z modelových a komerčných kozmetických výrobkov, primery ITS2, vzorky 1A – 21B (Bin A: $T_m = 88\text{ °C}$, Bin B: $T_m = 82,5\text{ °C}$)
- Príloha 7 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA z modelových a komerčných kozmetických výrobkov pri použití primerov ITS2, vzorky 22A - 31B
- Príloha 8 - Analýza kriviek tavenia, DNA izolovaná z modelových a komerčných kozmetických produktov, primery ITS2, vzorky 22A – 31B (Bin A: $T_m = 88\text{ °C}$, Bin B: $T_m = 82\text{ °C}$)
- Príloha 9 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov ITS2, vzorky DNA modelových a komerčných kozmetických výrobkov izolované zo sedimentu po centrifugácii
- Príloha 10 – Analýza krivky tavenia izolovanej DNA pri použití primerov ITS2, vzorky DNA modelových a komerčných kozmetických výrobkov izolované zo sedimentu po centrifugácii (Bin A $T_m = 88\text{ °C}$, Bin B: $T_m = 82\text{ °C}$)
- Príloha 11 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lim2F/R, vzorky izolovanej DNA z levandule, uvedené v Tabuľka 6 a Tabuľka 8, analýza kriviek tavenia uvedená v kapitole 4.3.1.
- Príloha 12 -Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lim2F/R, vzorky 1A až 21B, izolovaná DNA z krémov. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA izolovaná z kôry biocitróna
- Príloha 13 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lim2F/R, vzorky 22A – 31B, izolovaná DNA z krémov. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA izolovaná z kôry biocitróna
- Príloha 14 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lav1FR, vzorky bylín a modelové vzorky krémov
- Príloha 15 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lav1FR, vzorky komerčných krémov
- Príloha 16 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lav1modFR, vzorky bylín a modelové vzorky krémov
- Príloha 17 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lav1modFR, vzorky komerčných krémov

10 PRÍLOHY

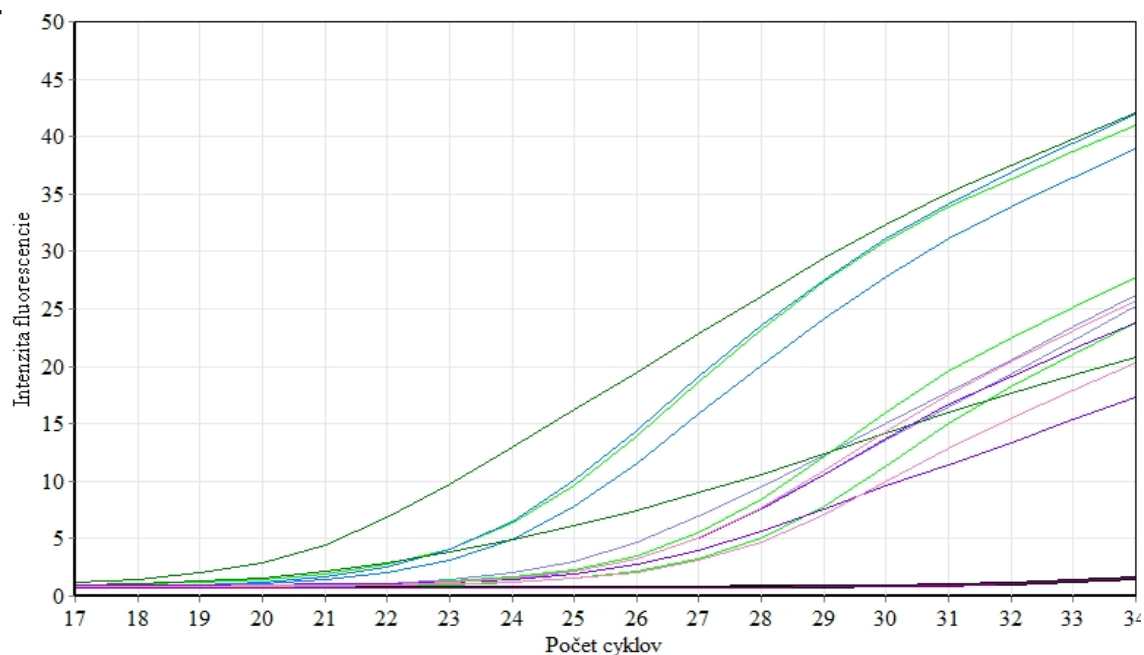


Príloha 1 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA z rastlín pri použití primerov ITS2

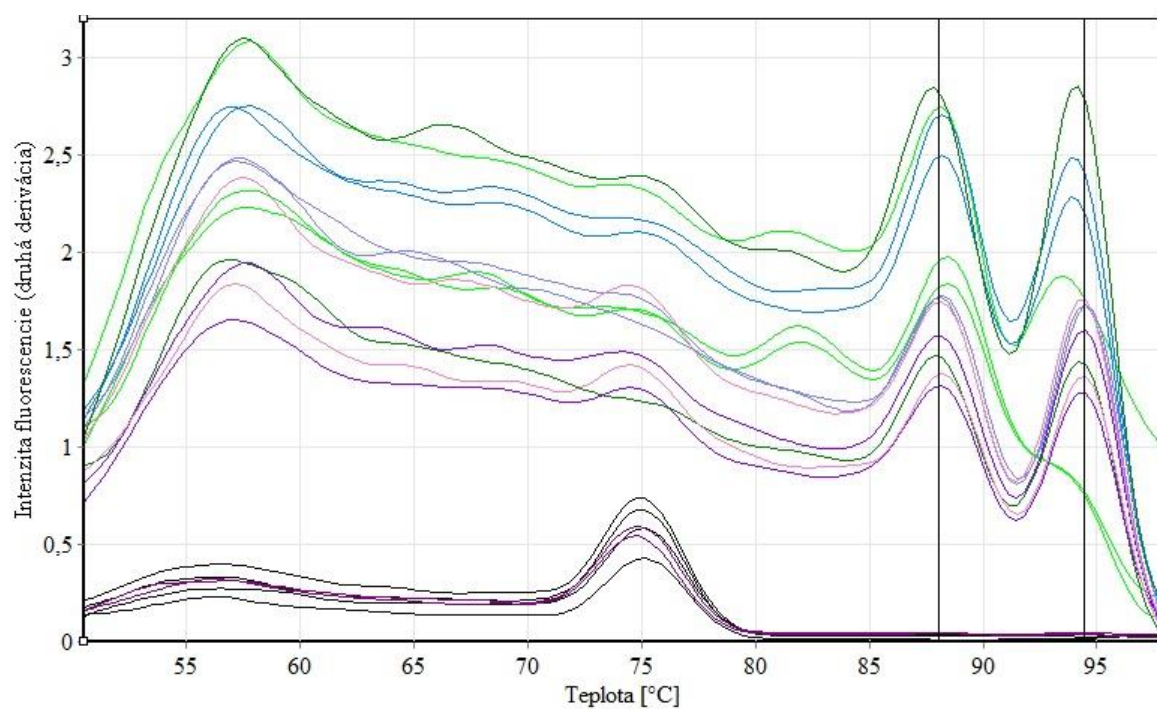


Príloha 2 - Analýza krivky tavenia, DNA izolovaná z rastlín, primery ITS2 ($T_m = 88,5\text{ }^{\circ}\text{C}$)

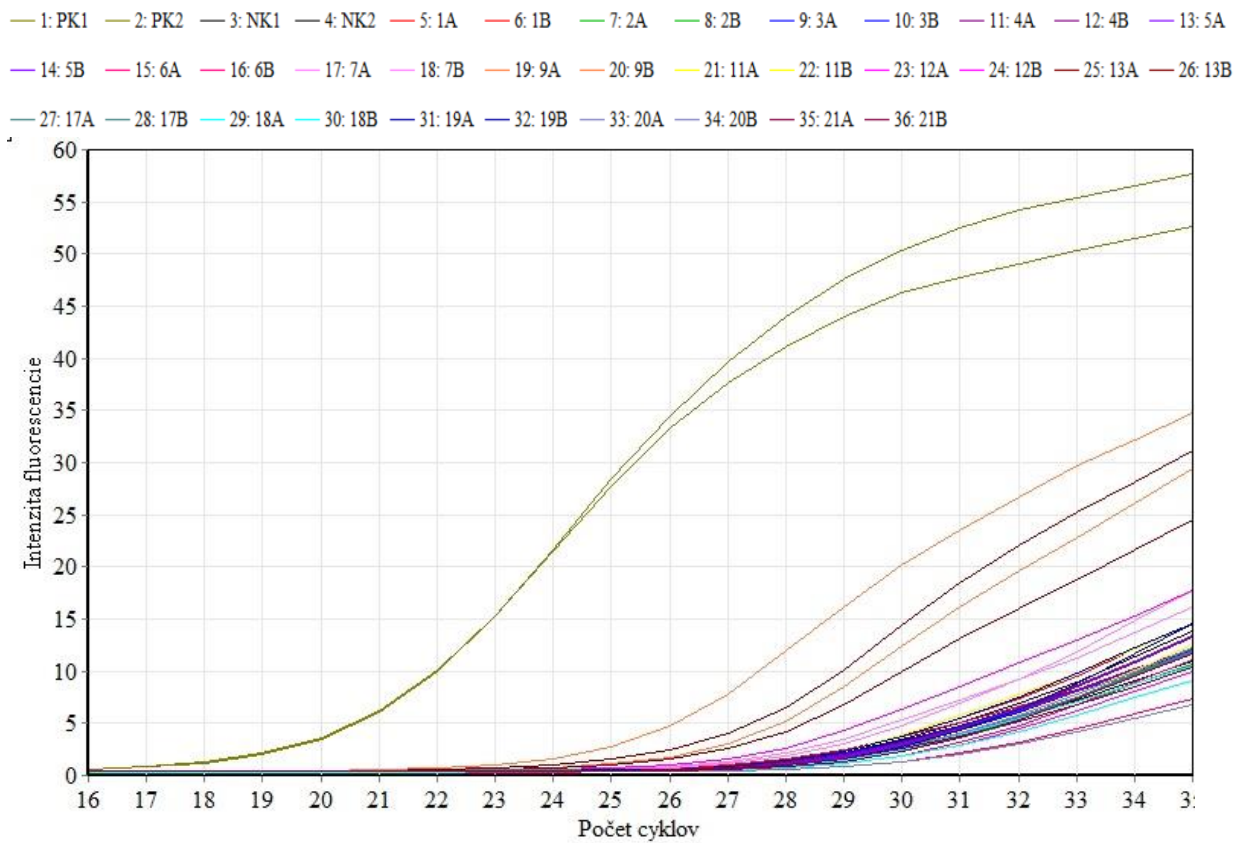
- | | |
|--|--|
| 1: NK1 | 2: NK2 |
| 3: NK3 | 4: NK4 |
| 11: mentha citaro čerstvá 1 | 12: mentha citaro čerstvá 2 |
| 13: mentha citaro čerstvá 3 | 14: levanduľa mrazená 1 |
| 15: levanduľa mrazená 2 | 16: levandula sušená 1 |
| 17: levanduľa sušená 2 | 18: levandula čerstvá - list 1 |
| 19: levanduľa čerstvá - list 2 | 20: levanduľová silica 1 |
| 21: levanduľová silica 2 | 24: krém + levanduľa sušená 1 |
| 25: krém + levanduľa sušená 2 | 26: krém + levanduľa sušená + levanduľová silica 1 |
| 27: krém + levanduľa sušená + levanduľová silica 2 | |



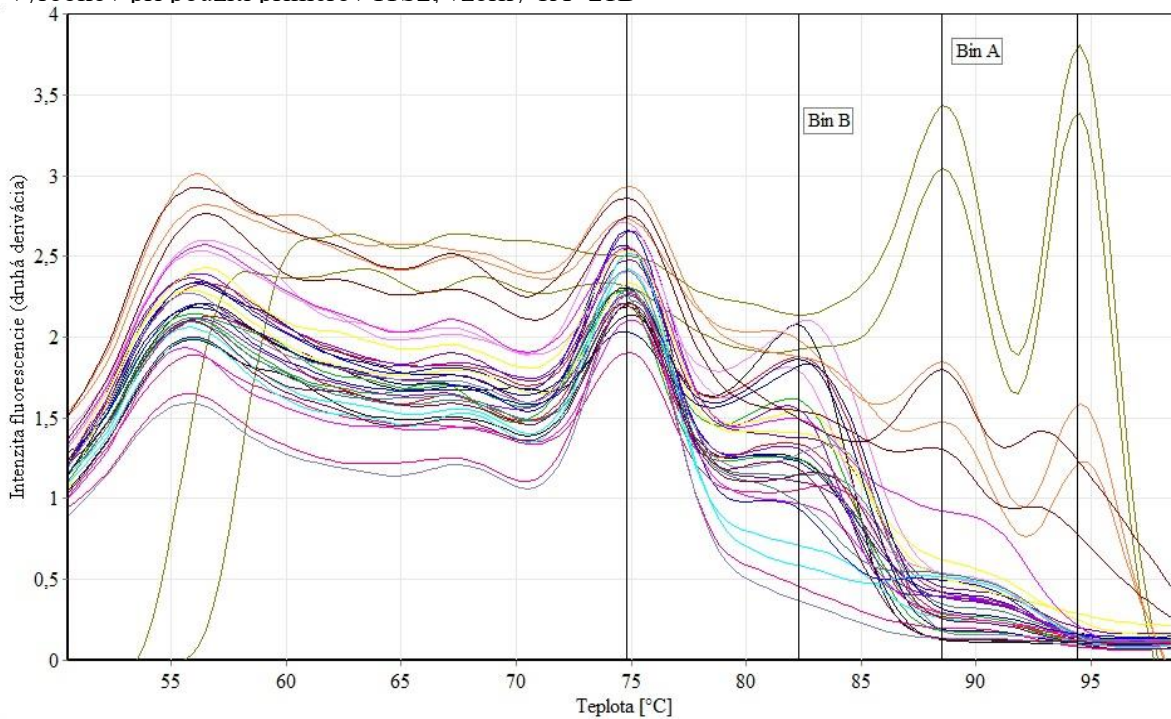
Príloha 3 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA z rastlín, primery ITS2



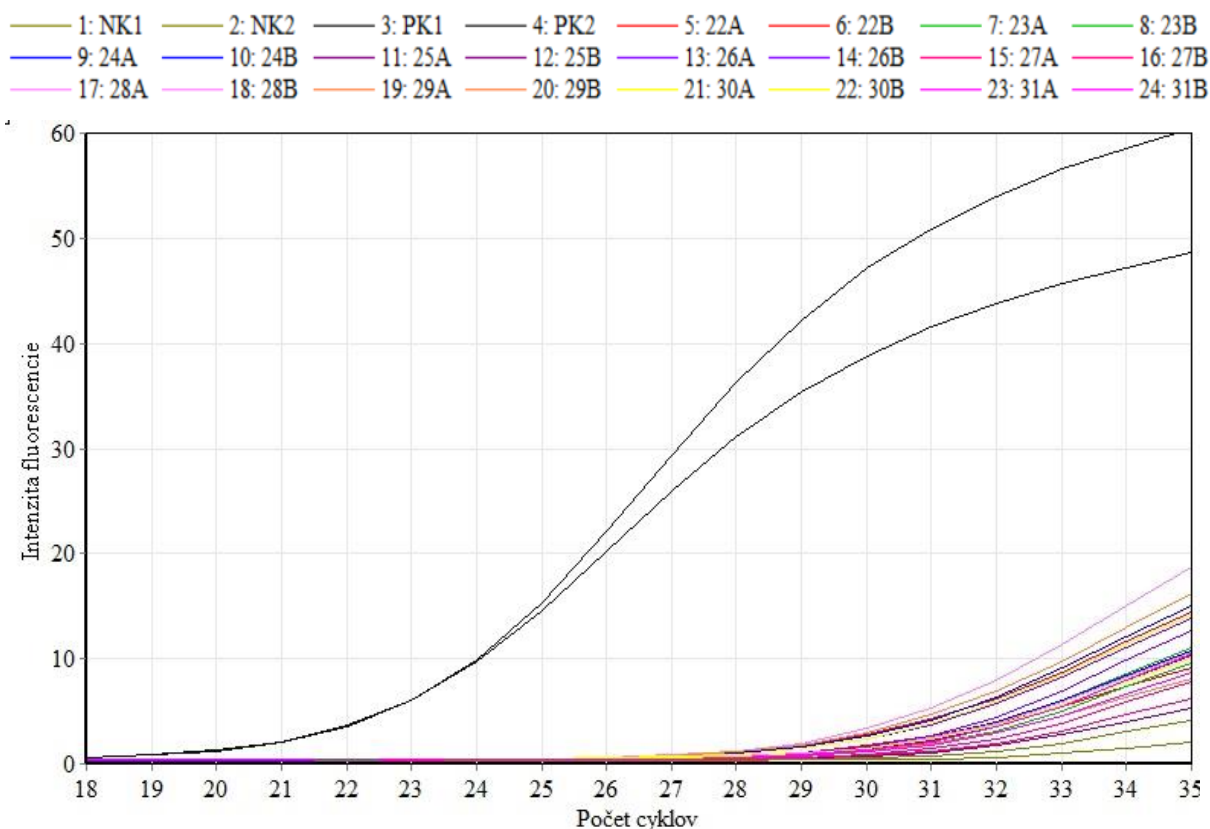
Príloha 4 - Analýza kriviek tavenia, DNA izolovaná z rastlín, primery ITS2 ($T_m = 88,1 \text{ } ^\circ\text{C}$)



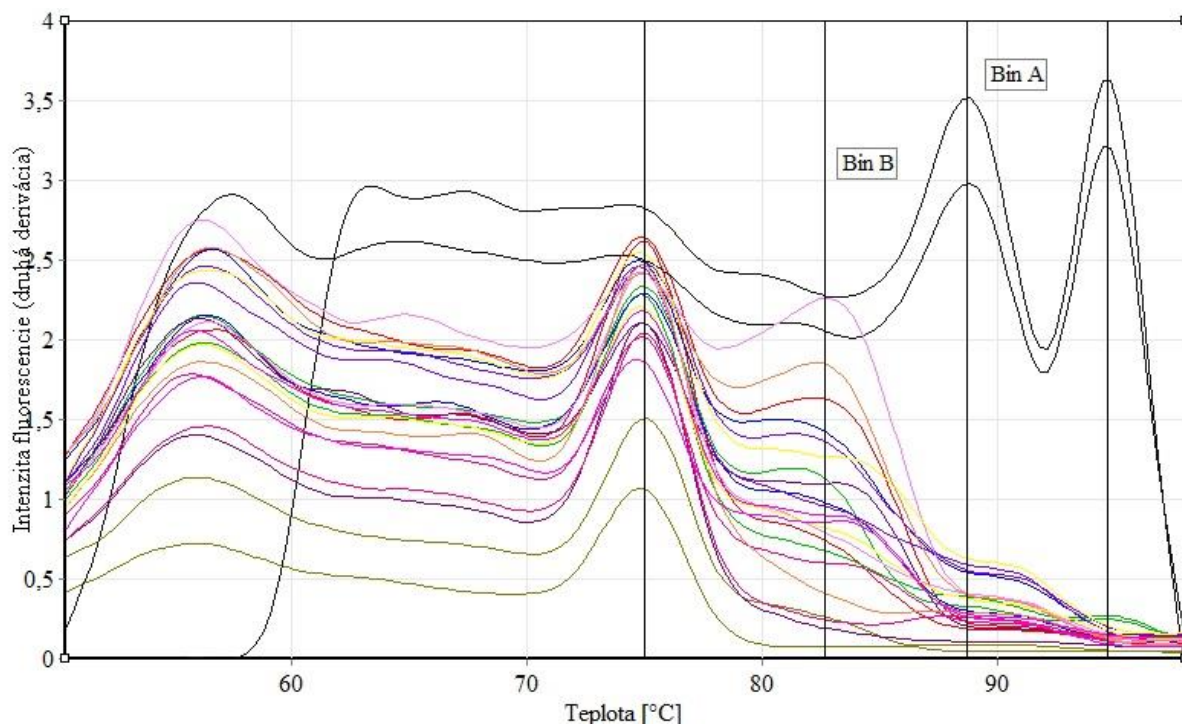
Príloha 5 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA z modelových a komerčných kozmetických výrobkov pri použití primerov ITS2, vzorky 1A -21B



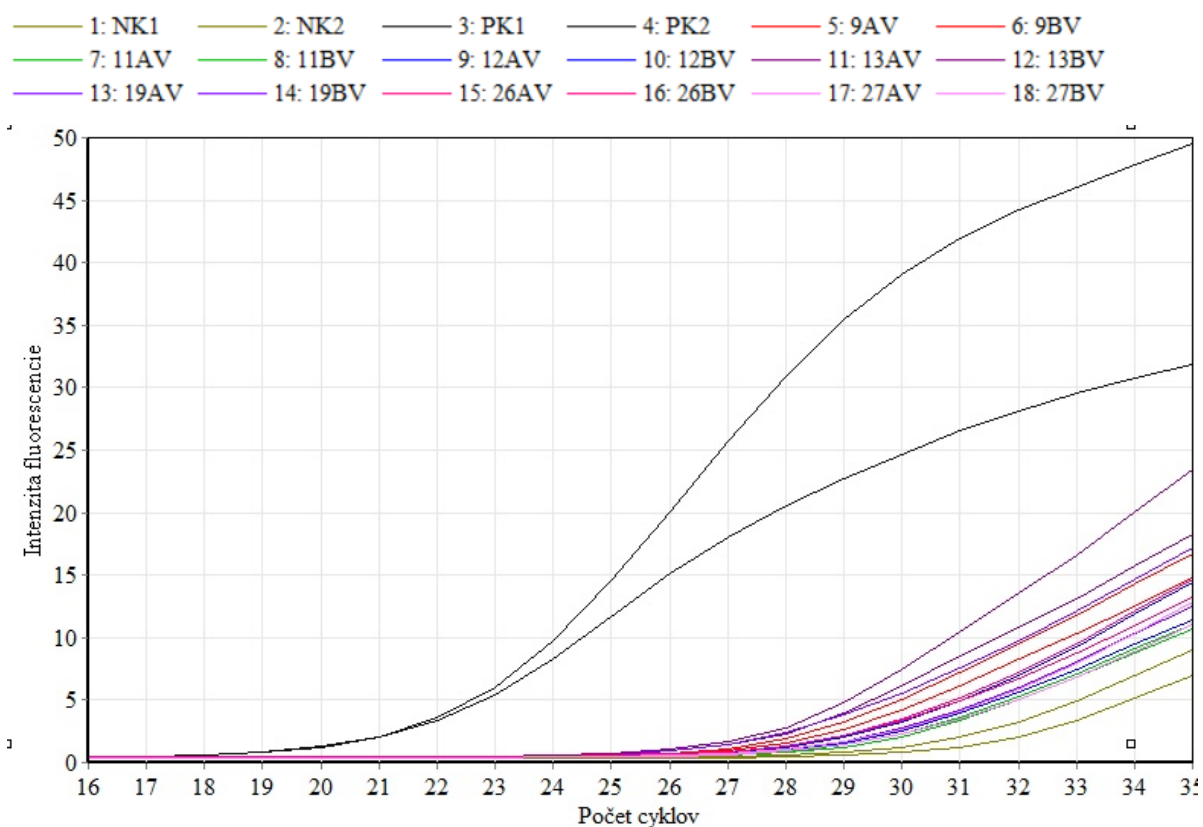
Príloha 6 - Analýza kriviek tavenia DNA izolovanej z modelových a komerčných kozmetických výrobkov, primery ITS2, vzorky 1A – 21B (Bin A: $T_m = 88^\circ\text{C}$, Bin B: $T_m = 82,5^\circ\text{C}$)



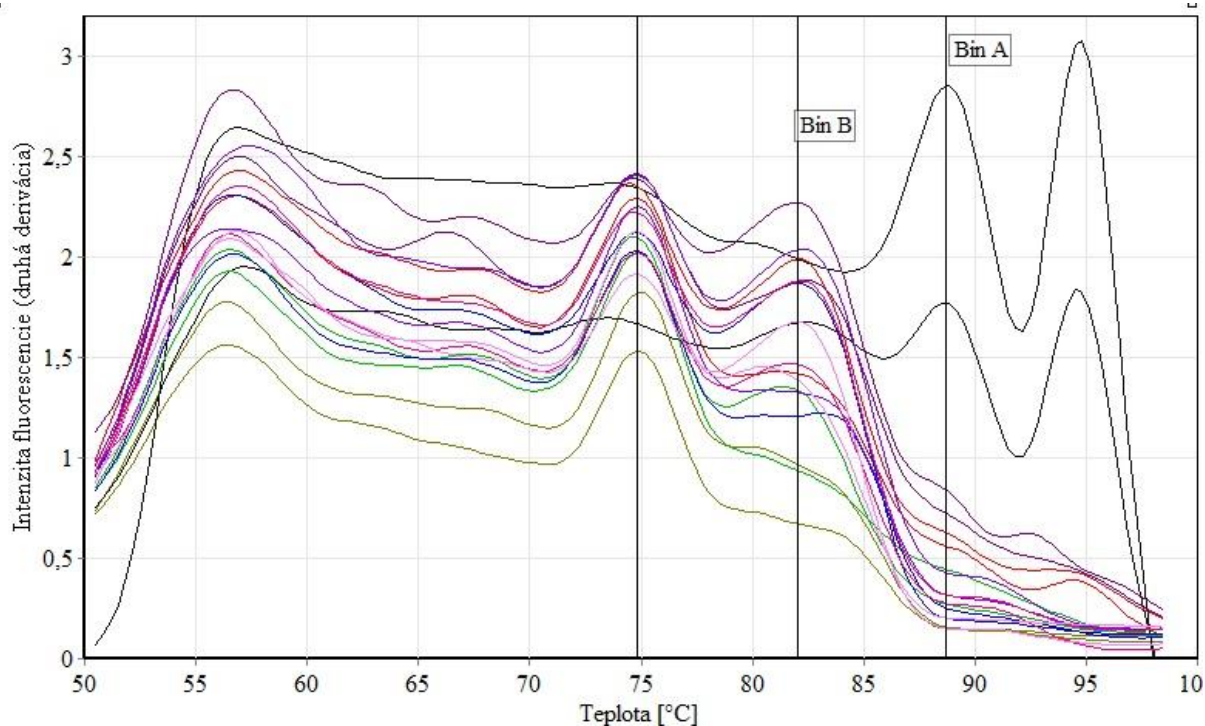
Príloha 7 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA z modelových a komerčných kozmetických výrobkov pri použití primerov ITS2, vzorky 22A - 31B



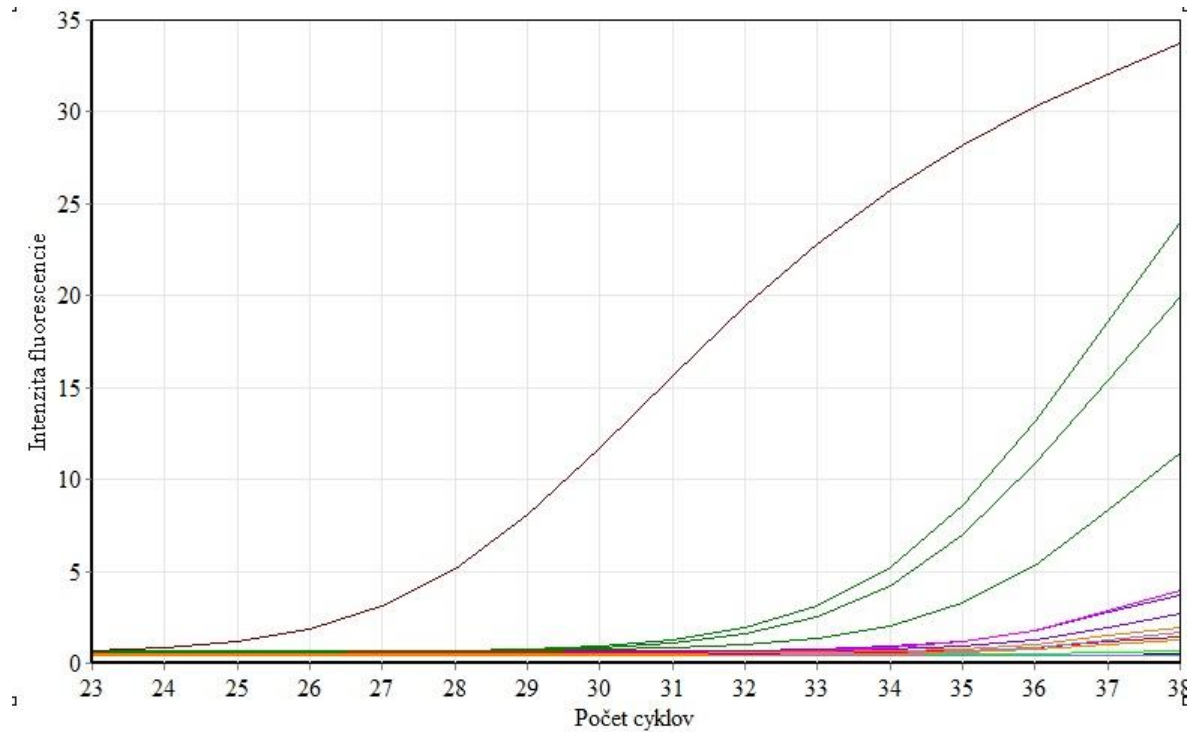
Príloha 8 - Analýza kriviek tavenia, DNA izolovaná z modelových a komerčných kozmetických produktov, primery ITS2, vzorky 22A – 31B (Bin A: $T_m = 88^\circ\text{C}$, Bin B: $T_m = 82^\circ\text{C}$)



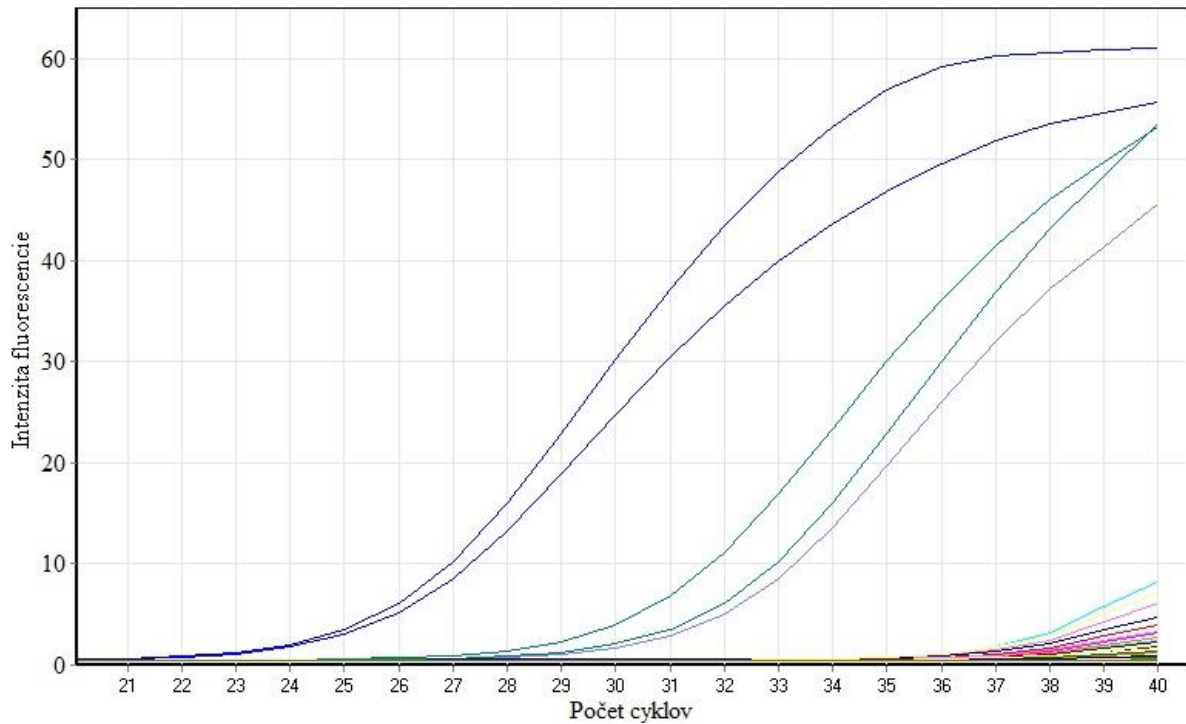
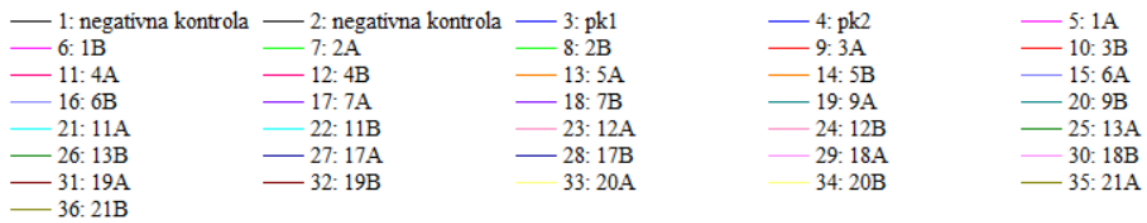
Príloha 9 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov ITS2, vzorky DNA modelových a komerčných kozmetických výrobkov izolované zo sedimentu po centrifugácii



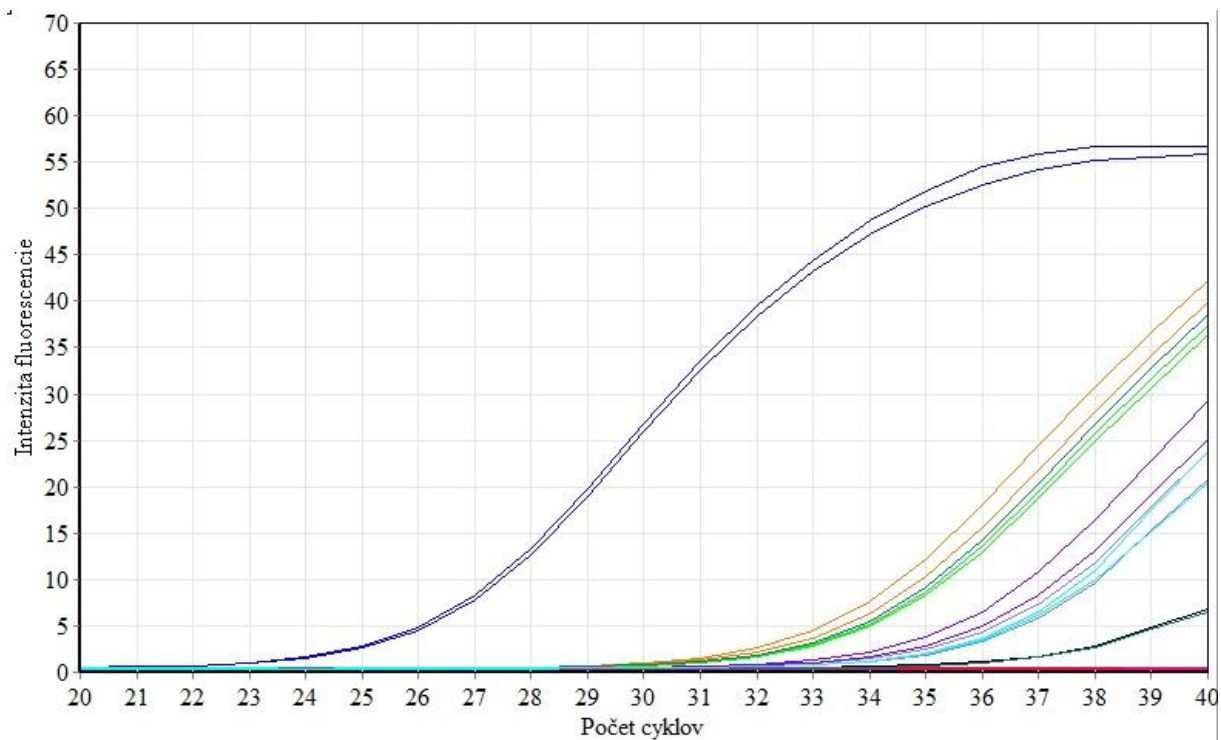
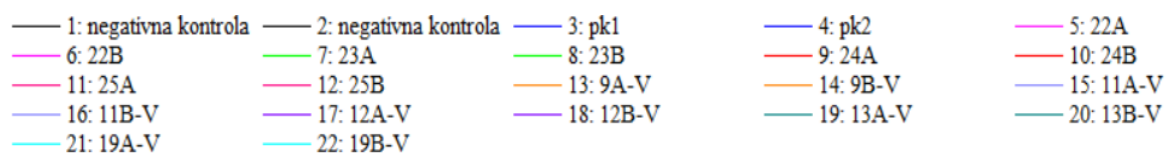
Príloha 10 – Analýza krivky tavenia izolovanej DNA pri použití primerov ITS2, vzorky DNA modelových a komerčných kozmetických výrobkov izolované zo sedimentu po centrifugácii (Bin A $T_m = 88\text{ }^{\circ}\text{C}$, Bin B: $T_m = 82\text{ }^{\circ}\text{C}$)



Príloha 11 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lim2F/R, vzorky izolovanej DNA z levandule, uvedené v Tabuľka 6 a Tabuľka 8, analýza kriviek tavenia uvedená v kapitole 4.3.1.

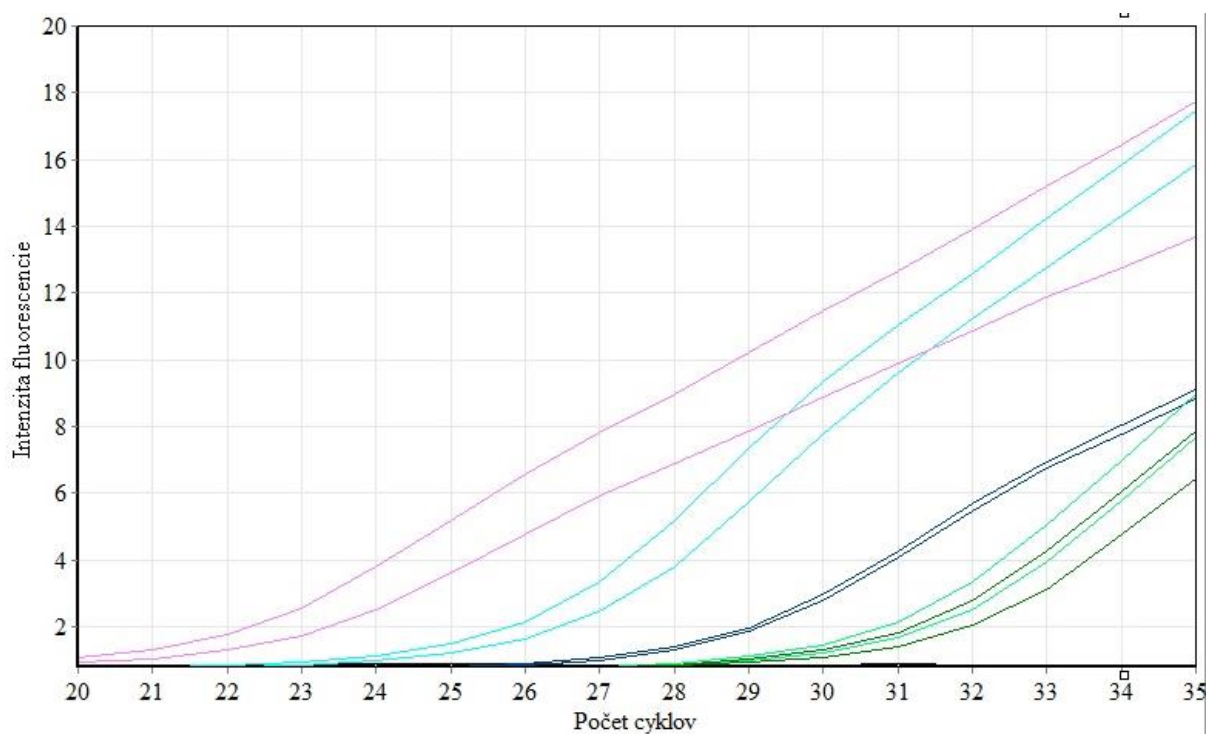


Príloha 12 -Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lim2F/R, vzorky 1A až 21B, izolovaná DNA z krémov. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA izolovaná z kôry biocitróna.



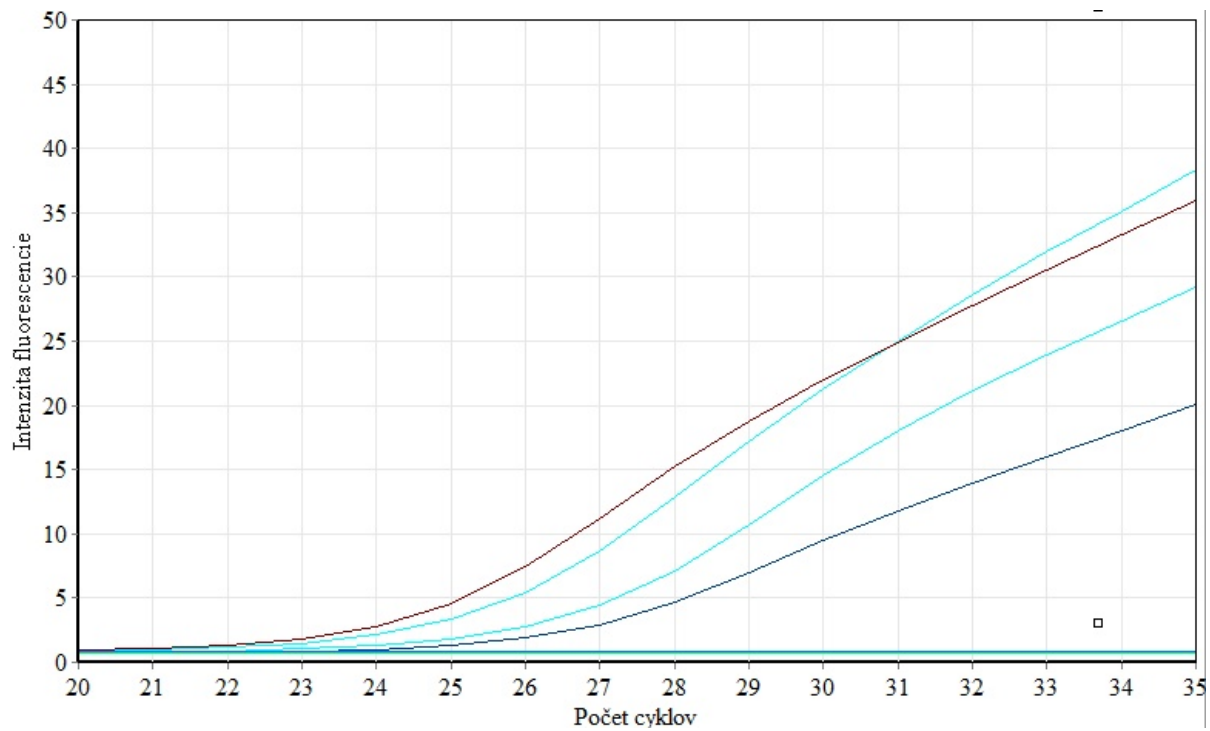
Príloha 13 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lim2F/R, vzorky 22A – 31B, izolovaná DNA z krémov. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA izolovaná z kôry biocitróna

- | | |
|--|--|
| 1: Negatívna kontrola | 2: Negatívna kontrola |
| 3: Negatívna kontrola | 4: Levandula mrazena 1 |
| 5: Levandula mrazena 2 | 6: Levandula sušená 1 |
| 7: Levandula sušená 2 | 8: Levandula čerstvá list 1 |
| 9: Levandula čerstvá list 2 | 10: Levandula silica 1 |
| 11: Levandula silica 2 | 12: krém + Levandula silica 1 |
| 13: krém + Levandula silica 2 | 14: krém + Levandula sušená 1 |
| 15: krém + Levandula sušená 2 | 16: krém + Levandula sušená + levandula silica 1 |
| 17: krém + Levandula sušená + levandula silica 2 | |



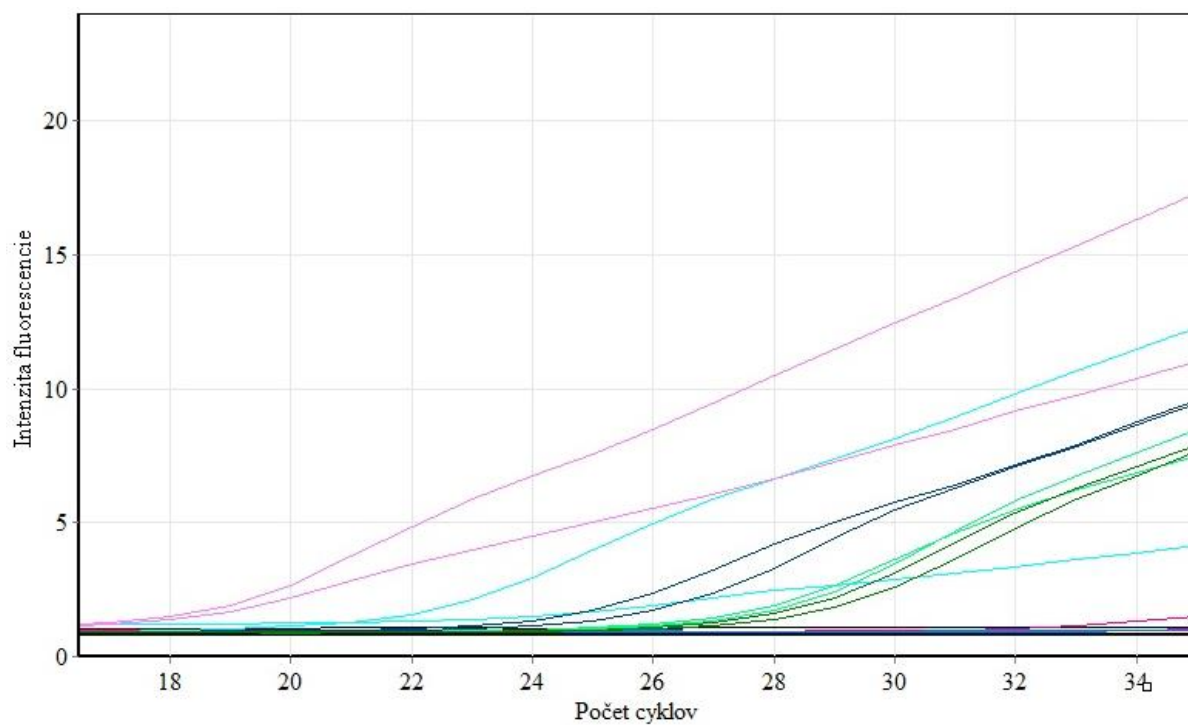
Príloha 14 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lav1FR, vzorky bylín a modelové vzorky krémov

— 1: Negativna kontrola — 2: Negativna kontrola — 3: levanduľa sušená 1 — 4: Levanduľa sušená 2 — 5: Levandula mrazena
 — 6: Levanduľa sušená — 8: 28B — 9: 29A — 10: 29B — 11: 30A
 — 12: 30B — 13: 31A — 14: 31B



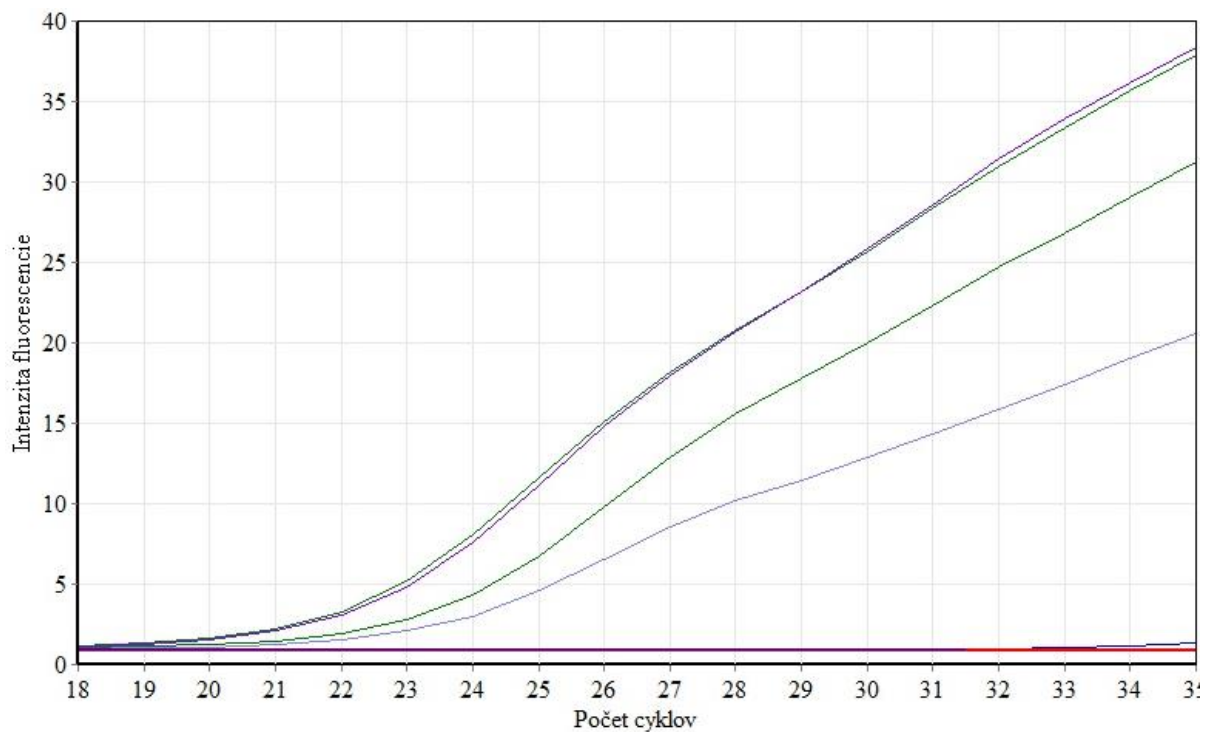
Príloha 15 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lav1FR, vzorky komerčných krémov

- | | |
|--|--|
| 1: Negativna kontrola | 2: Negativna kontrola |
| 3: Negativna kontrola | 4: Levandula mrazena 1 |
| 5: Levandula mrazena 2 | 6: Levandula sušená 1 |
| 7: Levandula sušená 2 | 8: Levandula čerstvá list 1 |
| 9: Levandula čerstvá list 2 | 10: Levandula sílica 1 |
| 11: Levandula sílica 2 | 12: krém + Levandula sílica 1 |
| 13: krém + Levandula sílica 2 | 14: krém + Levandula sušená 1 |
| 15: krém + Levandula sušená 2 | 16: krém + Levandula sušená + levandula sílica 1 |
| 17: krém + Levandula sušená + levandula sílica 2 | |



Príloha 16 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lav1modFR, vzorky bylín a modelové vzorky krémov

- | | | |
|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 15: Negativna kontrola | 16: Negativna kontrola | 17: Levanduľa sušená 1 |
| 18: Levanduľa sušená 2 | 19: Levandula mrazena 2 | 20: levanduľa sušená |
| 21: 28A | 22: 28B | 23: 29A |
| 24: 29B | 25: 30A | 26: 30B |
| 27: 31A | 28: 31B | |



Príloha 17 - Amplifikačné krivky izolovanej DNA pri použití primerov Lav1modFR, vzorky komerčných krémov