



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ROZVOJ METOD STANOVENÍ AUTENTICITY KOSMETICKÝCH VÝROBKŮ S ROSTLINNOU SLOŽKOU

DEVELOPMENT OF METHODS FOR DETERMINING THE AUTHENTICITY OF COSMETIC PRODUCTS WITH A PLANT COMPONENT

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Denisa Langová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

ŠKOLITEL SPECIALISTA

SUPERVISOR SPECIALIST

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2023

ABSTRAKT

V rámci disertační práce byly vyvíjeny metody pro stanovení autenticity kosmetických výrobků a potravin s rostlinnou složkou. Byla ověřena přítomnost přírodních složek v sérii modelových i komerčních kosmetických výrobků a byla ověřena i jejich autenticita. Těžištěm práce byl vývoj molekulárně-biologické metody pro účely detekce rostlinné složky (byliny, ovoce, silice) a probiotik přítomných v kosmetických výrobcích. Pro izolaci DNA z kosmetických přípravků byly použity komerčně dostupné izolační kity a metoda byla optimalizována pro izolaci rostlinné DNA ze vzorků kosmetických výrobků. Metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) byla detekována přítomnost rostlinné matrice v kosmetických výrobcích. Instrumentálními metodami byla detekována přítomnost vonných alergenů v kosmetických přípravcích. Byla zavedena metoda kvantifikace těchto alergenů pomocí kapalinové chromatografie a výsledky měření byly porovnány s výsledky plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Navržená metoda izolace a následné amplifikace rostlinné DNA je vhodná ke stanovení autenticity bylinných složek v kosmetických výrobcích. Navržená HPLC metoda je jednoduchá a levná metoda vhodná ke stanovení přítomných alergenů v množství nutném pro dodržení legislativy EU analytů a v požadované citlivosti (kromě hydroxycitronelalu). Obě metody lze využít i pro analýzu potravinářských výrobků.

ABSTRACT

In the final thesis, methods were developed for determining the authenticity of cosmetic products and food products with a plant component. The presence of natural ingredients in a series of model and commercial cosmetic products was verified and their authenticity was verified, too. The focus of the work was the development of a molecular-biological method for the detection of plant components (herbs, fruits, essential oils) and probiotics present in cosmetic products. Commercially available isolation kits were used for the isolation of DNA from cosmetic products and the method was optimized for the isolation of plant DNA present in cosmetic products. The presence of a plant matrix in cosmetic products was detected by the polymerase chain reaction (PCR) method. Instrumental methods were used to detect the presence of fragrance allergens in cosmetic products. A method of quantifying these allergens using liquid chromatography was introduced and the measurement results were compared with the results of gas chromatography with mass detection. The proposed method of isolation and subsequent amplification of plant DNA is suitable for determining the authenticity of herbal ingredients in cosmetic products. The proposed HPLC method is a simple and inexpensive method suitable for determining the allergens present in the amount necessary to comply with EU analyte legislation and in the required sensitivity (except for hydroxycitronellal). Both methods are suitable to be used for the analysis of food products, too.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kosmetické výrobky, autenticita, izolace DNA, PCR, vonné alergenů, HPLC, GC-MS

KEY WORDS

Cosmetic products, authenticity, DNA isolation, PCR, fragrance allergens, HPLC, GC-MS

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Dermis	9
2.1.1	Kožní bariéra	9
2.1.2	Kožní mikrobiom	9
2.2	Kosmetický výrobek	10
2.3	Složení kosmetických výrobků	10
2.3.1	Voda	10
2.3.2	Lipidy	11
2.3.3	Tenzidy	11
2.3.4	Parafinické uhlovodíky	11
2.3.5	Barviva a pigmenty	12
2.3.6	Látky zvyšující stabilitu	12
2.3.7	Konzervační látky	12
2.3.8	Probiotické bakterie	12
2.3.9	Aktivní látky	12
2.3.10	Vonné látky	13
2.3.11	Alergeny v kosmetických výrobcích	13
2.4	Rostliny v kosmetice	15
2.4.1	Organická a přírodní kosmetika	16
2.5	Typy kosmetických výrobků	16
2.5.1	Roztoky	16
2.5.2	Emulze	17
2.5.3	Suspenze	17
2.5.4	Pudry	17
2.5.5	Produkty s lipofilním základem	17
2.5.6	Gely	18
2.6	Projevy destabilizace kosmetického výrobku	18
2.6.1	Změna chemických vlastností	18
2.6.2	Změna fyzikálních vlastností	19
2.6.3	Změna sensorických vlastností	19
2.6.4	Změna mikrobiologických vlastností	19

2.6.5	Stabilitní testy	20
2.7	Instrumentální analýza.....	23
2.7.1	Chromatografické metody	23
2.8	Izolace DNA	26
2.8.1	Izolace rostlinné DNA	26
2.9	Inhibitory PCR.....	27
2.9.1	Mechanismus účinku PCR inhibitorů.....	27
2.9.2	PCR inhibitory přítomné v rostlinách.....	29
2.9.3	Detekce přítomnosti inhibitorů	30
2.9.4	Odstranění inhibitorů PCR	30
2.10	Polymerázová řetězová reakce.....	31
2.10.1	Real-time PCR.....	32
2.10.2	Digitální polymerázová řetězová reakce	33
3	Cíl práce	34
4	Materiál a metody	35
4.1	Chemikálie.....	35
4.1.1	Komponenty pro PCR	35
4.2	Materiál a přístroje.....	35
4.3	Roztoky.....	36
4.3.1	0,5 x TBE pufr	36
4.3.2	Agarózový gel pro elektroforézu	36
4.3.3	DNA standard	36
4.4	Příprava vlastní kosmetické emulze a její stabilita v porovnání s komerčními vzorky	37
4.4.1	Stabilitní testy	37
4.5	Výběr vhodného izolačního postupu pro izolaci DNA z rostlinné matrice.....	39
4.5.1	Výběr metody izolace DNA	39
4.5.2	Výběr vzorků	39
4.5.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	40
4.5.4	PCR v reálném čase	40
4.6	Izolace rostlinné DNA z kosmetických výrobků.....	41
4.6.1	Postup izolace DNA – upraven dle kitu EliGene	41
4.6.2	PCR v reálném čase	42
4.6.3	Optimalizace PCR specifické pro bylinu <i>Achyrocline satureioides</i>	44

4.7	Izolace bakteriální DNA	46
4.7.1	Kultivace probiotických bakterií z kosmetických výrobků	47
4.8	Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků s bylinnou a rostlinnou složkou.....	48
4.8.1	Postup izolace DNA – upraveno dle kitu EliGene	48
4.8.2	PCR v reálném čase	49
4.9	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	49
4.9.1	Standardy a jejich příprava	49
4.9.2	Aparatura a podmínky analýzy	50
4.9.3	Příprava silic pro analýzu	51
4.9.4	Příprava vzorků kosmetických a potravinových výrobků pro analýzu alergenů..	51
4.10	SPME-GC-MS	51
4.11	GC-MS s přímým nástřikem vzorku.....	52
5	Výsledky a diskuze	53
5.1	Příprava a výběr kosmetické emulze.....	53
5.1.1	Stabilita připravené emulze v porovnání se stabilitou komerčních kosmetických výrobků	54
5.2	Výběr vhodného izolačního postupu pro izolaci rostlinné matrice	58
5.3	Izolace DNA z rostlinného materiálu, matrice kosmetických výrobků s bylinnou složkou a dalších typů vzorků	60
5.3.1	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA.....	60
5.3.2	Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA	63
5.3.3	Optimalizace PCR specifické pro <i>Achyrocline satureioides</i>	67
5.3.4	Amplifikace DNA pomocí primerů Lim2F/R specifických pro limonensyntázu	70
5.3.5	Amplifikace DNA pomocí primerů lav1FR a lav1modFR specifických pro levanduli	75
5.3.6	Shrnutí výsledků PCR	77
5.4	Bakterie v kosmetických přípravcích s obsahem rostlinné složky a probiotik.....	78
5.4.1	PCR specifická pro doménu Bacteria	79
5.4.2	Detekce rostlinné DNA v produktech s bakteriální složkou	80
5.5	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – stanovení alergenů	82
5.5.1	Směsný roztok všech testovaných alergenů	82
5.5.2	Kalibrace 24 alergenů	83

5.5.3	Vzorky silic.....	84
5.5.4	Modelová emulze.....	85
5.5.5	Vzorky komerčních kosmetických přípravků a modelových směsí.....	85
5.5.6	Ověření výsledků analýzy alergenů metodou HPLC-DAD pomocí SPME-GC-MS	90
5.5.7	Detekce přítomnosti alergenů v extraktu z byliny <i>Achyrocline satureioides</i> ...	92
5.6	Porovnání výsledků PCR a HPLC.....	93
5.7	Potraviny s obsahem bylinné složky nebo ovoce	95
5.7.1	Izolace DNA a PCR analýza.....	95
5.7.1	Detekce přítomných alergenů pomocí HPLC-DAD.....	101
5.7.2	Porovnání výsledků PCR a HPLC.....	103
6	Závěr.....	104
7	Bibliografie.....	107
	Seznam příloh	124
	Příloha 1: Složení analyzovaných komerčních kosmetických výrobků a potravin.....	125
	Příloha 2: Výsledky stabilitních testů komerčních výrobků a připravené emulze	132
	Příloha 3: Specifikace a doplňkové informace o analyzovaných vonných alergenech ..	140
	Příloha 4: Amplifikační křivky, analýza křivek tání a výsledky gelové elektroforézy ..	154
	Příloha 5: UV-VIS spektra vonných alergenů.....	178
	Příloha 6: GC-MS chromatogramy standardů Allergen Mix 1 a 2, chromatogramy extraktu z <i>A.satureioides</i> pro navážky 10 a 25 mg	185
	Publikační činnost a Životopis	194

1 ÚVOD

Kosmetické výrobky jsou nedílnou součástí společnosti již tisíce let. V dnešní době je kladen důraz zejména na zdravotní nezávadnost běžně dostupných kosmetických výrobků a přírodní původ kosmetických surovin. Globální trh s přírodní a organickou kosmetikou jen v roce 2022 dosahoval hodnoty 12,5 miliardy dolarů. Evropa a Severní Amerika jsou největšími trhy pro přírodní a organické produkty osobní péče a asijský trh vykazuje v tomto ohledu nejvyšší nárůst zájmu o přírodní/bio produkty. Organická a přírodní kosmetika se řídí zejména dle standardu COSMOS a normy ISO 161128. Přírodní kosmetický produkt je připraven ze složek přírodního původu získaných mikrobiologickými, enzymatickými nebo fyzikálními metodami, jako je lisování, destilace, extrakce, filtrace nebo sušení. Celosvětově i v rámci Evropy existuje celá řada certifikátů, které certifikují dle standardu COSMOS, pro jejichž získání je důležitý zejména původ použitých surovin. Je zakázáno používat produkty petrochemického průmyslu, syntetické vonné látky a jsou podporovány přírodní konzervační systémy.

Výrobci kosmeticky se snaží dosáhnout co nejnižších výrobních nákladů, což může mít za následek „padělání“ některých surovin. Toto padělání se může týkat náhrady suroviny za surovinu levnější, například přírodní aroma nahradit syntetickými vonnými látkami. Může být také tvrzeno, že výrobek obsahuje extrakt nebo přímo celé části rostlin, ale ty se ve výrobku nenacházejí. Některé vonné látky také způsobují alergické reakce a jejich přítomnost ve výrobku je legislativně upravena nařízením Evropské komise. Instrumentální metody, především plynová a kapalinová chromatografie jsou schopny detekovat přítomnost legislativně sledovaných 24 vonných alergenních látek v rámci jedné analýzy. Pomocí molekulárně-diagnostických metod jsme zase schopni detekovat rostlinnou nebo bakteriální DNA přítomnou v kosmetickém výrobku i ve velmi malém množství. Metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) je možné zjistit, zda byla přidána přírodní složka v podobě celé rostliny nebo pouze její vůně.

Disertační práce byla zaměřena na ověření autenticity kosmetických výrobků, konkrétně byla ověřena přítomnost přírodních složek v sérii kosmetických výrobků molekulárně-diagnostickými a instrumentálními metodami.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Dermis

Lidská kůže je největší lidský orgán a tvoří přirozenou bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím, chrání proti mechanickému poškození, UV zářením, chemickými látkami a ztrátou vody. Dochází zde ke tvorbě vitamínu D, kůže pomáhá regulovat tělesnou teplotu a vylučovat odpadní látky. Kůži tvoří tři vrstvy, pokožka (*epidermidis*), škára (*corium*) a podkožní vazivo (*subcutis*) [1].

2.1.1 Kožní bariéra

Specifické hraniční prostředí kůže je tvořeno produkty mazových a potních žláz a odloučenými keratinovými buňkami, pH se pohybuje okolo 4,5 – 5,5. Kožní film tvoří z většiny glandulární lipidy minoritně epidermální lipidy. Epidermální lipidy vyplňují mezibuněčné prostory a zásadně přispívají k udržení vody v pokožce. Kožní film chrání organismus před osídlením kůže jinými mikroorganismy, obzvláště patogeny. Při vzniku nestabilního prostředí, kterou je např. změna pH, bobtnání, změna hydratačního faktoru, dochází následně k narušení kožní bariéry a to vede k rozvoji kožních chorob (psoriáza, ichthyóza). Tělní maz pomáhá udržovat kůži hydratovanou, jedná se o směs mastných kyselin, voskových esterů, triglyceridů, skvalenu, cholesterolu a odumřelých buněk kůže. Množství produkovaného mazu je ovlivněna věkem, hormony a stravou. Vysoká produkce tělního mazu naopak způsobuje vznik dermatitidy a akné [2; 3]. Tato onemocnění jsou samozřejmě spojena i s mikrobiální nerovnováhou.

2.1.2 Kožní mikrobiom

Všechny populace mikroorganismů, které se nachází na pokožce, se nazývají kožní mikrobiom. Jedná se o bakterie, kvasinky, houby a viry. Podstatnou část mikrobiomu tvoří bakterie, jen na lidských rukou se jich nachází $3,9 \cdot 10^4$ až $4,6 \cdot 10^6$ CFU · cm⁻² [4]. U dospělého jedince se množství přítomných bakteriálních druhů pohybuje v rámci stovek až tisíce, jedná se například o rody *Staphylococcus*, *Cutibacterium* a *Brevibacterium*. Jejich diverzita i počet je závislá na věku, stravě, hormonální rovnováze, ale také na vhodném používání kosmetických výrobků, zejména mýdel a antimikrobiálních přípravků. Při jejich častém používání dochází k narušení pH pokožky a následné disbióze (narušení přirozené mikrobiální rovnováhy). Následkem disbiózy pak může dojít ke vzniku ekzému, lupénky, kontaktní dermatitidě a dalším [5].

2.1.2.1 Onemocnění kůže

Následkem dysbiózy pak může dojít ke vzniku ekzému, lupénky, kontaktní dermatitidě a dalším onemocněním kůže. Častým onemocněním kůže je také atopická dermatitida, kterou spouští hormony, stres, strava, ale také dráždivé látky. U tohoto typu dermatitidy je velmi častá stafylokoková nebo streptokoková bakteriální kožní infekce, protože lidé s atopickou dermatitidou mají sníženou schopnost bojovat proti běžným bakteriálním infekcím [6].

Jedním z nejčastějších dermatologických onemocnění je akné. Jedná se o zánětlivé chronické onemocnění mazových žláz, které vede ke vzniku a pupínků a vředů. Vznik těchto vředů je způsoben zánětem vývodů mazových žláz, kde dojde k nahromadění odumřelých buněk kůže, tím jsou ucpány póry. Druhým způsobem vzniku vředu je zvýšená tvorba kožního mazu, který vzniká na základě zvýšené činnosti mazových žláz. Toto prostředí je ideální pro množení bakterie *Cutibacterium acne*, která poté způsobí zánět a přispívá ke zhoršení akné [7; 8].

2.2 Kosmetický výrobek

Jedná se o látku nebo směs látek, která slouží k očištění, vylepšení estetického dojmu nebo k parfemaci. Aplikuje se převážně na vnější části lidského těla (pokožka, rty, nehty, vlasy), ale i na ústní dutinu a zuby. Kosmetické výrobky se vyráběly už ve starověké Číně, Řecku, Římě, Egyptě a Persii. Nejčastěji byly používány vonné oleje a masti na zjemnění pokožky a zamaskování zápachu. Mezi nejpoužívanější suroviny patřily myrta, tymián, levandule, růže, olivový olej a mnoho dalších. Též byly vyráběny barvy na přírodním základu, které pak byly používány k barvení těla i vlasů. V období renesance došlo k dalšímu významnému rozvoji, zejména ve výrobě parfémů a parfémových směsí. Kosmetologie, jako vědní disciplína, vznikla až ve 20. století, spojovala poznatky dermatologie a přírodovědných disciplín. Dodnes se zabývá výzkumem a přípravou kosmetických výrobků [3; 9; 10].

V Evropské Unii upravuje pravidla přijímání kosmetických výrobků na trh Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích, ve kterém jsou uvedeny bezpečnostní požadavky a povinnost informovat i možných nežádoucích účincích. Výrobek musí být zdravotně nezávadný a na obalu musí být vyznačen časový údaj minimální trvanlivosti [11].

2.3 Složení kosmetických výrobků

Mezi suroviny pro výrobu kosmetických výrobků se řadí celé tisíce látek, jejichž počet se stále zvyšuje díky výrobě nových syntetických látek. Mezi nejstarší a nejdéle používané suroviny se řadí látky rostlinného i živočišného původu, např. rostlinné oleje, včelí vosk a lůj. Dodnes se také používají nerostné materiály, zejména pigmenty. Dalšími důležitými složkami jsou kyseliny a zásady pro úpravu pH výrobku, alkoholy, jíly, škroby, gumy, hydratační látky, konzervační látky, antioxidanty a vonné látky [3].

2.3.1 Voda

Je to základní a nejdůležitější kosmetická surovina a často tvoří většinový podíl všech surovin přítomných v kosmetickém výrobku. Voda bývá ve výrobcích často vázána humektanty, např. glycerol, sorbitol nebo propylenglykol. Pro kosmetické účely je využívána pitná, minerální a mořská voda. Pro výrobu kosmetických výrobků je třeba vodu čistit, používá se destilace, demineralizace spolu se sterilizací UV zářením a reverzní osmóza. [3; 12].

2.3.2 Lipidy

Jedná se tuky a látky tukové povahy rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech. Pomáhají vytvářet přirozený kožní film a podílejí se na bariérové funkci pokožky. Mezi kosmeticky významné lipidy se řadí tuky, vosky, fosfolipidy (lecitin), sfingolipidy (ceramid) a isoprenoidy (vitamin A a E). Některé mastné kyseliny mají antibakteriální účinek, např. kyselina palmitová, kapronová a kaprylová. Jiné naopak bakteriální růst podporují, např. kyselina olejová [3].

2.3.2.1 Tuky

Jsou to estery mastných kyselin a glycerolu. Z hlediska původu se dělí na rostlinné a živočišné, z hlediska skupenství rozlišujeme pevné tuky a oleje [3].

Rostlinné tuky se získávají ze semen a plodů rostlin, a to lisováním za studena (nejkvalitnější) i za tepla, nebo extrakcí organickými rozpouštědly (nejméně kvalitní). Nejčastěji používanými oleji jsou olej olivový, slunečnicový, sojový (vysoký obsah nenasycených mastných kyselin a lecitinu), podzemnicový, mandlový, ricinový, avokádový a kakaové máslo. Živočišné tuky jsou využívány minoritně, používá se např. vepřové sádlo, norkový olej a rybí tuk [3].

2.3.2.2 Vosky

Jsou to estery mastných kyselin a alkoholů. Vosky se dobře vážou na pokožku a usnadňují pronikání biologicky aktivních látek. Přírodních vosků je k dispozici málo, v kosmetice se využívá vosk karnaubský a japonský. Z chemického hlediska je voskem i jojobový olej. Z živočišných vosků je nejčastěji používán včelí vosk a lanolin. Lanolin velmi dobře váže vodu, a proto se používá jako emulgátor typu voda v oleji. Dále se velmi často používají vosky syntetické např. isopropylmyristát, okrylsteárat, decyloléat a další [3].

2.3.3 Tenzidy

Jedná se o látky s povrchovou aktivitou. Mají amfifilní molekulární strukturu a díky tomu jsou používány jako emulgátory. Dle polaritativy hydrofilní části molekul se používají jako emulgátor pro emulze typu voda v oleji nebo olej ve vodě. Čím je hydrofilní část tenzidu polárnější, tím je rozpustnější ve vodě. Důležitým parametrem je hydrofilně-lipofilní rovnováha tenzidu (HLB – hydrophylic-lipophilic balance). Jedná se o poměr hydrofilní části tenzidu vůči části lipofilní. Dle HLB lze posuzovat chování tenzidu na fázovém rozhraní. HLB se vyjadřuje pomocí bezrozměrného čísla na stupnici v rozsahu hodnot 0 – 50. Při menších hodnotách podporuje tenzid vznik emulzí typu V/O, při vyšších O/V. Nejvyšších hodnot HLB dosahují detergenty, prací prostředky a solubilizátory [3; 13].

2.3.4 Parafinické uhlovodíky

Jsou to produkty zpracování ropy nebo chemické syntézy. Jsou hojně využívány díky své chemické inertnosti a stabilitě, snadné zpracovatelnosti a ceně. Tyto nepolární sloučeniny je

nutné kombinovat s jinými látkami polárního charakteru pro dosažení vlastností přirozeného kožního filmu. Jedná se např. o parafín, ceresin a vazelína [3].

2.3.5 Barviva a pigmenty

Tyto látky se využívají zejména v dekorativní kosmetice. Zásadní je zdravotní nezávadnost a nealergenní povaha, dále musí být barevně stálé, chemicky stabilní, mít dobrou krycí schopnost a musí být snadno odstranitelné z pokožky. Mezi pigmenty se řadí látky přírodního i syntetického původu, např. hlinky, okry a běloby (zinková a titanová). Hlinky a okry jsou křemičitany hliníku s obsahem manganu a železa [3].

2.3.6 Látky zvyšující stabilitu

Některé suroviny podléhají oxidaci nebo mikrobiálnímu rozkladu, pro prodloužení doby trvanlivosti se přidávají stabilizační látky. Častou používané antioxidanty jsou např. estery kyseliny trihydroxybenzoové nebo gallové, kyselina askorbová a tokoferol [3].

2.3.7 Konzervační látky

Do přípravků s vysokým obsahem vody (emulze, gely) je obzvláště důležité přidávat látky zabraňující množení mikroorganismů. Přidávají se látky s bakteriostatickým (fungistatickým) i baktericidním (fungicidním) účinkem. Často se používaly/jí parabeny, ale mnoho z nich bylo zakázáno do kosmetických výrobků přidávat. Nebyly však zakázány všechny, zejména kvůli tomu, že za ně není zatím dostupná ve vodě dobře rozpustná náhrada. Dále se používá kyselina sorbová (fungistatikum v potravinářství), která má synergický účinek např. s kyselinou askorbovou. S narůstajícím trendem organické kosmetiky je výběr konzervačních látek pro tyto kosmetické přípravky velmi omezený, lze použít např. sodium anisát a sodium levulinát [3; 12].

2.3.8 Probiotické bakterie

Do kosmetických výrobků lze přidávat i probiotické bakterie, ty jsou schopny produkovat širokou škálu antimikrobiálních sloučenin, jako jsou například organické kyseliny (mléčná, mravenčí, propionová). Jako součást kosmetických výrobků a hygienických potřeb se aplikují na kůži a sliznice. Probiotické bakterie by měly svou přítomností příznivě ovlivňovat zdravotní stav pokožky a sliznic, zejména u velmi citlivé až atopické pleti, vytvořením ochranné bariéry. Tyto přípravky by měly napomáhat obnově přirozené kožní mikroflóry, rehydrataci dehydrované pokožky a aktivovat obranné mechanismy kůže. Běžně dostupné na trhu jsou gely pro intimní hygienu, krémy, tampony a ústní pastilky [14; 15].

2.3.9 Aktivní látky

V případě přírodní kosmetiky jsou přidávány různé výtažky a extrakty z rostlin do výrobků. Je třeba k nim přistupovat obezřetně, protože tyto látky jsou účinné a mohou vyvolat nežádoucí reakce u citlivých jedinců. Příkladem biologicky aktivní látky (BAL) jsou např. alfa-hydroxykyseliny (kys. citronová, vinná a jablečná – vyskytují se v ovocných šťávách, vážou ionty těžkých kovů), vitamíny (A,D,E,B5), azuleny a bisabolol (účinné látky heřmánku, tlumí záněty).

2.3.10 Vonné látky

Rostlinné silice, dříve běžně označované jako éterické nebo esenciální oleje, jsou organické látky rostlinného původu. Tyto organické látky můžeme nalézt v různých potravinářských výrobcích a ve všech typech kosmetických výrobků, kde jim propůjčují příjemnou vůni. Používají se v celé škále produktů běžného užívání, jako jsou např. deodoranty, šampóny, kondicionéry, pěny po holení, prostředky na praní, úklidové prostředky, atd. V jednom kosmetickém výrobku se může nacházet 20 až 200 vonných látek z celkového počtu více než 3 000 dostupných substancí. Největším zdrojem vonných látek a esenciálních olejů jsou rostliny, ale některé se získávají také z živočichů, řas a lišejníků. Častou alternativou k přírodním látkám jsou látky synteticky vyrobené, které se používají zejména proto, že jsou levnější. Výrobci tak nejsou závislí na dodávkách plodin, které nemusí mít odpovídající kvalitu. Dalšími důvody mohou být obtížný postup při získávání přírodní látky a nedostatečné nebo chybějící přírodní zdroje [16].

Původně byly vonné látky macerovány do oleje, dnes se čerstvé rostliny destilují vodní parou nebo v případě citrusových plodů se lisuje kůra plodů, vysoce kvalitní silice lze získat také CO₂ extrakcí. V čistém stavu nejsou esenciální oleje příliš stálé a mohou být alergenní, proto se nedoporučuje, aby se v koncentrovaném stavu dostaly do styku s kůží, a do výsledných produktů jsou přidávány ve zředěném a upraveném stavu. Toto se řeší přípravou vonných kompozic, každá kompozice obsahuje bázi (hlavní charakter vonné kompozice), adjuvans (složka vůně, která doplňuje a podtrhuje charakter vůně) a fixátor (látky, která má za úkol stabilizovat, prodloužit a zesílit vůni). Některé vonné látky však i přes vyředění byly pro spotřebitele příliš dráždivé na kůži a jejich použití bylo legislativně omezeno [3].

Těkavost vonných látek může být buď vysoká (olej vyprchá do 24 hodin), střední (vyprchá do 48 hodin, např. levandule a geranium) nebo nízká (vyprchá do jednoho týdne, např. jasmín, růže, neroli). Levandulová silice se získává z kvetoucích stonků levandule, obsahuje mimo jiné levandulol, linalool, geraniol a nerol. Je antiseptická, má uklidňující účinky a její toxicita je velmi nízká. Meduňková silice se získává z kvetoucí části meduňky, silice působí antidepresivně a obsahuje gerniol, citral, linalool a citronelal. Do napařovacích přístrojů se v nízké koncentraci používá silice z máty peprné. Nejčastěji používanými silicemi s osvěžující a příjemnou vůní jsou citrusové silice [3].

2.3.11 Alergeny v kosmetických výrobcích

Některé látky nepříznivě působí na lidské zdraví a způsobují alergické reakce ve formě dermatitidy (zánět kůže) [17]. Dle Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) bylo identifikováno 82 látek, které mohou být klasifikovány jako alergen, z toho 54 jednotlivých chemikálií a 28 přírodních extraktů. V případě žen jsou nejčastějšími zdroji senzibilizace deodoranty, parfémy a prezervativy. V případě mužů jsou to deodoranty a pěny po holení [16]. Množství alergenu přítomného v kosmetickém výrobku je regulováno. Všechny přítomné alergen musí být uvedeny na etiketě, a to pokud rinse-off (smývací) produkty obsahují 100 mg·kg⁻¹ a více alergenu a leave-on (nesmývací) produkty 10 mg·kg⁻¹ [18]. Kosmetické produkty jsou proto podrobovány analýzám, které pomáhají detekovat přítomnost

alergenních složek, ale také kvůli kontrolovat kvalitu a složení výrobku, ve kterém by mohly být některé drahé přírodní látky nahrazeny levnějšími syntetickými [19]. Alergeny mohou být buď bílkovinné povahy, ale v případě vonných kompozic jsou původcem alergie především nízkomolekulární látky.

2.3.11.1 Alergeny bílkovinné povahy

Nejrozšířenějšími skupinami rostlinných proteinů s alergenním účinkem, jsou nadrodiny cupinu (v sójových bobech, arašídech a dalších ořechích) a prolaminu (luštěniny, ořechy, obiloviny, ovoce a zelenina). Také proteiny podílející se na obranném systému rostlin jsou zodpovědné za zkříženou alergickou reakci pylu s ovocem. Celá řada alergických reakcí po konzumaci některých potravin je způsobena alergeny z plodů *Rosaceae* (jablka, meruňky, hrušky) a *Apiaceae* (celer a mrkev), které vykazují křížovou reakci s pylem břízy (alergen Bet v 1). International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee sestavila seznam alergenů klasifikovaných dle jejich zdroje (<http://www.allergen.org>) [20; 21; 22].

2.3.11.2 Nízkomolekulární alergenní látky

Dle evropské legislativy je nutno uvádět parfémové a aromatické kompozice a jejich suroviny slovy „parfum“ nebo „aroma“. Kromě toho existuje 26 sloučenin (z toho 24 těkavých látek a 2 přírodní extrakty) jejichž přítomnost musí být vyznačena v seznamu přísad podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 čl. 19 odst. 1 písm. g), pokud její koncentrace překračuje 0,001 % v přípravcích, které se neoplachují a 0,01 % v přípravcích, které se oplachují. Je nutné uvádět je na etiketě z důvodu jejich alergenních účinků. Jedná se o vonné látky, které se přirozeně vyskytují v rostlinách, ale i látky synteticky vyráběné.

V Tabulce 1 je uvedeno všech 24 těkavých látek, jejich chemické názvy, a zda se jedná o syntetickou nebo přírodní látku. Jejich chemickou strukturu a podrobnější popis, včetně jejich použití v kosmetice a potravinářském průmyslu, je uvedeno v Příloze 3. Od vydání tohoto nařízení v roce 2009 došlo k několika změnám, a to hlavně k úplnému zákazu přidávání lyralu (nařízení Evropské komise 2017/1410) a lilialu (nařízení Evropské komise 2021/1902) do všech kosmetických výrobků. Tyto látky se tak přesunuly na list zakázaných látek, o to důležitější je však hlídat, zda se výrobci nařízením řídí a tyto látky se ve výrobcích už skutečně nevyskytují [11; 23].

Tabulka 1:24 vonných látek s alergenním účinkem [24]

Název	Chemické názvosloví	Výskyt
Amylcinamal	2-Benzylideneheptanal	přírodní látka
Amylcinamylalkohol	2-Pentyl-3-phenylprop-2-en-1-ol	syntetická látka
Anisalkohol	4-Methoxybenzyl alcohol	přírodní látka
Benzylalkohol	Benzylalkohol	přírodní látka
Benzylbenzoát	Phenylmethyl benzoát	přírodní látka
Benzylcinnamát	3-Phenyl-2-propenoic acid phenylmethyl ester	přírodní látka
Benzylsalicylát	Benzyl-2-hydroxybenzoát	přírodní látka
Cinamal	3-Fenyl-2-propenal	přírodní látka
Citral	3,7-Dimethyl-2,6-oktadienal	přírodní látka
Cinamylalkohol	3-Fenyl-2-propen-1-ol	přírodní látka
Citronelol	(±)-3,7-Dimethylokt-6-en-1-ol	přírodní látka
Kumarin	2H-1-Benzopyran-2-on	přírodní látka
Eugenol	2-Methoxy-4-(2-propenyl)-fenol	přírodní látka
Farnesol	3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol	přírodní látka
Geraniol	3,7-Dimethyl-(2E)-2,6-octadien-1-ol	přírodní látka
Hexylcinamal	2-Benzylideneoctanal	přírodní látka
Hydroxycitronelal	7-Hydroxy-3,7-dimethyloctanal	syntetická látka
Izoegenol	2-Methoxy-4-(1-propenyl)-fenol	přírodní látka
α -Izomethylionon	3-Methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-on	syntetická látka
Lilial*	2-(4-tert-Butylbenzyl) propionaldehyde	syntetická látka
Limonen	(4R)-1-Methyl-4-(1-methylethenyl)cyclohexen	přírodní látka
Linalol	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol	přírodní látka
Lylal*	Hydroxyhexyl-3-cyclohexene carboxaldehyde	syntetická látka
Methylheptincarbonát	Methyl-2-oktynoát	syntetická látka

* v současné době přesunuty na list zakázaných látek pro použití v kosmetice

2.4 Rostliny v kosmetice

Rostliny přidávané do kosmetiky jsou většinou léčivé, obsahují komplexy látek, jejichž vlastnosti se doplňují. Některé rostliny jsou škodlivé nebo nebezpečné, ale i všeobecně uznávané léčivky nemusí být všemi jedinci dobře snášeny, např. heřmánek. Z hlediska kosmetiky jsou zajímavé jak primární metabolity rostlin (sacharidy, tuky, mastné kyseliny), tak sekundární metabolity (saponiny, alkaloidy, kumariny, silice, třísloviny a další). Do kosmetických přípravků je možné použít rostliny v čerstvém stavu. V případě pleťových masek se využívá zejména dužiny plodů (meruňky, broskve, okurky, jahody), používají se však také výluhy. Ze sušených bylin a rostlin lze také připravovat odvary a nálevy k okamžité spotřebě, vhodné jako obklady a pleťové masky. Dále se připravují tinktury a extrakty, ty je možné přidávat do kosmetických přípravků jako biologicky aktivní látky (pleťové masky, krémy, bylinkové koupele). Posledním způsobem využití celých rostlin v kosmetice, je příprava výluhů v propylenglykolu nebo olejích, které se přidávají do různých kosmetických

receptur. V rámci přírodní a organické kosmetiky je možné používat i celé části rostlin, zejména v případě peelingů, kde se jako abrazivum používají různá semínka, třeba malinová nebo jahodová. Též se používají meruňková jádra o různé hrubosti [3; 25].

2.4.1 Organická a přírodní kosmetika

Podstatnou část výše zmíněných surovin řadíme do kategorie přírodních látek. Mezi látky přírodního původu se řadí voda, minerály a zpracované zemědělské plodiny (mohou být i vhodně chemicky upravené). Mezi zpracované zemědělské plodiny se řadí zejména rostlinné oleje, extrakty, vodné výluhy bylin, éterické oleje a další [12]. V přírodní kosmetice používají přírodní látky a vyrábí se procesy udržitelné výroby. Aby kosmetický výrobek mohl být označený jako přírodní nebo organický, musí splňovat tyto podmínky:

- 1) Používat produkty ekologického zemědělství
- 2) Zodpovědně využívat přírodní zdroje
- 3) Respektovat životní prostředí v rámci zpracování a výroby produktů
- 4) Rozvoj konceptu „zelené chemie“ – chemické procesy, které eliminují tvorbu nebezpečných látek pro prostředí

Tyto podmínky pro přírodní kosmetiku si na mezinárodní úrovni stanovily certifikační instituty a společnosti jednotlivých států a sdružují se pod normou COSMOS (Cosmetics Organic and Natural Standard). Produkty podléhající certifikaci musí obsahovat minimálně 95 % přísad organického původu, nesmí tedy obsahovat ve vyšší míře produkty petrochemického průmyslu, včetně prezervačních látek petrochemického původu. Výjimkou pro 95% kritérium jsou parfémy a dezinfekční gely, u kterých není možné z hlediska jejich podstaty dosáhnout tohoto kritéria [12].

2.5 Typy kosmetických výrobků

Výrobky pro osobní hygienu (Personal Care Products, PCP) lze rozlišovat na 2 skupiny dle aplikace:

- Rinse-off produkty – po aplikaci na kůži se nesmývají,
- Leave-on produkty – po aplikaci se smývají.

PCP lze také rozlišovat dle zamýšlené aplikace (vlasová kosmetika, krémy, tělová mléka, make-up, laky na nehty, parfémy, koupelové produkty, prostředky pro ústní hygienu, atd.) Také lze rozlišit kosmetické výrobky dle formy (roztoky, emulze, suspenze, pudry, produkty s lipofilním základem, gely) [16; 26].

2.5.1 Rostoky

Roztoky jsou tvořeny zejména homogenními směsmi, kde hlavní složku tvoří voda, alkohol nebo olej a do ní jsou přidány rozpustné komponenty [3; 27]. Jedná se o formu kosmetického výrobku, která je velmi jednoduchá na přípravu [28].

Mezi roztoky patří toaletní voda, parfém, ústní voda, masážní olej a dezinfekční roztoky [1].

2.5.2 Emulze

Emulze je dvoufázový disperzní systém složený ze dvou vzájemně nemísitelných kapalin. Jedna je hydrofobní a označuje se jako olejová fáze. Druhá je hydrofilní a označuje se jako vodná fáze. Dle toho, která fáze tvoří disperzní prostředí, lze emulze rozdělit na 2 typy [3]:

- Olej ve vodě (O/V) – disperzní prostředí tvoří hydrofilní složka (hydroemulze)
- Voda v oleji (V/O) – disperzní prostředí tvoří lipofilní složka (oleoemulze)

Pro lepší spojení fází a zvýšení stability emulze se při její přípravě přidává emulgátor. Emulgátory jsou amfifilní látky, mají tedy část molekuly hydrofilní a část lipofilní. Nejčastěji se používají tenzidy, ale lze využít též polyakrylamidy a deriváty celulózy [27].

Emulze je jedna z nejrozšířenějších forem kosmetických výrobků, do této kategorie patří např. krémy a mléka [3].

2.5.3 Suspenze

Suspenze je dvoufázový disperzní systém, kde jednu fázi tvoří kapalina a druhá má pevné skupenství. Pro zabránění sedimentace je třeba použít komponenty, které zvyšují stabilitu a viskozitu výsledného produktu a napomáhají rovnoměrnému rozptýlení částic pevného podílu. Používají se např. bentonitové jíly a karbomery [3; 29].

Mezi výrobky na bázi suspenze se řadí dekorativní kosmetika, pasty a opalovací krémy s oxidem titaničitým [3].

2.5.4 Pudry

Pudry jsou směsí dvou a více složek pevného skupenství v práškové formě. Nejčastěji používanými komponentami jsou mastek, křemičitany a škrob. Z hlediska skladování jsou citlivé na vlhkost, nežádoucí podmínky mohou vést k trvalému znehodnocení [28].

Mezi pudry se řadí pudry na nohy, dětské pudry a zkrášlovací kosmetika.

2.5.5 Produkty s lipofilním základem

Lipidy jsou estery vyšších mastných kyselin a alkoholů. Dle skupenství lipidy pak dále dělíme na oleje, tuky a vosky. Lipidy můžeme také rozdělit dle původu na přírodní a syntetické. Přírodní lipidy mají vždy sudý počet uhlíků a řadí se sem rostlinné oleje, například kokosový, arganový nebo lněný olej, a živočišné lipidy, například lanolin nebo lůj. Mezi syntetické oleje řadíme produkty zpracování ropy, například vazelína nebo parafínový olej [30].

Do této skupiny se řadí rtěnky, lesky na rty a vlasové kondicionéry.

2.5.6 Gely

Gely jsou jednofázové směsi s vnitřní síťovanou strukturou. Základními složkami jsou kapaliny, které jsou mísitelné a mají shodné lyofilní vlastnosti. Pokud jsou hydrofilní, vzniklý gel se označuje jako hydrogel. Když jsou obě složky lipofilní, vzniká lipogel nebo oleogel. Pro přípravu trojrozměrné struktury gelu, je zapotřebí přidání zahušťovačů nebo gelovacích činidel, které zároveň zvyšuje viskozitu výsledného produktu. Jedná se zejména o polymerní látky [3; 27]. Tyto polymerní látky lze rozdělit [27; 31]:

- přírodní – polysacharidy a jejich deriváty (celulóza, guarová guma, xantanová guma), alginát, pektin
- syntetické – polyakrylová kyselina a její deriváty

Kosmetické výrobky v této kategorii se vyznačují průhledností nebo opalescencí a řadí se sem např. mycí nebo holicí gely [28].

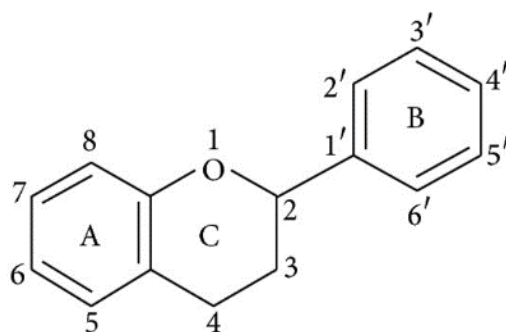
2.6 Projevy destabilizace kosmetického výrobku

Při procesu destabilizace dochází ke změně původních vlastností výrobku, jedná se zejména o vlastnosti chemické, fyzikální, senzorické a mikrobiologické [32]. Při destabilizaci výrobku pozorujeme většinou změnu vlastností z více kategorií zároveň.

2.6.1 Změna chemických vlastností

Chemické vlastnosti jsou úzce spojeny se složením a molekulovou strukturou výrobku, náchylné k degradaci jsou zejména lipidy, emulgátory a konzervační látky. Jedním z důležitých parametrů je pH, které ovlivňuje rozpustnost látek, např. rozpustnost kyseliny hyaluronové a benzoové při vyšším pH, a funkčnost výrobků, např. antibakteriální účinky antiperspirantů s pH hodnotou 4 [27]. Mezi rozkladné reakce ovlivňující stabilitu výrobku se řadí hydrolýza, vůči které jsou náchylné zejména emulgátory. Dalšími projevy chemické destabilizace jsou oxidace, degradace jednotlivých složek nebo jejich nežádoucí interakce [32].

Oxidace je důležitým destabilizačním dějem, jehož nejčastější původcem je vzdušný kyslík. Přítomnost kovů (mangan, železo, měď) oxidaci katalyzuje, děj urychluje také působení zvýšené teploty a záření. K oxidaci zářením jsou náchylné především pigmenty (oxidy železa a oxid titaničitý), v případě zvýšené teploty, jsou náchylné nenasycené lipidy, rostlinné oleje a vonné látky [27; 32]. Při nadměrně zvýšené okolní teplotě dochází u nenasycených lipidů k procesu žluknutí, kdy vznikají nepříjemně zapáchající látky, např. aldehydy, ketony a organické peroxidy [3]. Oxidaci se zabraňuje přidáváním chelatačních činidel (EDTA) a antioxidantů, např. kyselinou askorbovou, tokoferoly, thioly a také flavonoidy (Obrázek 1) [3; 27].



Obrázek 1: Chemická struktura flavonoidů (A, B – benzenové kruhy, C – pyran)

Z chemických vlastností se kromě stability zkoumá také přítomnost konzervantů, zakázaných látek (pesticidy, těžké kovy, ftaláty, diethylenglykol, 1,4,-dioxan) a alergenů. Tyto látky se do výrobku můžou dostat v průběhu výroby a při použití nekvalitních surovin [27; 33]. Z analytických metod lze pro detekci přítomných látek použít UV-VIS spektrofotometrii, hmotnostní spektrometrii, různé typy chromatografických analýz, anebo infračervenou spektrometrii [34].

2.6.2 Změna fyzikálních vlastností

Mezi sledované fyzikální vlastnosti výrobku se mimo jiné řadí hmotnost, viskozita, bod tání, míra stlačitelnosti, adheze, roztíratelnost, pevnost v tahu, doba odparování aj. [35; 36; 33]. Výběr sledovaných vlastností se odvíjí od typu testovaného výrobku, pro gely a krémy jsou to např. tokové vlastnosti a lepivost [35]. Fyzikální vlastnosti úzce souvisí se sensorickými vlastnostmi produktu, fyzikální analýza je ale založena na objektivním měření specializovaných přístrojů, např. přístrojů na analýzu struktury a reologii [35; 36].

2.6.3 Změna sensorických vlastností

Sensorické vlastnosti se hodnotí pomocí receptorů lidských smyslů, výstupem je sensorický profil výrobku. V praxi provádí sensorickou analýzu skupina proškolených lidí, hodnotitelů. Sensorická analýza je důležitá obzvláště při vývoji nových výrobků [27; 37]. Nejčastěji používaným smyslem je zrak, kterým se popisuje vzhled výrobku, hodnotí se zejména vzhled, mezi posuzované vlastnosti se řadí např. barva výrobku a její intenzita, lesk, případně průhlednost [37]. Hmatem se hodnotí konzistence, struktura, vlhkost a roztíratelnost výrobku. Řadí se sem kinestéze, kde se testuje tlak a síla potřebná k pocížení změn struktury vzorku, a somastéze, která hodnotí pocit vyvolaný v receptorech o nanesení výrobku [38].

2.6.4 Změna mikrobiologických vlastností

Kontaminace výrobku nežádoucími mikroorganismy a jejich následné pomnožení je zdravotním rizikem pro spotřebitele, může docházet k podráždění pokožky, ale i k rozvoji onemocnění, např. mykózy. Mikrobiologická kontaminace též způsobuje narušení stability výrobku a dochází k rozpadu složek a žluknutí. Do výrobku se mikroby nejčastěji dostávají v průběhu výroby a při používání výrobku. Kontaminanty jsou bakterie, kvasinky i plísně, nejčastěji jsou to *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a enterobakterie [3; 27; 39]. Pro tyto mikroorganismy je nulová

tolerance, tzn. 1 g nebo ml výrobku nesmí obsahovat žádný ze jmenovaných mikroorganismů. Čím vyšší je obsah vody ve výrobku, tím je náchylnější ke kontaminaci. Pro zabránění kontaminace se do výrobku přidávají konzervanty, do některých typů výrobků není nutné konzervanty přidávat, jsou uvedeny v normě ISO 29621 [40]. Používá se široké spektrum konzervačních látek, při přidávání do výrobku je třeba dbát na jeho povahu, některé konzervanty jsou vhodné do výrobků s vodným základem, jiné jsou vhodné pro olejový základ. Také je důležité spektrum mikroorganismů, proti kterým je látka účinná, proto se některé konzervační látky spolu vhodně kombinují [3].

2.6.5 Stabilitní testy

Stabilita, nebo také trvanlivost, je časový údaj, který vyjadřuje dobu, po kterou si výrobek udrží své původní chemické, fyzikální, sensorické i mikrobiální vlastnosti. Je ovlivněna samotným složením výrobku, výrobním postupem, balením, transportními podmínkami, uskladněním, ale hlavně zacházením v průběhu jeho používání [32]. Testy stability se provádí právě pro zjištění doby trvanlivosti produktu [41].

Konkrétní typy stabilitních testů jsou určeny pouze pro krémy na opalování a antiperspiranty. V případě krémů na opalování je třeba *in vitro* otestovat ochrannou schopnost proti krátkovlnnému UVB a dlouhovlnnému UVA ultrafialovému záření při vlnové délce 370 nm a jejich ochranný sluneční faktor [42]. V případě antiperspirantů je třeba provádět *in vivo* testy kvůli přítomnosti hlinitých solí a sloučeniny titanu [27; 43]. U ostatních výrobků závisí volba stabilitních testů na výrobcích, jsou voleny tak, aby nevyžadovaly úpravu vzorku pro měření, a zaměřují se na faktory nejvíce ovlivňující produkt [32; 41; 44]. Stabilitní testy se dělí do dvou kategorií:

- Dlouhodobé testy stability, též stabilitní testy v reálném čase, se provádí za konstantních podmínek a sleduje se hlavně vliv vlhkosti a teploty, výsledkem měření je hodnota skutečné stability [32; 44]. Nevýhodou těchto testů je jejich časová náročnost, což je nepraktické, při vývoji nových výrobků [44; 45], proto se tyto testy používají spíše jako kontrolní k testům akcelerovaným. Odečítání hodnot se provádí z počátku každé 3 měsíce a pak se interval prodlužuje na 6 – 12 měsíců [32; 43].
- Zrychlené testy stability, také označovány jako zkoušky za akcelerovaných podmínek, zkouška zrychleného stárnutí nebo stresové testy. Stabilita výrobků je testována za změny okolních podmínek a působících faktorů, aby změna stability výrobku mohla být sledována v co nejkratším časovém horizontu [32; 44].

Pro testování stability se nejčastěji využívá změna teploty, vlhkosti a sledování světelné stability. Při testování by sledované vlastnosti měly být zaznamenány aspoň čtyřikrát, z toho jednou na začátku a jednou na konci měření. Je vhodné vzorek sledovat ve více paralelních měřeních, ty by se od sebe neměly lišit, jinak je nutné celé měření opakovat [32; 45]. Dále se provádí cyklické testy a sledují se vlivy působení různých typů sil (vibrační a odstředivý test).

2.6.5.1 Změna teploty

Jedná se o jednu z nejčastěji modifikovaných podmínek, která se v případě dlouhodobých testů stability snaží přiblížit podmínkám při přepravě a skladování. Pro zrychlené stabilitní testy je doporučeno zvýšit teplotu minimálně o 15 °C oproti teplotě laboratorní (20 – 25 °C), běžně se tak produkty vystavují teplotám v rozmezí 37 – 50 °C. Testování probíhá za izotermických podmínek, kdy je teplota udržována konstantní po celou dobu měření [41; 44; 45]. Doporučená doba měření je závislá na zvolené teplotě a na rozhodnutí výrobce, všeobecně však platí, že čím je teplota vyšší, tím je doba trvání testu kratší, např. pro teplotu 37 °C je doporučená doba testování 3 – 6 měsíců, pro teplotu 45 °C pak 1 – 3 měsíce [41].

Na změnu teploty jsou zejména citlivé produkty s obsahem lipidické složky. Vlivem zvýšené, ale i snížené teploty, může dojít ke změně skupenství lipidu a tím i k nevratným změnám ve struktuře výrobku, v případě emulzí může např. dojít k nevratnému rozpadu emulze [32].

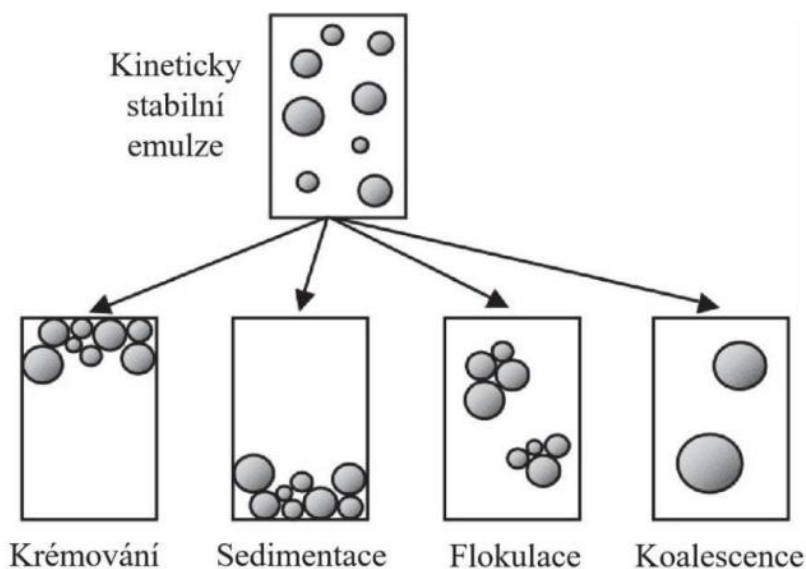
2.6.5.2 Cyklický test

Cyklický test sestává z několika po sobě se opakujících cyklů o dvou fázích, kde dochází k pravidelnému střídání okolních podmínek, zejména teploty a vlhkosti, nebo jejich kombinace. Tyto testy mají zejména simulovat podmínky, kterými bude pravděpodobně výrobek vystaven v průběhu transportu. V případě teploty se střídají fáze při nízké teplotě, v rozmezí od -5 do 4 °C, a při vysoké teplotě, v rozmezí od 25 do 50 °C, a to v 3 až 5 cyklech [32; 39].

Tento typ testu je vhodné zejména pro výrobky náchylné na vykrytalování jedné ze složek a pro emulze, u kterých by mohlo dojít k nevratnému oddělení fází [32].

2.6.5.3 Působení sil

Za běžných okolností na výrobek působí pouze síla gravitační, jejíž působení se testuje ve zrychlené formě centrifugačním testem, takto se testuje zejména stabilita emulzí a suspenzí. V průběhu testu může docházet k oddělení fází, a to ve formě krémování, kdy oddělené částice stoupají na hladinu [39], nebo ve formě sedimentace, kdy se usazují na dno [29]. Může též docházet k flokulaci, kdy dochází ke shlukování částic a vytvoření většího útvaru, nebo ke koalescenci, kdy dochází ke shlukování kapek [46] (viz Obrázek 2).



Obrázek 2: Destabilizace emulze – převzato, upraveno [47]

Test se vyhodnocuje dle rovnice 1, kde RCA je relativní odstředivé zrychlení (Relative Centrifugal Acceleration), která udává násobky gravitačního zrychlení, které na vzorek působí, t_1 odpovídá předpovídané době stability výrobku, t_2 pak době po kterou probíhal odstředivý test [32; 48].

$$t_1(\text{hod}) = t_2(\text{hod}) \cdot \text{RCA} \quad (1)$$

Dále se může provádět test vibrační (také známý jako test mechanickým šokem), který simuluje podmínky při přepravě a manipulaci s výrobkem a je vhodné ho použít zejména pro emulze, pudry a granuláty [32; 39].

2.6.5.4 Testy pro kontrolu mikrobiologické kontaminace

Ke kontaminaci výrobku bakteriemi, kvasinkami a plísněmi nejčastěji dochází v průběhu výroby a používání výrobku [3; 27; 39]. Mikrobiologická kontrola se provádí u vstupních surovin a u každé šarže výsledných produktů [27; 40].

- Screeningový test – je semikvantitativní test, který může provádět i personál bez speciálních znalostí. Za pomoci komerčního kitu se dá detekovat, zda je výrobek znatelně kontaminovaný mikroorganismy [39; 49].
- Kvantitativní test – je prováděn v laboratořích specializovaných na mikrobiologické rozborů. Zjišťuje se celkové množství přítomných životaschopných mikroorganismů (MO), jejichž množství je upraveno normou ČSN EN ISO 17516 [40; 50]. Počet mikroorganismů se stanovuje přímými metodami (výsev na agarové plotny, počítání pod mikroskopem, spektrofotometrie, nefelometrie) [39; 50; 51]. Výroba kosmetických výrobků není zpravidla sterilní, takže je nelze připravit tak, aby neobsahovaly žádné mikroorganismy, jsou však stanoveny různé limity pro kategorie kosmetických výrobků. Kategorie 1 zahrnuje kosmetické výrobky pro děti do 3 let, přípravky pro intimní hygienu a výrobky, které se aplikují na okolí očí. V této

kategorii nesmí celkový počet aerobních mezofilních MO přesáhnout 10^2 KTJ na gram případně mililitr. Do kategorie 2 spadají všechny ostatní výrobky, zde je limit 10^3 KTJ na gram nebo mililitr [40].

Zátěžový test – je zaměřen na účinnost použitého konzervantu. Do již hotového výrobku se přidává definované množství zvoleného mikroorganismu a sleduje se jeho úbytek v čase. Množství živých MO ve výrobku by se mělo dostat pod stanovené limity. Průběh testu je upraven normou ČSN EN ISO 11930, která uvádí, že by se do 20 g nebo ml výrobku mělo přidat 0,2 ml inokula o známém množství KTJ na ml. Úbytek je pozorován 28 dní vždy po sedmi dnech [40; 52].

2.7 Instrumentální analýza

Mezi metody používané k analýze kosmetických výrobků se řadí metody spektroskopické, včetně hmotnostní spektrometrie (MS) a Ramanovy spektroskopie (RS). MS lze identifikovat vonné látky v surovinách a hotových výrobcích. Při samostatném použití techniky MS lze zjistit otisk (fingerprint) vůně, čehož se využívá při padělání parfémů. Pro porovnávání otisků je však nutné mít knihovnu spekter. Vzorky lze detekovat přímo ionizační hmotnostní spektrometrií s elektrosprejem [53]. RS byla navržena jako vhodná nedestruktivní metoda pro rychlou kontrolu kvality vonných látek, nevyžaduje předběžnou úpravu vzorku a může poskytnout spolehlivé výsledky v reálném čase [54].

Nejčastěji používané jsou však metody chromatografické (GC-MS, HPLC). Pro detekci přítomnosti rostlinných matric a bakteriálních buněk obsažených v kosmetických výrobcích lze použít i izolaci DNA a následně polymerázovou řetězovou reakci (PCR) [18; 23].

2.7.1 Chromatografické metody

Mezi chromatografické metody se řadí plynová (gas chromatography; GC) a kapalinová chromatografie (liquid chromatography, LC). V případě použití chromatografických technik pro analýzu přítomných aromatických látek je většinou nutno vzorek před analýzou upravit.

2.7.1.1 *Techniky přípravy vzorku pro instrumentální analýzu*

Matrice, které obsahují vonné látky k analýze, jsou velmi různorodé. Je těžké najít univerzální postup přípravy vzorku pro analýzu, proto byly vyvinuty různé postupy v závislosti na složení vzorku. Matrice obsahují esenciální oleje, syntetické směsi, přírodní extrakty, tekuté vzorky, jako jsou například oleje a parfémy, mohou být analyzovány přímo, nebo po extrakci vhodným rozpouštědlem (aceton, hexan, acetonitril, etylacetát,...). Oproti tomu krémy, mléka a rtěnky jsou komplexní směsi a je často těžké převést je do homogenního roztoku [16; 55; 56].

Mezi přímé techniky přípravy vzorku se řadí extrakce kapalnou fází (liquid phase extraction; LPE), extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE) a metody tandemové extrakce a headspace techniky (HS). V případě LPE je nejčastěji vzorek podroben extrakci rozpouštědlem, pak je ovšem nutné ho dále centrifugovat nebo filtrovat, pro získání vzorku dostatečné čistoty pro další analýzu. Tato metoda se dá v některých případech zjednodušit a

automatizovat. Byly vyvinuty techniky extrakce pomocí ultrazvuku (ultrasound-assisted extraction; UAF) a extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (pressurized liquid extraction; PLE) [16]. SPE je jednou z nejpoužívanějších technik pro purifikaci a přípravu vzorků pro extrakci. Jako pevná fáze se používá celá škála syntetických i přírodních materiálů (např. zeolit). V průběhu let bylo vyvinuto několik modifikací SPE [57]. Metody tandemové extrakce jsou vhodné zejména pro složitější matrice. Jedná se o kombinaci LPE a SPE extrakce a dalších metod [16].

HS je vhodná pro extrakci těkavých látek. Rozlišujeme statickou HS a dynamickou HS. Nevýhodou statické HS je omezená citlivost, velký vstřikovací objem a výsledky závislé na distribučním koeficientu. Při dynamické HS jsou těkavé látky z vialky přeneseny heliem do desorpční trubice naplněné sorbentem, která má nižší teplotu, zde jsou těkavé látky zakoncentrovány a dále desorbovány a analyzovány [58]. V případě nízké koncentrace analytu je vhodné HS kombinovat s jinými extrakčními technikami mikroextrakce. Často je využívána metoda mikroextrakce na pevné fázi (headspace solid-phase microextraction; HS-SPME), protože je rychlá a nevyžaduje použití rozpouštědla. Je vhodná na analýzu těkavých a semi-těkavých sloučenin ze všech typů matric. K zachycení a zakoncentrování analytu se používá vlákno např. z oxidu křemičitého [59]. Tato metoda je reprodukovatelná, jednoduchá a přesná. HS-SPME je používána na prověření hlavních vonných složek parfémů, čisticích a pracích prostředků, ale také alergenů v kosmetických výrobcích [16; 60]. HS lze také kombinovat s mikroextrakcí v kapalně fázi (headspace liquid-phase microextraction; HS-LPME). Použití této metody bylo navrženo pro čisté matrice na bázi vodného roztoku, proto využití pro komplexní matrice kosmetických výrobků je značně omezené [16].

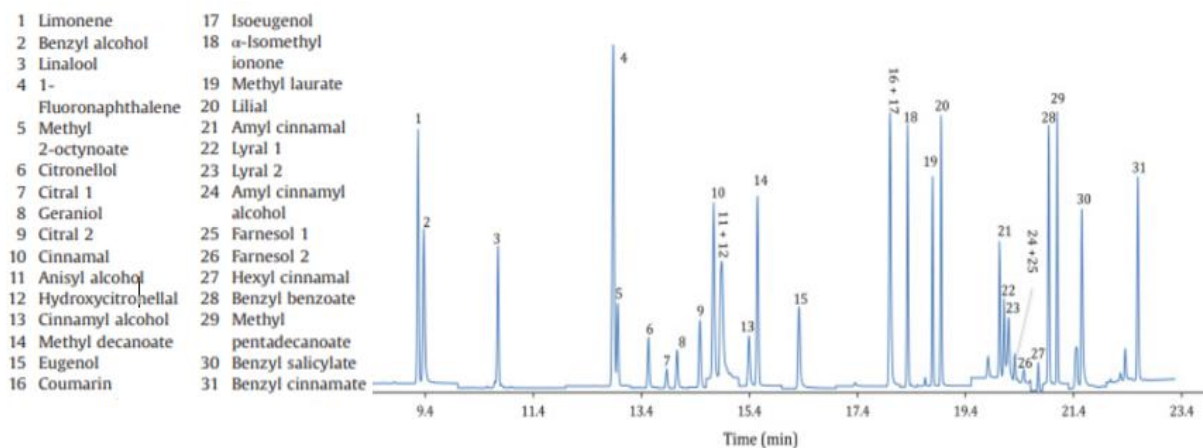
2.7.1.2 Plynová chromatografie (gas chromatography; GC)

GC je nejoblíbenější metodou pro analýzu vonných látek z důvodu jejich nízké teploty varu. Pro zavedení vzorku do kolony je využívána celá škála metod, např. pulzní splitless mód, přímý nástřik na kolonu, programovaný vaporizér, vstřikování za horka, atd. [58; 61].

Důležité je zvolit vhodnou kolonu z hlediska kapacity, rozlišení, citlivosti, robustnosti a selektivity. Při analýze vonných látek v kosmetických výrobcích se používají nejčastěji kapilární kolony (tubular capillary columns; OTCs) o délce 10-60 m o vnitřním průměru 0,10-0,32 mm s tloušťkou filmu 0,10-1,2 μm . Nejčastěji používané stacionární fáze jsou na bázi dimethylpolysiloxanů [16; 62].

Pro detekci vonných látek a dalších látek v kosmetických výrobcích se nejčastěji používají plamenový ionizační detektor (flame ionization detector; FID), hmotnostní spektrometr (mass spectrometry; MS) s elektronovou ionizací a elektrosprejem [58; 60]. Nejpoužívanějšími hmotnostními analyzátoři jsou kvadrupól a iontová past [55; 58; 61]. V případě měření s GC/MS jsou vonné látky identifikovány na základě jejich retenčních časů a hmotnostního spektra. Identifikace sloučenin tímto způsobem je přímo závislá na kvalitě a komplexnosti použité knihovny spekter [16].

Desmedt a kol. optimalizovali metodu HS-GC-MS pro současné stanovení všech alergenních vonných látek. Několik kosmetických výrobků (gelů) bylo extrahováno hexanem a podrobena analýze s úspěšným stanovením příslušných látek. Příklad spektra pro roztok standardů je na Obrázku 3 [63].



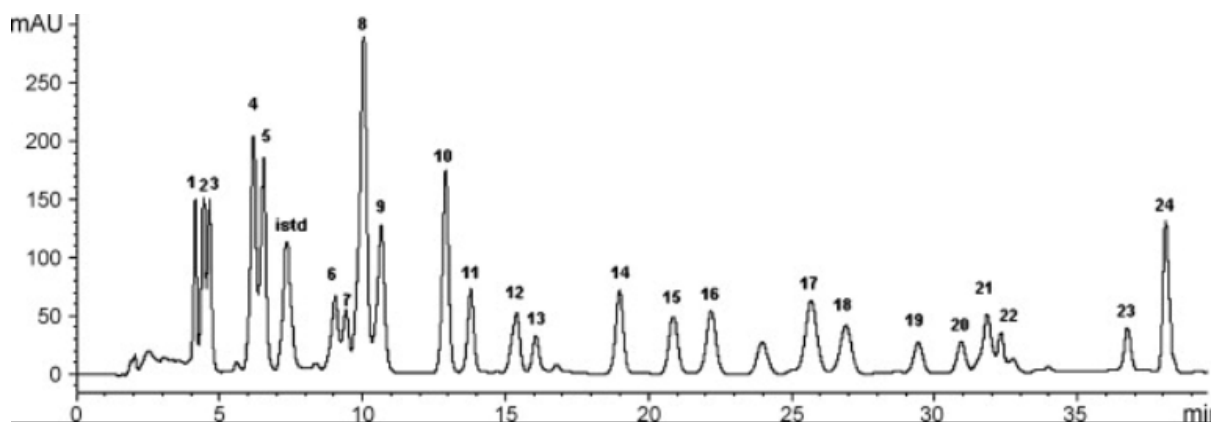
Obrázek 3: Chromatogram obsahující všechny hledané alergeny, 10 ppm (převzato z [63])

2.7.1.3 Kapalinová chromatografie (liquid chromatography; LC)

LC je separační technika, která je založena na dělení látek mezi dvě fáze, stacionární (pevná) a mobilní (kapalná). K separaci dochází na základě různé afinity analytů k mobilní a stacionární fázi, proto jsou analyty v systému zadržovány různě dlouhou dobu a každá má tak svůj specifický retenční čas. Jako stacionární fáze se nejčastěji využívá např. silikagel (oxid křemičitý) nebo alumina (oxid hlinitý). Jako mobilní fáze jsou v případě systému normálních fází používána organická rozpouštědla (např. hexan, benzen, aceton, acetonitril, etanol aj.), pro systém s obrácenými fázemi se jako mobilní fáze nejčastěji používá směs organického rozpouštědla s vodou (např. acetonitril – voda nebo metanol – voda). Složení mobilní fáze se může v průběhu analýzy měnit, tomuto procesu se říká gradientová eluce. K tomuto kroku se přistupuje, když jsou některé složky silněji vázány na stacionární fázi a analýza by tak trvala příliš dlouho. V případě LC s normálními fázemi je stacionární fáze polární a mobilní fáze je nepolární, v případě obrácených fází je tomu přesně naopak [64].

Ve většině studií zaměřených na detekci vonných látek byly použity C_{18} kolony s různými průměry a velikostí částic. Kapalinová chromatografie s reverzní fází (reversed-phase liquid chromatography; RPLC) se používá převážně při analýze chemických látek, které je obtížné stanovit pomocí GC, zejména kvůli jejich nízké těkavosti nebo vysoké termostabilitě. Z důvodu komplexnosti matrice kosmetických výrobků bylo nutné zvolit gradientovou eluci acetonitrem jako mobilní fází v kombinaci s vodou popř. vody s kyselinou octovou nebo mravenčí. Jako detektory jsou využívány zejména diodové pole (diode array detector; DAD), MS a fluorescenční detektor [16; 56; 65]. Villa a kol. optimalizovali metodu pro analýzu všech 24 vonných látek v rámci jedné analýzy za použití RP-HPLC/DAD a p-anisaldehydu jako standardu, gradientovou elucí acetonitril:voda a C_{18} kolonou (Obrázek 4). Podařilo se jim

úspěšně stanovit vonné látky ve 4 druzích komerčních kosmetických výrobků (esenciální olej – repelent, přírodní masážní olej, zvlhčující krém a vlasový kondicionér) [23].



Obrázek 4: Chromatogram směsi standardů 24 alergenních vonných látek stanovených v rámci 1 analýzy RP-HPLC (převzato z [23])

2.8 Izolace DNA

Cílem izolace DNA je získání nukleové kyseliny dostatečné kvantity a kvality. Takto izolovaná DNA je vhodná pro následnou analýzu metodou PCR. DNA i RNA mohou být izolovány z různých biologických materiálů, např. tkání, bakteriálních buněk, virů i rostlinných pletiv. Izolace nukleové kyseliny je vícekový proces, při kterém se ze vzorku biologického materiálu postupně odstraní proteiny, lipidy a inhibitory. Hlavní kroky izolace zahrnují lyzi buněk, inaktivaci buněčných nukleáz, extrakci a následné přečištění DNA. V případě lyze buněk a izolace DNA se využívají fyzikální, chemické a biologické jevy, jako var, hydrolyza proteinázami a inkubaci s detergenty. Rovněž mohou být využívány dostupné komerční kity pro extrakci DNA. Výběr vhodné metody je vždy závislý na matici zkoumaného vzorku [66].

2.8.1 Izolace rostlinné DNA

Izolace DNA vhodné kvality z rostlinných pletiv/buněk je náročná, protože v rostlinách je přítomna pevná polysacharidová buněčná stěna, polyfenolické sloučeniny, barviva a další sekundární metabolity inhibující PCR a je nutné je při přípravě vzorku odstranit [66]. Kvalitu a čistotu vyzolované DNA může také ovlivňovat stáří matrice, např. mladé listy jsou k izolaci rostlinné DNA mnohem vhodnější než staré, z důvodu menšího množství nahromaděných sekundárních metabolitů [67; 68; 69].

Bylo vyvinuto mnoho metod pro izolaci purifikované DNA z rostlinných matic, které mohou být použity v závislosti na složení matrice. Nejúspěšnější metody byly vytvořeny skupinami vědců Murray and Thompson [67], Doyle a Doyle [68], Rogers a Bendich [70]; Lodhi a kol. [71], avšak žádná z nich není univerzální pro všechny typy rostlinných matic. V izolačním postupu je proto nutné metody modifikovat nebo kombinovat v závislosti na rostlinné matici. Homogenizace je důležitým krokem při izolaci NK, ty mohou být

z buněk uvolněny fyzikální nebo chemickou disrupcí buněk. Fyzikální disrupce se provádí za pomoci rozbíjecích kuliček nebo třecí misky s tloučkem. Vzorek je vhodné třít v tekutém dusíku, z důvodu lepší homogenizace a rychlosti zpracování vzorku [71]. V případě chemické disrupce jsou využívány hydrolyzační enzymy (celulázy, pektinázy, ...), detergenty, polysacharidy (např. xanthan) [66].

2.8.1.1 Izolační kity

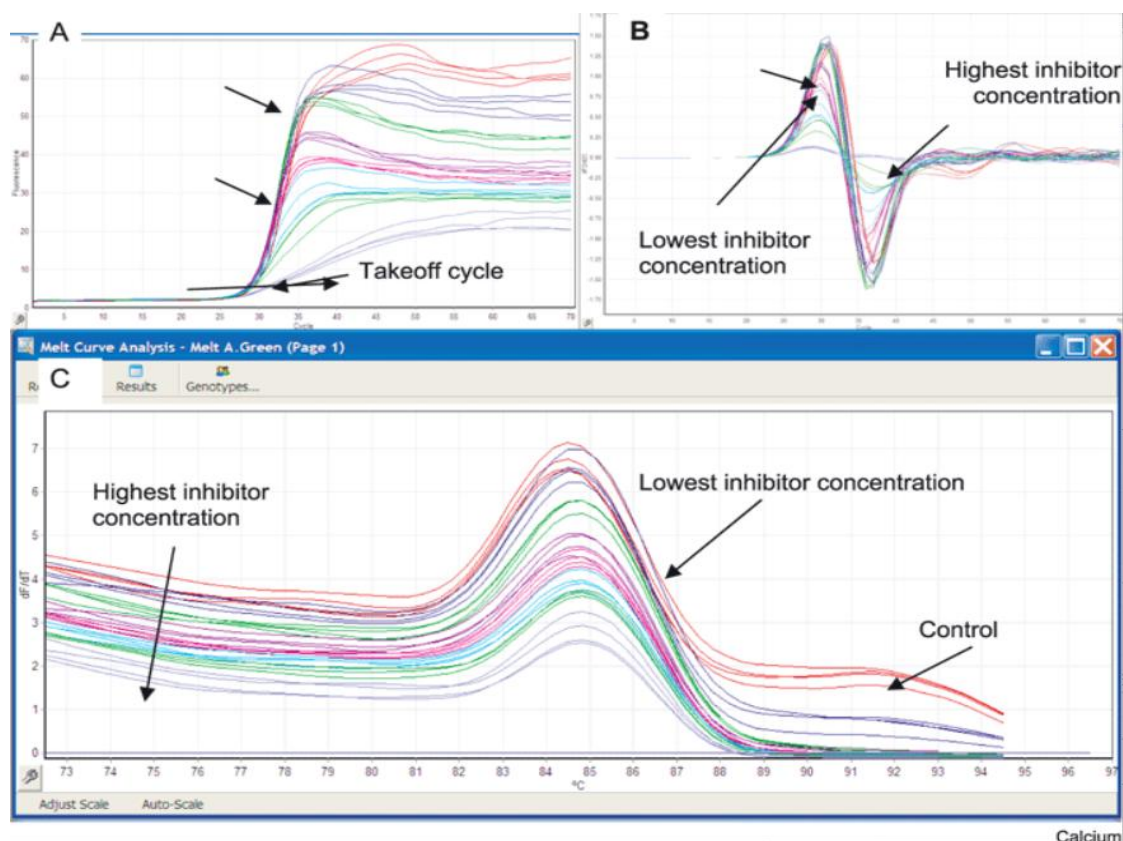
Izolace kvalitní a čisté DNA je obtížná, proto je dnes na trhu dostupná celá řada kitů pro izolaci rostlinné DNA. Komerční kity jsou snadné na používání, rychlé a poskytují dobré výsledky. Kity obsahují mechanické disruptory, lyzační pufry, RNAsy, atd. Polysacharidy a polyfenoly jsou odstraněny zpravidla vysrážením a centrifugací. Velké množství kitů obsahuje chromatografické kolony. DNA se váže na silikagel v přítomnosti chaotropických solí, DNA je vymyta z kolony po rehydrataci vodným pufrem. Výhodou je jednoduchost a rychlost izolace DNA. Nevýhodou využívání kitů pro izolaci rostlinné DNA je jejich vysoká pořizovací cena a možná neefektivnost při izolaci značně znečištěných vzorků [72; 73].

2.9 Inhibitory PCR

PCR inhibitory jsou různorodou skupinou látek s různým mechanismem účinku. Inhibitory mohou pocházet z matrice, ze které byla izolována DNA nebo se mohou dostat do vzorku v průběhu izolačních kroků. Hlavním důsledkem přítomnosti inhibitorů je snížená senzitivita, ale také falešně negativní výsledky [74].

2.9.1 Mechanismus účinku PCR inhibitorů

PCR inhibitory jsou organické i anorganické sloučeniny (např. Ca^{2+} ionty). Opel a kol. zkoumali vliv inhibitorů PCR na účinnost reakce, čím vyšší byl koncentrace vápenatých iontů tím nižší byly amplifikační křivky a rozdíl byl pozorovatelný i při analýze křivek tání (Obrázek 5) [75]. Většina známých inhibitorů je však organického původu, např. fenol, etanol, polysacharidy, sodium dodecyl sulfát (SDS), melanin, kolagen, myoglobin, proteinázy, atd. [76; 77]. Inhibiční účinek zpravidla roste s koncentrací přítomných inhibitorů [74].



Obrázek 5: Účinek množství přidávaných vápenatých iontů do PCR směsi, A- amplifikační křivky, C - analýza teploty tání PCR produktů (převzato z [75])

Široká škála látek může interferovat v různých krocích PCR reakce. Některé komponenty se mohou vázat na polymerní povrchy (např. stěny zkumavky) a tím je snížena účinnost extrakce nukleové kyseliny (NK). NK mohou být degradovány nukleázami a přítomnost polysacharidů snižuje schopnost resuspendace vysrážené NK. DNA polymeráza je enzym, který je důležitý v PCR pro amplifikaci nových úseků DNA [78; 79]. Činnost DNA polymerázy může být inhibována několika různými způsoby. Detergenty, proteázy, močovina a fenol způsobují degradaci enzymu [76; 80; 81] zatímco vápník, kolagen a hematin způsobují pouze inhibici její aktivity [75]. Polysacharidy mohou narušovat enzymatický proces napodobováním struktury nukleové kyseliny [82].

PCR v reálném čase může být ovlivněna inhibitory, které interferují s fluorescenčním barvivem nebo ztěžují snímání fluorescenčního signálu, jedná se zejména o barevné látky např. indigo, melanin a hematin [75]. Ze studie Love a kol. vyplývá, že látky obsažené v bobulích a rajčatech ovlivňují PCR v reálném čase s využitím TaqMan sond v porovnání s konvenční PCR [83]. Inhibitory a jejich mechanismy účinku jsou uvedeny v Tabulce 2 [74].

Tabulka 2: Inhibitory PCR a jejich mechanismus účinku

Mechanismus inhibičního účinku	Inhibitor	Reference
Koprecipitace s NK a snížená rozpustnost NK	polyfenoly, polysacharidy	[79; 84]
Degradace NK	zbytky buněk, detergenty, proteiny, polysacharidy, soli, rozpouštědla	[82; 85]
Propojení s NK a změna jejich chemických vlastností	polyfenoly, polysacharidy, huminové kyseliny, kolagen, melanin	[76; 84]
Vazba nebo adsorpce na NK a enzymy	huminová kyselina	[86]
Neúplný melting DNA	hematin, indigo	[75]
Snížení specifity primerů	kovové ionty	[86]
Degradace polymerázy	detergenty, proteázy, močovina	[80; 76]
Inhibice aktivity DNA polymerázy nebo reverzní transkriptázy	vápník, kolagen, hematin, rostlinné metabolity, IgG, melanin, myoglobin, polysacharidy, sodík, kyselina taninová	[75; 82; 87; 88; 89; 90]
Chelatace kovových iontů včetně Mg ²⁺	polyfenoly, kyselina taninová, EDTA	[75; 76; 86]
Kompetice s kofaktory polymerázy	vápenaté ionty	[75]
Inhibice elongace DNA	antivirotika (např. acyklovir)	[91]

2.9.2 PCR inhibitory přítomné v rostlinách

V rostlinných matricích se nachází mnoho inhibitorů polymerázové řetězové reakce (PCR), jsou to zejména některé polysacharidy a polyfenoly (antokyanin, flavonol, ellagitannin, proantokyanidin a fenolické kyseliny) [92; 93]. Polysacharidy jsou těžko odstranitelné látky. Homogenát je díky nim viskózní a falešně tak indikuje vysoké výtěžky DNA při izolaci. Polysacharidy jsou často vysráženy s DNA a ovlivňují činnost enzymů (polymerázy, ligázy a restriční endonukleázy) [66]. DNA kontaminovaná polysacharidy zůstává v průběhu elektroforézy v jamce gelu a nemigruje [94]. Výzkumy prokázaly, že kyselé rostlinné polysacharidy (např. dextransulfát, kyselina alginová) mají výrazný inhibiční efekt na PCR, kdy stačí přítomnost 0,001% dextransulfátu na komplexní inhibici PCR. Neutrální polysacharidy (dextran, škrob, arabinogalaktan) neprojevují inhibiční účinek i v relativně vysoké koncentraci, jako je 4% dextran, který PCR neinhibuje. Některé rostlinné polyfenolické sloučeniny (např. kyselina chlorogenová, kávová) mohou reagovat s proteiny/enzymy a pozměnit tak vlastnosti biopolymerů a výrazně inhibovat PCR [95]. Polyfenoly často způsobují degradaci DNA v průběhu izolace DNA. Mezi nejčastěji vyskytující se polyfenoly se řadí flavonoidy, terpenoidy a taniny. Oxidované polyfenoly z rozrušených buněk se ireversibilně vážou na DNA a způsobují enzymatické hnědnutí DNA peletu při izolaci [71; 96; 97]. Takto vázané polyfenoly nemohou být odstraněny běžnými izolačními postupy, většinou jsou do extrakčního pufru přidávány antioxidanty [66].

V potravinových matricích byla identifikována celá škála látek s inhibičními účinky v PCR, např. tuky, glykogen, polysacharidy, minerální látky a proteiny [80; 98]. Proteiny mohou být sráženy s DNA při její izolaci. Pro jejich odstranění jsou používány převážně detergenty a enzymy. Vysoké množství proteinů je zejména v semenech [66].

2.9.3 Detekce přítomnosti inhibitorů

Přítomnost některých inhibitorů lze odhalit měřením absorbance při spektroskopické analýze. Tato metoda je rychlá, jednoduchá a levná. Poměr absorbance při vlnových délkách 260/280 nm by se měl pohybovat v rozmezí 1,8 – 2,0. Pokud je poměr nižší, můžeme usuzovat na kontaminaci proteiny (většinou). Pokud je vyšší než 2,0, je to způsobeno přítomností vysokého množství RNA. DNA izolovaná z rostlinných matric může být kontaminována polyfenoly a polysacharidy, znečištění těmito látkami lze na spektru pozorovat při 230 a 270 nm. Poměr vlnových délek 260/230 nm by měl být v případě čisté DNA vyšší než 1,8 a poměr vlnových délek 260/270 nm by se měl pohybovat mezi 1,2 – 1,3 [66].

2.9.4 Odstranění inhibitorů PCR

Čím čistější DNA je použita v PCR, tím spolehlivější a reprodukovatelnější výsledky lze získat. Obecně lze množství inhibitorů snížit vhodným zpracováním vzorku, výběrem robustnější DNA polymerázy nebo použitím specifických aditiv do PCR směsi (betain, bovinní sérový albumin (BSA), dimethylsulfoxid, formamid, glycerol, neiontové detergenty, polyethylenglykol a inhibitory proteinázy) [88]. Ředěním vzorku nebo extrahované NK lze vyředit také inhibitory PCR, avšak citlivost PCR je tímto snížena [99]. V některých případech je pro odstranění nežádoucích látek dostačující fenol-chloroformová reakce. Některými autory je doporučována extrakce guanidinium thiokyanátem pro odstranění co možná největšího množství inhibičních látek [100]. Lze také použít kolonovou chromatografii s celou škálou možných sorbentů jako přečišťovací metodu [101]. Některými autory je používána také izolace DNA pomocí magnetických nosičů [102; 103].

Polysacharidy nacházející se v rostlinných matricích, zejména bobulích, brání resuspendaci vysrážených NK a je těžké je odstranit. Pro precipitaci polysacharidů se využívají Tween 20, DMSO, PEG nebo aktivní uhlí [104]. Někteří autoři doporučují také vysoké koncentrace NaCl, který zvyšuje rozpustnost polysacharidů v etanolu. Koncentrace roztoku NaCl se liší dle rostlinné matrice a obsahu polysacharidů ve vzorku, jsou uváděny koncentrace v rozmezí 1,4 – 6 M NaCl. Pro odstranění polysacharidů se používá i CTAB, který se při vysokých koncentracích solí váže do nerozpustných komplexů s proteiny a acidickými polysacharidy [71; 105].

Fenolické sloučeniny se odstraňují srážením za použití polyvinylpyrrolidonu (PVP) [84]. PVP funguje jako sorbent pro navázání polyfenolů a vytváření komplexů, zvláště při nízkém pH roztoku [71; 106; 107]. Dále je možné přidávat látky působící antioxidačně, např. β -merkaptoethanol, BSA, azid sodný, kyselina askorbová, DTT, siřičitan sodný, atd. U vzorků s vysokým obsahem polyfenolů (rajče, hrozny, kokos) byl v několika studiích přidáván inhibitor polyfenoloxiázy DIECA [66; 107].

Proteiny jsou odstraňovány přidavkem SDS, DTT nebo β -merkaptoethanolu, které narušují strukturu proteinu. Také lze použít enzymy hydrolyzující proteiny, např. proteináza K, která inaktivuje DNAsy a RNAsy. Konvenčně jsou proteiny odstraňovány organickými rozpouštědly při fenol-chloroformové extrakci [66].

2.10 Polymerázová řetězová reakce

PCR je standardní metodou k charakterizaci mikroorganismů a genetických markerů v široké škále vzorků. PCR je rychlá a citlivá metoda, při které dochází k amplifikaci specifického úseku DNA za přítomnosti DNA polymerázy, Mg^{2+} iontů, dNTP a specifických primerů. Metoda PCR je založena na cyklicky se opakující syntéze určitého úseku DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ prostřednictvím DNA polymerázy. Úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, což jsou krátké oligonukleotidy se specifickou sekvencí [74].

Teoretický koncept produkce vysokého množství kopií specifického úseku DNA, cyklicky se opakujícím procesem, za použití DNA polymerázy a oligonukleotidových primerů byl poprvé publikován již v roce 1971 [108]. Avšak až v roce 1988 bylo popsáno první použití termostabilní DNA polymerázy v polymerázové řetězové reakci (PCR), což umožnilo široké využití metody a její celosvětové rozšíření [109]. Amplikony jsou zpravidla ve vhodné kvalitě a kvantitě pro identifikaci dle délky amplikonů, dle teploty tání a pomocí sekvenování. Levnou a jednoduchou metodou používanou pro zjištění délky amplikonů je gelová elektroforéza. Avšak specifita gelové elektroforézy je poměrně nízká a to zejména v případě rozlišení různých molekul o stejné molekulové hmotnosti. Charakterizace produktů PCR dle jejich sekvence je mnohem více spolehlivá. Real-time PCR umožňuje sledování průběhu amplifikace monitorováním změny intenzity fluorescenčního záření. Hlavní výhodou real-time PCR oproti konvenční PCR je mimo jiné i možnost kvantifikace. Změna fluorescence může být spojena s akumulací produktu PCR různými způsoby [110].

Jsou používány dvě hlavní metody k získání fluorescenčního signálu v průběhu syntézy amplikonů v PCR. První metoda závisí na vlastnostech použitých fluorescenčních barviv (např. SYBR Green) vázat se na dvoušroubovici DNA, změnit tak svou konformaci a zvýšit tím i svou fluorescenci (interkalační barviva). Druhý přístup využívá fluorescenční rezonanční energetický transfer (FRET). Tento přístup využívá změnu relativního prostorového uspořádání donorových a akceptorových molekul. Tyto molekuly jsou připojeny k sondám, primerům nebo produktu PCR a jsou obvykle navrženy tak, že amplifikace specifického úseku DNA způsobuje zvýšení fluorescence při určité vlnové délce. Dnešní přístroje pro real-time PCR jsou schopny charakterizace amplikonů *in situ* analýzou teploty tání nebo charakterizací hybridizačních sond. V případě interkalačních barviv je teplota tání amplikonů měřena v závislosti na intenzitě fluorescence emitované barvivem při zvyšování teploty až nad očekávanou teplotu tání amplikonů. Metody, které využívají hybridizace sondy k vytvoření fluorescenčního signálu, jsou obecně méně náchylné k získání falešně pozitivních výsledků než metody s použitím interkalačních barviv. Mnoho sond je taktéž možné použít pro multiplexní reakce [110].

2.10.1 Real-time PCR

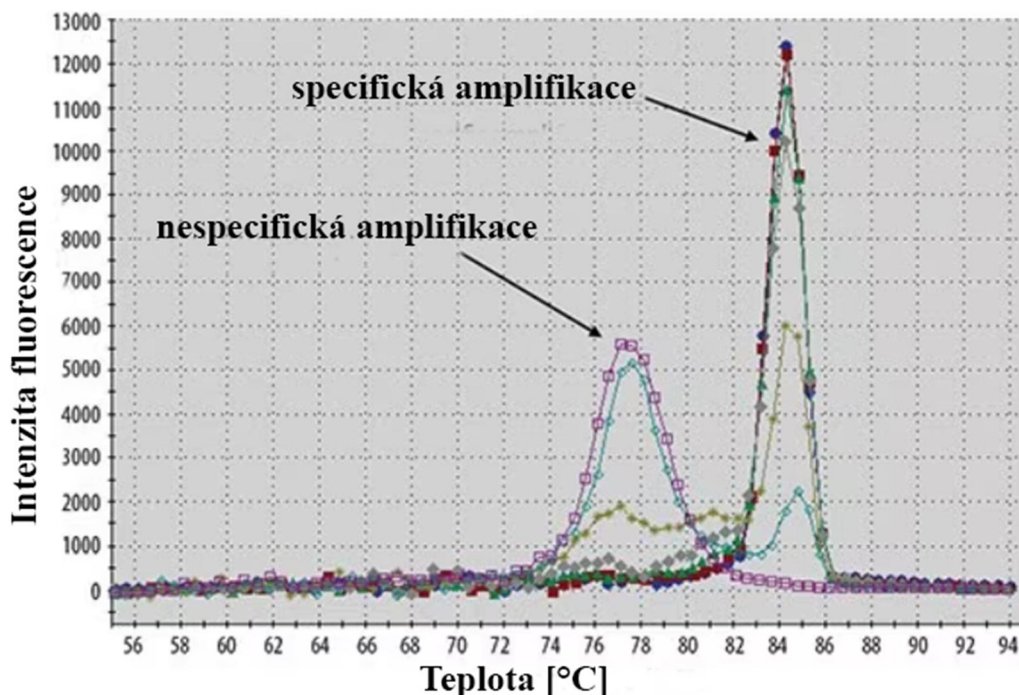
První práce, ve které byla demonstrována současně amplifikace a detekce specifické sekvence DNA v reálném čase byla publikována v roce 1992. Do reakční směsi byl přidán ethidium bromid (EtBr) a akumulace PCR produktu tak mohla být sledována na konci každého cyklu. Po navázání EtBr do dvoušroubovice DNA a po excitaci UV zářením mohl být sledován nárůst intenzity fluorescenčního záření, který indikoval, že dochází k amplifikaci [111]. Při vynesení intenzity fluorescence v závislosti na počtu cyklů do grafu bylo prokázáno, že kinetika fluorescence vyzařované EtBr po navázání do dvoušroubovice DNA je závislá na výchozím množství molekul DNA. Princip real-time tedy může být definován jako sledování fluorescenčního signálu na konci každého cyklu PCR, přičemž množství produktu vzniklého během exponenciální fáze amplifikace může být použito k určení výchozího množství molekul DNA [112]. Používání interkalačního barviva EtBr nebylo ideální z hlediska přesnosti a specifiity. V průběhu amplifikace totiž může docházet ke vzniku nespecifických produktů, zejména dimerů primerů, které pak mohou navyšovat intenzitu fluorescence. Postupem času byly představeny další typy interkalačních barviv a fluorescenčních sond, které významně zvyšovaly specifiitu a umožňovaly přesnější kvantifikaci [110]. Dnešní real-time PCR přístroje poskytují hned několik výhod, např. amplifikaci a detekci amplikonů v jednom systému, konstantní sledování průběhu reakce, zvýšenou citlivost, možnost kvantifikace, softwarově řízené operace atd. Avšak mají i několik nevýhod, např. limitovaná kapacita pro multiplexní reakce, ceny zařízení, analýza a zpracování výsledků může vyžadovat vyšší úroveň technických dovedností [113]. Hlavní výhodou real-time PCR je, že celý proces se odehrává v uzavřené reakční nádobě a tím je eliminována možnost kontaminace a jsou eliminovány post-PCR manipulace. Většina cyklerů pro real-time PCR využívá Peltierova efektu k aktivnímu transferu tepla z a do tenkostěnných zkumavek. Tato zařízení transferují teplo z jedné strany polovodiče na druhou. Některé platformy proto využívají alternativních technologií pro tepelnou výměnu, doba pro dosažení daných teplot je pak zkrácena. Byly sestrojeny termocyklery, které k ohřívání a chlazení zkumavek využívají vzduch. Je jím například vzduchem vyhříváný cycler Rotor-Gene fungující na bázi centrifugy LightCycler využívá skleněné kapiláry, která je stacionárně vyhřívána vzduchem [110].

2.10.1.1 Kvantifikace

Na rozdíl od konvenční PCR umožňují přístroje pro real-time PCR měření kinetiky akumulace produktu v každé PCR zkumavce zvlášť. K detekci dochází až po několika cyklech, a to po překročení detekčního prahu fluorescence přístroje (threshold). Po překročení prahu fluorescence následuje exponenciální fáze, účinnost PCR v této fázi by se v ideálním případě měla blížit 100 %, kdy dochází ke zdvojnásobení množství produktu PCR v každém cyklu. Po exponenciální fázi následuje plateau fáze. V plateau fázi už nedochází ke zvyšování intenzity fluorescence. Kvantifikace v real-time se provádí měřením počtu cyklů potřebných pro dosažení prahové úrovně fluorescenčního signálu popřípadě z druhého derivačního maxima křivky fluorescence v závislosti na cyklu. Pro kvantifikaci je nutné sestrojit kalibrační řadu z DNA o známé koncentraci [110; 112].

2.10.1.2 Analýza křivek tání

Analýza křivek tání je metoda, při které se ověřuje specifita vzniklých produktů PCR (amplikonů), viz Obrázek 6. Interkalační barvivo vázající se na dsDNA je vázáno reverzibilně, takže intenzita fluorescence klesá, když se reakční teplota zvyšuje nad teplotu tání (T_m). Ve spojení s kontrolami tento typ analýzy umožňuje detekci nespecifických produktů, které tají při jiných teplotách než konkrétní. Křivky tání jsou většinou vizualizovány jako záporná derivace fluorescence ($-dF/dT$). Amplikony s více páry bází a s vyšším obsahem G-C vazeb mají vyšší T_m [114]



Obrázek 6: Příklad analýzy křivky tání (derivace) (upraveno dle [114])

2.10.2 Digitální polymerázová řetězová reakce

Dalším typem PCR je digitální polymerázová řetězová reakce (dPCR), která také využívá fluorescenční molekuly a umožňuje absolutní kvantifikaci nukleových kyselin. Původní vzorek, který byl amplifikován pomocí PCR s fluorescenční látkou, je rozdělen do řady malých částí (např. olejových kapiček v případě ddPCR (Droplet Digital PCR)). Jednotlivé části obsahují jednu nebo žádnou molekulu DNA. Pak dojde pomocí fluorescenčního readeru k „přečtení“ každé kapky a zpracování signálů, vyhodnotí se, zda kapka obsahovala molekulu DNA nebo ne, vyhodnotí se také, zda bylo množství kapek dostatečné pro analýzu. Pomocí dPCR zjistíme počet DNA molekul v původním vzorku [115]. Rozdělení vzorku také umožňuje spolehlivou detekci cílové DNA v prostředí s vysokým obsahem necílové DNA, což je důležité např. pro analýzu GMO, kde transgen může být přítomný v mnohem nižší koncentraci než referenční gen (endogen). I inhibované reakce mohou stále produkovat detekovatelný signál, ale některé inhibitory jsou schopny ovlivnit absolutní kvantifikaci i v dPCR [116]. Některé studie však prokázaly vyšší toleranci dPCR vůči inhibitorům při kvantifikaci v porovnání s qPCR [117; 118].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je využití metod molekulární biologie v kombinaci s dalšími instrumentálními technikami k identifikaci a stanovení autenticity kosmetických výrobků s přírodní složkou. Tyto metodické strategie jsou aplikovatelné rovněž do oblasti potravinářství a budou zaměřeny zejména na analýzu bylinné kosmetiky.

V rámci disertační práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Literární rešerše zaměřená na přehled metod izolace, analýzy a identifikace přírodních rostlinných složek v komplexních matricích
2. Optimalizace metod izolace a charakterizace rostlinné DNA z vybraných typů kosmetických výrobků včetně modelových směsí
3. Screening a analýza kosmetických výrobků s přírodní rostlinnou složkou s využitím metod molekulární biologie k identifikaci rostlinného extraktu
4. Extrakce charakteristických metabolicky aktivních složek rostlinných extraktů z přírodních látek a kosmetických výrobků, analýza a identifikace aktivních složek pomocí instrumentálních metod
5. Srovnání a diskuse výsledků a aplikovatelnosti molekulárních a instrumentálních metod ke stanovení autenticity kosmetických výrobků, případně potravin.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Chemikálie

Destilovaná voda

Glycerol 99%, Míča a Harašta s.r.o., Česká republika

Gellinov easy, Lipo Chemicals, USA

Glyceryl Stearate GMS, ACE Trade, Česká republika

Caprylic/Capric Triglyceride, ACE Trade, Česká republika

Euxyl® K 703, Schülke, Německo

BHI bujón, Himedia, Indie

Bakteriologický agar (agar no. 1), Oxoid, Spojené království

Eligene Plant DNA isolation kit, Elisabeth Pharmacon, ČR

Agaróza pro elektroforézu, Top-Bio, Praha, ČR

Nanášecí pufer, Top-Bio, Praha, ČR

SYTO-9 qPCR 2x Master mix, Top-Bio, Praha, ČR

Voda pro PCR, Top-Bio, Praha, ČR

Acetonitril, HPLC Grade

Miliq voda

Kyselina boritá

DNA standard (Malamité, Moravské Prusy, ČR)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)

Fluorescenční barvivo MidoriGreen (Elisabeth Pharmacon, s.r.o., Brno, ČR)

Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)

Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)

Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)

Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)

Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Serva, Heidelberg, SRN)

4.1.1 Komponenty pro PCR

PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)

qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (2x koncentrovaný: 150mM Tris-HCl; pH 8,8; 40mM (NH₄)₂SO₄; 5mM MgCl₂; 400μM dATP; 400μM dCTP; 400μM dGTP; 400μM dTTP; Taq DNA polymeráza (50 U/ml); monoklonální protilátka anti-Taq; SYTO-9; stabilizátory a aditiva) (Top-Bio, Praha, ČR)

Primery (GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR)

4.2 Materiál a přístroje

Laboratorní váhy Scout, Ohaus, USA

Vodní lázeň série WE, Labo Play, Polsko

Hřídlová míchačka, Maneko, Česká republika

Váhy analytické Pioneer, Ohaus, USA

Minicentrifuga C1301LB-230V, Labnet, USA
Vínová sklenička GZ-19, Guzzanti, Itálie
Laboratorní mini inkubátor, Labnet, USA
Analyzátor disperzí – analytická centrifuga, LUMISizer, Německo
Laminární box Aura Mini, BioAir, Itálie
Inkubátor 1000, Heidolph, Německo
Třepačka Promax 1020, Heidolph, Německo
Mikrovlnný autokláv Microjet, Rodwell, Spojené království
McFarland densitometr Grant-bio DEN-1, Grant Instruments, Spojené království
Inkubátor IP100, U LTE Scientific, Spojené království
Kapesní váhy CM 60-2N, KERN, Německo
Centrifuga U-32 R, Boeco, Německo
Fixed Speed Vortex Mixer, Ohaus, USA
Combi-spin FVL-2400N, Biosan
Vortex MS2 Minishaker, IKA, Works, NNC, USA
Detekční systém pro dokumentaci gelu Azure biosystems C200, Dublin, Irsko
Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
Nanodrop 2000c UV-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific, USA
Termocykler – 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
HPLC - HPLC/PDA Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fischer, USA), DAD detektor Vanquish (Thermo Fischer, USA), kolona YMC-Triart C18 ExRS S-3 μ m, 8nm Analytical HPLC Column, 150 x 4.6 mm.
GC - Trace™ 1310 split/splitless injektoru (Thermo Fisher Scientific INC., Waltham, MA, USA) s hmotnostním detektorem ISQ™ LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific INC., Waltham, MA, USA). Analýza byla provedena na kapilární koloně TG-WaxMS, 30 m x 0,25 mm x 0,5 μ m.

4.3 Roztoky

4.3.1 0,5 x TBE pufr

Pro přípravu 5x TBE pufru, bylo smícháno 54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité s 600 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA a doplněno destilovanou vodou na 1000 ml. Následně byl takto připravený 5xTBE pufr 10x zředěn a použit pro další práci.

4.3.2 Agarózový gel pro elektroforézu

Návážka 1,8 g agarózy byla za horka rozpuštěna v 100 ml 0,5x TBE.

4.3.3 DNA standard

Byl použit DNA standard 100 bp, který obsahoval fragmenty o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 párů bází nebo standard 50 bp, který obsahoval

fragmenty o velikosti 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 párů bází.

4.4 Příprava vlastní kosmetické emulze a její stabilita v porovnání s komerčními vzorky

Pro testy stability bylo vybráno celkem 16 komerčně dostupných kosmetických přípravků (pleťové přípravky, tělové přípravky a peelings). Stabilita těchto výrobků byla porovnána se stabilitou vlastní připravené emulze, která v odstředivém testu vykazovala nejvyšší stabilitu. Specifikace těchto výrobků je uvedena v Příloze 1.

Byly připraveny 3 různé receptury, v Tabulce 3 je uvedeno jejich složení v hmotnostních procentech. Všechny emulze jsou typu olej ve vodě, vodná i olejová fáze byly připraveny zvlášť, zahřáty na 80°C a po té byla do vodné fáze za stálého míchání po malých částech přimíchána fáze olejová. Po vychladnutí byl do emulze přidán konzervant v koncentraci dle doporučení výrobce, případně další přísady.

Tabulka 3: Složení připravených emulzí

	Emulze 1	Emulze 2	Emulze 3
Vodní fáze	89,4 % destilovaná voda, 3 % glycerin	74 % destilovaná voda	84,3 % destilovaná voda 2,6 % glycerol
Olejová fáze	1 % gellinov easy, 2 % olej z vinných jader, 1 % glyceryl stearát, 3 % caprylic/capric triglycerid	10,4 % mandlový olej 8 % kokosový olej 7 % Olivem 1000 (emulgátor)	2,5 % ErcaWax BM1 (emulgátor) 3 % cetyl alkohol 1,5 % bílá vazelína 4 % parafinový olej 1,5 % dimeticon
Konzervant	0,6 % Euxyl K703	0,6 % Euxyl K703	0,6 % Euxyl K703
Přísady	2 % plod <i>Fragaria ananassa</i> / 0,25 % lyofilizované kůry <i>Citrus limon</i> / 2,5 % extraktu <i>Callisia fragrans</i> v 70% etanolu		

Každá emulze byla připravena ve 4 opakováních, přičemž jedna byla bez příměsí a do dalších třech byla do každé přidána jedna přísada uvedená v Tabulce 3, pro ověření, zda si emulze zachovají stejnou konzistenci i po přidání dalších přísad různého typu (čerstvý rostlinný materiál, sušený rostlinný materiál, extrakt v rozpouštědle). Přísady byly do emulzí přimíchány na úkor destilované vody pro zachování stejného procentuálního poměru všech ostatních složek emulzí.

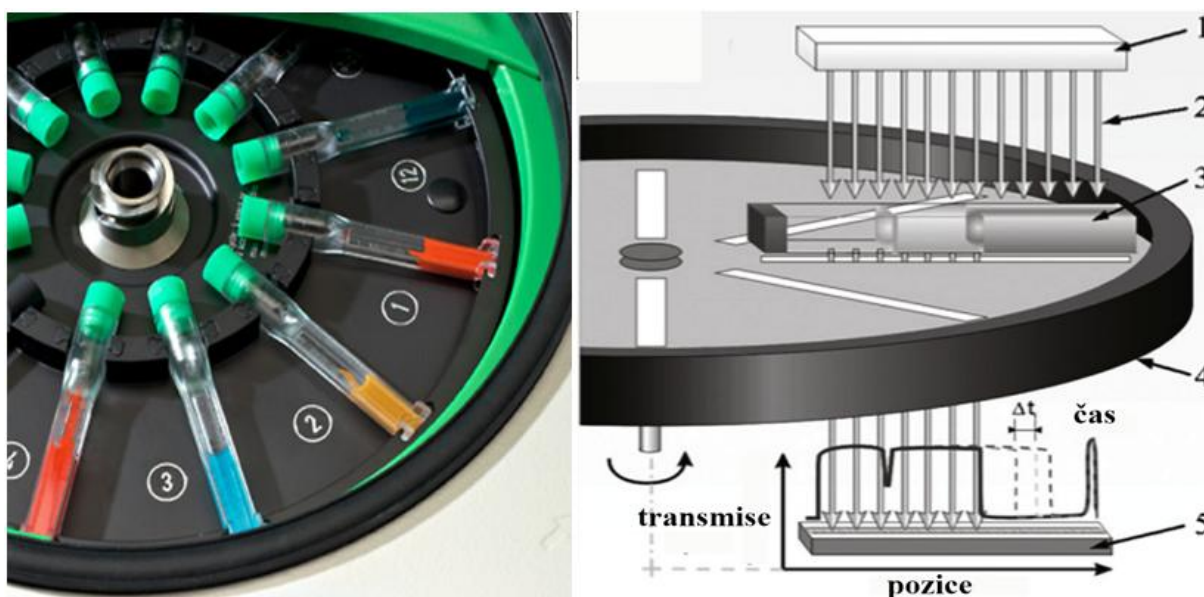
4.4.1 Stabilitní testy

Byl proveden odstředivý test připravených vlastních emulzí pomocí analytické centrifugy LUMiSizer. Byla vybrána nejstabilnější emulze, a ta byla podrobena dalším testům stability společně s komerčně dostupnými kosmetickými výrobky (viz Příloha 1). Bylo takto ověřeno, zda je emulze dostatečně stabilní v porovnání s komerčními výrobky, aby mohla sloužit jako

modelový vzorek pro optimalizaci izolace DNA a optimalizaci vybraných instrumentálních metod.

4.4.1.1 Odstředivý test připravených emulzí

Všechny připravené emulze (celkem 12) byly podrobeny odstředivému testu na analytické centrifuze LUMiSizer pro určení stability emulzí. Každý vzorek byl nadávkován pomocí dlouhé jehly do kyvet vhodných pro použití s přístrojem LUMiSizer. Pomocí softwaru byla měřena transmise (propustnost světla) laserového paprsku s vlnovou délkou 865 nm každých 60 s po časový úsek 6 hodin a 40 minut při teplotě 25°C a při 4 000 rpm. Přístroj a schéma záznamu měření lze vidět na Obrázku 7.



1 – zdroj světla, 2 – NIR světlo, 3 – vzorek v kyvetě, 4 – rotor, 5 – záznam a vyhodnocení

Obrázek 7: LUMiSizer (převzato a upraveno [119; 120])

4.4.1.2 Odstředivý test Emulze 1 a komerčních výrobků

Emulze 1 a dalších 10 vzorků (specifikace viz Příloha 1) byly v duplikátu podrobeny odstředivému testu na analytické centrifuze LUMiSizer pro určení stability emulzí. Každý vzorek byl nadávkován pomocí dlouhé jehly do kyvet vhodných pro použití s přístrojem LUMiSizer. Pomocí softwaru byla měřena transmise (propustnost světla) laserového paprsku s vlnovou délkou 865 nm každých 100 s po časový úsek 16 hodin a 40 minut při teplotě 25°C a při 4 000 rpm.

4.4.1.3 Cyklický test stability Emulze 1 a komerčních výrobků

Jeden gram od každého přípravku, včetně Emulze 1, byl navážen do zkumavky Eppendorf 1,5 ml a na váhací misku, pro porovnání skladování přípravku v těsnicím a netěsnicím obalu. Všechny vzorky byly naváženy v duplikátu. Cyklický test probíhal ve 3 cyklech (šesti fázích) kdy v jednom cyklu byly přípravky nejdříve vystaveny teplotě 5°C po dobu 24 hodin a

následovalo skladování při teplotě 40°C po dobu dalších 24 hodin. Vzhled a přesná hmotnost vzorků byla zaznamenána ihned po navážení vzorku a dále po skončení každé fáze.

4.4.1.4 Termický test stability Emulze 1 a komerčních výrobků

Jeden gram od každého přípravku, včetně Emulze 1, byl v duplikátu navážen na váhící misku. Všechny vzorky byly vloženy do termostatu vyhřátého na 37°C. Experiment probíhal 59 dní a všechny vzorky byly pravidelně váženy, zpočátku každý den (první týden), po té 1x týdně. V případě změny vzhledu byla tato změna zdokumentována.

4.4.1.5 Zátěžový test Emulze 1 a komerčních výrobků

Z každého přípravku byly do sterilních zkumavek odebrány 2 g výrobku, vše v duplikátu. Do každé zkumavky bylo následně přidáno cca 1 500 KJT *Staphylococcus epidermidis* CCM 2124. Množství mikroorganismů odpovídá přibližně počtu bakterií na 1 cm² kůže konečku prstu, ten přichází nejčastěji do kontaktu s produktem [121; 122]. Po přidání mikroorganismů do výrobků, byl každý vzorek promíchán sterilní tyčinkou, byla odebrána část vzorku, pro ověření množství živých buněk v čase 0. Pak byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě. Test probíhal 28 dní a každých, z testovací zkumavky bylo odebráno 0,5 g z přípravku do nové zkumavky po 7, 14 a 28 dnech. Do těchto zkumavek bylo přidáno 500 – 750 µl sterilní destilované vody, dle hustoty přípravku. Vzorky byly zvortexovány, případně krátce zcentrifugovány. V případě vytvoření dvou fází, byly na přítomnost mikroorganismů otestovány obě fáze. Na misky s BHI (brain heart infusion) agaru bylo napipetováno 100 µl každého vyředěného vzorku (případně naváženo 0,1 g). Misky byly v každém kontrolním bodě kultivovány při 37 °C po dobu 72 hodin a případný nárůst byl kontrolován a zaznamenán každých 24 hodin.

4.5 Výběr vhodného izolačního postupu pro izolaci DNA z rostlinné matrice

Byla izolována DNA z různých typů rostlinných matric za použití komerčně dostupných kitů. Takto izolovaná DNA byla dále amplifikována a na základě výsledků byl vybrán nejvhodnější izolační postup.

4.5.1 Výběr metody izolace DNA

Byl proveden výběr vhodného izolačního postupu, testováno bylo 5 komerčně dostupných kitů (DNeasy PowerPlant Pro Kit, Qiagen, Hilden, Německo; EliGene Plant DNA Isolation Kit, Elisabeth Pharmacon, Brno, Česká Republika; ChargeSwitch gDNA Plant Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Chemagic DNA Plant Kit, Perkin-Elmer, USA; Easy Prep Polyphenol Plant DNA Extraction Kit, Tools, New Taipei City, Taiwan) pro izolaci rostlinné DNA a modifikovaná CTAB metoda [123; 124]. Všechny vzorky byly izolovány v triplikátu. Izolace DNA probíhala dle doporučení výrobce daného kitu.

4.5.2 Výběr vzorků

Pro výběr vhodné izolační metody byla použita čerstvá rostlinná matrice, plody meruňky, jahody, citronová kůra, dužina citronu, pomerančová kůra, dužina pomeranče. Dále byla DNA

izolována ze sušených květů heřmánku. Jedná se o plody a květ, které v sobě obsahují vonné látky včetně alergenů a používají se v kosmetickém průmyslu. Byly tedy použity matrice různé konzistence (dužina, kůra), zpracování (čerstvé, sušené) a složení (různé barviva, antokyany, flavonoidy, sacharidy,...). Cílem bylo vybrat metodu izolace, kterou bude možné izolovat DNA z co nejširšího spektra různorodých matric. Většina kitů je optimalizována na izolaci rostlinné DNA z čerstvých listů, kde lze získat DNA vysoké kvality i čistoty, to však nelze v kosmetických výrobcích očekávat.

4.5.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Izolovaná DNA byla změřena spektrofotometricky za účelem zjištění její koncentrace a čistoty. Poměr absorbance při vlnových délkách 260/280 nm by se měl pohybovat v rozmezí 1,8 – 2,0. Pokud je poměr nižší, můžeme usuzovat na kontaminaci proteiny (většinou). Pokud je vyšší než 2,0, je to způsobeno přítomností vysokého množství RNA. DNA izolovaná z rostlinných matric může být kontaminována polyfenoly a polysacharidy, znečištění těmito látkami lze na spektru pozorovat při 230 a 270 nm. Poměr vlnových délek 260/230 nm by měl být v případě čisté DNA vyšší než 1,8 a poměr vlnových délek 260/270 nm by se měl pohybovat mezi 1,2 – 1,3 [66].

4.5.4 PCR v reálném čase

Následně byla ověřena amplifikovatelnost DNA pomocí primerů specifických pro rostliny pomocí PCR v reálném čase.

4.5.4.1 Směs pro PCR

Komponenty pro PCR byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce zcentrifugovány. Byla připravena směs pro konvenční PCR o celkovém objemu 25 μ l. Komponenty do směsi byly přidávány postupně v pořadí uvedeném v Tabulce 4.

Tabulka 4: Příprava směsi pro PCR v reálném čase

Krok	Komponenta	Objem [μ l]
1	Voda pro PCR	9,5
2	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3	Primer 1	1
4	Primer 2	1
5	Matrice DNA	1
	Celkem	25

Jako poslední byla přidána DNA matrice, 1 μ l roztoku izolované DNA rozpuštěné v elučním pufru. V případě izolované DNA o koncentraci vyšší 10 ng \cdot μ l⁻¹, byla DNA použitá do reakce vyředěna na tuto koncentraci. Jako negativní kontrola byl místo DNA matrice přidán 1 μ l vody pro PCR.

4.5.4.2 Primery

Pro amplifikaci byly použity primery specifické pro ITS2 oblast rostlin, jejich sekvence je uvedena v Tabulce 5.

Tabulka 5: Primery specifické pro ITS2 oblast rostlin [125]

Primery	Sekvence primerů (5'– 3')	Velikost PCR produktů
1 S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	500 bp
2 S3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	

4.5.4.3 Amplifikační program

Byla provedena amplifikace izolované DNA dle teplotního programu uvedeného v Tabulce 6.

Tabulka 6. Teplotní program PCR

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
S2F/S3R [125]				
95°C/5 min	95 °C/30 s	62 °C/30 s	72° C/30 s	72 °C/5 min
	34 cyklů			

4.5.4.4 Analýza křivek tání

Ihned po amplifikaci DNA PCR v reálném čase byla provedena analýza křivek tání produktů PCR (nazývaná též melt analýza). Před melt analýzou byl zařazen pre-melt krok (50 °C po dobu 90 s). Analýza křivek tání byla měřena v rozmezí 50 až 99 °C s teplotním krokem 1 °C po dobu 5 sekund. Amplifikační křivky a křivky tání byly zaznamenávány a analyzovány programem RotorGene 6000 Series Software.

4.6 Izolace rostlinné DNA z kosmetických výrobků

Pomocí EliGene Plant DNA Isolation Kit byla izolována rostlinná DNA z čerstvého rostlinného materiálu, lyofilizovaného rostlinného materiálu, z kosmetických výrobků s rostlinnou složkou.

4.6.1 Postup izolace DNA – upraven dle kitu EliGene

Pro izolaci DNA z rostlin byla použita souprava EliGene Plant DNA Isolation Kit. Postup byl proveden podle návodu přiloženého ke kitu. DNA rostlinných pletiv a krémů byla izolována vždy ve dvou nebo více opakováních. Úprava postupu se týkala jen navážky nebo předpřípravy některých typů vzorků. Pokud se v kosmetickém výrobku nachází viditelné části rostlinného materiálu, je možné vzorek předpřípravit na izolaci centrifugací. 0,5 g kosmetického přípravku je smícháno s 5 ml sterilní destilované vody a směs byla vortexována. Po té byl rozsuspendovaný vzorek centrifugován při 6 000 rpm po dobu 6 minut. Vzniklý sediment byl po té použit pro izolaci DNA kitem jako výchozí rostlinný materiál pro izolaci DNA.

Každého vzorku čerstvého a lyofilizovaného rostlinného materiálu bylo naváženo 0,02 gramů z rostlinného materiálu a 0,1 gramu z modelových a komerčních kosmetických produktů. K homogenizaci vzorku rostlinného materiálu bylo použito 0,2 g homogenizačního písku a kopisto, pro mechanické rozmělnění vzorku. Ke vzorkům komerčních a modelových kosmetických vzorků nebyl přidáván homogenizační písek v případě, že to jejich konzistence nedovolovala (emulze) nebo by jeho přítomnost byla zbytečná (peelingy), v těchto případech byl vzorek rozmělněn přímo v pufru. Po rozmělnění vzorku byl ke vzorku přidán homogenizační pufr, který zabraňoval degradaci nukleových kyselin a pomáhal odstraňovat proteiny a fenolické látky. Poté byl přidán lyzační pufr s dodecylsíránem sodným (SDS), který je potřebný pro kompletní lyzi buněk. Směs inkubována po dobu 10 minut při teplotě 70 °C. Vzorky byly centrifugovány a k supernatantu byl přidán pufr obsahující činidlo pro vysrážení organických a anorganických složek (proteiny, fenolické látky a polysacharidy). Po inkubaci byly k supernatantu přidány dva pufrы. První, vázací pufr, obsahoval chaotropní soli a druhý, obsahoval etanol. Tato kombinace pufrů poskytuje optimální podmínky pro vazbu DNA, ta díky chaotropním solím přilne k silikátové membráně spin filtru. Tekutá složka přejde skrz membránu a je odstraněna. Membrána spin filtru byla promývána promývacími roztoky na bázi etanolu, které přečistily DNA, navázanou na spin filtru. Membrána byla vysušena dvouminutovou centrifugací při vysokých otáčkách. K uvolnění DNA, navázané na spin filtru, byl použit eluční pufr.

4.6.2 PCR v reálném čase

Koncentrace a čistota eluované DNA byla stanovena spektrofotometricky a pak byla ověřena amplifikovatelnost této DNA pomocí primerů specifických pro rostliny pomocí PCR v reálném čase stejně jako v kapitole 4.5.4. V případě úspěšné amplifikace byla DNA podrobena další PCR v reálném čase se specifitějšími primery.

4.6.2.1 Směs pro PCR

Komponenty pro PCR byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce zcentrifugovány. Byla připravena směs pro konvenční PCR o celkovém objemu 25 μl . Komponenty do směsi byly přidávány postupně v pořadí uvedeném v Tabulce 7. Jako poslední byla přidána DNA matrice, 1 μl roztoku izolované DNA rozpuštěné v elučním pufru. V případě izolované DNA o koncentraci vyšší 10 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, byla DNA použita do reakce vyředěna na tuto koncentraci. Jako negativní kontrola byl místo DNA matrice přidán 1 μl vody pro PCR.

Tabulka 7: Příprava směsi pro PCR v reálném čase

Krok	Komponenta	Objem [μl]
1	Voda pro PCR	9,5
2	qPCR 2x SYTO–9 Master Mix	12,5
3	Primer 1	1
4	Primer 2	1
5	Matrice DNA	1
	Celkem	25

4.6.2.2 Primery

Pro amplifikaci byly použity primery uvedené v Tabulce 8. Tyto primery byly vybrány na základě předchozích optimalizací. Jejich specifita byla také ověřena v databázi NCBI v programu PrimerBlast.

Tabulka 8: Primery

Primery		Sekvence primerů (5' – 3')	Velikost PCR produktů
roslinná DNA – ITS 2 oblast [126]			
1	26S for	GAATTCACCCAAGTGTGGGA	220 bp
2	26S rev	AGAGGCGTTCAGTCATAATC	
Limonensyntáza - citrusy [127]			
1	Lim 2_Forward	ACAAAAGACGAGCAGAAGAG	122 bp
2	Lim 2_Reverse	AAAACGATGAGCCAATCCAA	
Rod citrus (genus <i>Citrus</i>) [128]			
1	Cit s 1.01_F	ACCCTTGGCATATCAGCATT	97 bp
2	Cit s 1.01_R	CCAGGACTAAGAAGATTTCGC	
Rod jahodník (genus <i>Fragaria</i>) [129; 130]			
1	CAD1C_F	GAGGAGGAAGCTCTTAAACACC	209 bp
2	CAD1C_R	GCAGAAACTGTGTCAATGATCC	
Levandule [131]			
1	Lav1-F	AAAGCTTCTCCGCTTTGCG	154 bp
2	Lav1-R	TCGTCTTTTACCTCTTCATCCA	
Levandule – modifikace dle [131]			
1	Lav1mod-R	TGATCTTTTACCTCTTCATCCA	154 bp
2	Lav1mod-F	AAAGCCTCTCCGCTTTGCG	

4.6.2.3 Amplifikační program

Byla provedena amplifikace izolované DNA dle teplotního programu uvedeného v Tabulce 9.

Tabulka 9. Teplotní program PCR

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
26S for/26S rev [126]				
95°C/5 min	95°C/40 s	57°C/40 s	72°C/80 s	72°C/10 min
	35 cyklů			
Lim2F/R [127]				
94°C/5 min	94°C/30 s	54 °C/30 s	72°C/30 s	72°C/5 min
	37 cyklů			
Cit s 1.01_F/R [128]				
94°C/5 min	94°C/30 s	55°C/30 s	72°C/20 s	72°C/5 min
	35 cyklů			

Pokračování Tabulky 9:

CAD1C F/R – touchdown PCR [129; 130]				
94°C/2 min	94°C/30 s	60-55°C/45 s	72°C/60 s	72°C/5 min
	10 cyklů – každý cyklus pokles 0,5°C			
	94°C/30 s	55°C/45 s	72°C/60 s	
	25 cyklů			
Lav1FR, Lav1modFR [131]				
95°C/5 min	9 °C/30 s	50°C/30 s	72°C/30 s	72°C/5 min
	35 cyklů			

4.6.2.4 Analýza křivek tání

Ihned po amplifikaci DNA PCR v reálném čase byla provedena analýza křivek tání produktů PCR. Před analýzou byl zařazen pre-melt krok (50 °C po dobu 90 s). Melt analýza byla měřena v rozmezí 50 až 99 °C s teplotním krokem 1 °C po dobu 5 sekund. Amplifikační křivky a křivky tání byly zaznamenávány a analyzovány programem RotorGene 6000 Series Software.

4.6.2.5 Detekce produktů PCR agarózovou gelovou elektroforézou

Byl připraven 1,8% agarózový gel (1,8 g agarózy ve 100 ml 0,5x TBE pufru). Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarózy. Po vychladnutí na teplotu cca 60 °C bylo do gelu přidáno 5 µl fluorescenčního/interkalačního barviva, suspenze byla promíchána a nalita do připravené formy s hřebínkem. Gel byl ponechán na rovné podložce do zatuhnutí (cca 30 minut – 1 hodinu). Hřebínek byl opatrně vytažen, do vzniklých jamek byly pipetovány produkty PCR s 6x koncentrovaným nanášecím pufrům (25µl vzorku, 5 µl nanášecího pufru). Do každé jamky bylo pipetováno 10 µl vzorku PCR produktů, a do jedné jamky bylo pipetováno 5 µl DNA standardu. Byly použity dva velikostní standardy, DNA standard 50 bp a DNA standard 100 bp. Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji, na kterém bylo nastaveno konstantní napětí 60 V a elektroforéza probíhala 1,5 – 3 hodiny (v závislosti na velikosti vany). Po skončení byl gel vyjmut z vany a vyhodnocen na přístroji Azure™ c 200.

4.6.3 Optimalizace PCR specifické pro bylinu *Achyrocline satureioides*

Byly navrženy primery pomocí nástroje Primer Blast pomocí sekvencí z databáze NCBI. Následně byl vybrán primerový pár, který byl nejvíce specifický k dané sekvenci a optimalizací podmínek PCR bylo dosaženo nejlepší účinnosti PCR reakce (v PCR v reálném čase).

4.6.3.1 Návrh primerů

Byly navrženy 3 primerové páry pomocí NCBI nástroje Primer-BLAST . Primery byly navrženy pomocí sekvencí z databáze GenBank (KT865231.1, KT865438.1, HG797713.1). Jejich specifita byla zkontrolována také pomocí nástroje Primer-BLAST, primery byly

specifické pro *A. saturoioides*, případně se lišily jedním nebo více páry bazí od ostatních druhů rodu *Achyrocline*. Primery jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10: Navržené primery

Primery		Sekvence primerů (5'–3')	Velikost PCR produktů
1	AS1F	TGGCCAAAATACGAGTCCCC	95 bp
2	AS1R	GCTTCCCCTACGATTGCAGA	
1	AS2F	ATGGATGTTTGGTGTGGGGG	74 bp
2	AS2R	ACGGGGACTCGTATTTTGGC	
1	AS3F	AAACCTTCGTCTTCCGTGGT	77 bp
2	AS3R	GCGTCGTCAAAGACAACACA	

4.6.3.2 Výběr primerů

Byla provedena PCR s DNA izolovanou ze sušených květů *A. saturoioides* se všemi navrženými páry primerů. Primery AS2F/R byly vyloučeny z další analýzy, protože došlo také k amplifikaci DNA *Matricaria chamomilla*. Teplotní program a složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulkách 11 a 12.

Tabulka 11: Složení směsi pro PCR

Krok	Komponenta	Objem [μl]
1	Voda pro PCR	9,5
2	qPCR 2x SYTO–9 Master Mix	12,5
3	Primer 1	1
4	Primer 2	1
5	Matrice DNA	1
	Celkem	25

Tabulka 12: Teplotní program

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
95°C/5 min	95°C/30 s	56°C/30 s	72°C/30 s	72°C/10 min
	36 cyklů			

4.6.3.3 Optimalizace účinnosti PCR

Bylo optimalizováno množství primerů AS1F/R a AS3F/R ve směsi PCR za účelem zvýšení účinnosti PCR reakce. Bylo testováno 0,1 μl; 0,2 μl; 0,3 μl; 0,4 μl; 0,5 μl; 0,6 μl; 0,7 μl; 0,8 μl; 0,9 μl; 1 μl; 2 μl; 2,5 μl; 3 μl; 3,5 μl; 4 μl; 4,5 μl a 5 μl primerů v PCR směsi. Pro každé zvýšení koncentrace primerů v PCR směsi byla ověřena a případně zvýšena teplota anealingu pomocí nástroje NEB Tm Calculator. V případě primerů AS3F/R byla účinnost amplifikace významně zvýšena v případě složení směsi uvedené v Tabulce 13. Amplifikační program je uveden v Tabulce 14.

Tabulka 13: Složení směsi pro PCR

Krok	Komponenta	Objem [μ l]
1	Voda pro PCR	5,5
2	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3	Primer 1	3
4	Primer 2	3
5	Matrice DNA	1
	Celkem	25

Tabulka 14: Teplotní program

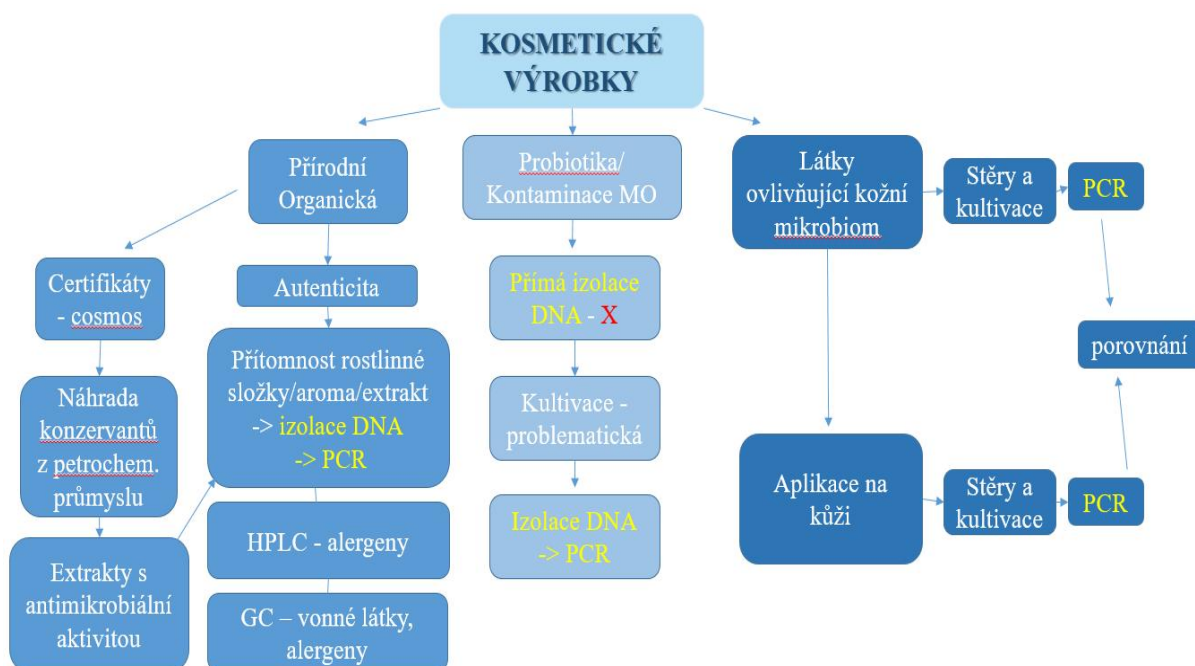
Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
95°C/5 min	95°C/30 s	54°C/30 s	72°C/40 s	72°C/10 min
	35 cyklů			

4.6.3.4 Detekce PCR produktů pomocí agarósově elektroforézy

Byl připraven 2,2% agarózový gel (2,2 g agarózy ve 100 ml 0,5x TBE pufru). Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarózy. Po vychladnutí na teplotu cca 60 °C bylo do gelu přidáno 5 μ l fluorescenčního/interkalačního barviva, suspenze byla promíchána a nalita do připravené formy s hřebínkem. Gel byl ponechán na rovné podložce do zatuhnutí (cca 30 minut – 1 hodinu). Hřebínek byl opatrně vytažen, do vzniklých jamek byly pipetovány produkty PCR s 6x koncentrovaným nanášecím pufrům (25 μ l vzorku, 5 μ l nanášecího pufru). Do každé jamky bylo pipetováno 10 μ l vzorku PCR produktů, a do jedné jamky bylo pipetováno 5 μ l DNA standardu. Byly použity dva velikostní standardy, DNA standard 50 bp a DNA standard 100 bp. Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji, na kterém bylo nastaveno konstantní napětí 50 V a elektroforéza probíhala 3 hodiny. Po skončení byl gel vyjmut z vany a vyhodnocen na přístroji Azure™ c 200.

4.7 Izolace bakteriální DNA

V kosmetických výrobcích se nachází kromě rostlinných složek i mikrobiální DNA, může se jednat o mikroorganismy, které byly do výrobku zaneseny v procesu výroby nebo používání, ale může se jednat i o mikroorganismy záměrně přidané do výrobku, např. probiotické bakterie. Na schématu níže je znázorněno, co vše lze v kosmetickém výrobku analyzovat pomocí extrakce DNA a PCR. Pomocí PCR lze také sledovat, jak po pravidelné aplikaci ovlivňuje kosmetický výrobek zastoupení mikroorganismů na pokožce.



4.7.1 Kultivace probiotických bakterií z kosmetických výrobků

Na přítomnost probiotických bakterií byly testovány 3 výrobky výrobce Eminence, které obsahovaly probiotika i rostlinnou složku (okurka), jejich specifikace se nachází v Příloze 1. Bylo odváženo v triplicátu 0,5 g každého výrobku do sterilních zkumavek a ředěním sterilní vodou byly připraveny vzorky o ředění 10^{-3} . Na agarové plotny MPA médiem bylo rozetřeno 100 μ l vzorku sterilní hokejkou ve třech paralelách. Růst při 37 °C byl kontrolován každých 24 hodin. Po třech dnech kultivace byly kolonie narostlé na MPA médiu přeočkovány křížovým roztěrem na tuhé MRS médium a kultivovány dalších 48 hodin. Následně byly kolonie setřeny očkovací kličkou a přeneseny do 50 μ l PCR vody a povařeny 20 minut pro PCR z jedné kolonie. Byla provedena amplifikace izolované DNA. Teplotní programy byly zvoleny v závislosti na použitých primerech (Tabulka 15). Teplotní program a směs PCR pro doménu *Bacteria* a pro rod *Lactobacillus* se nachází v Tabulce 16 a 17.

Tabulka 15: Specifické primery pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

Primery		Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR
Doména <i>Bacteria</i> [132]			
1	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp
2	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	
Rod <i>Lactobacillus</i> [132]			
1	F_alllact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92 bp
2	R_alllact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	

Směs pro PCR v reálném čase byla připravena dle doporučení výrobce SYTO Master Mix.

Tabulka 16: Příprava směsi pro PCR v reálném čase dle doporučení výrobce Master Mix

Krok	Komponenta	Objem [μ l]
1	Voda pro PCR	9,5
2	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3	Primer 1 ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	1,0
4	Primer 2 ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	1,0
5	Matrice DNA	1,0
Celkem		25,0

Tabulka 17: Teplotní programy

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
Doména <i>Bacteria</i> [132]				
95 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
	30 cyklů			
Rod <i>Lactobacillus</i> [132]				
95 °C/5 min	94 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
	30 cyklů			

4.8 Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků s bylinnou a rostlinnou složkou

Pomocí EliGene Plant DNA Isolation Kit byla izolována rostlinná DNA ze vzorků potravin s bylinnou a rostlinnou složkou, specifikace vzorků je uvedena v Příloze 1.

4.8.1 Postup izolace DNA – upraveno dle kitu EliGene

Pro izolaci DNA byla použita EliGene Plant DNA Isolation Kit. Postup byl proveden podle návodu přiloženého ke kitu. DNA z potravinových výrobků byla izolována vždy ve dvou nebo více opakováních. Úprava postupu se týkala jen navážky nebo předpřípravy některých typů vzorků. Každého vzorku bylo naváženo 0,1 gramu (navážka určena na základě předchozích optimalizací). K homogenizaci vzorku bylo použito 0,2 g homogenizačního písku a kopisto, pro mechanické rozmělnění vzorku. Po rozmělnění vzorku byl ke vzorku přidán homogenizační pufr, který zabraňoval degradaci nukleových kyselin a pomáhal odstraňovat proteiny a fenolické látky. Poté byl přidán lyzační pufr s dodecylsíránem sodným (SDS), který je potřebný pro kompletní lyzi buněk. Směs inkubována po dobu 10 minut při teplotě 70 °C. Vzorky byly centrifugovány a k supernatantu byl přidán pufr obsahující činidlo pro vysrážení organických a anorganických složek (proteiny, fenolické látky a polysacharidy). Po inkubaci byly k supernatantu přidány dva pufrы. První, vázací pufr, obsahoval chaotropní soli a druhý, obsahoval ethanol. Tato kombinace pufrů poskytuje optimální podmínky pro vazbu DNA, ta díky chaotropním solím přilne k silikátové membráně spin filtru. Tekutá složka přejde skrz membránu a je odstraněna. Membrána spin filtru byla promývána

promývacími roztoky na bázi ethanolu, které přečistily DNA, navázanou na spin filtru. Membrána byla vysušena dvouminutovou centrifugací při vysokých otáčkách. K uvolnění DNA, navázané na spin filtru, byl použit eluční pufr.

4.8.2 PCR v reálném čase

Koncentrace a čistota eluované DNA byla stanovena spektrofotometricky a pak byla ověřena amplifikovatelnost této DNA pomocí primerů specifických pro rostliny pomocí PCR v reálném čase stejně jako v kapitole 4.5.4. V případě úspěšné amplifikace byla DNA podrobena další PCR v reálném čase se specifitějšími primery uvedenými v kapitole 4.6.1.

4.9 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Metoda pro současné stanovení 24 vonných alergenů vychází z publikace C.Villa a kol. 2007, kde autoři navrhli metodu stanovení 24 vonných alergenů současně pomocí HPLC. V našem případě byla použita jiná kolona a upraveny podmínky analýzy. Analyty byly sledovány ve čtyřech UV kanálech (UV1 = 210 nm, UV2 = 254 nm, UV3 = 280 nm, UV4 = 225 nm). Při přípravě reálných vzorků pro analýzu byl přidán *p*-anisaldehyd do každého vzorku jako standard pro vyloučení chyb při extrakci analytů ze vzorku. Analýza byla provedena na přístroji HPLC/PDA Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fischer, USA), DAD detektor Vanquish (Thermo Fischer, USA), kolona YMC-Triart C18 ExRS S-3 μ m, 8nm Analytical HPLC Column, 150 x 4.6 mm.

4.9.1 Standardy a jejich příprava

Standardy alergenů byly získány od Accustandard Inc. (New Haven, USA), charakteristika je uvedena v Tabulce 18. Jako standard pro přepočet ztrát při extrakci byl použit *p*-anisaldehyd od MERCK (Darmstadt, Německo).

Jednotlivé zásobní roztoky 24 alergenů, které nebyly dodány už v rozpuštěném stavu, byly připraveny rozpuštěním standardu v acetonitrilu (HPLC grade) v odměrných baňkách na koncentraci 10 mg · ml⁻¹, s výjimkou hydroxycitronellalu (100 mg · ml⁻¹). Roztoky byly udržovány při 4 °C a za těchto podmínek byly stabilní po dobu alespoň 7 dnů. Jejich stabilita byla kontrolována pomocí HPLC ověřením, zda byly konstantní plochy, počty píků i retenční časy. Čerstvé pracovní roztoky připravené vhodným ředěním zásobních roztoků byly zpracovávány jednotlivě i ve směsi pro optimalizaci provozních podmínek a pro sestavení kalibračních křivek. Standardní směsný roztok všech testovaných alergenů a *p*-anisaldehydu byl připraven zředěním známého objemu každého zásobního roztoku v odměrných baňkách acetonitrilem.

Tabulka 18: Standardy 24 vonných alergenů od Accustandard Inc.

Katalogové číslo	Název	Množství
ALR-001N	Amyl cinnamal	100 mg
ALR-002N	Benzyl alkohol	100 mg
ALR-003N	Cinnamyl alcohol	100 mg
ALR-004N	Citral	100 mg
ALR-005N	Eugenol	100 mg
ALR-006-N	Hydroxy-citronellal	100 mg
ALR-007N	Isoeugenol	100 mg
ALR-008S-ET-10X	Amylcinnamyl alcohol	1000 µg/ml v etanolu, 1 ml
ALR-009N	Benzyl salicylate	100 mg
ALR-010N	Cinnamal	100 mg
ALR-011N	Coumarin	100 mg
ALR-012N	Geraniol	100 mg
ALR-013N	Lyrál (Mix of isomers)	100 mg
ALR-014N	Anisyl alcohol	100 mg
ALR-015N	Benzyl cinnamate	100 mg
ALR-016N	Farnesol (Mixed isomers)	100 mg
ALR-017S-CN-10X	2-(4-tert-Butylbenzyl)propionaldehyde	1000 µg/ml v acetonitrilu, 1 ml
ALR-018N	Linalool	100 mg
ALR-019N	Benzyl benzoate	100 mg
ALR-020N	b-Citronellol	100 mg
ALR-021S-ET-10X	Hexyl cinnamaldehyde	1000 µg/ml v etanolu, 1 ml
ALR-022N	d-Limonene	100 mg
ALR-023N	Methyl heptyne carbonate	100 mg
ALR-024S-CN-10X	Cetone Alpha (tech)	1000 µg/ml v acetonitrilu, 1 ml

4.9.2 Aparatura a podmínky analýzy

V článku C.Villa a kol. 2007 byla použita kolona LiChroCART Purospher Star RP18-e (250 mm × 4,6 mm id) (5 µm) (Merck, Darmstad, Německo). Podmínky, za kterých probíhala analýza, jsou uvedeny v Tabulce 19.

Tabulka 19: Původní podmínky analýzy

Čas [min]	Průtok [ml · min ⁻¹]	Acetonitril [%]	miliQ voda [%]
0	0,7	50	50
5	0,7	50	50
15	1,0	60	40
24	1,0	60	40
40	1,0	90	10

Metoda byla zjednodušena o průtokový gradient a gradient mobilní fáze byl pozměněn. Upravené podmínky analýzy jsou uvedeny v Tabulce 20. Vyhodnocení probíhalo pomocí softwaru Chromeleon.

Tabulka 20: Nové podmínky analýzy

Čas [min]	Průtok [ml · min ⁻¹]	Acetonitril [%]	miliQ voda [%]
0	1,0	40	60
5	1,0	50	50
15	1,0	60	40
24	1,0	60	40
40	1,0	90	10
49	1,0	90	10
51	1,0	40	60

4.9.3 Příprava silic pro analýzu

Bylo napipetováno 150 µl silice k 1350 µl acetonitrilu (HPLC grade), suspenze byla přefiltrována přes 0,45 µm nylonovou membránu. Vzorek byl vhodně naředěn, 10x a 100x, a následně byl analyzován.

4.9.4 Příprava vzorků kosmetických a potravinových výrobků pro analýzu alergenů

Do zkumavky bylo naváženo 0,2 g vzorku. Do každé zkumavky byl přidán 1 ml acetonitrilu s p-anisaldehydem (interní standard, konečná koncentrace 0,007 5 – 0,01 mg · ml⁻¹) a přibližně 0,2 g skleněných kuliček, které napomáhají lepší homogenizaci vzorku. Zkumavky byly vortexovány po dobu 15 minut. Suspenze byla přefiltrována přes 0,45 µm nylonovou membránu. Vzorky byly následně analyzovány pomocí HPLC, jako mobilní fáze byl použit acetonitril a miliQ voda. Byl proměřen i acetonitril a p-anisaldehydem, který sloužil k extrakci vzorků kvůli přepočtu ztrát analytů v průběhu extrakce a pro ověření správného průběhu měření.

4.10 SPME-GC-MS

Analýza hlavních těkavých komponent kosmetických přípravků byla provedena na TraceTM 1310 split/splitless injektoru (Thermo Fisher Scientific INC., Waltham, MA, USA) s hmotnostním detektorem ISQTM LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific INC., Waltham, MA, USA). Analýza byla provedena na kapilární koloně TG-WaxMS, 30 m x 0,25 mm x 0,5 µm. Jako nosný plyn bylo použito helium při průtoku 1 ml · min⁻¹. Hmotnostní detektor byl v režimu elektronové ionizace a nastaven na 70 eV, teplota iontového zdroje 200 °C, snímací rozsah 30–400 m/z, rychlost skenování 0,2 s. Podmínky analýzy jsou uvedeny v Tabulce 21. Vzorky pro GC analýzu byly naváženy do vialek, každého vzorku bylo naváženo cca 1 g.

Tabulka 21: Podmínky analýzy

Inkubace	10 min při 40 °C
Extrakce vzorku na vlákno PDMS/CAR/PVB	20 min při 40 °C
Desorpce na injektoru	20 min při 240 °C
Teplotní program	1 minuta 40 °C
	5 °C/min do 220 °C
	12 minut při 220 °C

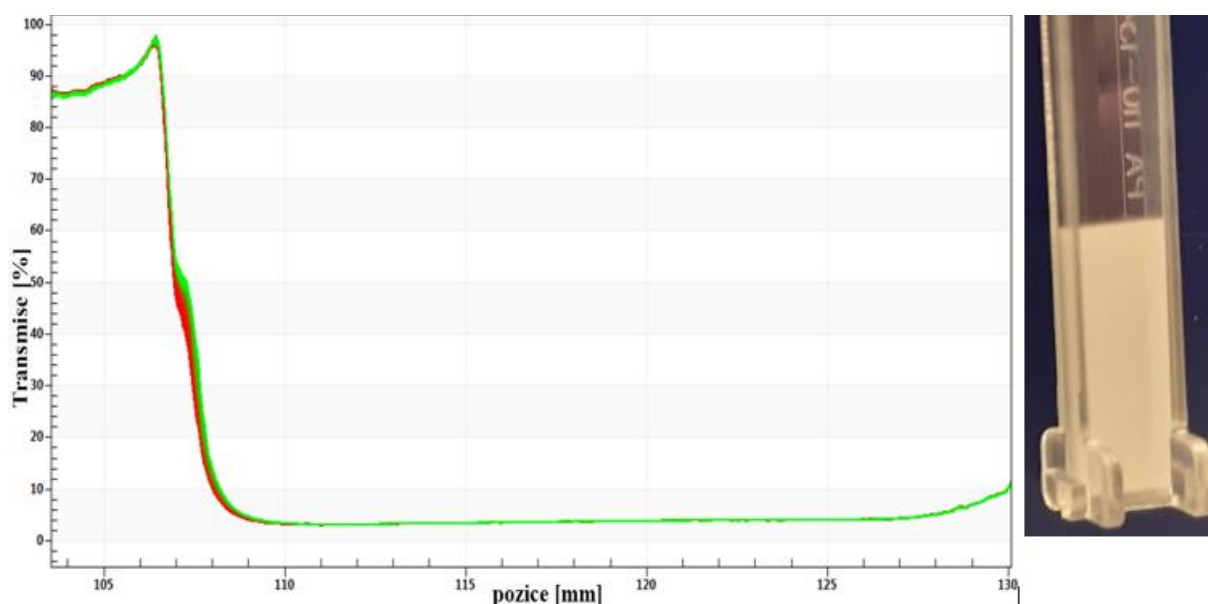
4.11 GC-MS s přímým nástřikem vzorku

Analýza hlavních těkavých komponent lyofilizovaného extraktu *Achyrocline satureioides* byl analyzován pomocí GC-MS s přímým nástřikem. K tomuto účelu byl použit plynový chromatograf Trace 1310 s hmotnostním detektorem TSQ 900 s kapilární kolonou Supelcowax (30 m x 0,25 mm; I.D. 0,25 µm). Navážka 5, 10 a 25 mg lyofilizovaného extraktu bylo rozpuštěno v ethylacetátu, vzorek byl extrahován do rozpouštědla po dobu 10 minut na třepačce (3000 rpm) a následně přefiltrován přes nylonový filtr (0,22 µm). Na kolonu byl nástřiknut 1 µl takto připraveného vzorku, teplota injektoru 250 °C, teplota transfer line 220 °C. Nosným plynem bylo helium a teplotní program probíhal 70 °C po dobu 1 min, následoval nárůst 10 °C/min do 135 °C, teplota byla držena na 135 °C po dobu 2 min. Dále teplota rostla 3 °C/min. do 170 °C, kde byla držena po dobu 1 min. Následoval nárůst teploty 10 °C/min. do 250 °C, kde byla teplota držena po dobu 20 min. MS detektor TSQ 9000 byl nastaven na full scan 35 – 350 m/z. Pro účely měření byly použity standardy Fragrance Allergen Mix 1 a Fragrance Allergen Mix 2 (Supelco, USA).

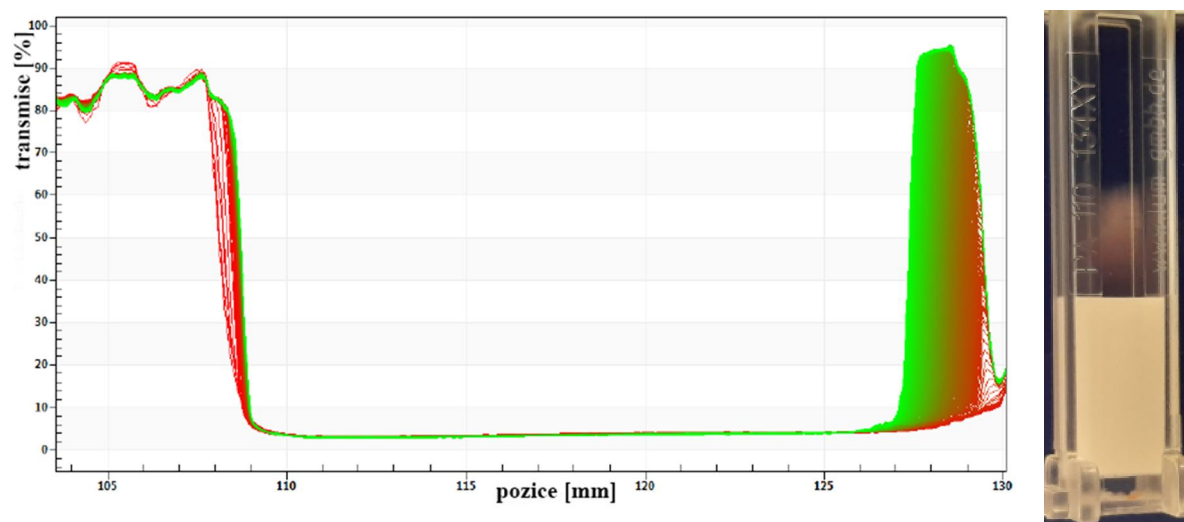
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Příprava a výběr kosmetické emulze

Jedním z výstupů měření analytické centrifugy je graf závislosti transmise paprsku na poloze vzorku v kyvetě. Hodnota 130 mm v grafu odpovídá dnu kyvety. Každých 60 s byla zaznamenána křivka, červené nejdříve a zelené ke konci měření. Z toho vyplývá, že pokud dochází k co největšímu překryvu všech křivek, je emulze po celou dobu měření stabilní. Čím více křivek je možné rozeznat, tím větší jsou změny ve stabilitě měřeného vzorku. Z hlediska testů stability na analytické centrifuze byla pro další experimenty vybrána Emulze 1, protože byla nejstabilnější z testovaných vzorků (viz Obrázek 8). Během odstředivého testu došlo k oddělení fází u Emulze 3 (viz Obrázek 9).



Obrázek 8: Závislost transmise na poloze v kyvetě vzorku čisté Emulze 1 bez přísad a fotka kyvety po centrifugaci



Obrázek 9: Závislost transmise na poloze v kyvetě vzorku čisté Emulze 3 bez přísad a fotka kyvety po centrifugaci

U Emulze 2 nedošlo k výraznému oddělení fází, ale index nestability (nabývá hodnot od 0 do 1, čím nižší, tím je výrobek stabilnější) byl vyšší než u Emulze 1 (viz Tabulka 22). V případě Emulzí 1 a 3 nebyl pozorován významný rozdíl mezi vzorky, které obsahovaly další přísady a mezi vzorky, které byly bez dalších příměsí. Avšak v případě Emulze 2 byly méně stabilní vzorky, které obsahovaly přísady, nejméně pak vzorek s přídavkem etanolového extraktu.

Tabulka 22: Naměřené indexy nestability připravených emulzí

	Přídavek	Index nestability
Emulze 1	2 % plod <i>Fragaria ananassa</i>	0,008
	0,25 % lyofilizované kůry Citrus limon	0,012
	2,5 % extraktu <i>Callisia fragrans</i> v 70% etanolu	0,010
	-	0,008
Emulze 2	2 % plod <i>Fragaria ananassa</i>	0,030
	0,25 % lyofilizované kůry Citrus limon	0,031
	2,5 % extraktu <i>Callisia fragrans</i> v 70% etanolu	0,038
	-	0,023
Emulze 3	2 % plod <i>Fragaria ananassa</i>	0,112
	0,25 % lyofilizované kůry Citrus limon	0,118
	2,5 % extraktu <i>Callisia fragrans</i> v 70% etanolu	0,118
	-	0,118

5.1.1 Stabilita připravené emulze v porovnání se stabilitou komerčních kosmetických výrobků

Emulze 1, která byla nejstabilnější z připravených emulzí, byla proto spolu s dalšími komerčně dostupnými prostředky podrobena dalším stabilitním testům. Konkrétně byla podrobena dalšímu odstředivému testu s prodlouženým časem analýzy, cyklickému, termickému a zátěžovému testu. Bylo tak ověřeno, zda je připravená emulze dostatečně stabilní pro následné optimalizace instrumentálních metod a izolace DNA.

5.1.1.1 Odstředivý test

Oproti podmínkám odstředivého testu pro výběr nejstabilnější z připravených emulzí byl prodloužen čas analýzy, a to o celých 10 hodin. Bylo tedy možné pozorovat, zda je emulze stabilní i po delší časový úsek a zda se může v tomto ohledu rovnat běžně dostupným komerčním výrobkům. Během odstředivého testu došlo ke krémování u třech testovaných komerčních přípravků. Ostatní testované produkty a Emulze 1 byly stabilní po celou dobu testu (viz Tabulka 18). Lze tedy usuzovat, že je připravená Emulze 1 dostatečně stabilní a může být použita jako „modelová směs“ pro další experimenty a optimalizace metod.

Teoretická stabilita výrobku byla vypočtena podle rovnice (1) v kapitole 2.6.5. Je vypočtena z doby, po kterou byl výrobek stabilní v průběhu testu, Ve sloupci Čas v Tabulce 23 je uvedena hodnota, kdy se významně změnil index nestability pro každý z výrobků. V tabulce 23 jsou vyznačeny tučně vzorky, které byly nejméně stabilní.

Tabulka 23: Index nestability testovaných přípravků a teoretická stabilita výrobku

Přípravek	Index nestability	RCA [g]	Čas [s]	Stabilita [měsíce]
Emulze 1	0,010	2123	60000	49,1
	0,011	2130	59900	49,2
Herbs od Bulgaria hydratační krém levandule	0,008	2129	59900	49,2
	0,008	2109	59900	48,7
Nivea NATURALLY GOOD	0,025	2120	59901	49,0
	0,023	2127	59901	49,2
Feel Free obnovující krém na ruce	0,023	2131	59900	49,2
	0,021	2107	59900	48,7
Nobilis Tilia levandulový krém	0,043	2118	750	0,1*
	0,017	2122	59900	49,0
Nobilis Tilia termoaktivní krém Termal	0,099	2124	17500	14,3
	0,108	2121	17500	14,3
Ryor hydratační krém s levandulí	0,217	2127	8000	6,6
	0,226	2124	8000	6,6
Ryor s probiotiky ** krém proti zarudnutí a rošířeným žilkám	0,350	2118	1000	0,8
	0,352	2125	1000	0,8
Havlíkova apotéka krémová maska okurka	0,014	2122	59901	49,0
	0,018	2122	59901	49,0
Natura Siberica Loves Estonia měsíčekový krém na tělo	0,015	2096	59900	48,4
	0,009	2134	59901	49,3
Alverde tělové máslo Skin Food	0,018	2118	59901	48,9
	0,012	2126	59901	49,1

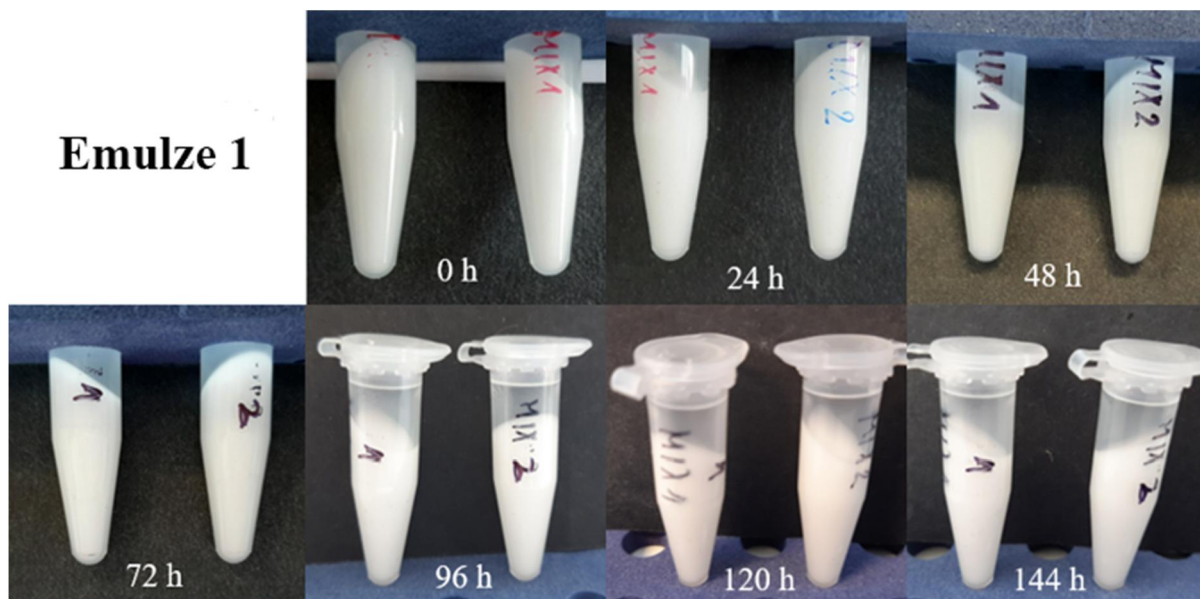
*u tohoto vzorku došlo zřejmě k chybnému nadávkování vzorku do kyvety, vzorek při vizuální kontrole nejevil známky destabilizace

** v době testování již tento výrobek byl po záruční době

5.1.1.2 Cyklický test

Vizuální a hmotnostní změny byly zaznamenány v pravidelném intervalu, tzn. na konci každé fáze. V uzavřených zkumavkách se hmotnostní úbytek pohyboval v rozmezí 0,2 – 2,7 % pro všechny testované produkty. U vzorků uzavřených do Eppendorff zkumavek bylo možné pozorovat projevy nestability některých výrobků (oddělení fází, změna skupenství, změna barvy, výskyt bublinek). V Příloze 2 jsou uvedeny grafy závislosti hmotnosti jednotlivých vzorků na čase a fotografie, jak se vizuálně měnily nestabilní vzorky v čase. Emulze 1 zůstala stabilní po celou dobu testu (viz Obrázek 10). V případě vzorků navážených na miskách došlo celkově k 90% hmotnostnímu úbytku u Emulze 1, avšak ostatní komerční výrobky s podobným obsahem vody, měly podobný úbytek hmotnosti (viz Příloha 2).

Emulze 1



Obrázek 10: Cyklický test Emulze 1

Z toho lze usuzovat, že při správném skladování a v uzavřeném obalu, je připravená emulze srovnatelná a v některých ohledech i stabilnější než některé komerčně dostupné kosmetické výrobky, a lze ji tedy použít jako modelovou směs pro další experimenty.

5.1.1.3 Termický test

V termickém testu byly urychleny destabilizační procesy, které by mohly u přípravku nastat. Jediný stabilní přípravek byl peeling C + Citrus Planeta Organica. Emulze 1 a zbylé komerční přípravky vykazovaly nestabilitu. Je tedy důležité těsnicí balení, aby nedocházelo ke ztrátám těkavých složek.

5.1.1.4 Zátěžový test

Emulze 1 měla funkční antimikrobiální ochranu. Při jedné paralele při vyhodnocení zátěžového testu byly sice pozorovány kolonie, ale jednalo se nejspíš o kontaminaci (Tabulka 24). Emulze 1 tedy splňovala stanovené limity 1 000 KTJ/g. Jedná se tedy o přípravek s dostatečnými konzervačními účinky.

Tabulka 24: Množství životaschopných bakteriálních buněk v Emulzi 1 v průběhu zátěžového testu

přípravek	vzorek	T0	T7	T14	T28
		KTJ/g	KTJ/g	KTJ/g	KTJ/g
Emulze 1	1-a	710	0	0	0
	1-b	710	0	0	15
	2-a	703	0	0	0
	2-b	703	0	0	0

T0 – počátek experimentu, T7 – 7. den experimentu, T14 – 14. den experimentu, T28 – 28. den experimentu; 1, 2 – naspikovaný vzorek v duplikátu; a, b – duplikát na agarových plotnách

5.1.1.5 Celkové vyhodnocení

Při odstředivém testu nastala separace fází u 3 komerčních přípravků, Emulze 1 byla stabilní, stejně jako ostatní komerční přípravky, jejich minimální vypočtená stabilita se pohybovala v rozmezí 48 – 49 měsíců (viz Tabulka 23).

Během cyklického testu v uzavřeném obalu se hmotnost vzorků téměř neměnila, byl však pozorován kondenzát na víčku u 13 ze 17 vzorků, včetně Emulze 1. K viditelným změnám ve struktuře či barvě v případě Emulze 1 nedošlo. V případě cyklického testu v neuzavřeném obalu byly všechny vzorky včetně Emulze 1 vyhodnoceny jako nestabilní, kromě peelingu Planeta Organica Citrus. Z toho vyplývá, že se Emulze 1 vykazuje obdobnou stabilitu v průběhu cyklického testu jako ostatní komerční přípravky (viz Tabulka 25).

Tabulka 25: Shrnutí výsledků jednotlivých stabilitních testů

Přípravek	Odstředivý test *	Cyklický test (Eppendoorf)	Cyklický test (misky)	Termický test	Zátěžový test
Emulze 1	+	+	-	-	+
Nivea NATURALLY GOOD	+	+	-	-	+
Ryor hydratační krém s levandulí	-	+	-	-	+
Ryor s probiotiky	-	-	-	-	+
Nobilis Tilia levandulový krém	+	+	-	-	-
Nobilis Tilia termoaktivní krém Termal	-	+	-	-	+
Herbs of Bulgaria hydratační krém levandule	+	+	-	-	+
Alverde tělové máslo Skin Food	+	+	-	-	+
Natura Siberia měsíčkový krém	+	+	-	-	+
Havlíkova apotéka krémová maska okurka	+	+	-	-	+
Feel Free obnovující krém na ruce	+	+	-	-	+
Organic Shop tělový peeling Malinový krém	0	+	-	-	+
Planeta Organica tělový peeling C + Citrus	0	-	+	+	+
Kvítok šľahaný krém Levandulový sen	0	-	-	-	+
Dr. Konopka's hydratační pleťový peeling	0	-	-	-	+
Organic Shop tělová pěna jahody a čokoláda	0	+	-	-	-
Organic Shop cukrový peeling Jahoda	0	-	-	-	+

Nestabilní (-), Stabilní (+), netestováno (0)

* z odstředivého testu byly vyřazeny vzorky s nevhodnou konzistencí pro nadávkování (příliš tuhý krém a abrazivní složky peelingu by ucpávaly dávkovací jehlu)

V průběhu termického testu byla většina přípravků včetně Emulze 1 nestabilní a byla pozorována změna hmotnosti i vzhledu. K nejvýraznějšímu hmotnostnímu úbytku došlo v průběhu prvních dvou dnů. Jediným přípravkem, u kterého nedošlo ke změně vzhledu ani

hmotnosti, peeling Planeta Organica Citrus. Emulze 1 vykazovala stejnou nestabilitu jako ostatní komerční výrobky.

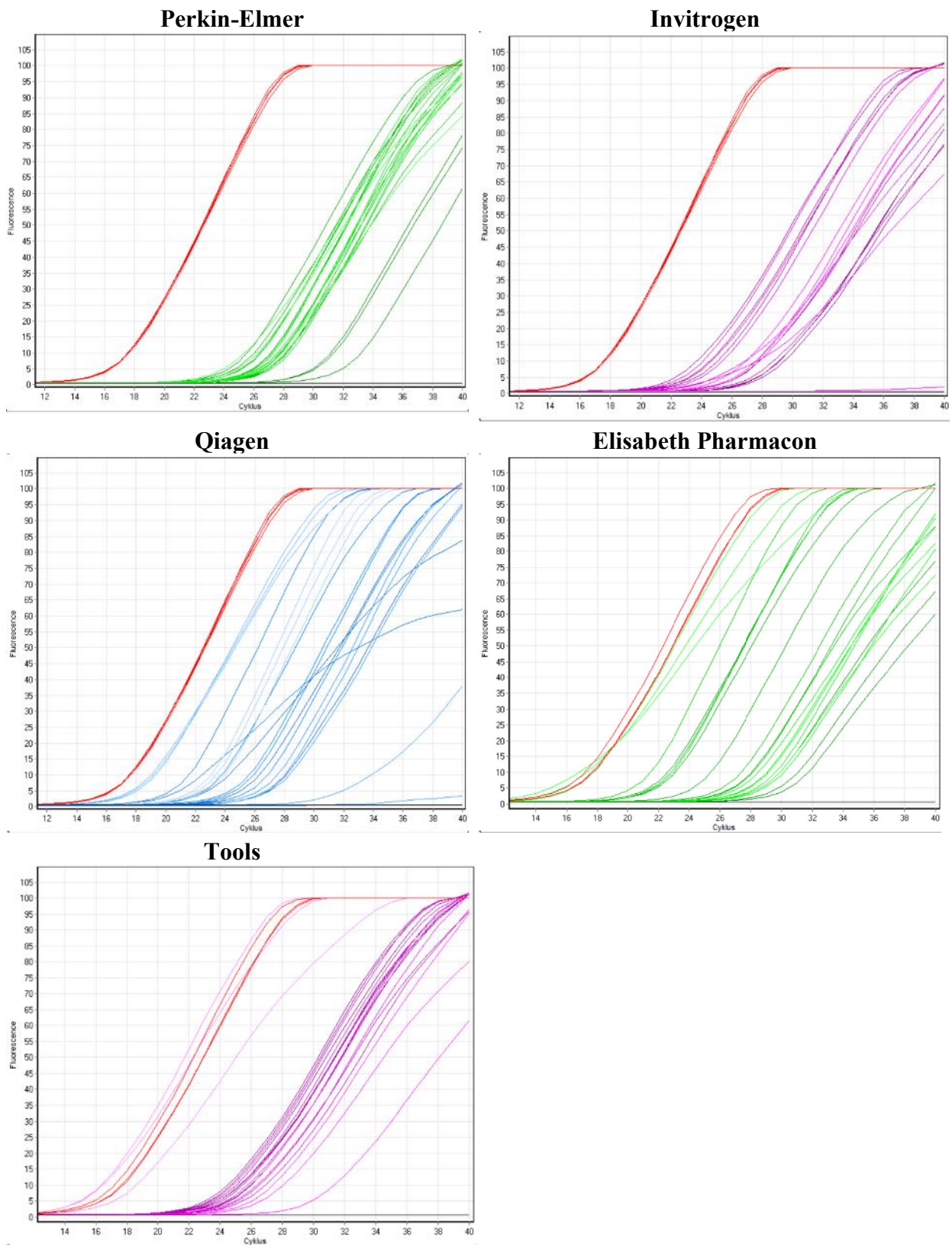
V průběhu zátěžového testu byl nestabilní pouze krém Nobilis Tilia z počátečního množství přítomných mikroorganismů 688 a 694 KTJ/g došlo k pomnožení bakterií až na množství více než 100 000 KTJ/g, což nesplňuje ani limity stanovené normou ČSN EN ISO 17516 [50]. Dále limity nesplnil přípravek tělová pěna jahody a čokoláda Organic Shop. Ostatní přípravky, včetně Emulze 1, byly stabilní s funkční antimikrobiální ochranou.

Pokud tedy bude Emulze 1 uchována v uzavřeném obalu bez výrazných teplotních výkyvů, bude emulze stabilní. Největší vliv na destabilizaci výrobku má dlouhodobě zvýšená teplota a netěsnící obal. Konkrétní výsledky stabilitních testů jsou uvedeny v příloze 2 tohoto dokumentu.

5.2 Výběr vhodného izolačního postupu pro izolaci rostlinné matrice

Z časového hlediska byla vyloučena metoda CTAB, která sice poskytuje vysoké výtěžky DNA obstožné kvality, avšak postup je zdlouhavý a je náchylný na chyby. Tato metoda je však vhodná pro přípravu DNA kontrol z čisté rostlinné matrice. Všechny testované kity poskytly obstožné výsledky a DNA byla izolována téměř ze všech vzorků. Největší výtěžky byly získány ze sušených květů heřmánku ve všech případech. Je to způsobeno zřejmě tím, že sušené květy byly nejlépe homogenizovány a DNA tak byla uvolněna z buněk ve vysokém množství. Dále byla DNA izolována ve vyšších koncentracích z kůry plodů nžli z jejich dužiny. To je zřejmě způsobeno větším množstvím buněk ve stejné navážce a také odlišným obsahem látek, které mohou působit potíže při izolaci (např. kyselé prostředí dužiny citrusů ovlivňuje pH při izolaci).

Celkově z hlediska výtěžku a čistoty DNA byly nejvhodnější kity od Qiagen, Tools a Elisabeth Pharmaconu. Z hlediska amplifikovatelnosti (amplifikace všech vzorků, efektivita amplifikační reakce) reakce nejlépe probíhala s DNA izolovanou kity od Tools a Elisabeth Pharmacon (viz Obrázek 11). Pro další experimenty byl zvolen kit od Elisabeth Pharmacon z hlediska lepší dostupnosti tohoto kitu u výrobce.



Obrázek 11: Amplifikační křivky – porovnání amplifikovatelnosti DNA izolované kity, Primery specifické pro ITS2 oblast rostlin

5.3 Izolace DNA z rostlinného materiálu, matrice kosmetických výrobků s bylinnou složkou a dalších typů vzorků

Byla ověřována autenticita přírodních rostlinných a bylinných složek v řadě modelových a komerčních kosmetických výrobků. Zkoumány byly výrobky s obsahem máty, citrusů, levandule, a dalších. Byla zjišťována přítomnost rostlinné DNA pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin. Vzorky, ve kterých byla potvrzena přítomnost rostlinné DNA, byly analyzovány pomocí dalších specifických primerů.

5.3.1 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

Koncentrace a čistota izolované rostlinné DNA byla stanovena spektrofotometricky při vlnových délkách 220 až 350 nm. Pro měření byl použit přístroj NanoDrop2000.

5.3.1.1 DNA izolovaná z rostlinné matrice

Výsledky spektrofotometrického měření DNA izolované z čerstvých listů, z lyofilizovaných listů a kůry, ze sušených květů a extraktu *Achyrocline satureioides*, jsou uvedeny v Tabulce 26. DNA z máty *Mentha piperita* "citaro" byla izolována z lyofilizovaného a čerstvého listu, je vidět značný rozdíl ve výtěžku, ale nikoli v čistotě. Všeobecně nejvyšší výtěžky jsou z čerstvých listů, protože je na to daný izolační kit optimalizovaný. Dále bylo izolováno vyšší množství DNA ze zamrazených vzorků a nejmenší výtěžky byly ze vzorků sušených. To může být způsobeno tím, že sušené vzorky do sebe absorbovaly poměrně velké množství pufru a poté šly obtížně homogenizovat. Tomuto lze ale částečně předejít homogenizací v suchém stavu a až poté přidat lyzační pufr. Dále také sušením a mražením dochází k poškození buněk i DNA. Poměr absorbance při vlnových délkách 260/280 nm se většinou pohyboval v rozmezí 1,8 – 2,0, což značí čistou DNA. Poměr absorbancí u vlnových délek 260/230 nm by měl být v případě čisté DNA vyšší než 1,8. Toho je dosaženo akorát v případě izolace DNA z čerstvého listu, v ostatních vzorcích jsou přítomny polyfenoly, polysacharidy nebo jiné látky, které mohou působit inhibičně v PCR.

Tabulka 26: Koncentrace a čistota izolované DNA

DNA izolovaná z:	opakování	c [ng · µl ⁻¹]	A 260/ A 280	A 260/ A 230
Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon" lyof. list	1	30,0	1,88	1,29
	2	24,5	1,87	1,26
Mentha Piperita "citaro" lyof. list	1	8,7	1,80	0,50
	2	14,8	1,96	0,77
Mentha Piperita "citaro" čerstvý list	1	62,5	2,02	2,33
	2	53,0	2,01	2,50
	3	38,2	1,98	1,69
Mentha pycnanthemum pilosum lyof. list	1	12,8	1,87	0,80
	2	11,9	1,95	0,69
Mentha almira strawberry pepermint lyof. list	1	11,8	2,09	0,75
	2	14,9	1,90	1,31

Pokračování Tabulky 26:

Biocitrón kůra lyof.	1	20,3	1,71	1,21
	2	19,3	1,7	1,09
Levandule lékařská květ (uchovávaný při 20°C)	1	10,2	1,68	0,80
	2	7,8	1,78	0,84
Levandule lékařská květ sušený	1	6,3	1,55	0,43
	2	6,1	1,33	0,30
Levandule lékařská list čerstvý	1	84,5	2,04	1,83
	2	80,4	2,03	1,70
<i>A.satureioides</i> sušený květ	1	7,9	1,78	0,74
	2	7,2	1,62	0,88
	3	5,1	1,66	1,05
<i>A.satureioides</i> EtOH extrakt	1	2,4	1,09	0,21
	2	2,8	1,41	0,33
	3	2,3	1,16	0,18
Levandule korunkatá Lavandula stoechas "Javelin Forte Deep Purple"	1	8,5	1,70	0,35
	2	7,8	2,06	0,33
Levandule lékařská Lavandula angustifolia officinalis	1	5,8	2,15	0,32
	2	2,8	1,60	0,43
Levandule lékařská Lavandula angustifolia "Aromatico Blue Compact"	1	8,2	1,24	0,38
	2	6,7	1,29	0,34
Levandule lékařská Lavandula angustifolia "Dwarf Blue"	1	4,1	1,46	0,27
	2	3,1	1,61	0,42
Levandule korunkatá Lavandula stoechas "Javelin Forte Deep Rose"	1	9,1	1,44	0,57
	2	5,2	1,45	0,31
Levandule prostřední Lavandula intermediata "Phenomenal"	1	3,0	1,94	0,28
	2	8,5	1,83	0,31
Levandule prostřední Lavandula Intermediata "Grosso"	1	16,4	1,53	0,35
	2	5,5	1,77	0,59
Levandule lékařská Lavandula angustifolia "Munstead Strain"	1	13,2	1,90	1,35
	2	11,2	1,23	0,53
Levandule lékařská Lavandula angustifolia "Rosea"	1	5,0	1,51	0,43
	2	7,3	1,29	0,65

5.3.1.2 *Silice*

V Tabulce 27 jsou uvedeny koncentrace DNA izolované z přírodních silic. Koncentrace DNA izolované ze silic byly nízké, blíží se k nule. Nízká koncentrace DNA v silicích je pravděpodobně způsobena procesem výroby silic. Silice se většinou vyrábějí destilací, neměla by být tedy genetická informace přenesena do výsledného produktu, ale některé silice se

získávají i jinak, například lisováním kůry zralých plodů, jako v případě *Citrus aurantium*. Vzorky byly dále analyzovány pomocí PCR.

Tabulka 27: Koncentrace a čistota izolované DNA ze silice

DNA izolovaná z:	c [ng · μl ⁻¹]	A 260/ A 280	A 260/ A 230
silice levandule	1,5	1,44	0,08
silice pepermint	2,1	1,33	0,26
silice heřmánek	2,4	6,57	0,12
silice skořice	3,2	0,75	0,38
silice rozmarýn	1,4	1,17	0,19
silice zázvor	1,5	2,11	1,36
silice "mandarinka"	1,6	0,78	0,21
Silice levandule 1 (Talus)	10,7	1,94	0,43
Silice levandule 2 (Talus)	5,9	6,34	0,46

5.3.1.3 Kosmetické výrobky

Koncentrace DNA izolované z Emulze 1 vlastní přípravy, do kterých byly přidávány bylinné složky je uvedena v Tabulce 28. Pro krém s přidavkem listů máty *Mentha gentilis* varieta citrata "lemon" byla izolace provedena i ze sedimentu po centrifugaci (postup uvedený v 4.7.1). DNA izolovaná ze sedimentu i čistota této DNA je vyšší, proto byl tento postup aplikován i pro komerční výrobky, pokud to bylo možné.

Tabulka 28: Koncentrace a čistota izolované DNA z Emulze 1

DNA izolovaná z:	opakování	c [ng · μl ⁻¹]	A 260/ A 280	A 260/ A 230
Emulze 1 + Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon"	1	1,2	0,88	0,21
	2	1,0	0,63	0,19
Emulze 1 + Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon" (ze sedimentu)	1	3,7	1,25	0,80
	2	3,6	1,60	0,34
Emulze 1+ silice "tangerinka"	1	0,9	2,47	0,05
	2	1,1	0,80	0,40
Emulze 1 + levandulová silice	1	2,5	24,02	0,21
	2	2,3	5,83	0,14
Emulze 1 + levandule lékařská sušený květ	1	1,6	4,86	0,32
	2	2,8	2,68	0,38
Emulze 1 + levandulová silice + levandule lékařská sušený květ	1	6,6	4,01	0,46
	2	4,3	2,45	0,25
Emulze 1 + EtOH extrakt <i>A.satureioides</i>	1	0,9	1,06	0,06
	2	1,9	1,39	0,09
	3	1,2	1,44	0,13

Byla změřena i koncentrace izolované DNA z komerčních vzorků kosmetických výrobků. Nicméně, koncentrace izolované DNA byla na nebo pod hranici detekce spektrofotometrické

metody, proto zde nejsou výsledky uvedeny, nebyly by vypovídající. DNA z těchto výrobků byla analyzována pomocí PCR, pro ověření přítomnosti amplifikovatelné rostlinné DNA.

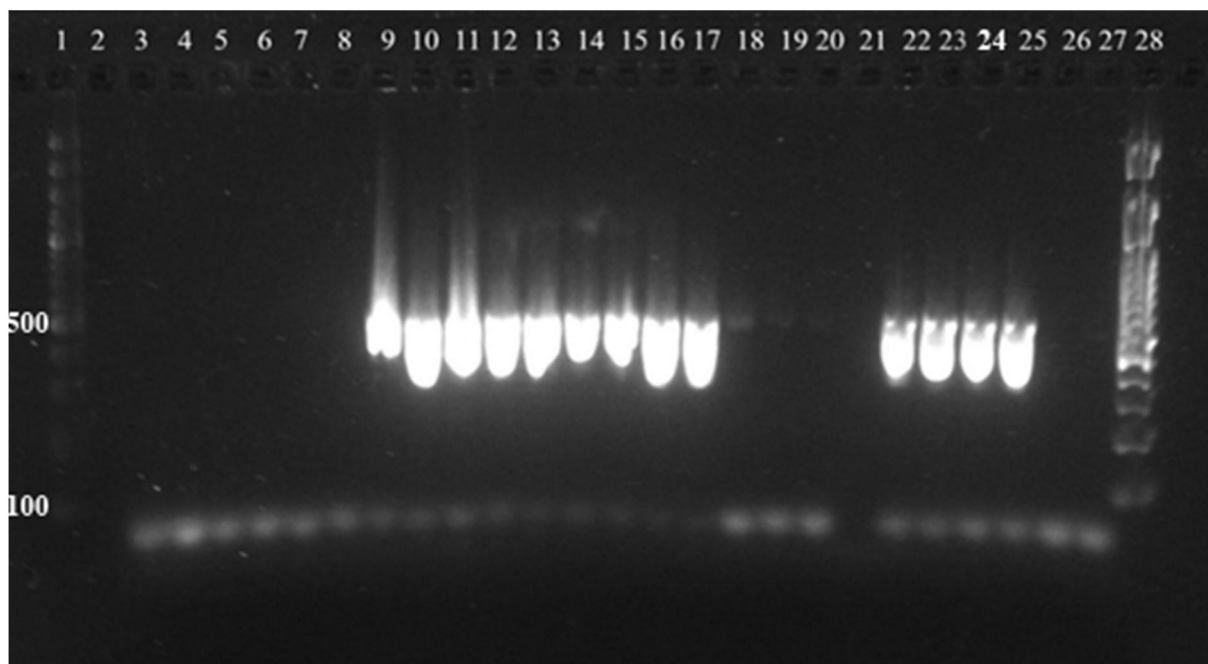
5.3.2 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA

U všech vzorků (bylinné vzorky, silice, modelové a komerční výrobky) byla amplifikovatelnost izolované DNA ověřována pomocí primerů S2R/S3F specifických pro ITS2 region rostlin (velikost ampikonů je 500 bp). Amplifikační křivky jsou uvedeny v Příloze 4. Produkty PCR byly nanášeny na 1,8% agarózový gel (Obrázek 12). Z každého vzorku bylo na gel pipetováno 15 μ l, což v případě některých vzorků bylo příliš vysoké množství (běhy 9-17 a 22-25). Na ostatní gely bylo nanášeno pouze 10 μ l (Obrázky 13, 14 a 15).

Modelový kosmetický přípravek Emulze 1 bez příměsí byl podroben izolaci DNA a PCR analýze pro vyloučení falešně pozitivních výsledků vlivem matrice Emulze 1. Dle spektrofotometrického měření nebyla naměřena žádná koncentrace přítomné DNA. Vzorky byly též amplifikovány primery S2F a S3R a nebyla pozorována žádná amplifikace ani specifické produkty melt analýzy. Příslušné amplifikační křivky a analýza křivek tání jsou uvedeny v Příloze 4.

Do Emulze 1 byly následně přidány meruňková jádra namletá na 2 hrubosti, určená pro přípravu peelingů, malinová zrníčka a jahodová zrníčka. Byla optimalizována metoda izolace DNA z těchto typů výrobků zařazením přípravného kroku před vlastní izolací kitem. Navážka kosmetického přípravku byla smíchána se sterilní destilovanou vodou a směs byla vortexována a centrifugována. Ze sedimentu byla izolována DNA izolačním kitem a byla provedena PCR. Zvýší se tak výtěžek vyizolované DNA i její čistota. Z většiny vzorků byla izolována amplifikovatelná DNA (viz Příloha 4), DNA nebyla úspěšně izolována jen z namletých jader meruňek vyšší hrubosti, to bylo zřejmě způsobeno problematickou přípravou vzorku. DNA nebylo možné z buněk uvolnit, kvůli přílišné tvrdosti a velikosti částic, které nešly rozemlít kopístem a nebyla tak uvolněna DNA. U jader menší hrubosti tento problém nenastal. Pokud tedy nelze matici, ze které izolujeme DNA, dostatečně rozemlít kopístem, je nutné vzorek rozemlít jinak (například tloučkem v třecí misce), jinak nebude izolace DNA úspěšná.

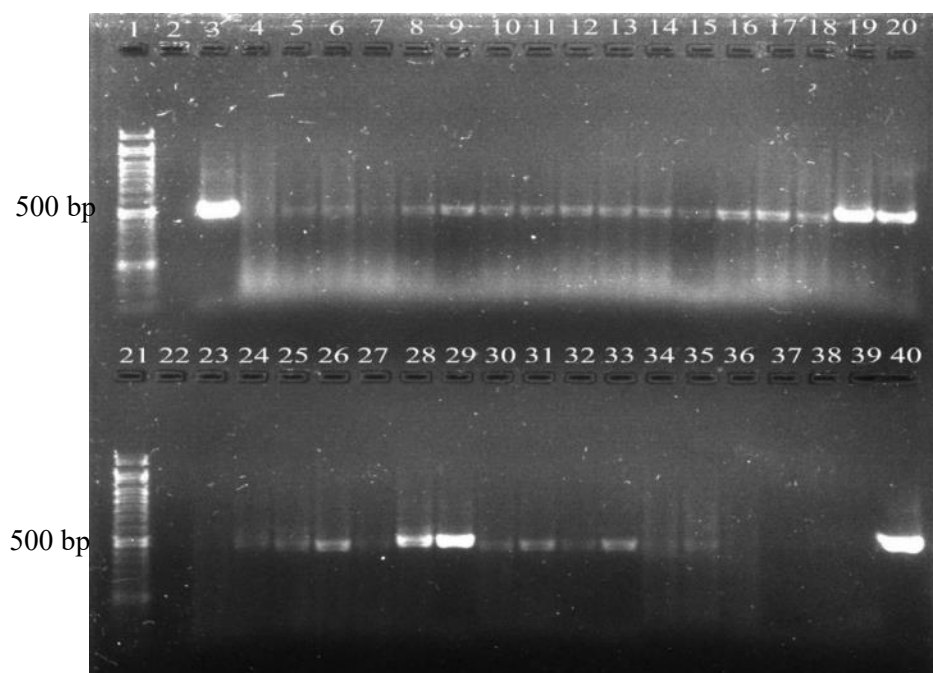
Agarózová gelová elektroforéza (Obrázek 12) potvrdila přítomnost amplifikovatelné rostlinné DNA ve vzorcích DNA izolovaných z bylin, a to ve všech, nezávisle na jejich skladování, jakož i ve vzorcích Emulze 1 s přídavkem bylin. Všechny amplifikované úseky měly požadovanou velikost 500 bp. DNA izolovaná ze silic a Emulze 1 s přídavkem levandulové silice nebyla amplifikována, nepodařilo se tedy izolovat amplifikovatelnou DNA. U levandulové silice (vzorek 18 a 19) však byl detekován slabý produkt PCR o velikosti 500 bp..



Běh	DNA	PCR produkt	Běh	DNA	PCR produkt
1	DNA standard 100 bp		15	Levandule sušená 2	+++
2	x		16	Levandule čerstvá - list	+++
3	Silice levandule	-	17		+++
4	Silice pepermint	-	18		Levandulová silice
5	Silice heřmánek	-	19	+	
6	Silice skořice	-	20	Emulze 1 + levandulová silice	-
7	Silice rozmarýn	-	21		-
8	Silice zázvor	-	22	Emulze 1 + levandule suš.	+++
9	M. P."citaro"čerstvá	+++	23		+++
10		+++	24	Emulze 1 + levandule suš., levandulová sil. 1	+++
11	M. P."citaro"čerstvá 3	+++	25	Emulze 1 + levandule suš., levandulová sil. 2	+++
12	Levandule mraz.	+++	26	Negativní kontrola	-
13		+++	27		-
14	Levandule sušená 1	+++	28	DNA standard 100 bp	

Obrázek 12: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR, primery specifické pro ITS2 region rostlin (500 bp) (x-žádný vzorek; - nedetekované; PCR produkt: + slabá, ++ střední, +++ silná intenzita)

Z modelových kosmetických přípravků Emulze 1 s přidavkem silic nebo bylin nebyla přítomnost DNA prokázána pouze ve vzorku se silicí z citrónové trávy (Obrázek 13). To může být způsobeno tím, že citrusové silice se získávají často lisováním kůry plodů, tím se z buněk uvolní i DNA.

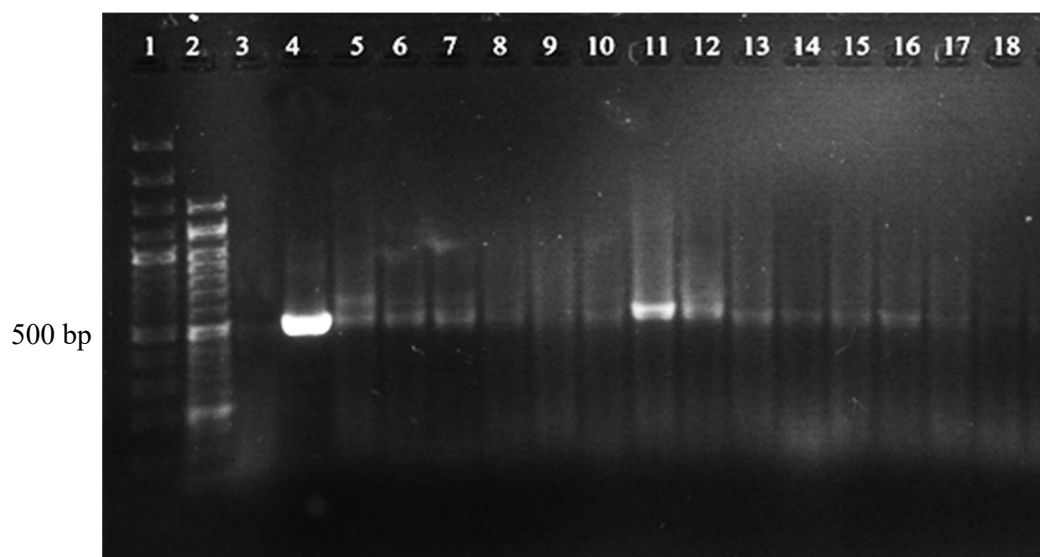


Běh	DNA	PCR produkt	Běh	DNA	PCR produkt
1	DNA standard 50 bp		21	DNA standard 50 bp	
2	x		22	x	
3	Pk (DNA z lyof kůry citronu, 20 ng/μl)	+++	23	nk	-
4	Nk	-	24	Emulze 1+ Mentha Piperita	+
5	Emulze 1+ Silice	+	25	"citaro"	+
6	červený pomeranč	+	26	Emulze 1+ Mentha	++
7	Emulze 1+ Silice	-	27	pycnanthemum pilosum	+
8	citrónová tráva	+	28	Emulze 1+ Mentha almira	+++
9	Emulze 1+ Silice máta	+	29	strawberry pepermint	+++
10	peprná	+	30	Balea handcreme protect*	+
11	Emulze 1+ Peprno-	+	31		++
12	mátová silice	++	32	Cosmos natural repairing	+
13	Emulze 1+ Pomerančová	++	33	hand protect*	++
14	silice španělská	++	34	Konopka's face commage	-
15	Emulze 1+	+	35	moist*	-
16	Mandarinková silice	++	36	Planeta organica natural	-
17	Emulze 1+ Grapefruitová	++	37	body scrub*	-
18	silice	+	38	N.A.E. shampoo bar*	-
19	Emulze 1+ Citronová	+++	39	x	
20	kůra	+++	40	Pk (M. P."citaro"čerství 1)	+++

Obrázek 13: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR, primery specifické pro ITS2 region rostlin (500 bp) (x-žádný vzorek; - nedetekované; PCR produkt: + slabá, ++ střední, +++ silná intenzita),

* seznam komerčních produktů včetně složení je uveden v Příloze 4

Z komerčních přípravků nebyla přítomnost DNA prokázána ve vzorcích „Konopka’s face commage moist, Planeta organica natural body scrub, N.A.E. shampoo bar, Naturalis sugar body scrub a Alverde pflage-dusche bio-minze.“ (Obrázky 13 a 15). Nicméně při použití postupu s centrifugací a izolací DNA ze sedimentu byla izolována amplifikovatelná DNA i z Konopka’s face commage moist (Obrázek 14).

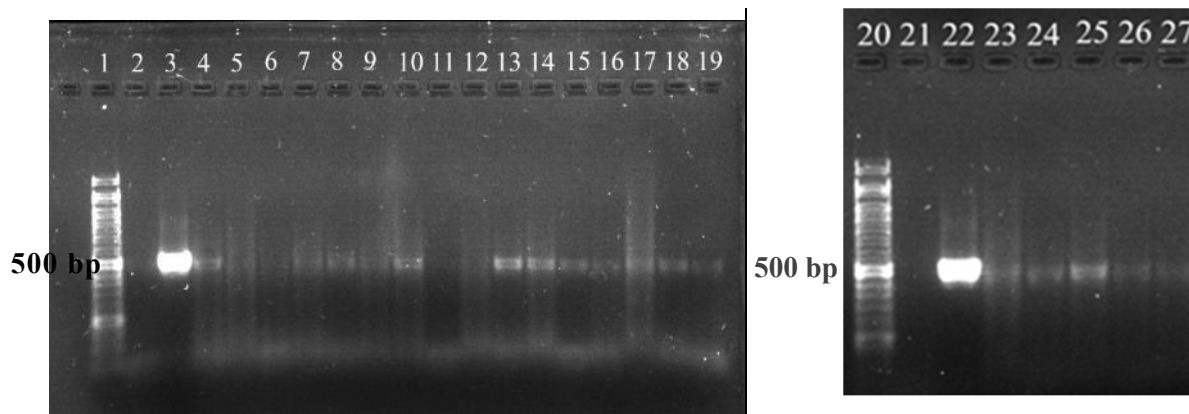


Běh	DNA	PCR produkt
1	DNA standard 50 bp	
2	DNA standard 100 bp	
3	Nk	-
4	Pk (DNA z lyof kůry citronu, 20 ng/μl)	+++
5	Emulze 1+ Citronová kůra	+
6	(DNA ze sedimentu**)	+
7	Emulze 1+ listy Mentha Piperita "citaro"	+
8	(DNA ze sedimentu**)	+
9	Emulze 1+ listy Mentha pycnanthemum pilosum	+
10	(DNA ze sedimentu**)	+
11	Emulze 1+ listy Mentha almira strawberry pepermint	++
12	(DNA ze sedimentu**)	++
13	Konopka’s face commage moist*	+
14	(DNA ze sedimentu**)	+
15	Organic shop strawberry body scrub *	+
16	(DNA ze sedimentu**)	+
17	Organic shop strawberry body mousse *	-
18	(DNA ze sedimentu**)	-

Obrázek 14: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR, primery specifické pro ITS2 region rostlin (500 bp) (- nedetekované; PCR produkt: + slabá, ++ střední, +++ silná intenzita),

* seznam komerčních produktů včetně složení je uveden v Příloze 1

** DNA izolována ze sedimentu po centrifugaci – postup uvedený v kapitole 4.7.1



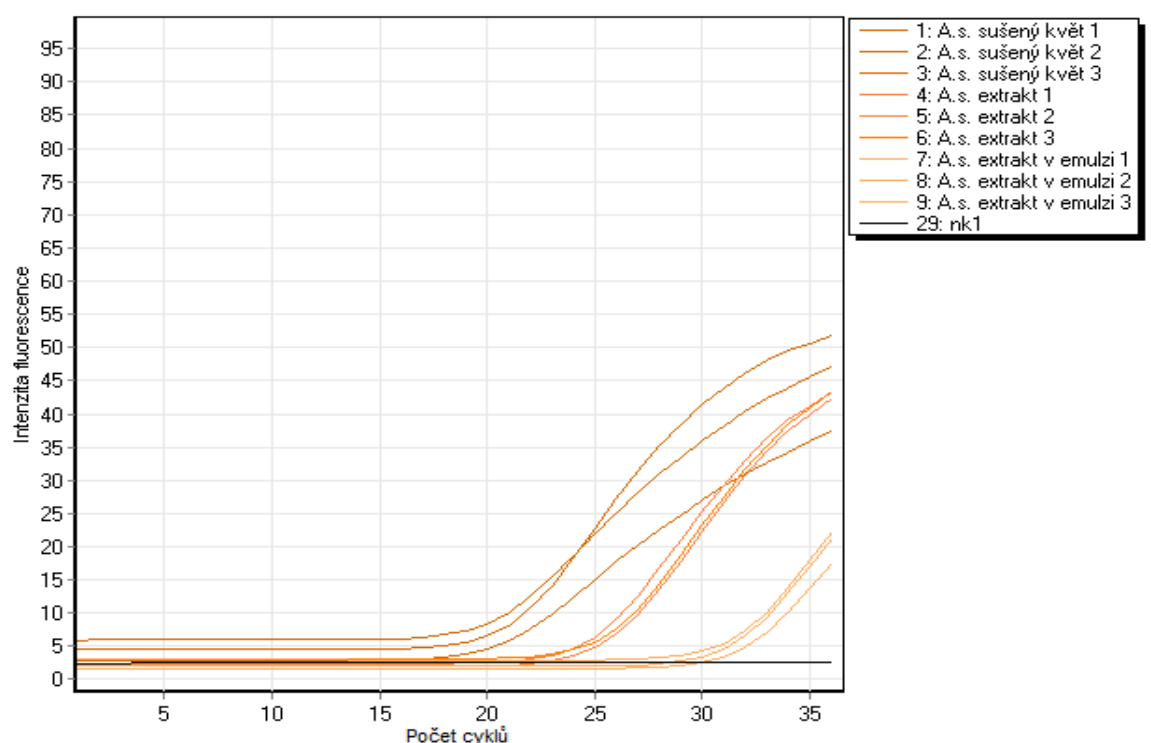
Běh	DNA	PCR produkt	Běh	DNA	PCR produkt
1	DNA standard 50 bp		20	DNA standard 50 bp	
2	Nk	-	21	Nk	-
3	Pk (DNA z lyof kůry citronu, 20 ng/μl)	+++	22	Pk (DNA z lyof kůry citronu, 20 ng/μl)	+++
4	N.A.E. shampoo bar*	+	23	Levandulový sen* 2	+
5	Naturalis sugar body scrub*	-	24	Herbs of Bulgaria face cream*	+
6		-	25		++
7	Balea sugar scrub *	+	26	Ryor hydratační krém*	+
8		+	27		+
9	Alverde skinfood Bio-limette*	+			
10		+			
11	Alverde pflege-dusche bio-minze*	-			
12		-			
13	Organic shop strawberry body scrub *	++			
14		++			
15	Organic shop strawberry body mousse *	+			
16		+			
17	Levandulový krém N.T.*	+			
18		+			
19	Levandulový sen* 1	+			

Obrázek 15: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR, primery specifické pro ITS2 region rostlin (500 bp) (x-žádný vzorek; - nedetekované; PCR produkt: + slabá, ++ střední, +++ silná intenzita),

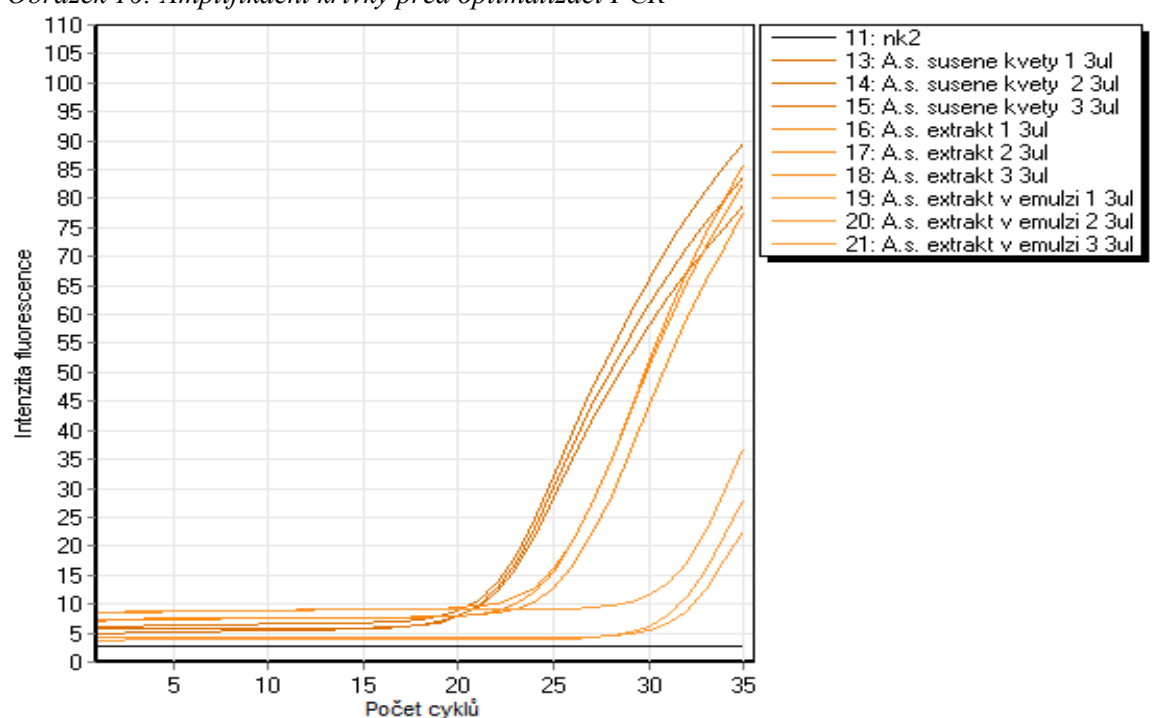
* seznam komerčních produktů včetně složení je uveden v Příloze 1

5.3.3 Optimalizace PCR specifické pro *Achyrocline satureioides*

Byly navrženy 3 páry bazí na základě dostupných sekvencí *A.satureioides* v databázi NCBI. Z těchto primerů byl vybrán pár AS3F/R, protože účinnost PCR se při změně podmínek reakce zvyšovala mnohem více než u ostatních primerových párů. Amplifikační křivky před a po optimalizace jsou uvedeny na Obrázcích 16 a 17.

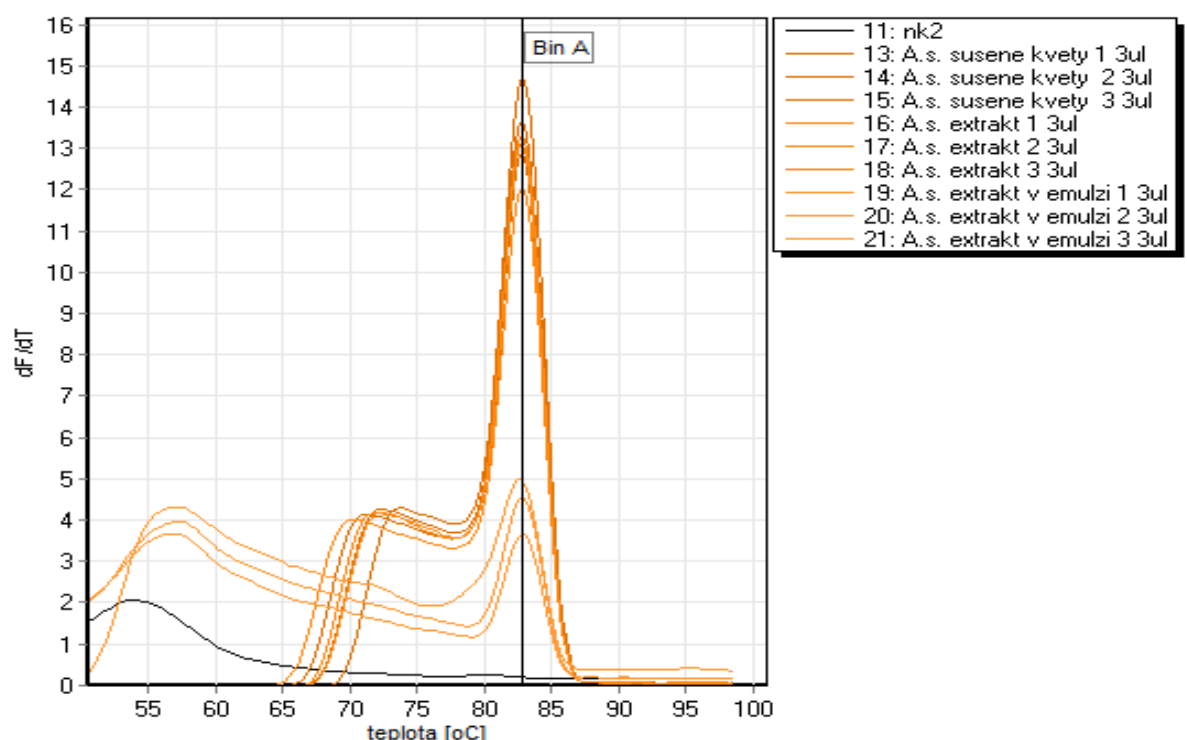


Obrázek 16: Amplifikační křivky před optimalizací PCR

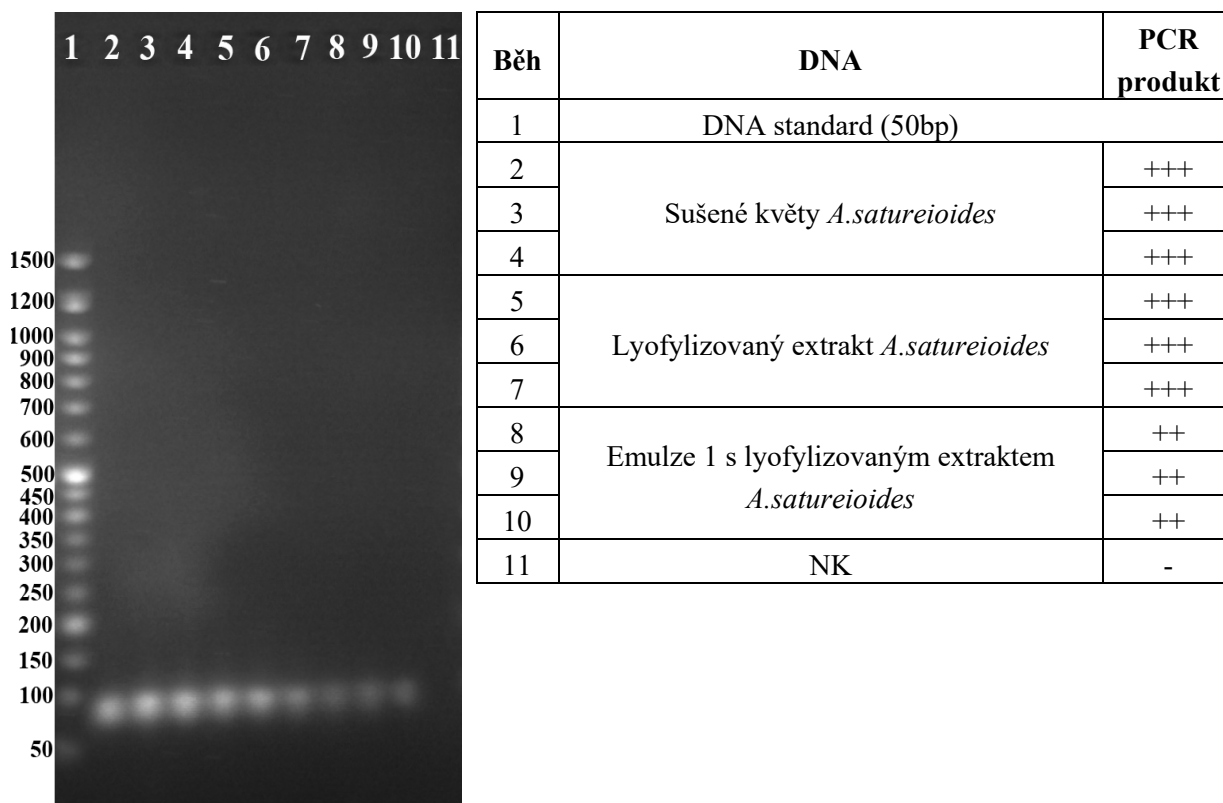


Obrázek 17: Amplifikační křivky po optimalizaci PCR

Analýza křivek tání a agarózová elektroforéza jsou uvedeny na Obrázcích 18 a 19. Byl detekován specifický produkt očekávané velikosti 77 bp. DNA *A. saturoioides* ze sušených květů, lyofilizovaného extraktu i extraktu přidaného do Emulze 1, byla úspěšně izolována, amplifikována i detekována ve všech testovaných vzorcích.



Obrázek 18: Melt analýza po optimalizaci PCR; $T_m = 82,8^\circ\text{C}$



Obrázek 19: Agarózová gelová elektroforéza po optimalizaci PCR s primery AS3F/R, velikost PCR produktů je 77 bp

Byla optimalizována PCR s primery specifickými pro *A.satureioides*. Zvýšením koncentrace primerů v PCR směsi, prodloužením syntézy a úpravou anealingové teploty bylo dosaženo zlepšení účinnosti PCR reakce. Byly detekovány PCR produkty specifické velikosti 77 bp a

s teplotou tání 82,8°C. Amplifikována byla DNA izolována ze sušených květů, z extraktu i z emulze s 1% (hm/hm) přídavkem lyofilizovaného extraktu. Touto metodou lze tedy stanovit autenticitu přidané složky v podobě extraktu z *A.satureioides*. Tato rostlina je léčivá bylina rostoucí na území Jižní Ameriky, která má antibakteriální a hojivé účinky, je proto zajímavou bylinou z hlediska přidávání do kosmetických výrobků.

5.3.4 Amplifikace DNA pomocí primerů Lim2F/R specifických pro limonensyntázu

Byla provedena PCR analýza s použitím primerů Lim2F/R specifických pro limonensyntázu. Byla prokázána přítomnost genu pro limonensyntázu v různých druzích levandule pomocí PCR i HPLC a následně byly testovány i modelové emulze a komerční přípravky s obsahem levandule i dalších rostlinných matic.

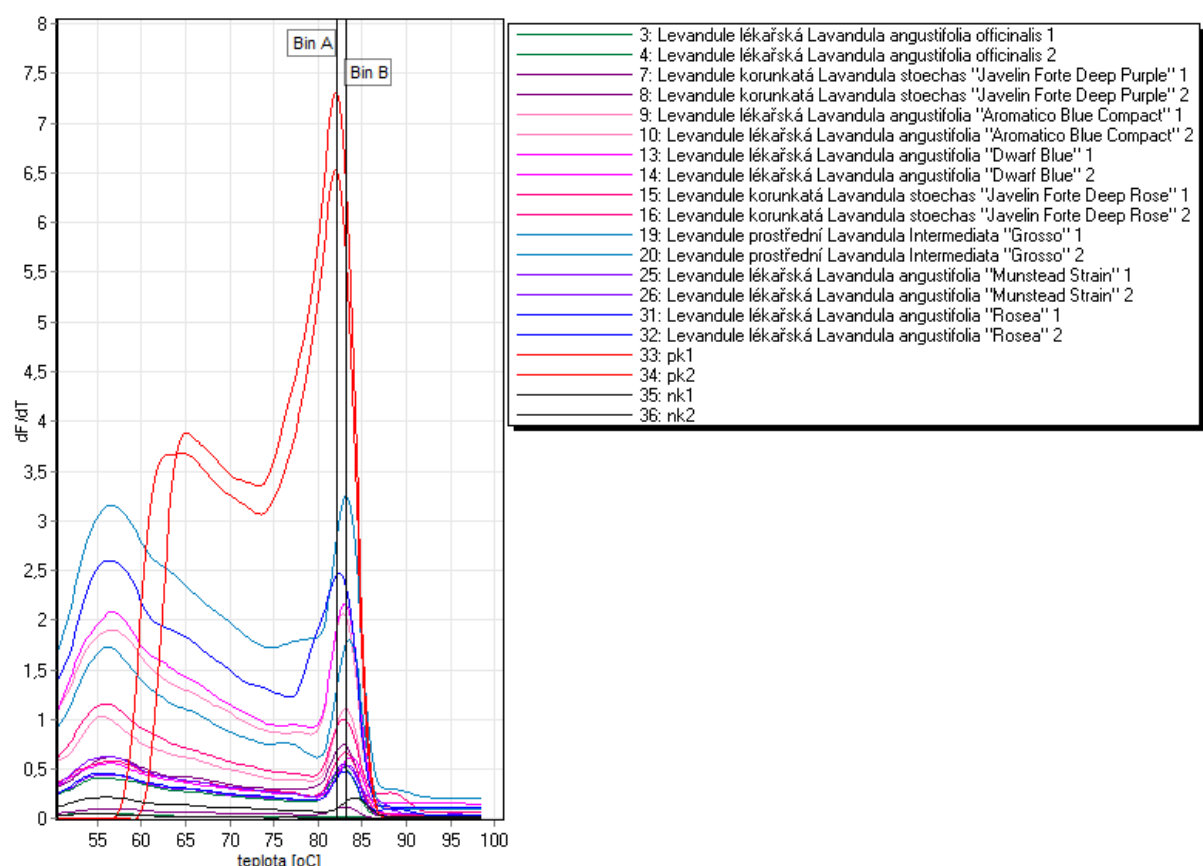
5.3.4.1 Amplifikace DNA pomocí primerů Lim2F/R specifických pro limonensyntázu v různých druzích i varietách levandule

Levandule (*Lavandula*) je jednou z nejčastěji používaných bylin v kosmetice, buď v podobě různých extraktů, nebo silic. Rod *Lavandula* obsahuje okolo 40 druhů. V kosmetice jsou nejčastěji používané druhy levandule pravá (*Lavandula angustifolia*) a levandule prostřední (*Lavandula intermedia*). Levandule prostřední se také označuje jako lavandin a pěstuje se ve Francii zejména kvůli vysokému obsahu vonných silic.

Tabulka 29: Amplifikace části genu pro limonen syntázu a detekce limonenu pomocí HPLC

Vzorek	Amplifikováno pomocí primerů Lim2F/R	Detekováno agarózovou elektroforézou	Detekce limonenu pomocí HPLC
Levandule korunkatá <i>Lavandula stoechas</i> "Javelin Forte Deep Purple"	ANO	ANO	NE
Levandule lékařská <i>Lavandula angustifolia</i> officinalis	ANO	ANO	ANO
Levandule lékařská <i>Lavandula angustifolia</i> "Aromatico Blue Compact"	ANO	ANO	ANO
Levandule lékařská <i>Lavandula angustifolia</i> "Dwarf Blue"	ANO	ANO	ANO
Levandule korunkatá <i>Lavandula stoechas</i> "Javelin Forte Deep Rose"	ANO	ANO	NE
Levandule prostřední <i>Lavandula intermedia</i> "Phenomenal"	ANO	ANO	ANO
Levandule prostřední <i>Lavandula Intermediata</i> "Grosso"	ANO	ANO	ANO
Levandule lékařská <i>Lavandula angustifolia</i> "Munstead Strain"	ANO	ANO	ANO
Levandule lékařská <i>Lavandula angustifolia</i> "Rosea"	ANO	ANO	ANO

Ostatní druhy levandule se pěstují zejména pro okrasné účely, např. levandule korunkatá. V Tabulce 29 je uvedeno, ve kterých vzorcích DNA izolované z různých druhů a variet levandule byl nalezen gen pro limonensyntázu. Pro porovnání jsou také uvedeny výsledky HPLC, pomocí které byl detekován limonen přítomný ve vzorcích levandule. Analýza křivek tání je uvedena na Obrázku 20. V případě levandule lékařské a prostřední bylo množství limonenu ve vzorcích dostatečně vysoké, aby byl detekován pomocí HPLC. Pomocí PCR byla potvrzena přítomnost genu pro limonensyntázu



Obrázek 20: Analýza křivek tání, $T_{mA} = 82,05^{\circ}\text{C}$, $T_{mB} = 83,13^{\circ}\text{C}$

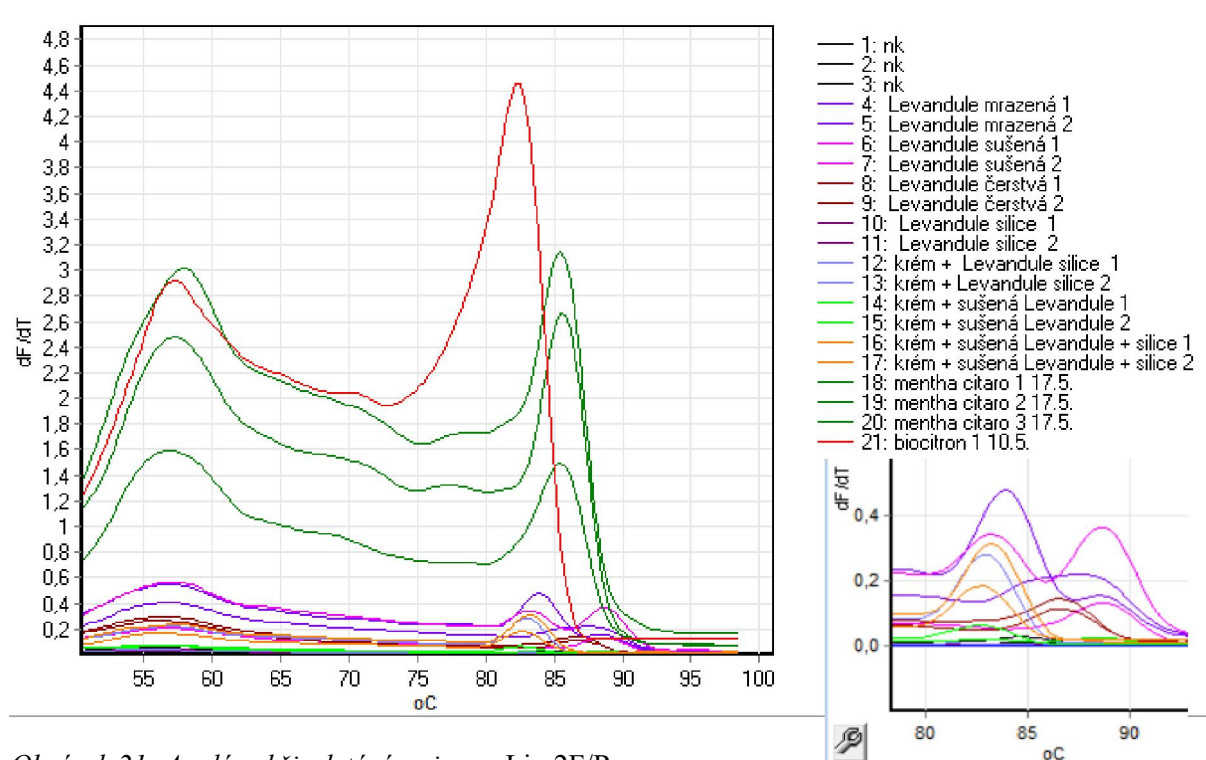
Na Obrázku 20 lze vidět křivky tání příslušných amplikonů, které mají teplotu tání $83,13^{\circ}\text{C}$, jako pozitivní kontrola byla použita DNA z kůry *citrusu limon* o koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Z uvedených výsledků lze vidět, že výsledky HPLC i PCR jsou ve shodě v případě levandule lékařské a prostřední. V případě levandule korunkaté se liší, zřejmě kvůli velmi nízkému množství limonenu přítomného v tomto druhu levandule. PCR je tedy v tomto případě citlivější metodou pro detekci limonen produkující rostliny přítomné v analyzované matici.

5.3.4.2 Amplifikace DNA pomocí primerů *Lim2F/R* specifických pro limonen syntázu ve vzorcích DNA izolované z rostlinných matic, modelové emulze i kosmetických přípravků

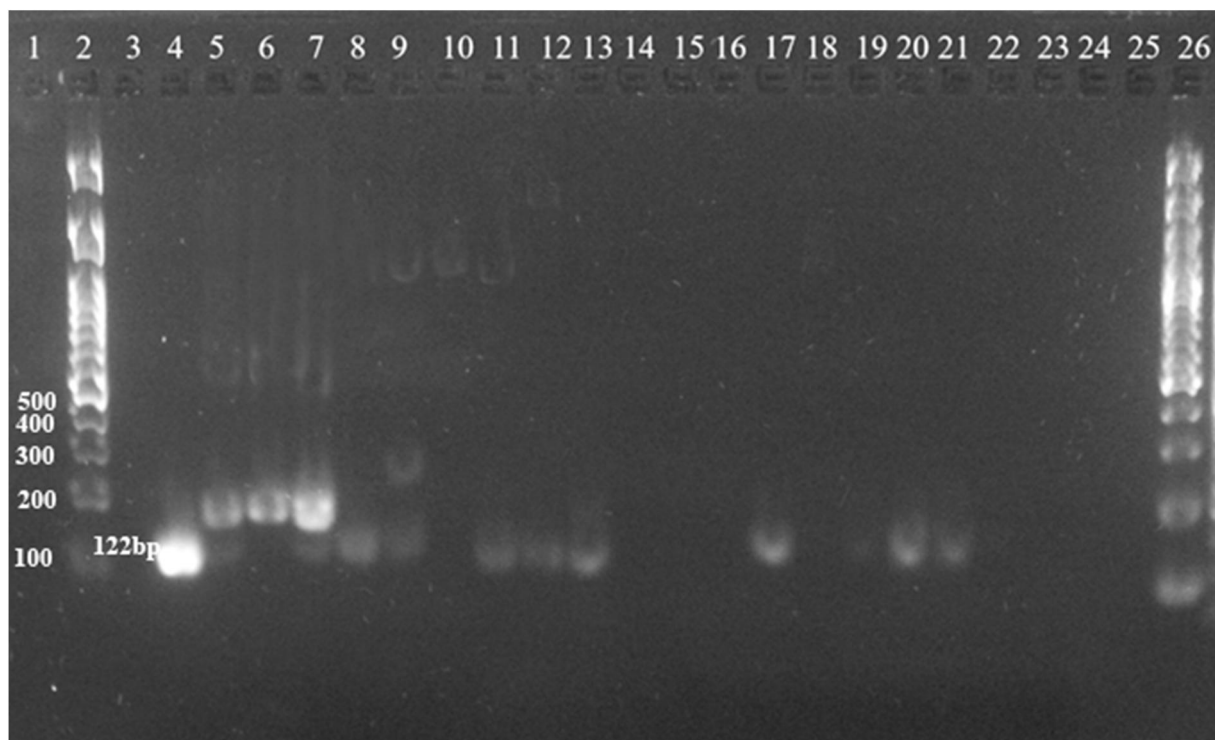
U vzorků, u kterých byla prokázána přítomnost amplifikovatelné DNA pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin (bylinné vzorky, modelové a komerční vzorky krémů),

byla provedena PCR analýza s použitím primerů Lim2F/R specifických pro limonensyntázu. Jako pozitivní kontrola byla použita, v každé analýze, DNA izolovaná z lyofilizované kůry biocitronu o koncentraci $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Amplifikační křivky jsou uvedeny v Příloze 4. Produkty PCR byly naneseny v množství $10 \mu\text{l}$ na 1,8% agarózový gel a byla provedena elektroforéza.

DNA izolovaná z máty se amplifikovala úspěšně, ale má jinou teplotu tání než pozitivní kontrola, to je zřejmě způsobeno rozdílným úsekem DNA, který kóduje limonensyntázu. Dle agarové elektroforézy má také větší velikost, cca 150 bp oproti citronové kůře, která má 122 bp (Obrázek 22), což odpovídá hodnotám zjištěným pomocí programu primer blast. V případě PCR produktů vzorků levandule je velikost ampliconů též 122 bp. Analýza křivek tání ampliconů je na Obrázku 21 a amplifikační křivky v Příloze 4. Byla amplifikována DNA izolovaná z levandule, a to jak ze zamražených květů, tak z květů sušených, byla také amplifikována DNA izolovaná z Emulze 1 s přidavkem sušených květů, nikoli však s přidavkem silice. To znamená, že je možné rozlišit, zda výrobek obsahuje rostlinnou složku nebo jen silici.



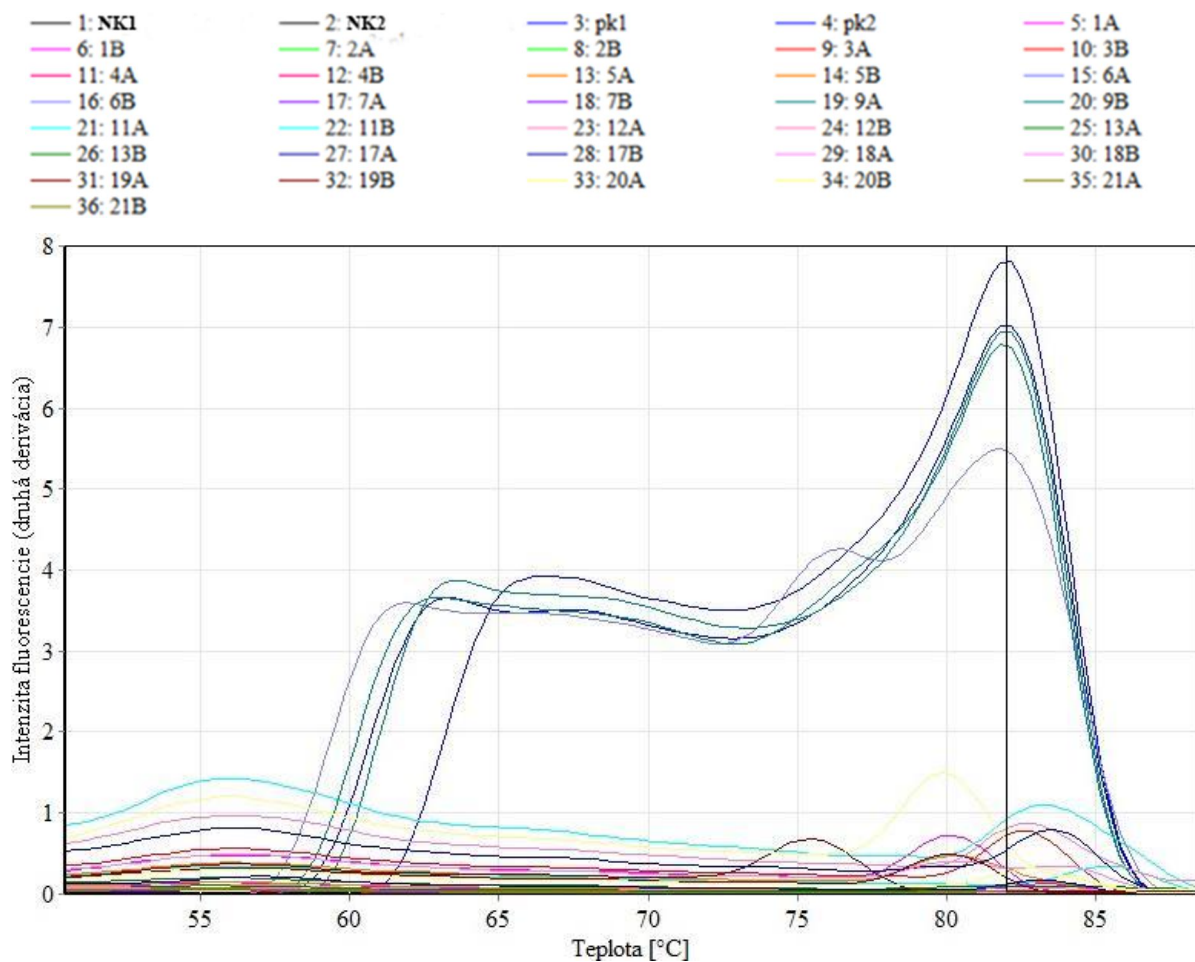
Obrázek 21: Analýza křivek tání, primery Lim2F/R
(vz21 $T_m = 82,3 \text{ }^\circ\text{C}$, vz18-20 $T_m = 85,5 \text{ }^\circ\text{C}$, vz4-7 $T_m = 83,3 \text{ }^\circ\text{C}$ a $88,8 \text{ }^\circ\text{C}$)



Běh	DNA	PCR produkt	Běh	DNA	PCR produkt
1	x		14	Levandulová silice	-
2	DNA standard 100 bp		15		-
3	x		16	Emulze 1+ levandulová silice	-
4	PK	+++	17	Emulze 1+ levandule lékařská sušená 1	+
5	Mentha Piperita "citaro" čerstvá	+	18	Emulze 1+ levandulová silice 2	-
6		+	19	Emulze 1+ levandule lékařská sušená 2	+
7		+	20	Emulze 1+ levandule lékařská sušená, levandulová silice	+
8	Levandule lékařská	+	21		+
9	mrazená	+	22	Nk	-
10	Levandule lékařská	-	23		-
11	sušená	+	24		-
12	Levandule lékařská	+	25	x	
13	čerstvá - list	++	26	Standard 100 bp	

Obrázek 22: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR, primery Lim2F/R (122 bp) (x-žádný vzorek; - nedetekované; PCR produkt: + slabá, ++ střední, +++ silná intenzita)

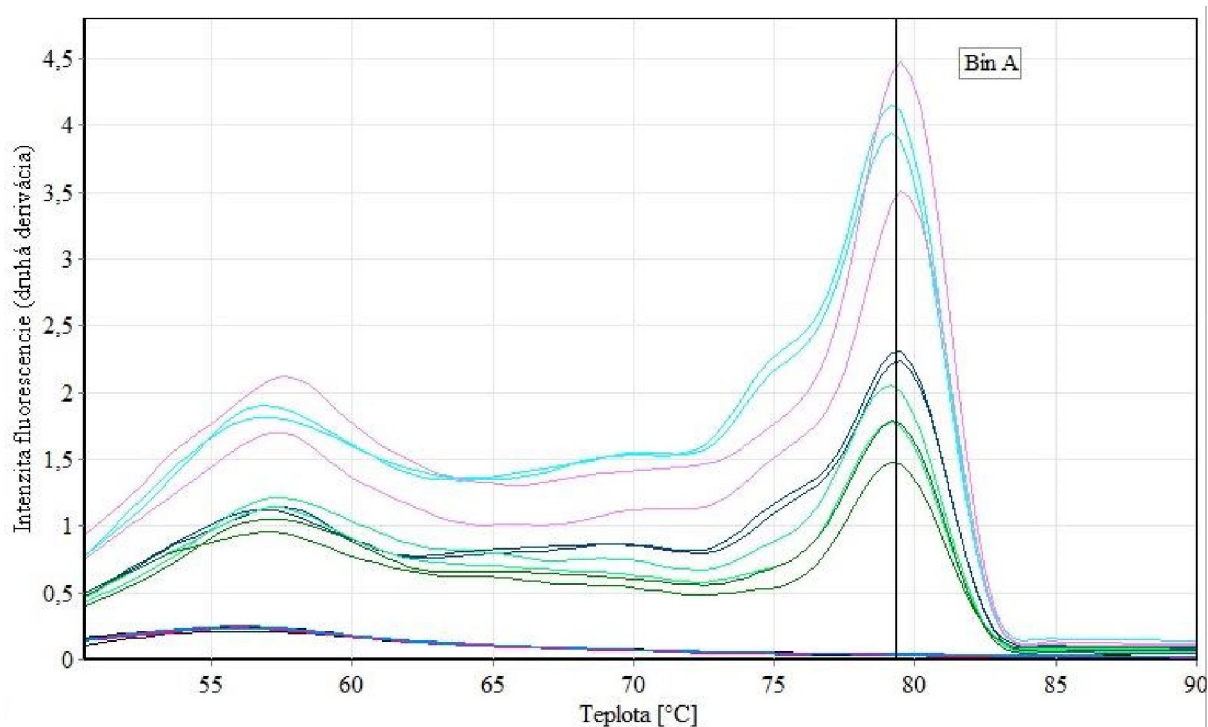
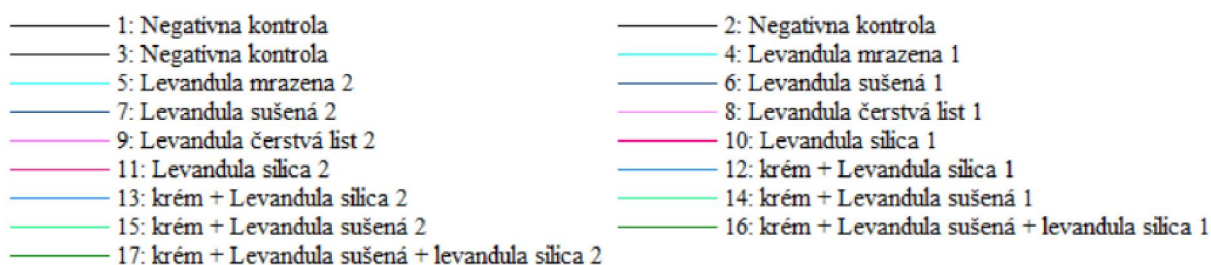
Byla zjištěna přítomnost genu pro limonensyntázu ve vzorcích modelových a komerčních krémů pomocí primerů Lim2F/R. PCR Amplifikační křivce a křivce tání pozitivní kontroly nejvíce odpovídají vzorky Emulze 1 s příměsí citrónové kůry (Vzorky 9A a 9B) a komerčního produktu Balea Hand creme protect (Vzorek 17A a B). Rovněž při MELT analýze odpovídají i teploty tání teplotě $T_m = 82\text{ °C}$ (Obrázek 23). Celkově, modelové Emulze 1 se amplifikovaly v případě silice pomerančové španělské, přídatku mentha piperita citaro a sušeného květu levandule. Ve všech ostatních k amplifikaci nedošlo, anebo výsledky nebyly dostatečně průkazné. K amplifikaci specifického produktu došlo v případě komerčních výrobků Balea Hand creme protect, Balea sugar scrub a Planeta organica natural body scrub. Byla analyzována i DNA izolovaná ze sedimentu po centrifugaci, amplifikace byla úspěšná, v některých případech i lepší. Všechny ostatní amplifikační křivky, příslušné analýzy křivek tání, výsledky gelové elektroforézy a legenda označení daných vzorků jsou uvedeny v Příloze 4.



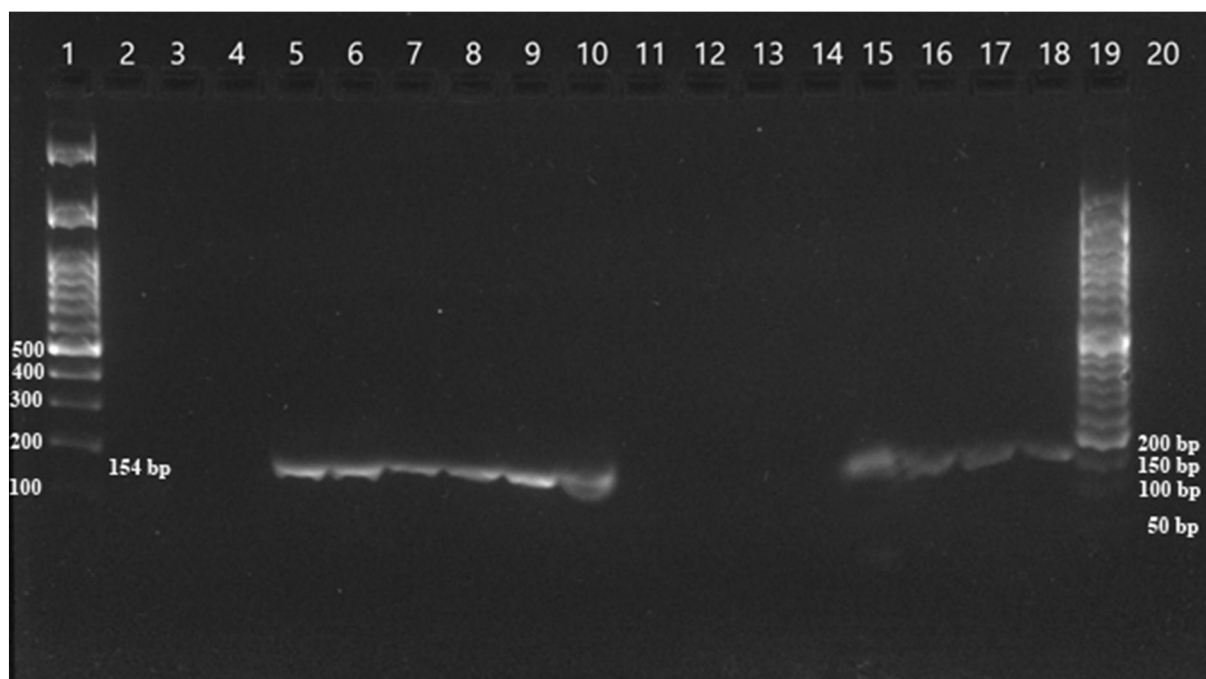
Obrázek 23: Analýza křivek tání, použité primery Lim2F/R, modelové a komerční vzorky krémů ($T_m = 82\text{ °C}$)

5.3.5 Amplifikace DNA pomocí primerů lav1FR a lav1modFR specifických pro levanduli

U vzorků, které obsahovaly levanduli a u kterých byla prokázána přítomnost amplifikovatelné DNA pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin (bylinné vzorky, modelové a komerční vzorky krémů), byla provedena PCR analýza s použitím primerů lav1FR a lav1modFR specifických pro levanduli. Jako pozitivní kontrola byla použita, v každé analýze, DNA izolována ze sušených květů levandule lékařské o koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Amplifikační křivky jsou uvedeny v Příloze 4. Produkty PCR byly naneseny v množství $10 \mu\text{l}$ na 1,8% agarózový gel a byla provedena elektroforéza (Obrázek 25). Nejlépe se amplifikovala DNA izolovaná z čerstvých listů levandule lékařské a z lyofilizovaných květů. Neamplifikovala se DNA izolovaná z levandulové silice a modelového vzorku krému s touto silicí. Melt analýza je uvedena na Obrázku 24.



Obrázek 24: Analýza křivek tání, použité primery Lav1FR, $T_m = 79,3^\circ\text{C}$



Běh	DNA	PCR produkt	Běh	DNA	PCR produkt
1	DNA standard 100 bp		11	Levandulová silice	-
2			12		-
3	Nk	-	13	Emulze 1+ levandulová silice	-
4	Nk	-	14		-
5	Levandule mrazená	+++	15	Emulze 1+ levandule sušená	++
6		+++	16		+
7	Levandule sušená	++	17	Emulze 1+ levandule sušená, levandulová silice	+
8		++	18		+
9	Levandule čerstvá list	+++	19	DNA standard 50 bp	
10		+++	20	x	

Obrázek 25: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR, primer *Lav1FR* (154 bp) (x mezera, - nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Byla ověřena přítomnost amplifikovatelné DNA levandule v komerčních přípravcích pomocí primerů *lav1FR* a *lav1modFR*. Jako pozitivní kontrola byla použita sušená a mrazená levandule ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Amplifikovaly se pouze pozitivní kontroly, ani jeden vzorek komerčních produktů, což naznačuje, že se komerčních výrobcích nenacházela matrice levandule, zřejmě jen její silice. To bylo potvrzeno i agarózovou gelovou elektroforézou. Všechny amplifikační křivky, křivky tání amplikonů a gely se nachází v Příloze 4.

5.3.6 Shrnutí výsledků PCR

V Tabulce 30 a Tabulce 31 lze vidět srovnání výsledků analýzy PCR s primery pro S2F/S3R, Lim2F/R, Lav1FR a Lav1modFR získané oběma metodami detekce ampliconů, analýzou teplot tání (MELT) a pomocí gelové elektroforézy (Gel).

Tabulka 30: Shrnutí naměřených výsledků metodou PCR pro modelové vzorky krémů Emulze 1 (+ detekováno, - nedetekováno, x neanalyzováno)

Látky přidané do Emulze 1	Množství látky v 1g emulze [mg]	S2F/S3R		Lim2F/R		Lav1FR		Lav1modFR	
		MELT	Gel	MELT	Gel	MELT	Gel	MELT	Gel
Silice červený pomeranč	4,34	+	+	-	-	x	x	x	x
		+	+	+	+	x	x	x	x
Silice citrónová tráva	3,89	-	-	-	-	x	x	x	x
		+	+	-	-	x	x	x	x
Silice máta peprná	5,87	+	+	+	+	x	x	x	x
		+	+	-	-	x	x	x	x
Peprno-mátová silice	3,93	+	+	-	-	x	x	x	x
		+	+	-	-	x	x	x	x
Pomerančová silice španělská	2,97	+	+	+	+	x	x	x	x
		+	+	+	+	x	x	x	x
Mandarinková silice	5,23	+	+	-	-	x	x	x	x
		+	+	+	+	x	x	x	x
Grapefruitová silice	4,97	+	+	-	-	x	x	x	x
		+	+	-	-	x	x	x	x
Citrónová kůra lyofilizovaná	1,89	+	+	+	+	x	x	x	x
		+	+	+	+	x	x	x	x
Mentha Piperita "citaro"	2,42	+	+	+	+	x	x	x	x
		+	+	+	+	x	x	x	x
Mentha pycnanthemum pilosum	3,39	+	+	-	-	x	x	x	x
		+	+	+	+	x	x	x	x
Mentha almira strawberry peppermint	2,49	+	+	-	-	x	x	x	x
		+	+	-	-	x	x	x	x
Sušená levandule	1,98	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+
Levandulová silice	3,02	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-
Sušená levandule + levandulová silice	1,76+ 1,94	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+

Pozn. Na izolaci DNA navážky Emulzí činily 0,1 g. Na izolaci DNA tedy byly použity řádově stovky mikrogramů přidané rostlinné matrice/silice.

Tabulka 31: Shrnutí naměřených výsledků metodou PCR pro komerční výrobky(+ detekováno, - nedetekováno, x neanalyzáno)

Kosmetické výrobky	S2F/S3R		Lim2F/R		Lav1FR		Lav1modF R	
	MELT	Gel	MELT	Gel	MELT	Gel	MELT	Gel
Balea handcreme protect	+	+	+	+	x	x	x	x
	+	+	+	+	x	x	x	x
Cosmos natural repairing hand protect	+	+	-	-	x	x	x	x
	+	+	-	-	x	x	x	x
Konopka's face commage moist	-	-	-	-	x	x	x	x
	-	-	-	-	x	x	x	x
Planeta organica natural body scrub	-	-	-	-	x	x	x	x
	-	-	+	+	x	x	x	x
N.A.E. shampoo bar	-	-	-	-	x	x	x	x
	-	-	-	-	x	x	x	x
Naturalis sugar body scrub	-	-	-	-	x	x	x	x
	-	-	-	-	x	x	x	x
Balea sugar scrub	+	+	+	+	x	x	x	x
	+	+	+	+	x	x	x	x
Alverde skinfood Bio-limette	+	+	-	-	x	x	x	x
	+	+	-	-	x	x	x	x
Alverde pflege-dusche bio- minze	-	-	-	-	x	x	x	x
	-	-	-	-	x	x	x	x
Organic shop strawberry body scrub	+	+	x	x	x	x	x	x
	+	+	x	x	x	x	x	x
Organic shop strawberry body mousse	+	+	x	x	x	x	x	x
	+	+	x	x	x	x	x	x
N.T. Levandulový krém	+	+	x	x	-	-	-	-
	+	+	x	x	-	-	-	-
Kvítok Levandulový sen	+	+	x	x	-	-	-	-
	+	+	x	x	-	-	-	-
Herbs of Bulgaria face cream s levandulí	+	+	x	x	-	-	-	-
	+	+	x	x	-	-	-	-
Ryor hydratační krém s levandulí	+	+	x	x	-	-	-	-
	+	+	x	x	-	-	-	-

5.4 Bakterie v kosmetických přípravcích s obsahem rostlinné složky a probiotik

Optimalizace izolace DNA a amplifikace v PCR kosmetických výrobků s probiotiky byla provedena již v rámci mé diplomové práce [133]. MPA médium je vhodné pro kultivaci všech bakterií z kosmetických výrobků. Následně se narostlé kolonie přeočkují na agarové plotny s MRS médiem. Z takto narostlých kolonií je pak možné izolovat DNA vhodnou pro

amplifikaci v PCR. Přímá izolace bakteriální DNA nebo přímá kultivace mikroorganismů na selektivních médiích není většinou úspěšná, protože mikroorganismy v důsledku nepříznivých podmínek ztrácí schopnost růstu na selektivních médiích [134]. V Tabulce 32 jsou uvedeny výsledky kultivace kosmetických výrobků Eminence s probiotiky a okurkou. Ve výrobcích bylo zřejmě přítomno malé množství životaschopných buněk, protože při vyšším ředění byl nárůst buněk minimální.

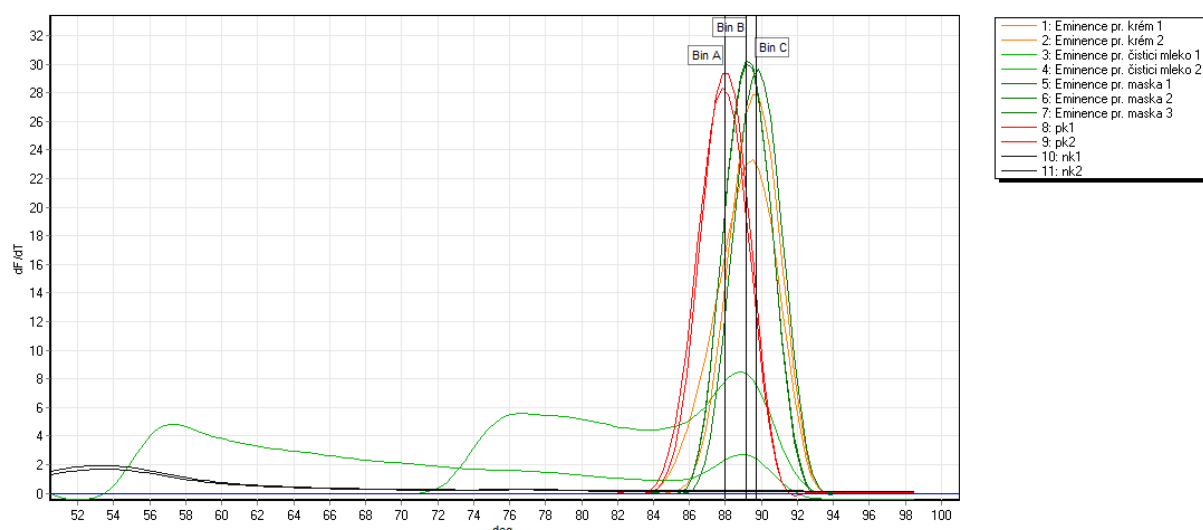
Tabulka 32: Nárůst bakterií z kosmetických přípravků s probiotiky na MPA médiu

Výrobek	Ředění	Nárůst na MPA médiu		
Eminence probiotický krém s okurkou	10^{-3}	+	++	-
	10^{-5}	+	-	-
Eminence probiotická maska s okurkou	10^{-3}	++	++	++
	10^{-5}	+	+	-
Eminence probiotické čisticí mléko s okurkou	10^{-3}	+	+	-
	10^{-5}	+	-	-

- žádný nárůst, + nepatrný růst, ++ mírný růst

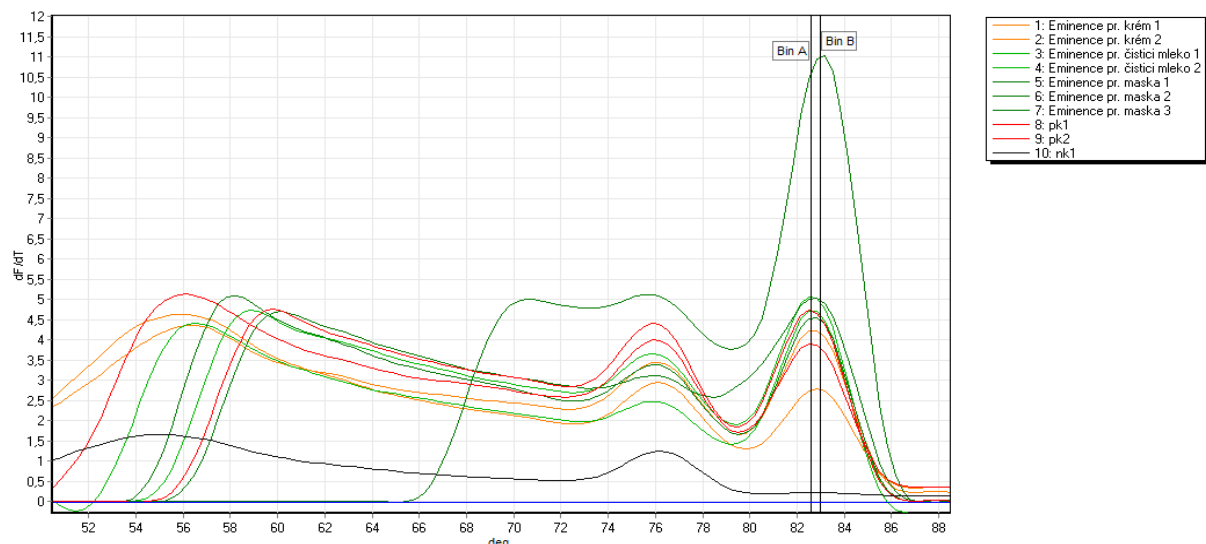
5.4.1 PCR specifická pro doménu Bacteria

Z nakultivovaných buněk byla vyizolována DNA a použita pro analýzu v PCR v reálném čase za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria*. Ve výrobcích Eminence probiotický krém s okurkou, Eminence probiotické čisticí mléko s okurkou a Eminence probiotická maska s okurkou byla prokázána přítomnost bakteriální DNA. Na Obrázku 26 je analýza křivek tání, amplifikační křivky a výsledek elektroforézy jsou uvedeny v Příloze 4, na gelu byly detekovány produkty specifické velikosti 466 bp. Rozdíly v teplotě tání jednotlivých produktů lze vysvětlit přítomností rozdílných množství a druhů bakterií přítomných v původní matici.



Obrázek 26: Analýza křivek tání - PCR specifická pro doménu Bacteria (BinA = 87,98°C, BinB = 89,18°C, BinC = 89,72°C)

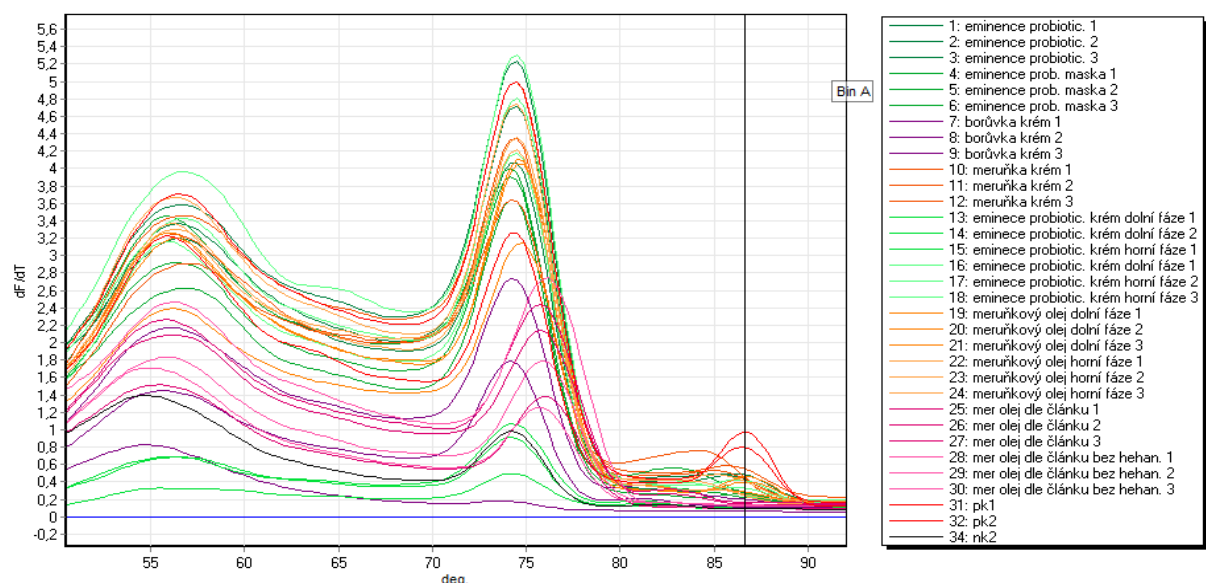
Ve výrobcích Eminence probiotický krém s okurkou, Eminence probiotické čistící mléko s okurkou a Eminence probiotická maska s okurkou byla prokázána přítomnost DNA laktobacilů. Na Obrázku 27 je analýza křivek tání, amplifikační křivky a výsledek elektroforézy jsou uvedeny v Příloze 4, na gelu byly detekovány produkty specifické velikosti 92 bp. Rozdíly v teplotě tání jednotlivých produktů lze vysvětlit přítomností rozdílných množství a druhů laktobacilů přítomných v původní matici.



Obrázek 27: Analýza křivek tání - PCR specifická pro rod *Lactobacillus* (Bin A = 82,58°C, Bin B = 82,98°C)

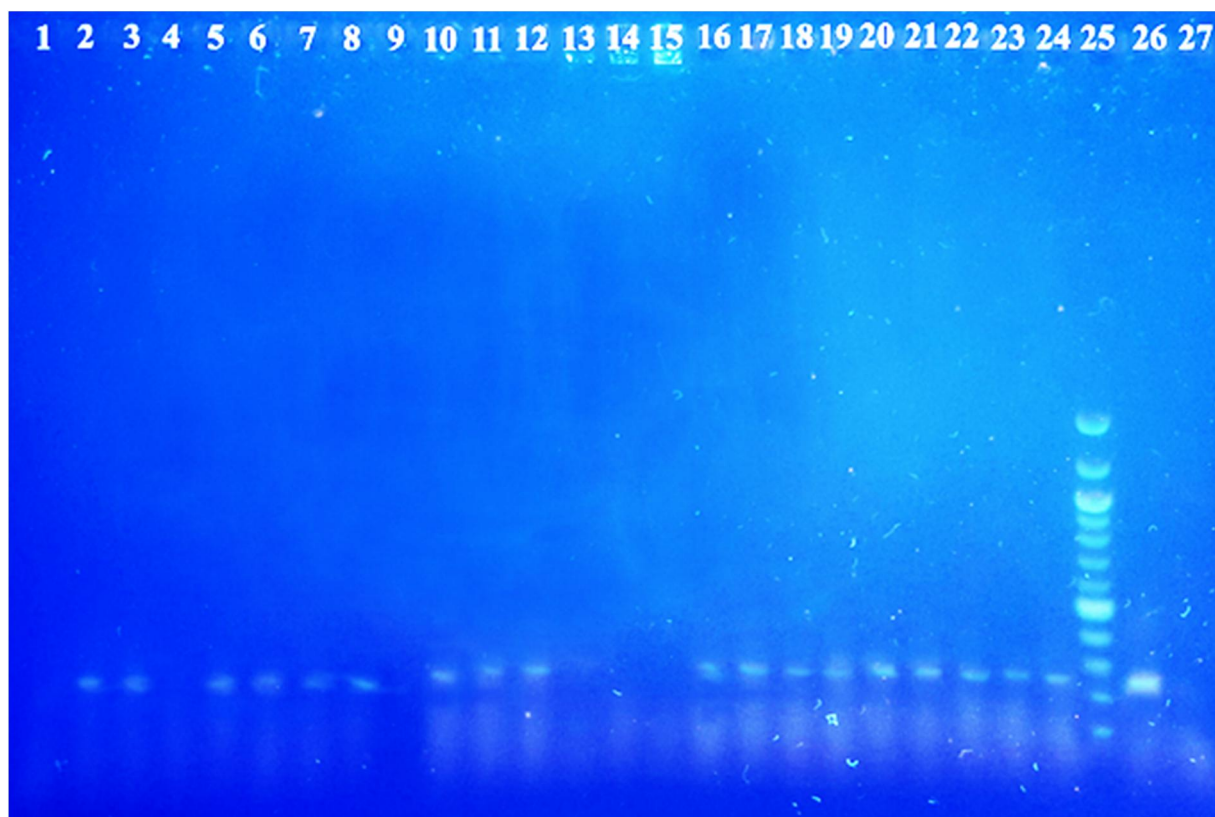
5.4.2 Detekce rostlinné DNA v produktech s bakteriální složkou

DNA kosmetických produktů s obsahem rostlinné a bakteriální složky získaná izolací kitem byla použita pro analýzu v PCR. Byla provedena PCR v reálném čase za použití primerů specifických pro rostlinnou DNA (220 bp).



Obrázek 28: Analýza křivek tání (BinA = 86,67°C)

Na Obrázku 28 jsou uvedeny křivky tání amplikonů třech opakováních). Produkty PCR byly následně naneseny na agarózový gel (Obrázek 29 – produkty velikosti 220 bp (rostlinná DNA).



Č.	vzorek	detekce
1,2,3	Eminence probiotický krém	- / + / +
4,5,6	Eminence probiotická maska	- / + / +
7,8,9	Eminence Borůvkový krém	+ / + / -
10,11,12	Eminence Meruňkový krém	+ / + / +
13,14,15	Eminence probiotické mléko dolní fáze	- / - / -
16,17,18	Eminence probiotické mléko horní fáze	+ / + / +
19-24	Manufactura meruňkový olej	+ / + / + / + / + / +
25	DNA standard	
26	pk N.tabacum 1ng/ul	+ +
27	NK	-

Obrázek 29: Agarósová gelová elektroforéza produktů PCR – produkty velikosti 220 bp

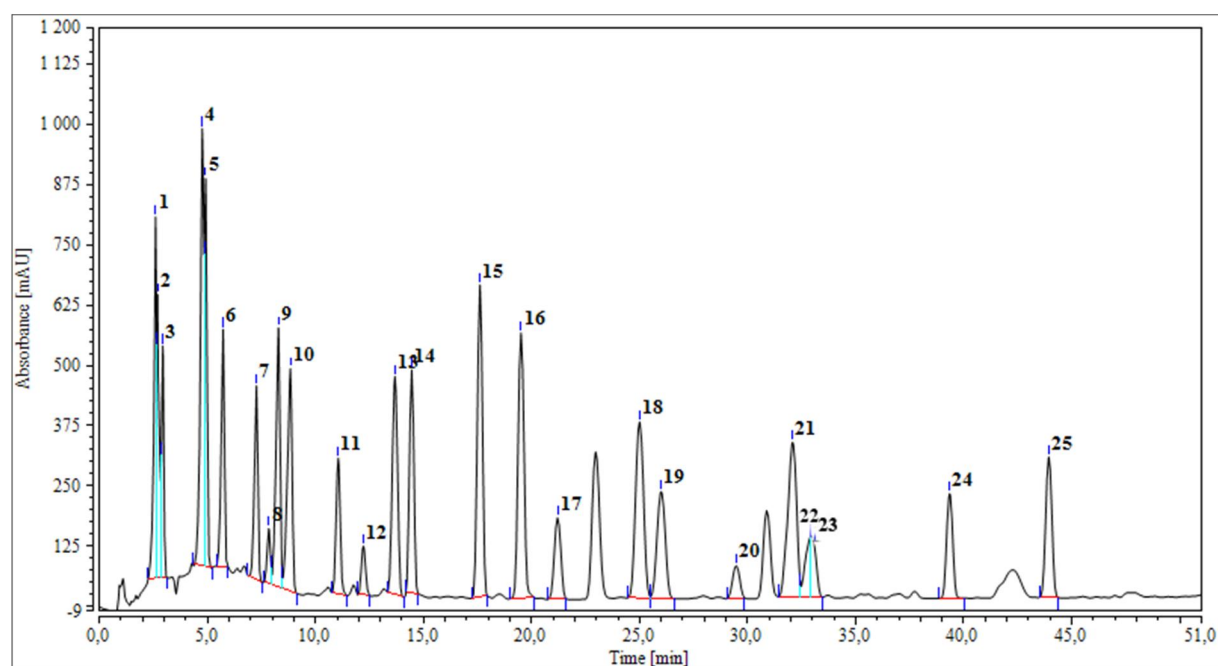
Byla potvrzena přítomnost rostlinné DNA ve všech testovaných probiotických kosmetických výrobcích s obsahem rostlinné matrice okurky.

5.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – stanovení alergenů

Metoda pro současné stanovení 24 vonných alergenů vychází ze článku C.Villa a kol. 2007 a byla upravena. Příprava vzorků a standardů je uvedena v kapitole 4.9.

5.5.1 Směsný roztok všech testovaných alergenů

Vzhledem k odlišné polaritě analytů byla stejně jako v původní publikaci zvolena gradientová eluce směsí acetonitrilu a vody. *Para*-anisaldehyd byl vybrán jako standard pro přepočítání ztrát při extrakci, protože má odlišný retenční čas než sledované analyty a jeho absorpční pásy jsou blízké maximální UV absorpenci všech sledovaných sloučenin. Za výše popsaných chromatografických podmínek bylo 24 analytů vhodně separováno v průběhu 50 minut (Obrázek 30, UV1 kanál). V Tabulce 33 jsou uvedeny retenční časy (Rt) všech analytů, jejich pořadí i číselné označení odpovídá číselnému označení píků na Obrázku 30. V chromatogramu jsou dva kritické páry, hydroxycitronellal a anisylalkohol, a ceton-alfa a amylcinnamal. Tyto analyty se od sebe dají odlišit díky ověření v jiném kanále než je UV1 (viz Tabulka 33). Případně lze ověřit absorpční spektrum, které je pro látku charakteristické, tato spektra jsou uvedena v Příloze 5.



Obrázek 30: Chromatogram směsi 24 alergenů a *p*-anisaldehydu při 210 nm (UV1)

5.5.2 Kalibrace 24 alergenů

Dle postupu v kapitole 4.9. Byly sestaveny kalibrační křivky pro všech 24 alergenů. Každý analyt je kvantifikovatelný v rozmezí uvedeném v tabulce 33.

Tabulka 33: Kvantifikační rozmezí analytů

Č.	Název	Ret. Čas [min]	Rozmezí [mg · ml ⁻¹]	Detekce			
				UV1	UV2	UV3	UV4
1	Hydroxycitronelal	2,593	1,000 – 20,000	+	-	-	+
2	Anisylalkohol	2,685	0,001 – 0,100	+	+	+	+
3	Benzylalkohol	2,923	0,001 – 0,050	+	-	-	-
4	Cinnamylalkohol	4,750	0,001 – 0,050	+	+	-	-
5	Kumarin	4,910	0,001 – 0,010	+	+	+	-
6	p-anisaldehyd	5,717	0,001 – 0,050	+	+	+	+
7	Cinamal	7,260	0,001 – 0,050	+	+	+	+
8	Lyrál (Mix isomerů)	7,833	0,010 – 0,500	+	-	-	-
9	Eugenol	8,278	0,001 – 0,010	+	-	+	+
10	Isoeugenol	8,832	0,001 – 0,010	+	+	+	+
11	Geraniol	11,045	0,001 – 0,100	+	+	+	+
12	Linalol	12,212	0,010 – 0,500	+	-	-	-
13	b-Citronelol	13,673	0,005 – 0,100	+	+	+	+
14	Citral	14,447	0,025 – 0,500	+	+	+	+
15	Methylheptyncarbonát	17,608	0,005 – 0,100	+	+	-	+
16	Amylcinamylalkohol	19,507	0,005 – 0,100	+	+	+	+
17	Benzyl benzoate	21,202	0,001 – 0,100	+	+	+	+
18	Benzyl salicylate	24,993	0,001 – 0,050	+	+	-	+
19	Benzyl cinnamate	25,995	0,001 – 0,100	+	+	+	+
20	2-(4-tert-Butylbenzyl) propionaldehyd (lilial)	29,467	0,005 – 0,100	+	+	-	+
21	Farnesol (Mix isomerů)	32,080	0,010 – 0,100	+	-	-	-
22	Cetonalfa (tech)	32,887	0,005 – 0,100	+	+	-	+
23	Amylcinamal	32,940	0,001 – 0,100	+	-	+	-
24	Hexylcinamaldehyd	39,35	0,005 – 0,100	+	+	+	+
25	d-Limonen	43,94	0,005 – 0,100	+	-	-	-

Pozn. UV1 = 210 nm, UV2 = 254 nm, UV3 = 280 nm, UV4 = 225 nm

5.5.3 Vzorky silic

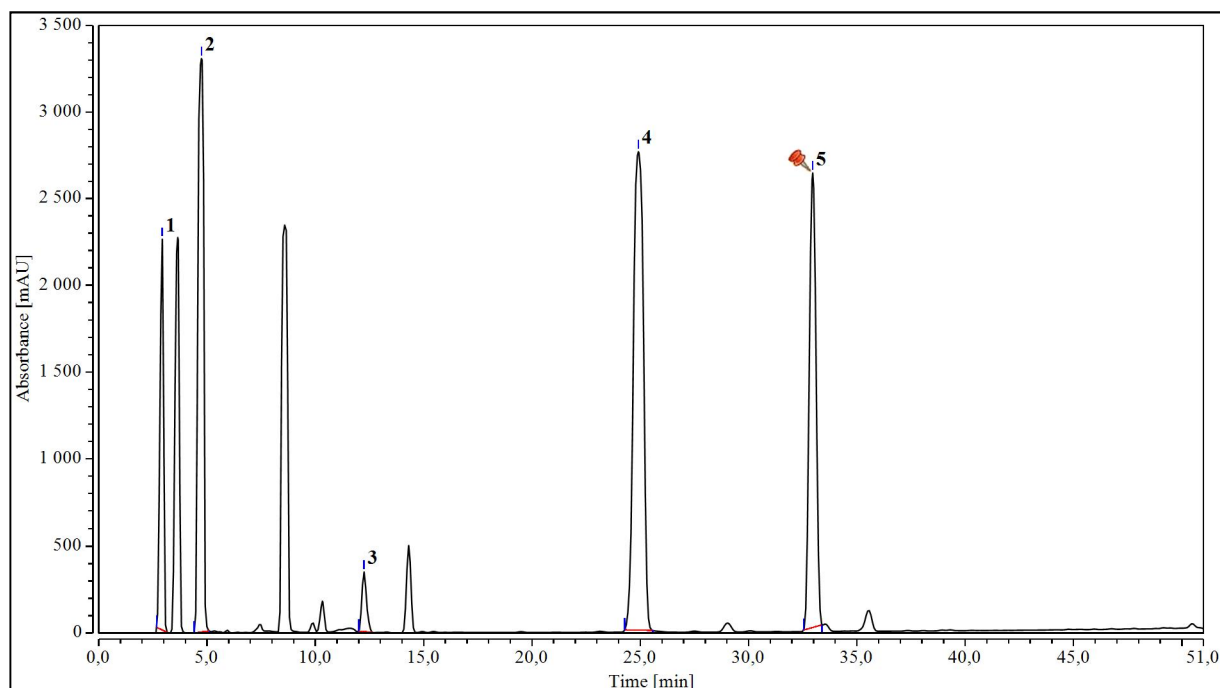
Touto metodou bylo zjištěno množství alergenů obsažené v komerčních vzorcích silic, a to pro ověření, zda je metoda dostatečně citlivá a je aplikovatelná na reálné vzorky. Byly porovnány nalezené alergeny ve vzorcích pomocí HPLC s údaji uvedenými výrobcem (viz Tabulka 34).

Tabulka 34: Komerční silice - údaje od výrobce a výsledek HPLC analýzy přítomných alergenů

Vzorek	Údaje výrobce	Detekováno HPLC
Mandarinka, Míča a Harašta s.r.o. 100% přírodní esenciální olej	Linalool	+
	Citral	+
	Limonene	+
Jasmín, Míča a Harašta s.r.o. Vonný olej	Hydroxycitronellal*	-
	Benzyl alcohol	+
	Cinnamyl alcohol	+
	Linalool	+
	Benzyl salicylate, Amyl cinnamal	+

* nebyl detekován zřejmě kvůli tomu, že se jeho množství nacházelo pod mezí detekce

Chromatogram vonného oleje Jasmín je uveden na Obrázku 31. Vzorek je 10x zředěn, přesto se je detekováno vysoké množství hledaných látek.

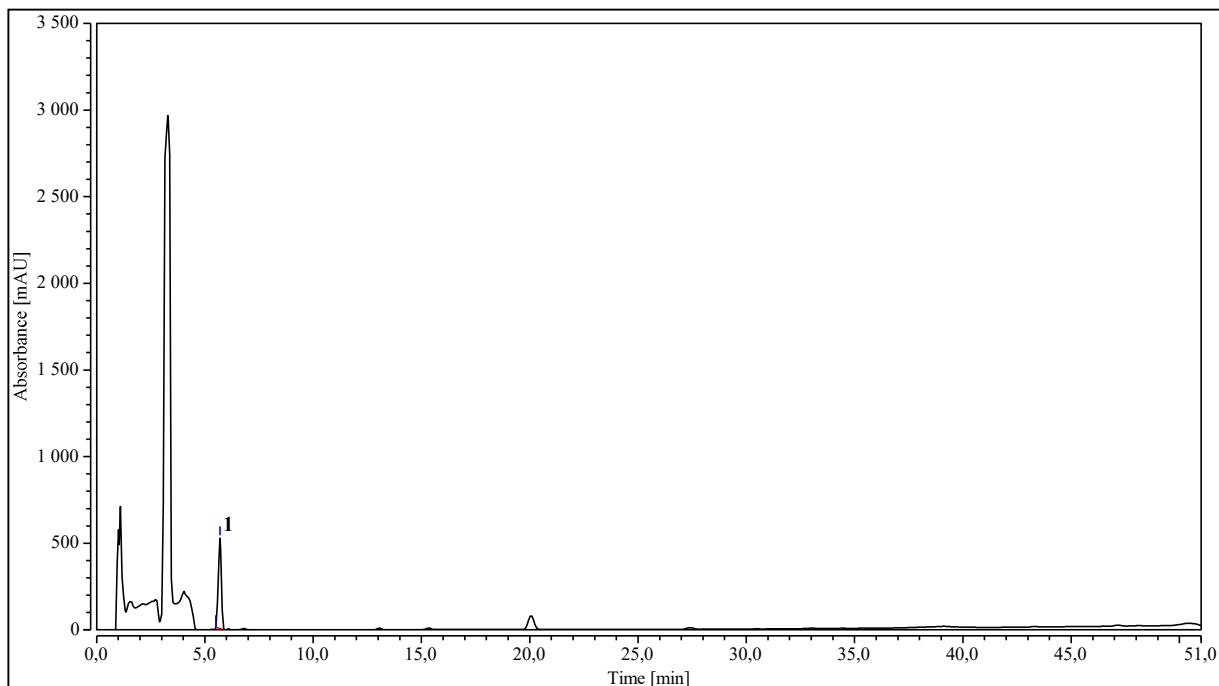


Obrázek 31: Chromatogram vonného oleje Jasmín

1 – benzylalkohol, 2 – cinnamylalkohol, 3 – linalool, 4 – benzylsalicylát, 5 – amylcinnamal

5.5.4 Modelová emulze

Byla extrahována čistá Emulze 1 a bylo ověřeno, že neobsahuje žádné detekovatelné alergeny, a je tak vhodnou modelovou směsí pro další analýzy (viz Obrázek 32). Ze spektra lze vidět, že v retenčním čase 3,2 minuty se objevuje velký pík, nicméně nekoliduje s retenčními časy sledovaných analytů.



Obrázek 32: Chromatogram Emulze 1

1 – *p*-anisaldehyd

5.5.5 Vzorčky komerčních kosmetických přípravků a modelových směsí

Obsah alergenů v modelových a komerčních vzorcích kosmetických výrobků s obsahem máty, citrusů a levandule byl analyzován pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Postup měření a přípravy vzorku je popsán v kapitole 4.9. Přítomnost alergenů v komerčních kosmetických výrobcích a modelových vzorcích Emulze 1 je uvedena v Tabulce 35 a Tabulce 36. Hodnoty jsou uvedeny v hmotnostních procentech a byly korigovány na ztrátu při extrakci přepočtem na úbytek *p*-anisaldehydu při extrakci. Z uvedených dat lze vidět, že v případě komerčních modelových krémů výrobci poměrně často chybovali, když neuváděli kompletní seznam přítomných alergenů (neuvedené položky jsou v tabulce uvedeny tučně), nutno však podotknout, že ve většině případů se hodnoty nalezených alergenů nacházely na hranici dané legislativou. Výjimkou je *Cosmos natural repairing hand protect*, kde nebyly uvedeny téměř žádné legislativou požadované údaje.

Tabulka 35: Množství přítomných alergenů v komerčních přípravcích – přepočteno na hmotnostní procenta ve výrobku

Komerční kosmetické výrobky	AnisylalKohol	BenzylalKohol	Kumarin	Eugenol	Geraniol	Linalol	Citral	Hexyl cinamaldehyd	Limonen
Balea handcreme protect	-	0,438	-	-	0,016	0,107	0,003	0,029	0,082
	-	±0,015	-	-	±0,001	±0,004	±0,000	0,001	±0,001
Cosmos natural repairing hand protect	-	0,982	-	-	-	0,067	0,019	-	0,153
	-	±0,023	-	-	-	±0,000	±0,001	-	±0,007
Konopka´s face commage moist	-	0,571	-	-	-	0,040	-	-	-
	-	±0,017	-	-	-	±0,003	-	-	-
Planeta organica natural body scrub	-	-	-	-	-	0,036	-	-	0,030
	-	-	-	-	-	±0,004	-	-	±0,005
N.A.E. shampoo bar	-	-	-	0,001	-	0,077	0,007	-	0,010
	-	-	-	±0,000	-	±0,019	±0,001	-	±0,001
Naturalis sugar body scrub lim.máta	-	-	-	-	-	0,018	-	-	0,018
	-	-	-	-	-	±0,001	-	-	±0,000
Balea sugar scrub	-	-	-	-	-	-	-	-	0,040
	-	-	-	-	-	-	-	-	±0,002
Alverde skinfood Bio-limette	-	-	-	-	-	0,013	0,054	-	0,012
	-	-	-	-	-	±0,001	±0,001	-	±0,001
Alverde pfle-gusche bio-minze	-	-	-	-	-	0,019	0,172	-	0,020
	-	-	-	-	-	±0,000	±0,001	-	±0,002
Org. s. strawberry body scrub	-	-	-	-	-	-	-	-	+0,004
	-	-	-	-	-	-	-	-	±0,000
Org. s. strawberry body mousse	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N.T. Levandulový krém	-	-	0,001	-	0,002	0,486	-	-	-
	-	-	±0,000	-	±0,000	±0,022	-	-	-
Kvítok Levandulový sen	+	-	0,001	-	0,005	1,169	-	-	0,005
	+	-	±0,000	-	±0,001	±0,009	-	-	±0,000
Herbs of Bulgaria face cream lev.	-	-	0,001	-	0,006	0,019	-	-	0,012
	-	-	±0,000	-	±0,000	±0,001	-	-	±0,001
Ryor hydratační krém levandule	-	-	-	-	0,001	0,173	-	-	-
	-	-	-	-	±0,000	±0,017	-	-	+

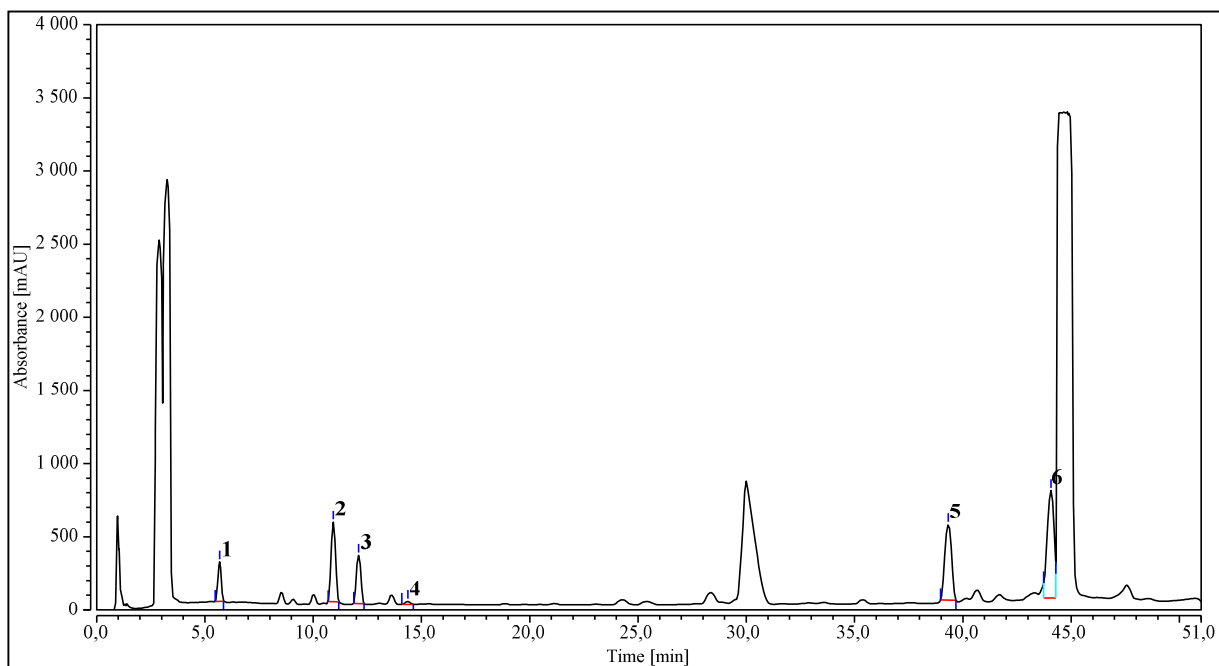
- nedetekováno; + detekováno, ale v nižším množství než je vyžadováno uvádět legislativou; tučně jsou zvýrazněny alergeny, které nebyly výrobcem uvedeny na obalu i když vzhledem k přítomnému množství dle EU legislativy uvedeny být měly.

Tabulka 36: Množství přítomných alergenů v modelové Emulzi 1 – přepočteno na hmotnostní procenta ve výrobku

Emulze 1	mg v 1g emulze	Anisylalkohol	Eugenol	Isoeugenol	Geraniol	Linalol	Citronelol	Citral	Methylheptin karbonát	Limonen
s. červený pomeranč	4,34	-	-	-	-	0,017	-	0,002	-	+
		-	-	-	-	±0,000	-	±0,000	-	+
s. citrónová tráva	3,89	0,007	-	0,002	0,021	0,0017	-	0,387	-	-
		±0,001	-	±0,000	±0,001	±0,001	-	±0,039	-	-
s. máta peprná	5,87	0,016	+	-	-	-	-	0,005	-	0,033
		±0,002	+	-	-	-	-	±0,000	-	±0,004
s. peprno-mátová	3,93	0,018	+	-	-	-	-	0,003	-	0,008
		±0,001	+	-	-	-	-	±0,000	-	±0,001
s. pomerančová španělská	2,97	0,034	-	-	-	-	-	0,002	-	0,238
		±0,000	-	-	-	+	-	±0,000	-	±0,011
s. mandarinková	5,23	0,028	-	-	-	0,007	+	0,004	-	0,219
		±0,002	-	-	-	±0,000	+	±0,000	-	±0,002
s. grapefruitová	4,97	-	-	-	-	0,018	+	0,002	-	0,307
		-	-	-	-	±0,003	+	±0,000	-	±0,005
citrónová kůra lyof.	1,89	0,036	-	-	-	0,004	-	-	-	-
		±0,001	-	-	-	±0,000	-	-	-	-
<i>M.Piperita "citaro"</i>	2,42	0,042	-	-	-	0,005	-	-	-	-
		±0,001	-	-	-	±0,000	-	-	-	-
<i>M. pycnanthemum pilosum</i>	3,39	0,043	-	-	-	0,005	-	-	-	-
		±0,005	-	-	-	±0,001	-	-	-	-
<i>M.A. strawberry peppermint</i>	2,49	0,041	-	-	-	0,011	-	-	-	-
		±0,003	-	-	-	±0,002	-	-	-	-
<i>M.Gentilis Varieta Citrata "lemon"</i>	1,94	0,039	-	-	-	0,004	-	-	-	-
		±0,001	-	-	-	±0,000	-	-	-	-
Sušená levandule	1,98	0,029	-	-	-	0,006	-	-	0,001	-
		±0,003	-	-	-	±0,000	-	-	±0,000	-
Levandulová sílice	3,02	0,036	-	-	-	0,719	-	-	-	0,006
		±0,004	-	-	-	±0,035	-	-	-	±0,000
Sušená lev. +sílice	1,76+	0,039	-	-	+	0,490	-	-	0,001	-
	1,94	±0,002	-	-	-	±0,052	-	-	±0,000	-

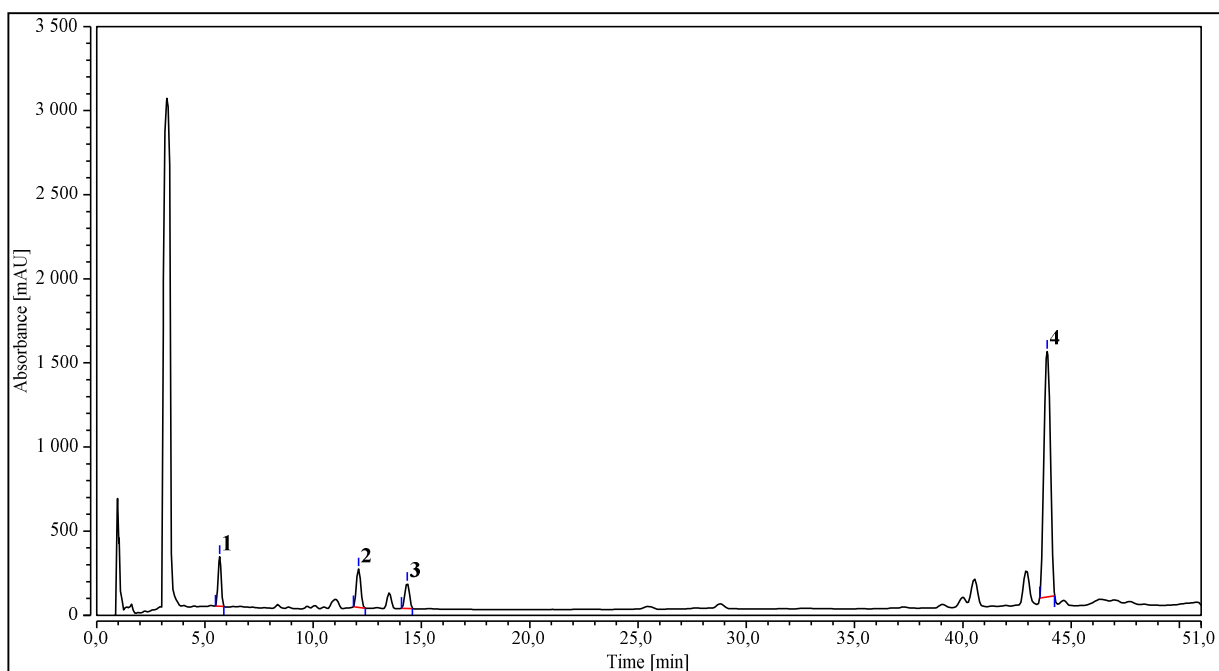
- nedetekováno; + detekováno, ale v nižším množství než je vyžadováno uvádět legislativou

Na Obrázku 33 je chromatogram náležející *Balea handcreme protect*, jsou v něm viditelné píky všech alergenů, které jsou uvedené v tabulce, jen benzylalkohol byl značně překoncentrován a pro zjištění přesné koncentrace musel být vzorek zředěn 100x. Tato vysoká koncentrace výrobku naznačuje záměrný přídavek benzylalkoholu jako prezervační látky, kdy je v některých případech takto užíván, poté jeho konečná koncentrace ve výrobku může dosahovat až jednotek hmotnostních procent.



Obrázek 33: Chromatogram *Balea handcreme protect*

1 – *p*-anisaldehyd; 2 – geraniol; 3 – linalool; 4 – citral; 5 – hexylcinnamaldehyd, 6 - limonen

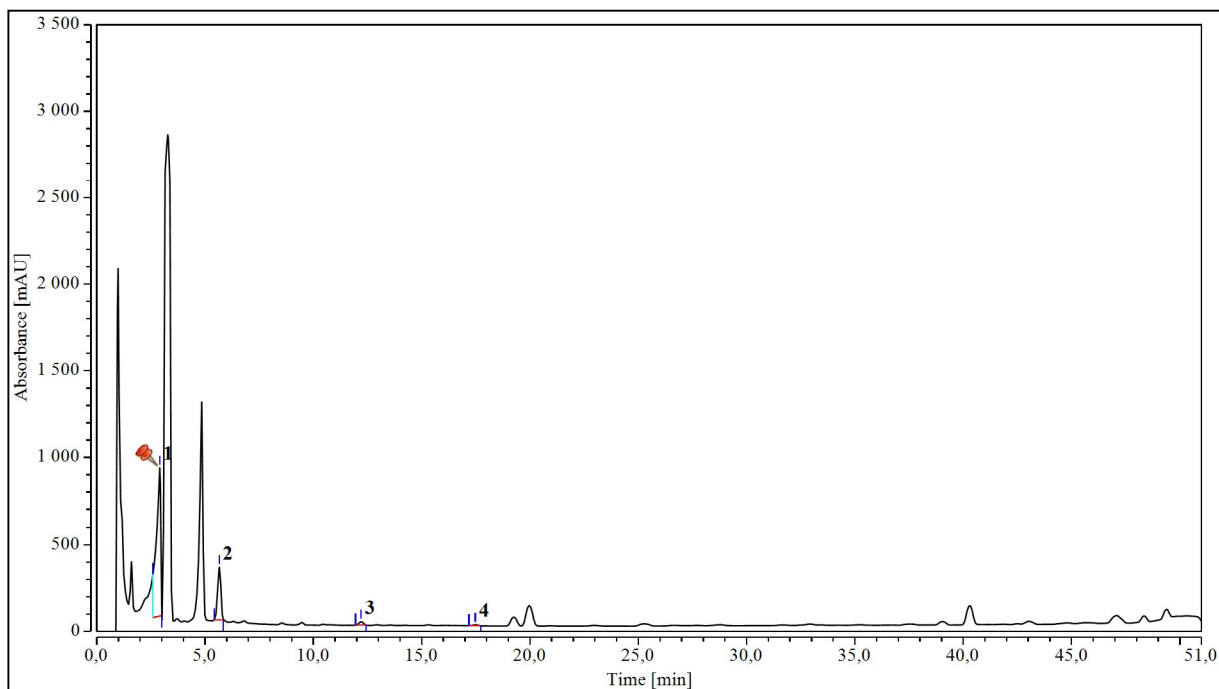


Obrázek 34: Chromatogram *Cosmos natural repairing hand protect*

1 – *p*-anisaldehyd; 2 – linalool; 3 – citral; 4 - limonen

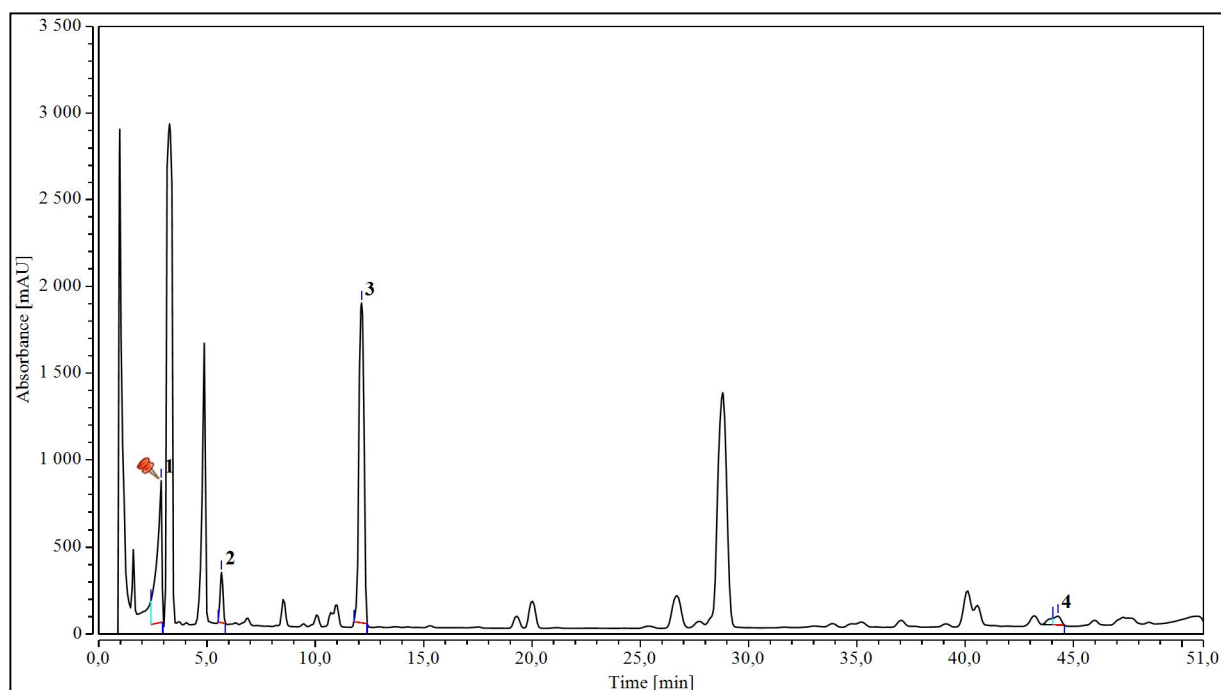
Na Obrázku 34 je chromatogram náležející *Cosmos natural repairing hand protect*, jsou v něm viditelné píky všech alergenů, které jsou uvedené v tabulce, benzylalkohol byl jako v předchozím případě značně překonzentrován a pro zjištění přesné koncentrace musel být vzorek zředěn 100x.

Z uvedených výsledků lze vidět, že u modelových krémů se silicemi bylo nalezeno poměrně velké množství alergenů v porovnání s krémy s obsahem celých rostlinných částí (Tabulka 36), jak je patrné i z porovnání chromatogramů Emulze 1 se sušenou levandulí lékařskou a silicí na Obrázcích 35 a 36.



Obrázek 35: Emulze 1 se sušenou levandulí lékařskou

1 – anisylalkohol, 2 – *p*-anisaldehyd, 3 – linalool, 4 – methylheptine carbonát



Obrázek 36: Emulze 1 s levandulovou silicí

1 – anisylalkohol, 2 – p-anisaldehyd, 3 – linalool, 4 – limonen

5.5.6 Ověření výsledků analýzy alergenů metodou HPLC-DAD pomocí SPME-GC-MS

Přítomnost alergenů detekovaných pomocí HPLC-DAD byla ověřena také pomocí metody SPME-GC-MS. Postup přípravy vzorků a podmínky měření jsou uvedeny v kapitole 4.9. Výsledky měření pro Emulzi 1 s přidavkem sušené levandule lékařské a levandulové silice jsou uvedeny v Tabulce 37. Byla potvrzena přítomnost linaloolu a limonenu v obou testovaných vzorcích. Limonen byl pomocí GC-MS detekován i ve vzorku sušené levandule, ale ve velmi malém množství, které se nachází pod mezí detekce metody HPLC. Nicméně dle platné legislativy se nemusí takto nízké množství limonenu uvádět na etiketě a mez detekce HPLC pro stanovení množství limonenu v kosmetických výrobcích je dostačující.

Tabulka 37: Ověření přítomnosti alergenů pomocí SPME-GC-MS v modelové Emulzi 1 (HPLC - přepočteno na hmotnostní procenta ve výrobku)

Emulze 1	mg v 1g emulze	Anisyl alkohol	Linalol	Methylheptin carbonát	Limonen
Sušená levandule	1,98	0,029	0,006/D	0,001	-/D
Levandulová silice	3,02	0,036	0,719/D	-	0,006/D

- nedetekováno; D značí, že byla přítomnost daného alergenů potvrzena i pomocí SPME-GC-MS

V Tabulce 38 jsou uvedeny výsledky měření HPLC-DAD a SPME-GC-MS pro komerční kosmetické přípravky. Přítomnost většiny analytů kvantifikovaných pomocí HPLC byla potvrzena i pomocí GC-MS, včetně alergenů, které nebyly uvedeny výrobcem na etiketě (např. výrobek Cosmos natural repairing hand protect).

Tabulka 38: Ověření přítomnosti alergenů pomocí SPME-GC-MS v komerčních kosmetických přípravcích (HPLC - přepočteno na hmotnostní procenta ve výrobku)

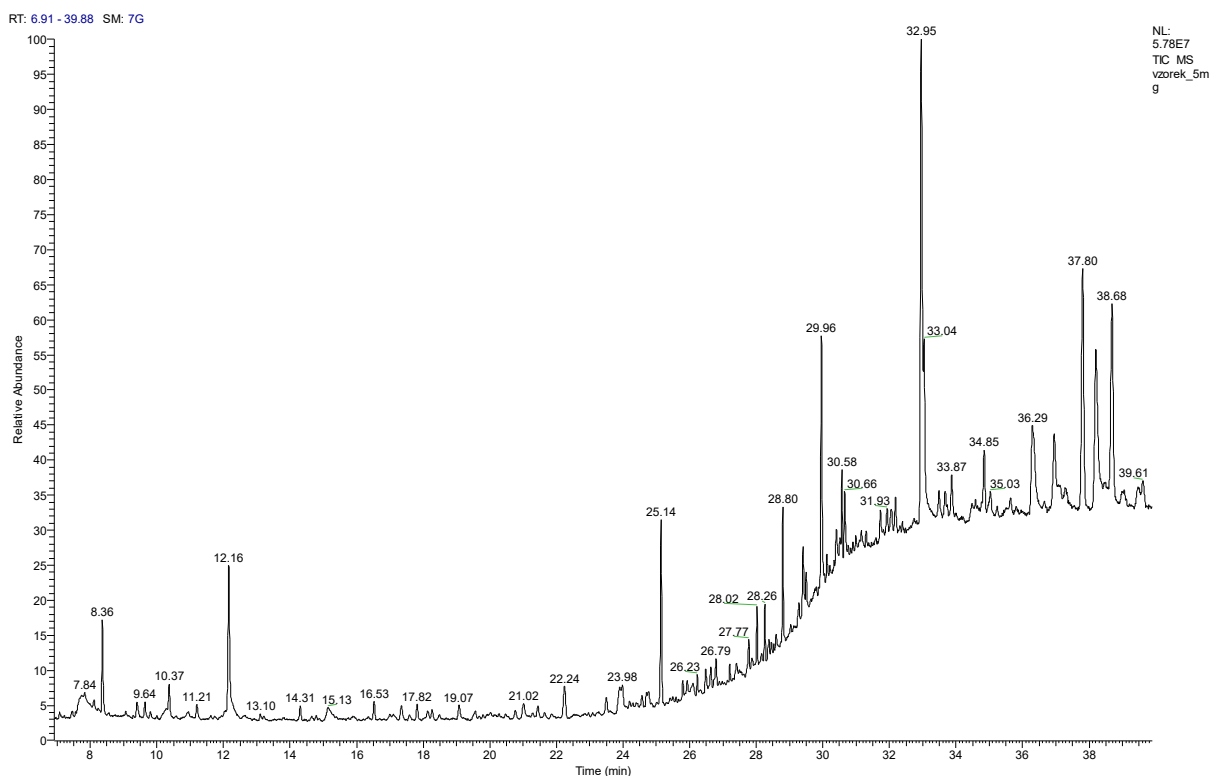
Komerční kosmetické výrobky	Anisylalkohol	Benzylalkohol	Kumarin	Eugenol	Geraniol	Linalol	Citral	Hexyl cinamald.	Limonen
Balea handcreme protect	-	0,438 /D	-	-	0,016 /D	0,107 /D	0,003	0,029 /D	0,082 /D
Cosmos natural repairing hand protect	-	0,982 /D	-	-	-	0,067 /D	0,019 /D	-	0,153 /D
Konopka's face commage moist	-	0,571 /D	-	-	-	0,040 /D	-	-	-/D
Planeta organica natural body scrub	-	-	-	-	-	0,036 /D	-	-	0,030 /D
N.A.E. shampoo bar	-	-	-	0,001	-	0,077 /D	0,007	-	0,010 /D
Naturalis sugar body scrub lim.máta	-	-	-	-	-	0,018 /D	-	-	0,018 /D
Balea sugar scrub	-	-	-	-	-	-	-	-	0,040 /D
Alverde skinfood Bio-limette	-	-/D	-	-	-	0,013 /D	0,054 /D	-	0,012 /D
Alverde pflege-dusche bio-minze	-	-	-	-	-	0,019 /D	0,172 /D	-	0,020 /D
Org. s. strawberry body scrub	-	-	-	-	-	-	-	-	0,004 /D
Org. s. strawberry body mousse	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-
N.T. Levandulový krém	-	-	0,001	-	0,002 /D	0,486 /D	-	-	-/D
Kvítok Levandulový sen	+	-	0,001	-	0,005 /D	1,169 /D	-	-	0,005 /D
Herbs of Bulgaria face cream lev.	-	-	0,001	-	0,006 /D	0,019 /D	-	-	0,012 /D
Ryor hydratační krém levandule	-	-	-	-	0,001 /D	0,173 /D	-	-	-/D

- nedetekováno; + detekováno, ale v nižším množství než je vyžadováno uvádět legislativou; tučně jsou zvýrazněny alergeny, které nebyly výrobcem uvedeny na obalu i když vzhledem k přítomnému množství dle EU legislativy uvedeny být měly; D značí, že byla přítomnost daného alergenu potvrzena i pomocí SPME-GC-MS

Stejně jako u modelové Emulze 1 byla zjištěna přítomnost limonenu i ve vzorcích kde se pomocí HPLC limonen nepodařilo prokázat, nicméně takto malé množství limonenu přítomného ve výrobku není nutné ze zákona uvádět na etiketě. Metoda HPLC-DAD je dostatečně citlivá pro detekci alergenů přítomných v kosmetických výrobcích. Metodou SPME-GC-MS byla potvrzena přítomnost většiny detekovaných a kvantifikovaných analytů pomocí HPLC-DAD.

5.5.7 Detekce přítomnosti alergenů v extraktu z byliny *Achyrocline satureioides*

V případě *A.satureioides* nebyly nalezeny žádné vonné alergeny v sušených květech ani v extraktu pomocí HPLC-DAD. Extrakt byl tedy analyzován pomocí GC-MS (plynový chromatograf Trace 1310 s hmotnostním detektorem TSQ 900, Kapilární kolona Supelcowax (30 m x 0,25 mm; I.D. 0,25 µm)) s přímým nástřikem. Na Obrázku 37 je uveden chromatogram odpovídající navážce 5 mg extraktu. V Příloze 6 jsou uvedeny chromatogramy příslušných alergenních mixů a chromatogramy pro zbývající dvě navážky extraktu (10 a 25 mg).



Obrázek 37: GC-MS chromatogram odpovídající navážce 5 mg extraktu *A. satureioides*

V extraktu byl nalezen linalool ($R_t = 8,36$ min) v množství $143,3 \pm 17,6$ µg na gram extraktu a eugenol ($R_t = 23,49$ min) v množství $12,0 \pm 2,0$ µg na gram extraktu. Množství těchto látek v lyofilizovaném extraktu se nachází hluboce pod legislativně daným limitem. Dále byly v extraktu nalezeny další vonné látky, caryofylen ($R_t = 9,40$ min) $15,8 \pm 0,9$ µg; mentol ($R_t = 10,24$ min) $41,3 \pm 0,8$ µg; terpineol ($R_t = 11,20$ min) $10,0 \pm 1,6$ µg; carvon ($R_t = 12,16$ min) $263,8 \pm 36,6$ µg; anetol ($R_t = 14,31$ min) $22,9 \pm 4,4$ µg a vanilin ($R_t = 29,43$ min) $91,1 \pm 3,2$ µg na gram lyofilizovaného extraktu.

GC-MS je tedy citlivější metodou pro stanovení obsahu vonných alergenů, ale co se legislativních limitů týká, tak je HPLC-DAD dostačující pro stanovení většiny sledovaných analytů. HPLC-DAD je také levnější, co se provozu a nákladů na pořízení samotného přístroje týká.

5.6 Porovnání výsledků PCR a HPLC

Výsledky analýzy PCR a HPLC vzorků modelových a komerčních kosmetických přípravků jsou uvedeny v Tabulce 39 a 40. V případě vzorků s obsahem mátové a citrusové složky byla ověřena přítomnost genu pro limonensyntázu pro modelové směsi s pomerančovou silicí, citrónovou kůrou a mátou *Piperita citaro*. Pomerančová silice (i jiné citrusové silice) je vyráběna lisováním pomerančové kůry [3], což vysvětluje přítomnost detekovatelné DNA v silici, přítomnost samotného limonenu byla potvrzena i pomocí HPLC, stejně jako v případě lyofilizované citrónové kůry.

Tabulka 39: Porovnání výsledků analýzy PCR a HPLC pro limonen, vzorky modelových kosmetických výrobků Emulze 1

Emulze 1	Primery Lim2F/R		HPLC
	PCR	Gel	limonen
silice červený pomeranč	-	-	+
	+	+	+
silice citrónová tráva	-	-	-
	-	-	-
silice máta peprná	+	+	+
	-	-	+
silice peprno-mátová	-	-	+
	-	-	+
silice pomerančová španělská	+	+	+
	+	+	+
silice mandarinková	-	-	+
	+	+	+
silice grapefruitová	-	-	+
	-	-	+
Citrónová kůra lyof.	+	+	+
	+	+	+
<i>M.Piperita "citaro"</i>	+	+	-
	+	+	-
<i>M. pycnanthemum pilosum</i>	-	-	-
	+	+	-
<i>M.A. strawberry peppermint</i>	-	-	-
	-	-	-

- nedetekováno; + detekováno

V případě máty *Piperita citaro* bylo zřejmě množství limonenu pod mezí detekce přístroje. V případě modelových směsí s bylinami *M. pycnanthemum pilosum* a *M. almira strawberry peppermint* nebyla potvrzena přítomnost genu pro limonensyntázu a nebyl nalezen žádný limonen ani pomocí metody HPLC. Ne všechny byliny spadající do rodu *Mentha* tedy

produkují limonen. Druhy, které jsou schopny limonen produkovat, jej obsahují jen velmi malé množství, které nemusí být detekovatelné instrumentálními metodami, nicméně stále se může v rostlině nacházet.

V případě lyofilizované kůry nebyl detekován limonen pomocí HPLC, ale pomocí PCR byla potvrzena přítomnost limonensyntázy, což je způsobeno zřejmě tím, že během lyofilizace většina limonenu ze vzorku vytékala. V případě grapefruitové silice byla izolována amplifikovatelná DNA, nicméně nebyla potvrzena přítomnost limonensyntázy primery Lim2F/R, zřejmě má grapefruit jiný typ limonensyntázy, pro který by bylo vhodnější použít jiné primery.

Tabulka 40: Porovnání výsledků analýzy PCR a HPLC pro limonen, vzorky komerčních kosmetických přípravků

Komerční kosmetické přípravky	Primery Lim2F/R		HPLC
	PCR	Gel	limonen
Balea handcreme protect	+	+	+
	+	+	+
Cosmos natural repairing hand protect	-	-	+
	-	-	+
Konopka's face commage moist	-	-	-
	-	-	-
Planeta organica natural body scrub	-	-	+
	+	+	+
N.A.E. shampoo bar	-	-	+
	-	-	+
Naturalis sugar body scrub	-	-	+
	-	-	+
Balea sugar scrub	+	+	+
	+	+	+
Alverde skinfood Bio-limette	-	-	+
	-	-	+
Alverde pflege-dusche bio-minze	-	-	+
	-	-	+

- nedetekováno; + detekováno

V případě komerčních vzorků stojí za zmínku Balea krém na ruce, který obsahoval amplifikovatelnou DNA i pomocí HPLC detekovatelné množství limonenu. To podporuje tvrzení výrobce, že výrobek obsahuje výtažek z *Citrus sinensis*. Stejně tak lze potvrdit z výsledků PCR přítomnost *Citrus aurantium dulcis* – prášku z kůry ve vzorku Balea sugar scrub. Naopak u ostatních vzorků nebyla potvrzena přítomnost hledané DNA ve vzorku, ale byly identifikovány sledované alergeny pomocí HPLC, což ukazuje na přidání aromat do výrobku.

Výsledky analýzy PCR a HPLC vzorků modelových a komerčních kosmetických přípravků s obsahem levandule jsou uvedeny v Tabulce 41. V modelových směsích Emulze 1

s obsahem levandule byla potvrzena přítomnost DNA levandule v obou vzorcích s přidavkem sušené levandule lékařské, ale nikoli ve vzorku, kde byla přidána pouze silice. Ve vzorku s levandulovou silicí byla pomocí HPLC, oproti ostatním dvěma modelovým směsím, potvrzena i přítomnost limonenu, zřejmě v důsledku jeho zakoncentrování destilací vodní parou. Dle PCR se v levanduli nachází gen limonensyntázy. Ve všech komerčních vzorcích s přidavkem levandule byla detekována pouze přítomnost alergenů pomocí HPLC, ani v jednom případě nebyla prokázána přítomnost rostlinné složky metodou PCR, což také svědčí pouze o použití vonných silic v těchto vzorcích.

Tabulka 41: Porovnání výsledků analýzy PCR a HPLC pro vzorky modelové směsi Emulze 1 a komerčních kosmetických přípravků s obsahem levandule

Emulze 1 a komerční kosmetické přípravky	Primery Lim2F/R		Primery Lav1FR		HPLC	
	PCR	Gel	PCR	Gel	Linalol	Limonen
E1 + Sušená levandule	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	-
E1 + Levandulová silice	-	-	-	-	+	+
	-	-	-	-	+	+
E1 + Sušená levandule + levandulová silice	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	-
N.T. Levandulový krém	-	-	-	-	+	+
	-	-	-	-	+	+
Kvítok Levandulový sen	-	-	-	-	+	+
	-	-	-	-	+	+
Herbs of Bulgaria face cream lev.	-	-	-	-	+	+
	-	-	-	-	+	+
Ryor hydratační krém levandule	-	-	-	-	+	+
	-	-	-	-	+	+

- nedetekováno; + detekováno

5.7 Potraviny s obsahem bylinné složky nebo ovoce

Metoda izolace rostlinné DNA a stanovení množství přítomných alergenů byly aplikovány i na potraviny s obsahem bylinné (extrakty, části rostlin) a ovocné složky. Jejich složení je uvedeno v Příloze 1.

5.7.1 Izolace DNA a PCR analýza

Koncentrace a čistota izolované rostlinné DNA byla stanovena spektrofotometricky při vlnových délkách 220 až 350 nm. Pro měření byl použit přístroj NanoDrop2000.

5.7.1.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty

Výsledky spektrofotometrického měření DNA izolované z potravin s obsahem bylinné složky nebo ovoce jsou uvedeny v Tabulce 42. Nejvyšší množství DNA bylo získáno z černého čaje a cookies. Naopak nejmenší množství DNA bylo získáno ze vzorků tvrdých bonbonů, zřejmě v důsledku obtížné homogenizace, a protože jsou z většiny tvořeny cukrem nebo sladidly.

Poměr absorbance při vlnových délkách 260/280 nm se pohyboval níže než je rozmezí 1,8 – 2,0, což značí mírně znečištěnou DNA proteiny. Poměr vlnových délek 260/230 nm by měl být v případě čisté DNA vyšší než 1,8, toho však nebylo dosaženo v žádném vzorku. Ve všech vzorcích jsou přítomny znečišťující látky, např. polyfenoly, polysacharidy nebo jiné látky, které mohou působit inhibičně v PCR.

Tabulka 42: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z potravin s obsahem bylinné složky nebo ovoce

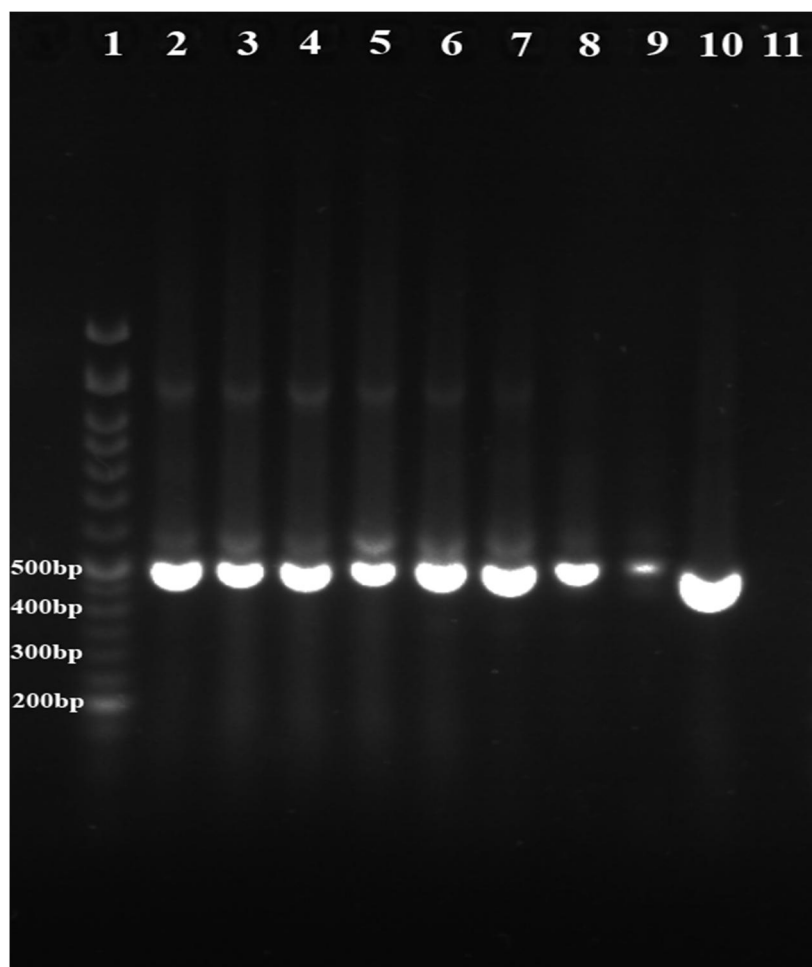
DNA izolovaná z:	opakování	c [ng · μl ⁻¹]	A 260/ A 280	A 260/ A 230
Černý čaj s kousky květů levandule McCoy teas	1	11,4	1,33	0,40
	2	9,2	1,63	0,36
	3	11,7	1,56	0,42
	4	10,7	1,64	0,45
Černý čaj s aroma levandule Liran spol. s.r.o.	1	40,9	1,73	0,88
	2	39,0	1,68	0,82
	3	34,5	1,49	0,72
	4	22,5	1,40	0,37
Jahodový džem s levandulí LEVANDULAND	1	10,2	1,26	0,33
	2	8,2	1,09	0,33
Homemade cookies s levandulí chodouňskou	1	29,7	1,77	0,93
	2	37,0	1,86	0,81
Rescue plus bonbony Fleur de Bach	1	0	-	-
	2	1,8	1,38	1,58
Bio raw jahoda s Levandulí Chodouňskou	1	16,5	1,55	0,26
	2	12,7	1,60	0,31
Bylinné bonbony s meduňkou Vitalp	1	5,4	1,60	0,19
	2	6,2	1,61	0,18

5.7.1.2 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA

U všech vzorků potravin s obsahem bylinné složky nebo ovoce byla amplifikovatelnost izolované DNA ověřována pomocí primerů S2R/S3F specifických pro ITS2 region rostlin (velikost amplikonů je 500 bp). Amplifikační křivky jsou uvedeny v Příloze 4. Produkty PCR byly naneseny na 1,8% agarózový gel (Obrázky 38 a 39).

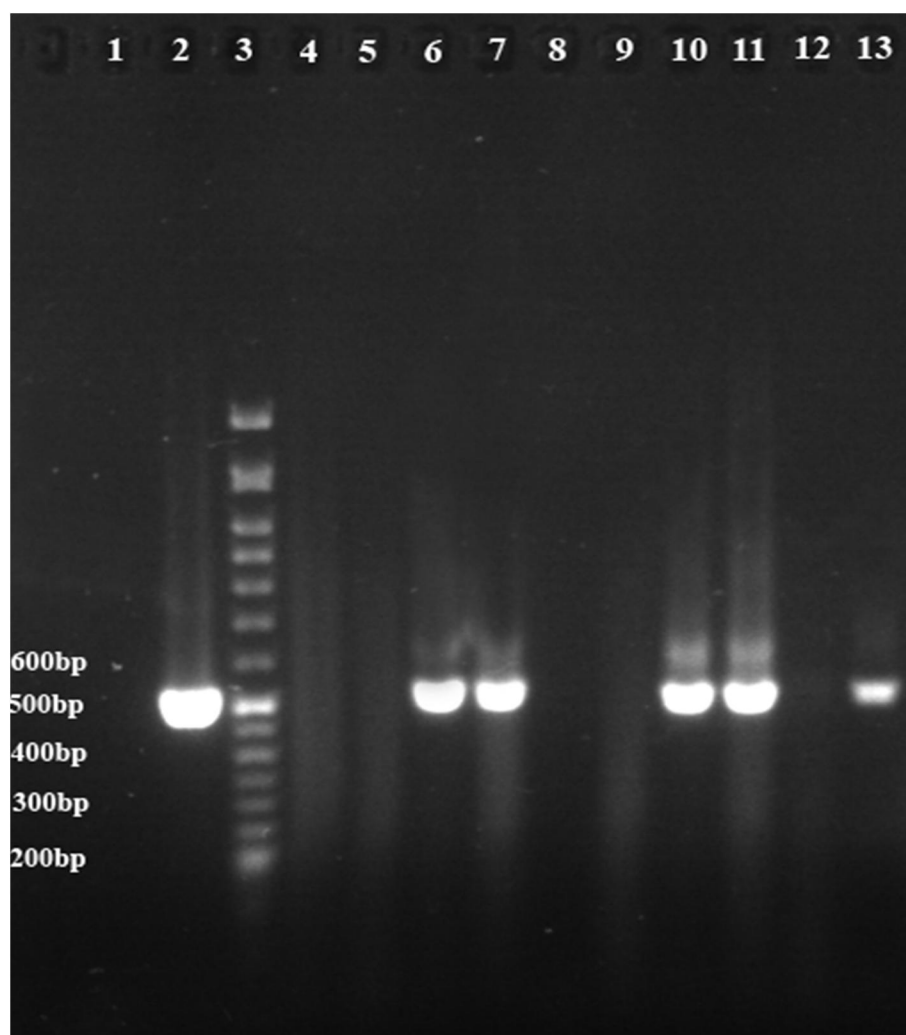
Pomocí elektroforézy byly detekovány produkty PCR o velikosti 500 bp v případě obou černých čajů, domácích cookies s levandulí, raw tyčinky s levandulí a bylinných bonbonů Rescue plus bonbony Fleur de Bach. Nebyla amplifikována DNA z bonbonů Bylinné bonbony s meduňkou lékařskou Vitalp. Dále nebyla amplifikována DNA z jahodového džemu s levandulí, v tomto případě by bylo nutné optimalizovat postup izolace (např. přidáním

pektinázy v průběhu izolace DNA), z důvodu přítomnosti pektinu, který komplikuje izolaci čisté DNA dostatečné kvality pro amplifikaci.



Běh	DNA	PCR produkt
1	DNA standard 50bp	
2	Černý čaj s levandulí	+++
3		+++
4		+++
5		+++
6		+++
7	Černý čaj s levandulovým aroma	+++
8		+++
9		+
10		+++
11	NK	-

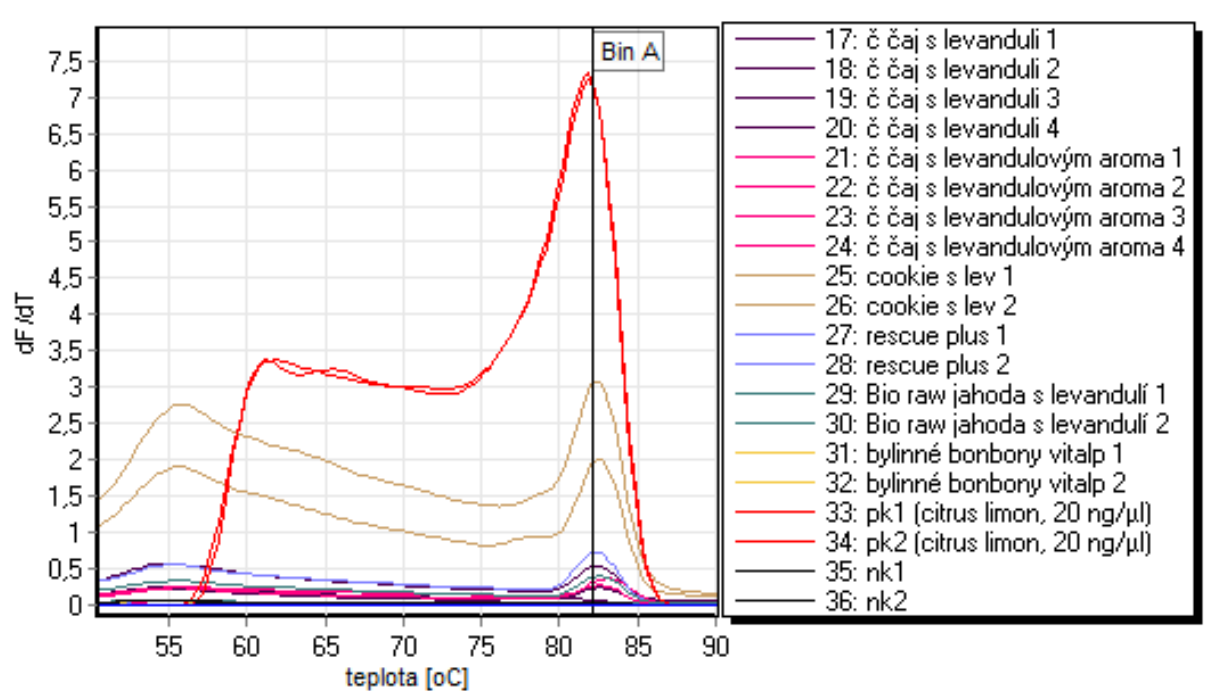
Obrázek 38: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR - ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z potravin, primery S2F/S3R specifické pro ITS2 region rostlin (500 bp) (- nedetekované; PCR produkt: + slabá, ++ střední, +++ silná intenzita),



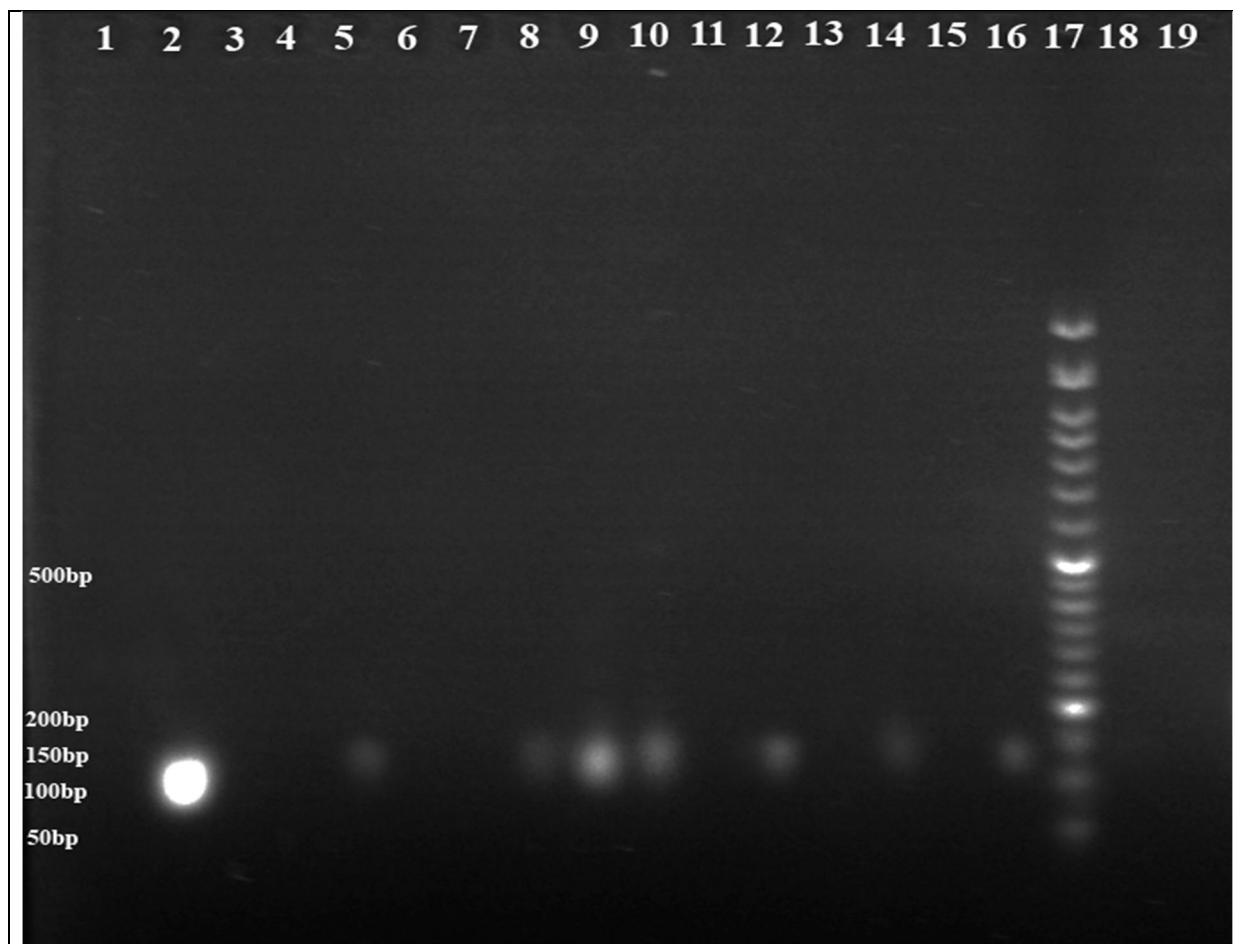
Běh	DNA	PCR produkt
1	Nk	-
2	PK (DNA z listu citrus limon, 20 ng/μl)	+++
3	DNA standard 50bp	
4	Jahodový džem s levandulí LEVANDULAND	-
5		-
6	Homemade cookies s levandulí chodouňskou	+++
7		+++
8	Bylinné bonbony s meduňkou lékařskou Vitalp	-
9		-
10	Bio raw jahoda s Levandulí Chodouňskou	+++
11		+++
12	Rescue plus bonbony Fleur de Bach	-
13		++

Obrázek 39: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR - ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z potravin, primery S2F/S3R specifické pro ITS2 region rostlin (500 bp) (- nedetekované; PCR produkt: + slabá, ++ střední, +++ silná intenzita),

DNA izolovaná z vybraných potravinářských výrobků, která byla amplifikována pomocí S2F/S3R, byla také amplifikována pomocí primerů Lim2F/R pro ověření, zda se ve výrobku nachází rostlina schopná produkovat limonen (Obrázky 40 a 41). Amplifikována byla DNA izolovaná z tyčinky s levandulí lékařskou, v tomto případě byl amplifikován pouze jeden vzorek z duplikátu. To může být způsobeno buď nízkým množstvím přítomné DNA, která náleží levanduli lékařské, nebo nedostatečnou homogenizací vzorku při izolaci DNA, kdy byla odebrána pro izolaci DNA část tyčinky, kde se nenacházela levandule. V případě Rescue plus bonbony Fleur de Bach byl amplifikován také jeden vzorek z duplikátu. V případě domácích cookies s levandulí lékařskou byly amplifikovány oba duplikáty. V případě černého čaje s levandulí byly amplifikovány 2 vzorky ze 4, to bylo očekávatelné, protože byla DNA izolována záměrně z odlišných částí vzorku. Amplifikovaly se ty vzorky, které obsahovaly viditelné části květů levandule. Při izolaci DNA je tedy nutné dbát na dokonalé vzorkování, jinak může dojít ke zkreslení výsledků. V případě černého čaje s aroma levandule byl amplifikován jeden vzorek ze 4, dle informací od výrobce tento čaj obsahuje kromě levandulového aroma taky přidané květy levandule. Avšak při odebírání vzorků na izolaci DNA nebyly přítomny květy ve velikosti pozorovatelné pouhým okem a zřejmě se zde nacházely ve velmi malém množství.



Obrázek 40: Melt analýza produktů PCR - DNA izolovaná z potravin, primery Lim2F/R ($T_m = 82,14^\circ\text{C}$)



Běh	DNA	PCR produkt	Běh	DNA	PCR produkt
1	Nk	-	11	Černý čaj s levandulí (1-4)	-
2	PK (DNA z listu citrus limon, 20 ng/μl)	+++	12		+
3	Bylinné bonbony s meduňkou lékařskou Vitalp	-	13		-
4		-	14		+
5	Bio raw jahoda s Levandulí Chodouňskou	+	15	Černý čaj s levandulovým aroma (1,2)	-
6		-	16		+
7	Rescue plus bonbony Fleur de Bach	-	17	DNA standard 50bp	
8		+	18	Černý čaj s levandulovým aroma (3,4)	-
9	Homemade cookies s levandulí chodouňskou	++	19		-
10		+			

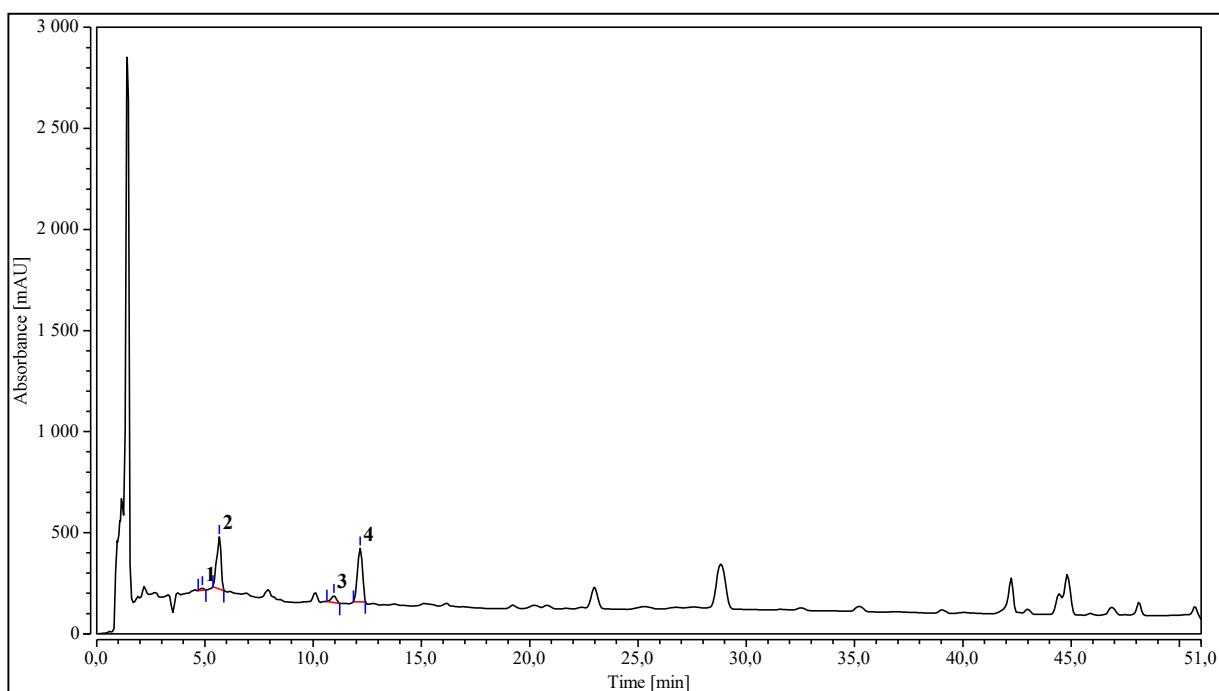
Obrázek 41: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR primery Lim2F/R , specifický produkt o velikosti 122 bp

(- nedetekované; PCR produkt: + slabá, ++ střední, +++ silná intenzita),

5.7.1 Detekce přítomných alergenů pomocí HPLC-DAD

Obsah alergenů v potravinářských výrobcích s obsahem bylin, levandule a ovoce byl analyzován pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Postup měření a přípravy vzorků je popsán v kapitole 4.9. Přítomnost alergenů v potravinách včetně kvantifikace je uvedena v Tabulce 43. Hodnoty jsou uvedeny v hmotnostních procentech a byly korigovány na ztrátu při extrakci přepočtem na úbytek p-anisaldehydu při extrakci. Z uvedených dat lze vidět, že se v testovaných potravinách s bylinnou nebo rostlinnou složkou nachází sledované alergeny, ne však v takové míře jako u kosmetických výrobků. Vzhledem k tomu, že většina těchto výrobků byla pořízena ve zdravé výživě a obsahuje zejména suroviny přírodního původu (ovoce, byliny, extrakty z bylin) a velmi málo aromatizujících složek, lze předpokládat, že většina detekovaných alergenů pochází právě z těchto surovin, a proto je detekované množství alergenů tak nízké.

Na Obrázku 42 je chromatogram *černého čaje s květy levandule*. Tento vzorek má nejvyšší množství detekovaného linaloolu ze všech sledovaných vzorků potravin. To je zřejmě způsobeno aromatem bergamotu, který výrobce uvádí ve složení výrobku. Na Obrázku 43 je chromatogram *černého čaje s aroma levandule*, kde oproti předchozímu vzorku bylo dle názvu očekáváno vyšší množství přidaných aromat, ale detekovaných alergenů se ve vzorku nacházelo jen velmi nízké množství.



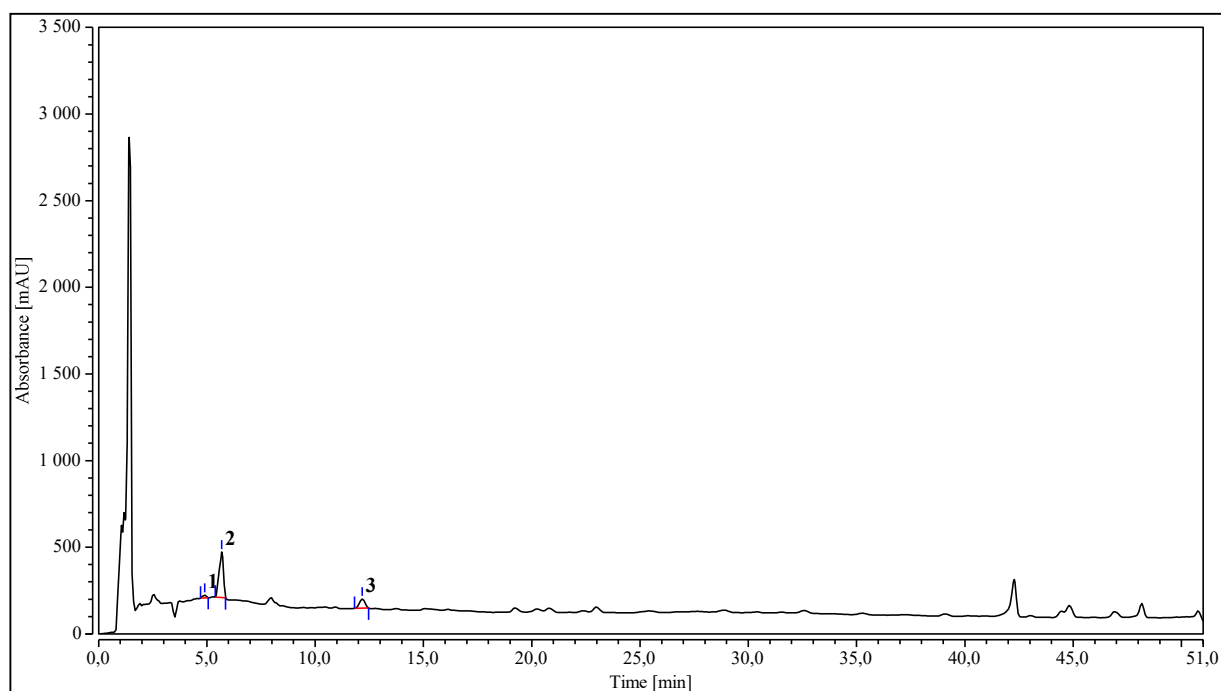
Obrázek 42: Černý čaj s květy levandule s přírodním aroma bergamotu

1 – coumarin, 2 – p-anisaldehyde, 3 – geraniol, 4 – linalool

Tabulka 43: Množství přítomných alergenů v potravinářských výrobcích – přepočteno na procenta ve výrobku

Potravinářské výrobky	Kumarin	Geraniol	Linalol	Citronelol	Citral	Limonen
Černý čaj s kousky květů levandule McCoy teas	+	0,001	0,093	-	-	-
	+	±0,000	±0,004	-	-	-
Černý čaj s aroma levandule Liran spol. s.r.o.	+	-	0,017	-	-	-
	+	-	±0,002	-	-	-
Jahodový džem s levandulí LEVANDULAND	+	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-
Homemade cookies s levandulí chodouňskou	-	-	0,013	-	-	-
	-	-	±0,000	-	-	-
Rescue plus bonbony Fleur de Bach	-	-	0,003	+	-	-
	-	-	±0,000	+	-	-
Bio raw jahoda s Levandulí Chodouňskou	-	-	0,006	-	-	-
	-	-	±0,001	-	-	-
Bylinné bonbony s meduňkou Vitalp	-	+	-	+	0,007	0,004
	-	+	-	+	±0,000	±0,000

- nedetekováno; + detekováno, ale v nižším množství než jsou tisícinové hmotnostní procent



Obrázek 43: černý čaj s aroma levandule
1 – coumarin, 2 – p-anisaldehyde, 3 – linalool

5.7.2 Porovnání výsledků PCR a HPLC

Metoda izolace rostlinné DNA následovaná PCR a metoda detekce alergenů pomocí HPLC, vypracované v rámci této práce, jsou aplikovatelné i na potravinářské výrobky, např. čaje, sušenky a raw tyčinky. V Tabulce 44 je uvedeno porovnání výsledků obou metod. Z hlediska izolace DNA jsou problematickými vzorky zejména ty, které obsahují velké množství sacharidů a polysacharidů (tvrdé bonbony a marmeláda). V případě vzorku marmelády nebylo možné vyizolovat amplifikovatelnou DNA, postup je tedy nutný upravit dalším krokem pro odstranění pektinu. Tento vzorek obsahuje z hlediska alergenů pouze kumarin, který zřejmě pochází z jahod, které tvoří 50 hm% výrobku. Z ostatních vzorků bylo možné DNA izolovat a následně amplifikovat pomocí PCR.

V případě ostatních potravinářských výrobků s obsahem levandule nebyla detekována pomocí HPLC přítomnost limonenu avšak byla pomocí PCR potvrzena přítomnost genu limonensyntázy. Jelikož se ve všech vzorcích jednalo o levanduli lékařskou, je přítomnost limonenu očekávatelná (viz kapitola 5.3.4.1) avšak metoda HPLC není dostatečně citlivá a množství přítomného alergenu se nachází pod mezí detekce.

Tabulka 44: Porovnání výsledků PCR a HPLC pro potravinářské výrobky

Potravinářské výrobky	HPLC						PCR	
	Kumarin	Geraniol	Linalool	Citronellool	Citral	Limonen	S2R/S3F	Lim2F/R
Černý čaj s kousky květů levandule McCoy teas	+	+	+	-	-	-	+/+	+/-
Černý čaj s aroma levandule Liran spol. s.r.o.	+	-	+	-	-	-	+/+	-/-
Jahodový džem s levandulí LEVANDULAND	+	-	-	-	-	-	-	-
Homemade cookies s levandulí chodouňskou	-	-	+	-	-	-	+	+
Rescue plus bonbony Fleur de Bach	-	-	+	+	-	-	+	+
Bio raw jahoda s Levandulí Chodouňskou	-	-	+	-	-	-	+	+
Bylinné bonbony s meduňkou Vitalp	-	+	-	+	+	+	-	-

6 ZÁVĚR

Závěrečná práce byla zaměřena na analýzu kosmetických výrobků obsahujících přírodní složky a stanovení jejich autenticity za použití molekulárně-diagnostických a instrumentálních metod.

V první části práce byly navrženy modelové kosmetické emulze jako základ pro další testy. Ze tří připravených emulzí (modelových směsí) byla pomocí analytické centrifugy vybrána jako nejstabilnější Emulze 1. Ta byla použita pro optimalizaci metody izolace rostlinné DNA. Stabilita této emulze byla porovnána stabilitními testy s komerčními produkty a byla shledána vyhovující pro další experimentální práci.

V další části práce byla optimalizována metoda izolace rostlinné DNA z kosmetických výrobků. Komerčně dostupné kity na izolaci rostlinné DNA byly testovány na různých rostlinných matricích a na základě množství, čistoty a amplifikovatelnosti DNA byl vybrán EliGene Plant DNA Isolation Kit, který byl shledán nejuniverzálnějším pro izolaci DNA z různých rostlinných matric. Byla optimalizována izolace rostlinné DNA z modelové Emulze 1. DNA izolovaná z čisté modelové Emulze 1 byla použita pro vyloučení falešně pozitivních výsledků. Amplifikovatelnost této DNA byla ověřena pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin a bylo potvrzeno, že z čisté Emulze 1 nebyla izolována amplifikovatelná DNA. Následně byly do Emulze 1 přidány abraziva rostlinného původu (jádra, zrníčka) a byl optimalizován postup izolace se zakoncentrováním rostlinné matrice před samotnou izolací DNA. DNA byla izolována i přímo z Emulze 1 s přidavkem máty, citrónové kůry, levandule. Postup izolace kitem byl upraven zvýšením navážky vzorku pro izolaci DNA. Amplifikovatelnost izolované DNA byla ověřena pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin, DNA byla amplifikována.

Pro izolaci rostlinné DNA z komerčních kosmetických výrobků byl použit optimalizovaný postup izolace DNA komerčním kitem EliGene. Z výsledků PCR analýzy vyplývá, že tímto způsobem lze detekovat přítomnost DNA pocházející z extraktů, šťáv z rostlin, abrazivních látek, rostlinných pletiv i silic (pokud jsou vyrobeny lisováním, nikoli destilací). Molekulárně diagnostické metody jsou velmi citlivé, a proto lze detekovat přídavek 1-2 hm% rostlinné matrice do výrobku. Při navážce 0,1 g to odpovídá 0,001 g rostlinné matrice, ze které je izolována DNA a následně úspěšně amplifikována PCR. Amplifikovatelnost izolované DNA byla ověřena pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin. Z komerčních vzorků se přítomnost rostlinné DNA nepotvrdila ve vzorcích „Dr. Konopka's Hydratační pleťový peeling (Face Gommage Moisturizing)“, „Alverde sprchový gel s mátou a bergamotem“, „N.A.E. – tuhý šampon Equilibrio“, „Planeta organica – tělový peeling C + citron“ a „Naturalis - Cukrový tělový scrub limetka a máta.“ Ve všech ostatních byla ověřena přítomnost rostlinné DNA, detekované PCR produkty měly velikost ampliconů 500 bp. S izolovanou DNA byla provedena PCR specifická pro limonensyntázu, kterou mají zejména citrusy a levandule lékařská a prostřední, přičemž byly použity primery Lim2F/R. Velikost PCR produktů odpovídala očekávané velikosti 122 bp. DNA izolovaná ze vzorků s levandulí byla amplifikována za použití primerů specifických pro levanduli – Lav1FR a Lav1modFR.

V případě Emulze 1 s přidanou maticí levandule lékařské byla její přítomnost potvrzena, velikost ampliconů DNA byla 155 bp pro oba primery. Pro komerční vzorky se přítomnost DNA levandule nepotvrdila, zřejmě byla levandule přidána do výrobků jen ve formě silice.

Byla také navržena metoda detekce přítomnosti extraktu byliny *Achyrocline satureioides* v modelové Emulzi 1 izolací a následnou amplifikací přítomné DNA. Extrakt z této byliny vykazuje významné antimikrobiální účinky, podporuje růst a obnovu keratinocytů a má příjemnou vůni jen s minimálním množstvím přítomných vonných alergenů, které jsou hluboce limitem daným legislativou EU. Přítomné vonné látky byly kvantifikovány metodou GC-MS s přímým nástřikem.

Z kosmetických výrobků lze izolovat i bakteriální DNA. Postup izolace DNA probiotických bakterií přidaných do kosmetických výrobků byl optimalizován již v rámci diplomové práce [133]. Z výrobků Eminence, které obsahovaly jak rostlinnou maticí (okurka), tak probiotické bakterie, byla úspěšně izolována jak bakteriální, tak rostlinná DNA. PCR produkty specifické velikosti byly detekovány pomocí agarové elektroforézy.

Byla zavedena metoda detekce 24 vonných alergenů na HPLC/DAD dle [23], byla však použita jiná C18 kolona a byly upraveny podmínky analýzy. Pro všechny alergeny bylo určeno rozmezí koncentrací, ve kterém lze látku touto metodou kvantifikovat. Vzorky se extrahují přímo do acetonitrilu (HPLC grade) s přesnou koncentrací p-anisaldehydu a množství detekovaných analytů je pomocí p-anisaldehydu korigováno na ztrátu analytů v průběhu extrakce.

Všechny kosmetické výrobky připravené v laboratoři (Emulze 1 s přidavkem máty, citrónové kůry, levandule) a komerční kosmetické produkty byly podrobeny extrakci vonných alergenů a následné analýze pomocí HPLC. V modelových přípravcích Emulze 1 s rostlinnou maticí bez přidaných silic byly detekovány jen nepatrné koncentrace sledovaných analytů. U ostatních modelových směsí byly detekovány očekávatelné alergeny dle přidaných silic. V případě komerčních kosmetických výrobků byly poměrně často detekovány alergeny, které výrobce neuvedl na obalu. Jejich koncentrace se většinou pohybovala na hranici dané legislativou. Výjimkou je *Cosmos natural repairing hand protect*, kde nebyly uvedeny téměř žádné legislativou požadované údaje a koncentrace sledovaných analytů byla poměrně vysoká. Přítomnost nalezených alergenů pomocí metody HPLC-DAD byla potvrzena metodou SPME-GC-MS.

Výsledky PCR analýzy byly porovnány s výsledky získanými metodou HPLC. V některých výrobcích, ve kterých nebyla detekována přítomnost rostlinné matrice pomocí metody PCR, byla detekována přítomnost alergenů metodou HPLC. To svědčí o přidání rostlinných silic do vybraných vzorků. Pokud byla detekována rostlinná matrice pomocí metody PCR a současně nebyla detekována přítomnost alergenů pomocí metody HPLC, jde spíše o přidání rostlinných matic ve formě celých kusů rostlinných pletiv nebo ve formě extraktu.

Optimalizovaná metoda izolace rostlinné DNA byla použita i na vybrané potraviny, přičemž byla úspěšně izolována DNA z komerčních výrobků s bylinnou a rostlinnou matricí. V případě tvrdých bonbonů s vysokým obsahem sacharidů a sladidel však bylo množství extrahované DNA téměř nulové, stejně jako v případě marmelády. V tomto případě by bylo nutné ještě zařadit do izolace krok pro odstranění sacharidů. U ostatních vzorků byla DNA úspěšně izolována i amplifikována. Extrakcí alergenů acetonitrilem z vybraných potravin a následnou HPLC analýzou bylo nalezeno jen nepatrné množství alergenů, nejčastěji se v potravinách vyskytoval linalol. To nasvědčuje tomu, že do těchto potravin nebyla přidána dodatečná aromata.

Z uvedených výsledků lze uzavřít, že navržená metoda izolace a následné amplifikace rostlinné i bakteriální DNA je vhodná ke stanovení autenticity bylinných složek v kosmetických výrobcích stejně jako k odhalení přítomnosti původce vonných alergenů (např. limonenu). Navržená HPLC metoda je jednoduchá a levná metoda vhodná ke stanovení množství přítomných alergenů v množství nutném pro dodržení legislativy EU v případě všech sledovaných analytů v požadované citlivosti kromě hydroxycitronelalu. Obě metody jsou vhodné i pro analýzu potravinářských výrobků.

7 BIBLIOGRAFIE

- [1] DYLEVSKÝ, I. *Základy funkční anatomie*. 1. Olomouc: Poznání, 2011. ISBN 978-80-87419-06-9.
- [2] NADKARNI, M.A., F. MARTIN, N.A. JACQUES a N. HUNTER. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002, **148**(1), 257-266. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-148-1-257
- [3] FEŘTEKOVÁ, V., O. FEŘTEK, Z. ŠEDIVÝ a D. ŠRÁMEK. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 3. rozš. vyd. Praha: Maxdorf, 2000. ISBN 80-859-1219-8.
- [4] ZULKOWSKI, K. Skin Bacteria. *Advances in Skin & Wound Care*. 2013, **26**(5), 231-236. ISSN 1527-7941. Dostupné z: doi:10.1097/01.ASW.0000428953.13223.fa
- [5] GRICE, E.A., H.H. KONG, S. CONLAN et al. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science*. 2009, **324**(5931), 1190-1192. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1171700
- [6] BENÁKOVÁ, N. Celková léčba atopické dermatitidy – evropské doporučené postupy a současný stav. *Česko-slovenská dermatologie*. 2019, **94**(6), 223-231.
- [7] YOLANDA, M.O., N. JUSUF a I. PUTRA. Lower facial skin hydration level increases acne vulgaris severity level. *Bali Medical Journal*. 2021, **10**(3), 1081-1084. ISSN 2302-2914. Dostupné z: doi:10.15562/bmj.v10i3.2195
- [8] HAIDER, A. Treatment of Acne Vulgaris. *JAMA*. 2004, **292**(6). ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.292.6.726
- [9] JAIN, N.K. a S.K. CHAUDHRI. History of cosmetics. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2009, **3**(3). ISSN 0973-8398. Dostupné z: doi:10.4103/0973-8398.56292
- [10] MILLIKAN, L.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
- [11] *Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products*. In: . Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2009, ročník 59, 1223/2009. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/2022-12-17>

- [12] COSMOS standard. In: *COSMOS STANDARD* [online]. Belgium: COSMOS-standard AISBL, 2023 [cit. 2023-02-03]. Dostupné z: <https://www.cosmos-standard.org/en/documents/>
- [13] GRIFFIN, W.C. Classification of Surface Active Agents by HLB. *Society of Cosmetic Chemists*. 1949, **1**(1), 311-320.
- [14] RYOR. In: *Ryor e-shop* [online]. Praha: TROELL s.r.o., 2017 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://eshop.ryor.cz/x8402/ryor-krem-proti-zarudnuti-a-rozsirenym-zilkam>
- [15] LACTOVIT ACTIVIT. In: *Lactovit* [online]. Český Brod, Česká republika: MARCA CZ s.r.o., 2017 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://lactovit.cz/product/sprchovy-gel-activit/>
- [16] ABEDI, G., Z. TALEBPOUR a F. JAMECHENARBOO. The survey of analytical methods for sample preparation and analysis of fragrances in cosmetics and personal care products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018, **102**(1), 41-59. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.01.006
- [17] BASKETTER, D.A., S. LEMOINE a J.P. MCFADDEN. Skin sensitisation to fragrance ingredients: is there a role for household cleaning/maintenance products?. *European Journal of Dermatology*. 2015, **25**(1), 7-13.
- [18] MONDELLO, L., D. SCIARRONE, A. CASILLI, P. TRANCHIDA, P. DUGO a G. DUGO. Fast gas chromatography-full scan quadrupole mass spectrometry for the determination of allergens in fragrances. *Journal of Separation Science*. 2007, **30**(12), 1905-1911. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200600541
- [19] SELL, C., P.H. KAHN a R. HALUZA-DELAY. *The Chemistry of Fragrances: From Perfumer to Consumer*. 2. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007. ISBN 978-0-85404-824-3.
- [20] BREITENEDER, H. a C. RADAUER. A classification of plant food allergens☆. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004, **113**(5), 821-830. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2004.01.779
- [21] MURZIN, A.G. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology*. 1995, **247**(4), 536-540. ISSN 10898638. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.1995.0159
- [22] VIETHS, S., S. SCHEURER a B. BALLMER-WEBER. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci*. 2002, **1**(964), 47-68.

- [23] 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
- [24] BURDOCK, G.A. *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*. 6. USA: CRC Press, 2010. ISBN 978-1-4200-9077-2.
- [25] HLAVA, B. a F. STARÝ. *Rostliny v kosmetice*. 1. Praha: Atria, 1987. ISBN 37-004-87.
- [26] SALVADOR, A. a A. CHISVERT. *Analysis of cosmetic products*. 1. London: Elsevier, 2007. ISBN 978-0-444-52260-3.
- [27] BAREL, A.O. a I. MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. 1. New York: Marcel Dekker, 2001. ISBN 08-247-0292-1.
- [28] ROMANOWSKI, P. The 10 Different Types of Cosmetic Formulas You Must Know. In: *Chemists Corner* [online]. 2020 [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: <https://chemistscorner.com/the-10-different-types-of-cosmetic-formulas-you-must-know/>
- [29] POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [30] MURRAY, R.K. *Harperova Biochemie*. 2. Praha: H & H, 1998. Lange medical book. ISBN 80-857-8738-5.
- [31] WILLIAMS, P.A., M. HICKEY a D. MITCHELL. Fluid Gels Based On Natural Polymers For Cosmetic Applications. In: *Cosmetics&Toiletries* [online]. 2009 [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/cosmetic-ingredients/rheology-thickener/article/21833871/fluid-gels-based-on-natural-polymers-for-cosmetic-applications>
- [32] *ISO/TR 18811. Cosmetics — Guidelines on the stability testing of cosmetic products*. 1. Switzerland: : International Organization for Standardization, 2018.
- [33] Physical and Chemical Testing. In: *SGS* [online]. Switzerland: Société Générale de Surveillance SA, 2023 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <https://www.sgs.com/en/services/physical-and-chemical-testing>
- [34] PASIECZNA-PATKOWSKA, S. a T. OLEJNIK. Analysis of Cosmetic Products Using Different IR Spectroscopy Techniques. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska*. 2014, **68**(1-2), 95-106. Dostupné z: doi:10.2478/umcschem-2013-0008

- [35] Texture Testing of the Physical Characteristics of Cosmetics. In: *AZoMaterials* [online]. Sydney: AZoNetwork, 2023 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=12477>
- [36] *Stable Micro Systems. Physical testing in the cosmetics industry: From raw material to display counter* [online]. USA: DocPlayer, Inc., 2023 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <https://docplayer.net/99758651-Physical-testing-in-the-cosmetics-industry-from-raw-material-to-display-counter.html>
- [37] BUŇKA, F., J. HRABĚ a B. VOSPĚL. *Senzorická analýza potravin I. 1*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. ISBN 978-80-7318-628-9.
- [38] YAP, K. a A. AMINAH. Sensory analysis of lipstick. *International Journal of Cosmetic Science*. 2011, **33**(3), 245-250. ISSN 01425463. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-2494.2010.00621.x
- [39] Stability Testing of Cosmetics. In: *MakingCosmetics* [online]. Washington: MakingCosmetics Inc., 2022 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: https://www.makingcosmetics.com/Stability-Testing-of-Cosmetics_ep_59.html
- [40] *ČSN EN ISO 29621 (681560): Kosmetika - Mikrobiologie - Směrnice pro posuzování rizika a identifikaci mikrobiologicky málo rizikových výrobků*. 1. Hradec Králové: TECHNOR print, s.r.o., 2017.
- [41] Cosmetic Product Stability Test. In: *Obelis Group* [online]. Brussels: Obelis Group, 2019 [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: www.obelis.net/cosmetic-product-stability-test
- [42] *Doporučení komise ze dne 22. září 2006 o účinnosti prostředků na ochranu proti slunečnímu záření a o uváděných tvrzeních, která s nimi souvisí*. In: . Brusel: Evropská komise, 2006. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32006H0647>
- [43] EDWARDS, K. Stability Testing Guidance for Product Safety and Shelf life Insight. In: *Cosmetics&Toiletries* [online]. Illinois, USA: Allured Business Media, 2018 [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/testing/methoddevelopment/Stability-Testing-Guidance-for-Product-Safety-and-Shelf-life-Insight-503072831.html>
- [44] Zkouška trvanlivosti (stabilita). In: *EUROLAB: Laboratory Services* [online]. Istanbul, 2017 [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: <https://www.eurolab.com.tr/cs/sektorel-test-ve-analizler/endustriyel-testler/raf-omru-stabilite-testi>
- [45] Stability and Compatibility Testing of Cosmetic Products. In: *CE.way* [online]. Ireland [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal->

- [46] ŠČUKIN, E., A. PERCOV a E. AMELINOVÁ. *Koloidní chemie*. 1. Praha: Academia, 1990. ISBN 80-200-0259-6.
- [47] CHITYALA, P.K. *Evaluation of Xanthan/Enzymatically Modified Guar Gum Mixtures in Oil-in-Water Emulsions*. Kentucky, USA, 2015. Dostupné také z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Evaluation-of-Xanthan%2FEnzymatically-Modified-Guar-Chityala/1522a2c88bd931fc1b6c7f696ca90b16bf7b507a>. Masters Theses & Specialist Projects. Western Kentucky University.
- [48] DASTYCH, M. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4226-1.
- [49] ROTI@DipSlide PCA/Legionella. In: *Carl Roth* [online]. Karlsruhe: Carl Roth GmbH, 2023 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <https://www.carlroth.com/com/en/contact-agar-roti-dipslides/rotidipslide-pca-legionella/p/2493.1>
- [50] ČSN EN ISO 17516: *Kosmetika – Mikrobiologie – Mikrobiologické limity*. 1. Hradec Králové: TECHNOR print, s.r.o., 2015.
- [51] BUŇKOVÁ, L. a M. DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. ISBN 978-80-7318-516-9.
- [52] ČSN EN ISO 11930 (681561): *Kosmetika - Mikrobiologie - Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku*. 1. Hradec Králové: TECHNOR print, s.r.o., 2019.
- [53] MARQUES, L., R. CATHARINO, R. BRUNS a M. EBERLIN. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of perfumes: rapid classification and counterfeit detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006, **20**(24), 3654-3658. ISSN 09514198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.2779
- [54] GODINHO, R., M. SANTOS a R. POPPI. Quality control of fragrances using Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2016, **47**(5), 579-584. ISSN 03770486. Dostupné z: doi:10.1002/jrs.4856
- [55] KALOUSTIAN, J., C. MIKAIL, T. EL-MOSELHY, L. ABOU a H. PORTUGAL. GC-MS analysis of allergens in plant oils meant to cosmetics. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*. 2007, **14**(2), 110-115. ISSN 1258-8210. Dostupné z: doi:10.1051/ocl.2007.0103
- [56] FAMIGLINI, G., V. TERMOPOLI, P. PALMA, F. CAPRIOTTI a A. CAPPIELLO. Rapid LC-MS method for the detection of common fragrances in personal care products without sample preparation. *ELECTROPHORESIS*. 2014, **35**(9), 1339-1345. ISSN

01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201300462

- [57] PONIEDZIAŁEK, K., B. STRZEMIECKA, M. KASPERKOWIAK a K. BIELICKA-DASZKIEWICZ. Assessment of the adsorption strength of fragrances on zeolites via solid-phase extraction. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2017, **40**(7), 353-360. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1080/10826076.2017.1306558
- [58] DEVOS, C., N. OCHIAI, K. SASAMOTO, P. SANDRA a F. DAVID. Full evaporation dynamic headspace in combination with selectable one-dimensional/two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry for the determination of suspected fragrance allergens in cosmetic products. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1255**(1), 207-215. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.01.082
- [59] ZHANG, Z. a J. PAWLISZYN. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*. 2002, **65**(14), 1843-1852. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00062a008
- [60] DIVIŠOVÁ, R., E. VÍTOVÁ, P. DIVIŠ, J. ZEMANOVÁ a J. OMELKOVÁ. Validation of SPME-GC-FID Method for Determination of Fragrance Allergens in Selected Cosmetic Products. *Acta Chromatographica*. 2015, **27**(3), 509-523. ISSN 1233-2356. Dostupné z: doi:10.1556/AChrom.27.2015.3.8
- [61] DEL NOGAL SÁNCHEZ, M., J. PÉREZ-PAVÓN a B. MORENO CORDERO. Determination of suspected allergens in cosmetic products by headspace-programmed temperature vaporization–fast gas chromatography–quadrupole mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, **397**(6), 2579-2591. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-3803-8
- [62] VAN ASTEN, A. The importance of GC and GC-MS in perfume analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2002, **21**(9-10), 698-708. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-9936(02)00807-5
- [63] DESMEDT, B., M. CANFYN, M. PYPE et al. HS–GC–MS method for the analysis of fragrance allergens in complex cosmetic matrices. *Talanta*. 2015, **131**(1), 444-451. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2014.08.006
- [64] PARRIS, N.A. Instrumental Liquid Chromatography: A Practical Manual on High-Performance Liquid Chromatographic Methods. *Journal of Chromatography Library*. Elsevier, 1976, **5**(3), 1-331. *Journal of Chromatography Library*. ISBN 9780444414274. ISSN 0301-4770. Dostupné z: doi:10.1016/S0301-4770(08)61239-7
- [65] PÉREZ-OUTEIRAL, J., E. MILLÁN a R. GARCIA-ARRONA. Ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with high-performance liquid chromatography

- for the simultaneous determination of fragrance allergens in cosmetics and water. *Journal of Separation Science*. 2015, **38**(9), 1561-1569. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201401330
- [66] VARMA, A., H. PADH a N. SHRIVASTAVA. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal*. 2007, **2**(3), 386-392. ISSN 18606768. Dostupné z: doi:10.1002/biot.200600195
- [67] MURRAY, M.G. a W.F. THOMPSON. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980, **8**(19), 4321-4325.
- [68] DOYLE, J.J. a J.L. DOYLE. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*. 1987, **19**(1), 11-15.
- [69] WILLIAMS, C.E. a P.C. RONALD. PCR template-DNA isolated quickly from monocot and dicot leaves without tissue homogenization. *Nucleic Acids Res.* 1994, **22**(10), 1917-8.
- [70] ROGERS, Scott a Arnold BENDICH. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1989, **1**(1), 73-83. ISBN 978-94-010-6918-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-009-0951-9_6
- [71] LODHI, M., G.-N. YE, N. WEEDEN a B. REISCH. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1994, **12**(1), 6-13. ISSN 0735-9640. Dostupné z: doi:10.1007/BF02668658
- [72] MICHIELS, A., W. VAN DEN ENDE, M. TUCKER, L. VAN RIET a A. VAN LAERE. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*. 2003, **315**(1), 85-89. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2697(02)00665-6
- [73] SHARMA, K., M. LAVANYA a V. ANJALIAH. A method for isolation and purification of peanut genomic DNA suitable for analytical applications. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2000, **18**(4), 393-393. ISSN 0735-9640. Dostupné z: doi:10.1007/BF02825068
- [74] SCHRADER, C., A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK a R. JOHNE. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, **113**(5), 1014-1026. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- [75] OPEL, Kerry, Denise CHUNG a K. MCCORD. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *Journal of Forensic Sciences*. 2010, **55**(1), 25-33. ISSN 00221198. Dostupné z: doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x

- [76] ROSSEN, L., P. NØRSKOV, K. HOLMSTRØM a O. RASMUSSEN. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*. 1992, **17**(1), 37-45. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1605(92)90017-W
- [77] RÅDSTRÖM, P., R. KNUTSSON, P. WOLFFS, M. LÖVENKLEV a C. LÖFSTRÖM. Pre-PCR Processing: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Molecular Biotechnology*. 2004, **26**(2), 133-146. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1385/MB:26:2:133
- [78] SU, X. a A. GIBOR. A method for RNA isolation from marine macro-algae. *Analytical Biochemistry*. 1988, **174**(2), 650-657. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(88)90068-1
- [79] SIPAHIOGLU, H., M. USTA a M. OCAK. Use of dried high-phenolic laden host leaves for virus and viroid preservation and detection by PCR methods. *Journal of Virological Methods*. 2006, **137**(1), 120-124. ISSN 01660934. Dostupné z: doi:10.1016/j.jviromet.2006.06.009
- [80] POWELL, H.A., C.M. GOODING, S.D. GARRETT, B.M. LUND a R.A. MCKEE. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*. 1994, **18**(1), 59-61. ISSN 0266-8254. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765X.1994.tb00802.x
- [81] KATCHER, H.L. a I. SCHWARTZ. A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. *Biotechniques*. 1994, **16**(1), 84-92.
- [82] PEIST, R., D. HONSEL a G. TWIELING. PCR inhibitors in plant DNA preparations. *QIAGEN News*. 2001, **3**(1), 7-9.
- [83] LOVE, D., M. CASTEEL, J. MESCHKE a M. SOBSEY. Methods for recovery of hepatitis A virus (HAV) and other viruses from processed foods and detection of HAV by nested RT-PCR and TaqMan RT-PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, **126**(1-2), 221-226. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.032
- [84] JOHN, M.E. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res*. 1992, **20**(9), 2381.
- [85] BURKARDT, H.J. Standardization and Quality Control of PCR Analyses. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2000, **38**(2), 87-91. ISSN 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2000.014

- [86] ABBASZADEGAN, M., M.S. HUBER, C.P. GERBA a I.L. PEPPER. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993, **59**(5), 1318-1324.
- [87] AL-SOUD, W.A. a P. RÅDSTRÖM. Capacity of nine thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol.* 1998, **64**(10), 3748-3753.
- [88] AL-SOUD, W.A. a P. RÅDSTRÖM. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**(12), 4463-4470.
- [89] ECKHART, L., J. BACH, J. BAN a E. TSCHACHLER. Melanin Binds Reversibly to Thermostable DNA Polymerase and Inhibits Its Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2000, **271**(3), 726-730. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.2000.2716
- [90] WILKINS, T.A. a L.B. SMART. A laboratory guide to RNA: isolation, analysis and synthesis. *New York : Wiley-Liss, Inc.* 1996, **1**(1), 21-42.
- [91] YEDIDAG, E., A. KOFFRON, K. MUELLER, B. KAPLAN, D. KAUFMAN, J. FRYER, F. STUART a M. ABECASSIS. Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus. *Transplantation.* 1996, **62**(2), 238-242. ISSN 0041-1337. Dostupné z: doi:10.1097/00007890-199607270-00015
- [92] SEERAM, N., L. ADAMS, Y. ZHANG, R. LEE, D. SAND, H.S. SCHEULLER a D. HEBER. Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2006, **54**(25), 9329-9339. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf061750g
- [93] WEI, T., G. LU a G. CLOVER. Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses. *Journal of Virological Methods.* 2008, **151**(1), 132-139. ISSN 01660934. Dostupné z: doi:10.1016/j.jviromet.2008.03.003
- [94] PUCHOOA, D. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *African Journal of Biotechnology.* 2004, **3**(4), 253-255. ISSN 1684-5315. Dostupné z: doi:10.5897/AJB2004.000-2046
- [95] DEMEKE, T. a G. JENKINS. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2010, **396**(6), 1977-1990. ISSN 1618-2642.

Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-3150-9

- [96] PETERSON, D., K. BOEHM a S. STACK. Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), A plant containing high levels of polyphenolic compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997, **15**(2), 148-153. ISSN 0735-9640. Dostupné z: doi:10.1007/BF02812265
- [97] KIM, C.S., C.H. LEE, J.S. SHIN, Y.S. CHUNG a N.I. HYUNG. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Res*. 1997, **25**(5), 1085-6.
- [98] RICHARDS, G. Limitations of Molecular Biological Techniques for Assessing the Virological Safety of Foods. *Journal of Food Protection*. 1999, **62**(6), 691-697. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-62.6.691
- [99] SCIPIONI, A., A. MAUROY, D. ZIANT, C. SAEGERMAN a E. THIRY. A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. *Virology Journal*. 2008, **5**(94), 1. ISSN 1743-422X. Dostupné z: doi:10.1186/1743-422X-5-94
- [100] HALE, A.D., J. GREEN a D.W.G. BROWN. Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. *Journal of Virological Methods*. 1996, **57**(2), 195-201. ISSN 01660934. Dostupné z: doi:10.1016/0166-0934(95)01966-9
- [101] CROCI, L., E. DUBOIS, N. COOK et al. Current Methods for Extraction and Concentration of Enteric Viruses from Fresh Fruit and Vegetables: Towards International Standards. *Food Analytical Methods*. 2008, **1**(2), 73-84. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-008-9025-4
- [102] NGAZOA, E.S., I. FLISS a J. JEAN. Quantitative study of persistence of human norovirus genome in water using TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, **104**(3), 707-715. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03597.x
- [103] SUR, K., S. MCFALL, E. YEH, S. JANGAM, M. HAYDEN, S. STROUPE a D. KELSO. Immiscible Phase Nucleic Acid Purification Eliminates PCR Inhibitors with a Single Pass of Paramagnetic Particles through a Hydrophobic Liquid. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2010, **12**(5), 620-628. ISSN 15251578. Dostupné z: doi:10.2353/jmoldx.2010.090190
- [104] ABOLMAATY, A., W. GU, R. WITKOWSKY a R.E. LEVIN. The use of activated charcoal for the removal of PCR inhibitors from oyster samples. *Journal of Microbiological Methods*. 2007, **68**(2), 349-352. ISSN 01677012. Dostupné z:

doi:10.1016/j.mimet.2006.09.012

- [105] ALJANABI, S.M. a I. MARTINEZ. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 1997, **25**(22), 4692-3.
- [106] POREBSKI, S., L. BAILEY a B. BAUM. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter.* 1997, **15**(1), 8-15. ISSN 0735-9640. Dostupné z: doi:10.1007/BF02772108
- [107] PERMINGEAT, H., M.V. ROMAGNOLI, J. SESMA a R. VALLEJOS. A Simple Method for Isolating DNA of High Yield and Quality from Cotton (*shape Gossypium hirsutum L.*) Leaves. *Plant Molecular Biology Reporter.* 1998, **16**(1), 89-89. ISSN 07359640. Dostupné z: doi:10.1023/A:1007466522028
- [108] KLEPPE, K., E. OHTSUKA, R. KLEPPE, I. MOLINEUX a H.G. KHORANA. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology.* 1971, **56**(2), 341-361. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/0022-2836(71)90469-4
- [109] SAIKI, R., D. GELFAND, S. STOFFEL, S. SCHARF, R. HIGUCHI, G. HORN, K. MULLIS a H. ERLICH. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988, **239**(4839), 487-491. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.2448875
- [110] LOGAN, J., K. EDWARDS a N. SAUNDERS. *Real-time PCR: current technology and applications.* Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009. ISBN 978-1-904455-39-4.
- [111] HIGUCHI, R., G. DOLLINGER, P. WALSH a R. GRIFFITH. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology.* 1992, **10**(4), 413-417. ISSN 0733-222x. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0492-413
- [112] HIGUCHI, R., C. FOCKLER, G. DOLLINGER a R. WATSON. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology.* 1993, **11**(9), 1026-1030. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0993-1026
- [113] LEVIN, R. The Application of Real-Time PCR to Food and Agricultural Systems. A Review. *Food Biotechnology.* 2007, **18**(1), 97-133. ISSN 0890-5436. Dostupné z: doi:10.1081/FBT-120030386
- [114] Sigmaaldrich. In: *Merck* [online]. Darmstadt, Germany: Merck KGaA, 2023 [cit. 2023-02-07]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/qpcr/quantitative-pcr-and-digital-pcr-detection->

methods

- [115] SIDSTEDT, M., E. ROMSOS, R. HEDELL, R. ANSELL, C. STEFFEN, P. VALLONE, P. RÅDSTRÖM a J. HEDMAN. Accurate Digital Polymerase Chain Reaction Quantification of Challenging Samples Applying Inhibitor-Tolerant DNA Polymerases. *Analytical Chemistry*. 2017, **89**(3), 1642-1649. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.6b03746
- [116] DEMEKE, T. a D. DOBNIK. Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018, **410**(17), 4039-4050. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-018-1010-1
- [117] NIXON, G., J. GARSON, P. GRANT, E. NASTOULI, C. FOY a J. HUGGETT. Comparative Study of Sensitivity, Linearity, and Resistance to Inhibition of Digital and Nondigital Polymerase Chain Reaction and Loop Mediated Isothermal Amplification Assays for Quantification of Human Cytomegalovirus. *Analytical Chemistry*. 2014, **86**(9), 4387-4394. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac500208w
- [118] RAČKI, N., T. DREO, I. GUTIERREZ-AGUIRRE, A. BLEJEC a M. RAVNIKAR. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods*. 2014, **10**(1). ISSN 1746-4811. Dostupné z: doi:10.1186/s13007-014-0042-6
- [119] Lumisizer - oficiální stránka prodejce. In: *LUM* [online]. Germany, 2022 [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: https://www.lum-gmbh.com/lumisizer_en.html
- [120] LOW, L.E., S.P. SIVA, Y.K. HO, E.S. CHAN a B.T. TEY. Recent advances of characterization techniques for the formation, physical properties and stability of Pickering emulsion. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2020, **1**(277). Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2020.102117
- [121] The editors of Christeys food hygiene. Hand Hygiene. In: *Christeys food hygiene* [online]. United Kingdom: Christeys, 2018 [cit. 2023-01-13]. Dostupné z: <https://www.christeysfoodhygiene.co.uk/hand-hygiene/>
- [122] BYRD, A.L., Y. BELKAID a J.A. SEGRE. The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. 2018, **16**(3), 143-155. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1007/s004120050424
- [123] ABOUL-MAATY, N.A.-F. a H.A.-S. ORABY. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*. 2019, **43**(1). ISSN 2522-8307. Dostupné z:

doi:10.1186/s42269-019-0066-1

- [124] FIALOVA, Lenka, Denisa ROMANOVSKA a Ivana MAROVA. A Comparative Study of Some Procedures for Isolation of Fruit DNA of Sufficient Quality for PCR-Based Assays. *Molecules*. 2020, **25**(18), 1-15. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25184317
- [125] CHEN, S., H. YAO, J. 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
- [126] YOONG LIM, K., A. KOVARIK, R. MATYÁSEK, M. BEZDĚK, C.P. LICHTENSTEIN a A.R. LEITCH. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma*. 2000, **109**(3), 161-172. ISSN 0009-5915. Dostupné z: doi:10.1007/s004120050424
- [127] Newly designed primers targeting limonene synthase. In: LANGOVÁ, D., L. FIALOVÁ a I. MÁROVÁ. *Special Issue:European Biotechnology Congress 2020. Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 35. Prague: Taylor and Francis, 2021, s. 119-119. ISBN 1310-2818. ISSN 1314-3530.
- [128] WU, J., L. CHEN, D. LIN, Z. MA a X. DENG. Development and Application of a Multiplex Real-Time PCR Assay as an Indicator of Potential Allergenicity in Citrus Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, **64**(47), 9089-9098. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.6b03410
- [129] SARGENT, D., A. HADONOU a D. SIMPSON. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers from *Fragaria viridis*, a wild diploid strawberry. *Molecular Ecology Notes*. 2003, **3**(4), 550-552. ISSN 1471-8278. Dostupné z: doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00507.x
- [130] SARGENT, D., J. CLARKE, D. SIMPSON et al. An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006, **112**(7), 1349-1359. ISSN 0040-5752. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-006-0237-y
- [131] SOARES, S., L. GRAZINA, J. COSTA, J. AMARAL, M.B.P.P. OLIVEIRA a I. 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
- [132] HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal *Lactobacillus* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and*

- Environmental Microbiology*. 2006, **72**(4), 2359-2365. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006
- [133] LANGOVÁ, Denisa. *Identifikace mikroorganismů v kosmetických výrobcích s obsahem probiotik*. Brno, 2017. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [134] ORTH, D. *Handbook of cosmetic microbiology*. 1. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. Cosmetic science and technology series, v. 12. ISBN 08-247-9012-X.
- [135] MICK, W. a P. SCHREIER. Additional volatiles of black tea aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1984, **32**(4), 924-929. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf00124a055
- [136] AMES, J.M. a G. MACLEOD. Volatile Components of an Unflavored Textured Soy Protein. *Journal of Food Science*. 1984, **49**(6), 1552-1565. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.1984.tb12842.x
- [137] API, A.M., D. BELSITO, S. BISERTA et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, α -amylcinnamyl alcohol, CAS Registry Number 101-85-9. *Food and Chemical Toxicology*. 2019, **134**(1). ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2019.110712
- [138] SCOGNAMIGLIO, J., L. JONES, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on anisyl alcohol. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, **50**(1), 134-139. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2011.10.012
- [139] ZELLER, A. a M. RYCHLIK. Character Impact Odorants of Fennel Fruits and Fennel Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, **54**(10), 3686-3692. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf052944j
- [140] SCOGNAMIGLIO, J., L. JONES, D. VITALE, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on benzyl alcohol. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, **50**(1), 140-160. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2011.10.013
- [141] API, A.M., F. BELMONTE, D. BELSITO et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, benzyl benzoate, CAS Registry Number 120-51-4. *Food and Chemical Toxicology*. 2020, **144**(1), 1-10. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2020.111381
- [142] BHATIA, S.P., G.A. WELLINGTON, J. COCCHIARA, J. LALKO, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on benzyl cinnamate. *Food and Chemical Toxicology*. 2007, **45**(1), 40-48. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2007.09.027

- [143] PIAZZA, S.P., B.M. PUTON, R.M. DALLAGO, D. DE OLIVEIRA, R.L. CANSIAN, M. MIGNONI a N. PAROUL. Production of benzyl cinnamate by a low-cost immobilized lipase and evaluation of its antioxidant activity and toxicity. *Biotechnology Reports*. 2021, **29**(1), 1-7. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2021.e00586
- [144] API, A.M., D. BELSITO, S. BISERTA et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, benzyl cinnamate, CAS Registry Number 103-41-3. *Food and Chemical Toxicology*. 2020, **141**(1), 1-10. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2020.111381
- [145] LAPCZYNSKI, A., D. MCGINTY, L. JONES, S. BHATIA, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on benzyl salicylate. *Food and Chemical Toxicology*. 2007, **45**(1), 362-380. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2007.09.036
- [146] NATSCH, A., L. HOSTETTLER, T. HAUPT a H. LAUE. A critical assessment of the estrogenic potency of benzyl salicylate. *Toxicology Reports*. 2021, **8**(1), 1002-1007. ISSN 22147500. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxrep.2021.05.001
- [147] HÄUSLER, M. a A. MONTAG. Minor constituents of honey with aroma-relevance. III. Nectar flow-specific distribution of aromatic aldehydes and presence of nitrogen and sulphur heterocyclic compounds. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. Hamburg, Germany, 1990, **86**(6), 171-174. ISSN 0012-0413.
- [148] API, A.M., D. BELSITO, S. BISERTA et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, cinnamyl alcohol, CAS Registry Number 104-54-1. *Food and Chemical Toxicology*. 2020, **141**(1). ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2020.111337
- [149] API, A.M., D. BELSITO, S. BISERTA et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, citral, CAS Registry Number 5392-40-5. *Food and Chemical Toxicology*. 2020, **141**(1), 1-10. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2020.111339
- [150] LAPCZYNSKI, A., S.P. BHATIA, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on dl-citronellol. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, **46**(11), 103-109. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2008.06.043
- [151] API, A.M., F. BELMONTE, D. BELSITO et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, coumarin, CAS Registry Number 91-64-5. *Food and Chemical Toxicology*. 2019, **130**(1), 1-12. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2019.05.030
- [152] API, A.M., D. BELSITO, S. BHATIA et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, Eugenol, CAS Registry Number 97-53-0. *Food and Chemical Toxicology*. 2016, **97**(1), 25-37. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2015.12.013

- [153] LAPCZYNSKI, A., S.P. BHATIA, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on farnesol. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, **46**(11), 149-156. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2008.06.046
- [154] LAPCZYNSKI, A., S.P. BHATIA, R.J. FOXENBERG, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on geraniol. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, **46**(11), 160-170. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2008.06.048
- [155] HAGVALL, L., C. BÄCKTORP, S. SVENSSON, G. NYMAN, A. BÖRJE a A.-T. KARLBERG. Fragrance Compound Geraniol Forms Contact Allergens on Air Exposure. Identification and Quantification of Oxidation Products and Effect on Skin Sensitization. *Chemical Research in Toxicology*. 2007, **20**(5), 807-814. Dostupné z: doi:10.1021/tx700017v
- [156] IVIĆ, I., M. KOPJAR, V. JUKIĆ, M. BOŠNJAK, M. MAGLICA, J. MESIĆ a A. PICHLER. Aroma Profile and Chemical Composition of Reverse Osmosis and Nanofiltration Concentrates of Red Wine Cabernet Sauvignon. *Molecules*. 2021, **26**(4), 1-19. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26040874
- [157] API, A.M., D. BELSITO, D. BOTELHO et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, hydroxycitronellal, CAS Registry Number 107-75-5. *Food and Chemical Toxicology*. 2022, **163**(1), 1-12. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2022.112983
- [158] LEDAUPHIN, J., J.-F. SAINT-CLAIR, O. LABLANQUIE, H. GUICHARD, N. FOUNIER, E. GUICHARD a D. BARILLIER. Identification of Trace Volatile Compounds in Freshly Distilled Calvados and Cognac Using Preparative Separations Coupled with Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, **52**(16), 5124-5134. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf040052y
- [159] LAPCZYNSKI, A., J. LALKO, V.T. POLITANO, D. MCGINTY, S. BHATIA, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on alpha-iso-methylionone. *Food and Chemical Toxicology*. 2007, **45**(1), 280-289. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2007.09.051
- [160] SGORBINI, B., M.R. RUOSI, C. CORDERO, E. LIBERTO, P. RUBIOLO a C. BICCHI. Quantitative determination of some volatile suspected allergens in cosmetic creams spread on skin by direct contact sorptive tape extraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(16), 2599-2605. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2009.12.052
- [161] *Nářízení Komise (EU) 2021/1902: kterým se mění přílohy II, III a V nářízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009, pokud jde o používání některých látek klasifikovaných jako karcinogenní, mutagenní nebo toxické pro reprodukci v*

- kosmetických přípravcích*. In: . Evropská unie: Úřední věstník Evropské unie, 2021, ročník 1, číslo 1. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R1902>
- [162] DO, T.-A., J. VIEIRA, J. HARGREAVES, B. WOLF a J. MITCHELL. Impact of Limonene on the Physical Properties of Reduced Fat Chocolate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2008, **85**(10), 911-920. Dostupné z: doi:10.1007/s11746-008-1281-3
- [163] LETIZIA, C.S, J COCCHIARA, J LALKO a A.M API. Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*. 2003, **41**(7), 943-964. Dostupné z: doi:10.1016/S0278-6915(03)00015-2
- [164] API, A.M., D. BELSITO, S. BHATIA et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, Linalool, CAS registry number 78-70-6. *Food and Chemical Toxicology*. 2015, **82**(1), 29-38. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2015.01.005
- [165] API, A.M., D. BELSITO, D. BOTELHO et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, 3 and 4-(4-hydroxy-4-methylpentyl)-3-cyclohexene-1-carboxaldehyde, CAS registry number 31906-04-4. *Food and Chemical Toxicology*. 2022, **165**(1), 1-10. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2022.113163
- [166] *Nářízení Komise (EU) 2017/1410: kterým se mění přílohy II a III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích*. In: . Evropská unie: Úřední věstník Evropské unie, 2017, ročník 1, číslo 1. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R1410&from=ET>
- [167] API, A.M., D. BELSITO, S. BISERTA et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, methyl 2-octynoate, CAS Registry Number 111-12-6. *Food and Chemical Toxicology*. 2019, **134**(1), 1-7. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2019.110825

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Složení analyzovaných komerčních kosmetických výrobků a potravin

Příloha 2: Výsledky stabilitních testů komerčních výrobků a připravené emulze

Příloha 3: Specifikace a doplňkové informace o analyzovaných vonných alergenech

Příloha 4: Amplifikační křivky, analýza křivek tání a výsledky gelové elektroforézy

Příloha 5: UV-VIS spektra vonných alergenů

Příloha 6: GC-MS chromatogramy standardů Allergen Mix 1 a 2, chromatogramy extraktu z *A.satureioides* pro navážky 10 a 25 mg

PŘÍLOHA 1: SLOŽENÍ ANALYZOVANÝCH KOMERČNÍCH KOSMETICKÝCH VÝROBKŮ A POTRAVIN

KOMERČNÍ KOSMETICKÉ VÝROBKY:
Nivea zklidňující denní krém NATURALLY GOOD
Složení: Aqua, Glycerin, Cetearyl Alcohol, Alcohol Denat., Prunus Amygdalus Dulcis Oil, Simmondsia Chinensis Seed Oil, Dicaprylyl Ether, Butyrospermum Parkii Butter, Glyceryl Stearate, Caprylic/Capric Triglyceride, Chamomilla Recutida Flower Extract, Helianthus Annuus Seed Oil, Tocopherol, Maltodextrin, Glyceryl Caprylate, Sodium Levulinate, Decylene Glycol, Ethylhexylglycerin, p-Anisic Acid, Sodium Chloride.
Minimální trvanlivost: neuvedeno
Trvanlivost po otevření: 10 měsíců
Ryor hydratační krém s levandulí
Složení: Aqua, Isopropyl Myristate, Caprylic/Capric Triglyceride, Diethylhexyl Carbonate, Potassium Olivoyl Hydrolyzed Oat Protein, Cetearyl Alcohol, Glyceryl Oleate, Glyceryl Stearate, Macadamia Ternifolia Seed Oil, Glycerin, Cetyl Palmitate, Sorbitan Palmitate, Sorbitan Oleate, Simmondsia Chinensis Seed Oil, Panthenol, Tocopheryl Acetate, Xylitylglucoside, Anhydroxylitol, Xylitol, Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Lavandula Officinalis Flower Oil, Linalool, Limonene, Polyacrylate Crosspolymer-6, Lactic Acid.
Minimální trvanlivost: 10/2021
Trvanlivost po otevření: neuvedeno
Ryor krém proti zarudnutí a rozšířeným žilkám s probiotiky
Složení: Aqua, Persea Gratissima (Avocado) Oil, Caprylic/Capric Triglyceride, Cetearyl Oliviate, Sorbitan Oliviate, Hydrogenated Polyisobutene, Glycerin, Cetearyl Alcohol, Cetyl Palmitate, Sorbitan Palmitate, Sorbitan Oleate, Lactobacillus Ferment Lysate, Sodium Caproyl Proline, Oleyl Erucate, Cocos Nucifera Oil, Oak Root Extract, Laminaria Ochroleuca Extract, Tocopheryl Acetate, Simmondsia Chinensis (Jojoba) Seed Oil, Pentylene Glycol, Lecithin, Alcohol, Ascorbyl Palmitate, Tocopherol, Retinol, Polysorbate 20, Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Parfum, Alpha-Isomethyl Ionone, Benzyl Salicylate, Butylphenyl Methylpropional, Citronellol, Geraniol, Hexyl Cinnamalm Linalool.
Minimální trvanlivost: neuvedeno
Trvanlivost po otevření: 06/2018
Nobilis Tilia levandulový krém
Složení: Aqua, Prunus Amygdalus Dulcis Oil, Butyrospermum Parkii Butter, Polyglyceryl-3-Methylglucose Distearate, Glycerin, Sodium Anisate, Sodium Levulinate, Cetyl Alcohol, Caprylic/Capric Triglyceride, Stearic Acid, Aloe Barbadensis Leaf Extract, Glycerine Soja Oil, Cera Alba, Xanthan Gum, Panthenol, Lecithin, Tocopheryl Acetate, Lavandula Angustifolia Oil, Retinyl Palmitate, Magnolia Officinalis Bark Extrakt, Sodium Stearoyl Lactylate, Citric Acid, Linalool*, Geranyl*, Limonene* (z přírodních éterických olejů).
Minimální trvanlivost: 21/09/2021
Trvanlivost po otevření: neuvedeno
Herbs of Bulgaria hydratační krém na obličej levandule
Složení: Aqua, Glycerin, Caprylic/Capric Triglyceride, Glyceryl Stearate Citrate, Dimethicone, Glyceryl Stearate, Cocos Nucifera Oil, Cetearyl Ethylhexanoate, Cetearyl

Alcohol, Lavandula Angustifolia Flower Water, Phenoxyethanol, Caprylyl Glycol, Stearic Acid, Simmondsia Chinensis Seed Oil, Cera Alba, Hydroxyethyl Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer, Creatine, Hydroxyacetophenone, Parfum, Panthenol, Tocopheryl Acetate, Bht, Butylphenyl Methylpropional, Coumarin, Hexyl Cinnamal, Limonene.
Minimální trvanlivost: 11/2022
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Havlíkova apotéka krémová maska okurka
Složení: Aqua, Glycerin, Helianthus Annuus Seed Oil, Cetyl Alcohol, Coco-Caprylate/Caprinate, Glyceryl Stearate Citrate, Butyrospermum Parkii Butter, Spirulina maxima Powder, Glyceryl Caprylate, Benzyl Alcohol, Polyglyceryl-3 Stearate, Xanthan Gum, Hydrogenated Lecithin, Cucumis Sativus Fruit Extract, Citric Acid, Sodium Phylate, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Tocopherol, Alcohol
Minimální trvanlivost: 06/2022
Trvanlivost po otevření: neuváděno
Nobilis Tilia termoaktivní krém Termal
Složení: Aqua, Glycine Soja Oil, Steareth-2, Glycerin, Steareth-21, Stearic Acid, Cetyl Alcohol, Cinnamomum Zeylanicum Bark Oil, Phenoxyethanol, Benzoic Acid, Dehydroacetic Acid, Ethylhexylglycerin, Polyaminopropyl Biguanide, Cinnamal*, Eugenol*, Linalool*, Limonene*, Cinnamyl Alcohol* (z přírodních éterických olejů).
Minimální trvanlivost: 19/02/2022
Trvanlivost po otevření: neuváděno
Alverde tělové máslo Skin Food, Biolimette
Složení: Aqua, Alcohol, Helianthus Annuus Seed Oil*, Glyceryl Stearate Citrate, Theobroma Cacao Seed Butter*, Dicaprylyl Ether, Butyrospermum Parkii Butter*, Glycerin, Panthoic Acid, Stearic Acid, Betaine, Sodium Lactate, Citrus Aurantifolia Fruit Extract*, Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil, Parfum, Xanthan Gum, Carrageenan, Levulinic Acid, Sodium Levulinate, Sodium Hydroxide, P-Anisic Acid, Citral**, Limonene**, Linalool**, Citronellol**, Geraniol*. (*z certifikovaného ekologického zemědělství, **z přírodních esenciálních olejů)
Minimální trvanlivost: 03/2022
Trvanlivost po otevření: neuváděno
Natura Siberica Loves Estonia měsíčekový krém na tělo
Složení: Aqua, Butyrospermum Parkii Butter, Cetearyl Alcohol, Coco-Caprylate/Caprinate, Glyceryl Stearate Citrate, Glyceryl Stearate, Sorbitan Caprylate, Cyclopentasiloxane, Sodium Polyacrylate, Benzyl Alcohol, Tocopheryl Acetate, Parfum, Sodium Stearoyl Glutamate, Dehydroacetic Acid, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Citric Acid, Calendula Officinalis Flower Extract, Rhodiola Rosea Root Extract, Glycerin, CI 15985, CI 19140, Citronellol, Geraniol, Linalool.
Minimální trvanlivost: neuváděno
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Balea krém na ruce protect s vitamínem C, Handcreme protect
Složení: voda, C12-15 Alkyl Benzoát, Caprylic/Capril Triglycerid, Dibutyl Adipát, Polyglyceryl-3 Methylglukóza Distearát, Glyceryl Stearát, Glycerin, Cetyl Alcohol, Dicaprylyl Carbonát, Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoát, Ethylhexyl Triazon, Methylen Bis-Benzotriazol tetramethylbutylpentol (Nano), Myristyl Myristát, Xantánová guma, Phenoxyethanol, Benzyl Alkohol, Caprylyl Glycol, Parfum, Sodium-ascorbyl fosfát, Decyl Glucosid, Carrageenan, Kyselina Citrónová, Ethylendiamin Disuccinát, Propylen Glykol, Tokoferol, Citrus Sinensis - ovocný extrakt, Limonen, Hexyl Cinnamal, Linalool,

Geraniol, Citronellol, Citral.
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Alverde – mléko na opalování BIO mandarinka, OF 30
Složení: voda, dioxid titaničitý, cocoglyceridy, slnečnicový olej, izoamyl laurát, polyglyceryl – 2 dipolhydroxystearát, polyglyceryl – 3 polyrincinoleát, olivový olej, magnézium sulfát, alumina, kyselina stearová, limonen, kyselina linolová, tokoferol, glyceryl caprylát, kyselina levulinová, kyselina p-anisiová, levulinát sodný, geraniol, linalool, citral, ascorbyl palmitát, kyselina linolenová, parfém, CI 75130, Citrus reticulata – ovocný extakt
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Organic Shop hydratační tělová pěna jahody a čokoláda, strawberry body mousse
Složení: Aqua, Isopropyl Palmitate, Cetyl Palmitate, Glyceryl Stearate, Simmondsia Chinensis Seed Oil, Cetearyl Alcohol, Fragaria Vesca Fruit Extract*, Carbomer, Theobroma Cacao Seed Butter*, Pinus Sibirica Seed Oil*, Cocos Nucifera Oil, Gardenia Tahitensis Flower Extract, Benzyl Alcohol, Ethylhexylglycerin, Parfum, Sodium Hydroxide, CI 16255.
Minimální trvanlivost: neuvedeno
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Cosmos natural, krém na ruce, Feel Free natural repairing hand protect
Složení: Aqua, Aloe Barbadensis Leaf Juice*, Olea Europaea Fruit Oil*, Coco-caprylate/Caprates, Glycerin, Caprylic/Capric Triglyceride, Polyglyceryl-6 Distearate, Stearyl Alcohol, Prunus Amygdalus Dulcis Oil*, Citrus Aurantium Dulcis Peel Oil*, Chamomilla Recutita Flower Extract*, Tocopherol, Potassium Sorbate, Sodium Benzoate, Benzyl Alcohol, Beta-Sitosterol, Squalene, Dehydroacetic Acid, Citric Acid, Xanthan Gum (*z ekologického zemědělství).
Minimální trvanlivost: 06/2022
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Kvítok šlehaný tělový krém Levandul'ový sen
Složení: Butyrospermum Parkii Butter, Prunus Amygdalus Dulcis Oil, Persea Gratissima Oil, Tocopherol, Lavandula Angustifolia Oil, Linalool*, Limonene*, Geraniol*. (*vyskytují se přirozeně v silicích)
Minimální trvanlivost: 07/2022
Trvanlivost po otevření: neuvedeno
Dr. Konopka's hydratační pleťový peeling , face commage moist
Složení: Aqua, Glyceryl Stearate, Coco-Caprylate/Caprates, Cetearyl Alcohol, Prunus Armeniaca Shell Powder*, Caprylic/Capric Triglyceride, Octyldodecanol, Butyrospermum Parkii Butter, Glycerin, Chamomilla Recutita Flower Water*, Nuphar Luteum Root Extract*, Viola Odorata Extract*, Melilotus Albus Flower/Leaf/Stem Extract*, Secale Cereale Seed Extract*, Amaranthus Spinosisus Seed Extract*, Cedrus Atlantica Wood Oil*, Linum Usitatissimum Seed Oil*, Ribes Nigrum Leaf Water*, Chamomilla Recutita Flower Water*, Anthemis Nobilis Flower Extract*, Rubus Idaeus Fruit Extract*, Rubus Idaeus Seed Oil*, Camellia Oleifera Seed Oil*, Rosa Canina Fruit Oil*, Rosa Canina Fruit Extract*, Caprylyl/Capryl Wheat Bran/Straw Glycosides, Fusel Wheat Bran/Straw Glycosides, Polyglyceryl-5 Oleate, Sodium Cocoyl Glutamate, Glyceryl Caprylate, Tocopherol, Xanthan Gum, Sodium Stearoyl Glutamate, Benzyl Alcohol, Dehydroacetic Acid, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Parfum, Citric Acid, CI 77492, Limonene, Linalool. (*z ekologického zemědělství)
Minimální trvanlivost: neuvedeno
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců

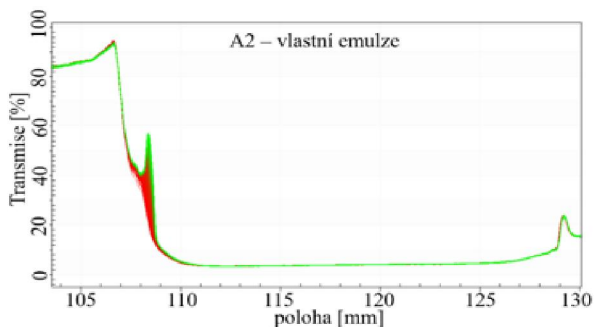
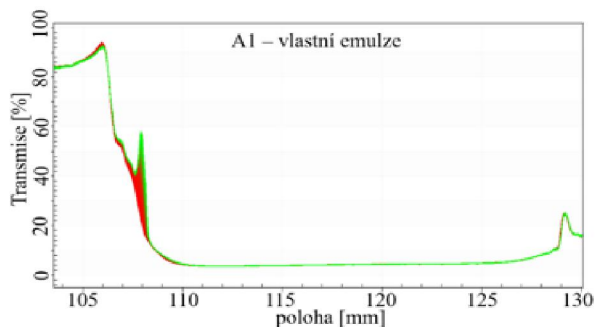
Organic Shop tělový cukrový peeling Jahoda, strawberry body scrub
Složení: Glycerin, Sucrose, MIPA-Lauthern Sulfate, Laureth-3, Helianthus Annuus Seed Oil, Cetearyl Alcohol, Cocamide DEA, Propylene Glycol, Tocopheryl Acetate, Cocos Nucifera Fruit Powder, Rubus Idaeus Fruit, Vaccinium Vitis-Idaea Seed Oil, Ribes Nigrum Leaf Water*, Fragaria Vesca Fruit Extract*, Rubus Idaeus Seed Oil*, Euterpe Oleracea Fruit Extract, Parfum, CI 42090, CI 19140, CI 14720 (*z ekologického zemědělství).
Minimální trvanlivost: neuvedeno
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Organic Shop tělový peeling malinový krém
Složení: Sucrose, Glycerin, Cetearyl Alcohol, Butyrospermum Parkii Butter, Cocamidopropyl Betaine, Rubus Idaeus Fruit Extract*, Aqua, Parfum, Limonene, Linalool, CI 777491, CI 77491. (*z ekologického zemědělství)
Minimální trvanlivost: neuvedeno
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Planeta Organica tělový peeling C + citrus , natural body scrub
Složení: Sodium Chloride, Glycerin, Sucrose, Aqua, Helianthus annuus Seed Oil, Citrus Aurantifolia Fruit Extract *, Citrus Aurantium Dulcis Fruit Extract *, Citrus Nobilis Fruit Extract *, Citrus Limon Fruit Extract *, Citrus Grandis Fruit Extract *, Sodium Ascorbyl Phosphate , Xanthan Gum, Citric Acid, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Parfum, CI 15985, Hexyl Cinnamal, Limonene, Linalool (*ingredience organického původu).
Minimální trvanlivost: neuvedeno
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Balea cukrový pleťový peeling s vitamínem C, sugar scrub
Složení: glycerin, sacharóza, sójový olej, propylen glykol, voda, hydrogenovaný ricinový olej, sodium askorbyl fosfát, Citrus aurantium dulcis – prášek z kůry, sacharóza stearát, parfém, chlorid sodný, sodium sulfát, disódium EDTA, limonen, CI 47005, CI 45100
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Naturalis cukrový tělový scrub limetka a máta, sugar body scrub
Složení: Sacharóza, caprylic/capric triglycerid, olivový olej, slnečnicový olej, tekutý parafín, hydroxid uhličitý horečnatý, phenoxyethanol, silica, parfém, tokoferol, glycerín, Citrus aurantifolia – extrakt, voda, limonen, hexyl cinamal, Mentha piperita – extrakt, kyselina mléčná, hydroxid sodný, sorbát draselný, benzoát sodný, CI 47005, CI 42090
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
N.A.E. tuhý šampón Equilibrio, shampoo bar
Složení: pšeničný škrob, lauryl sulfát draselný, lauryl sulfát sodný, cetaryl alkohol, voda, glycerín, máslo z maslovníku afrického, kyselina palmitová, kyselina steárová, parfém, kyselina mléčná, hydrolyzovaný jojobový ester, biosacharidová guma, Mentha piperita – extrakt z listov, Salvia officinalis – extrakt z listu, sódium levulinát, glyceryl caprylát, sódium anisát, linalool, limonen, citral
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Alverde sprchový gel s mátou a bergamotem, pflegedushe bio-minze
Složení: voda, sodium coco-sulfát, lauryl glukozid, glycerin, sodium laktát, mořská sůl, mentha piperita – olej, Citrus Limon – ovocný extrakt, sodium cocoyl glutamát, disodium cocoyl glutamát, Citrus aurantium bergamia – šťáva z kůry, Mentha piperita – šťáva z listu, alkohol, parfém, linalool, limonen, citral, geraniol
Trvanlivost po otevření: 12 měsíců
Eminence meruňkový krém
Meruňková šťáva - oživující a hydratační složka obsahující vitamíny a živiny. Mrkev -

obsahuje vitamín A a karotenové oleje. Olej z kukuřičných výhonků - vyživuje, chrání a hydratuje pokožku. Biocomplex™ - zdroj antioxidantů, Vitamínu A, Ester-C, E, Coenzymu Q10, Alpha Lipoické kyseliny.
Eminence maska z borůvek a sóji
Borůvková šťáva a dužina – vysoký obsah antioxidantů a fytonutrientů. Sója (ne GMO) – bohatá na isoflavonoidy a vitamín B. Bambucké máslo – zklidňující a hydratující složka. Malinová šťáva - obsahuje vitamin C a fytonutrienty. Ostružinová šťáva – antioxidant, vysoký obsah vitamínů A a C. Měsíčkový olej - antioxidant, zklidňující složka. Biocomplex™ - unikátní kombinace antioxidantů a vitamínů A, koenzym Q10, alfa-lipoová kyselina pro redukci vrásek a celkového zlepšení vzhledu pleti.
Manufactura Meruňkový olej lisovaný za studena
Za studena lisovaný zvláčňující a regenerační BIO meruňkový olej lisovaný z jader. Olej ze semen Helianthus Annus, MIPA laureth sulfát, Laureth-3, Laureth-7 citrát, olej z jader Prunus Armeniaca, olej z Prunus Amygdalus Dulcis, Poloxamer 101, isopropyl myristát, PEG-15 glyceryl isostearát, parfém, panthenol, tokoferol, Beta-sitosterol, skvalen, limonen, linalol, Hexyl Cinnamal, butylfenyl methylpropional, geraniol.
Eminence probiotický krém
Okurková šťáva - revitalizuje, tónuje a minimalizuje póry, čistí pokožku. Výtažek z vrbové kůry – astringent. Jogurt - exfoliant, zdroj mléčné kyseliny, hydratace a výživa. Tea Tree olej - esenciální olej. Měsíčkový olej - antioxidant, esenciální olej. Bambucké máslo - hydratant bohatý na triglyceridy a mastné kyseliny. Biocomplex.
Eminence probiotické čistící mléko
Okurkový džus - revitalizér, toner, zmenšuje póry a zároveň pleť čistí. Jogurt - exfoliační, obsahuje kyselinu mléčnou, hydratační a vyživující. Sladké mandlové mléko - změkčuje, vyživuje, chrání a sladce voní. Tea Tree olej - zklidňující protizánětlivý, antiseptický. Extrakt z vrbové kůry - protizánětlivý, stahující, uklidňuje a zklidňuje pokožku. Biocomplex™ - zdroj antioxidantu, Vitamínu A, Ester-C, E, Coenzymu Q10, Alpha Lipoické kyseliny.
Eminence probiotická zklidňující maska
Jogurt - exfoliační, obsahuje kyselinu mléčnou, je hydratační a vyživující. Okurka - Revitalizer, toner, tonizuje a zmenšuje póry a zároveň pleť čistí a oživuje. Bambucké máslo - hydratační, s vysokým obsahem triglyceridů a mastných kyselin, je vynikajícím změkčovadlem pro kůži, kterou revitalizuje a zklidňuje. Měsíček - anti-dráždivý, antiseptický, jemně zklidňuje, čistí, dezinfikuje a zvlhčuje pokožku. Jíl - hluboce čistí a zvláčňuje pokožku. Netřesk - protizánětlivý, regenerační, rozjasňující, snižuje podráždění, regeneruje, zesvětluje pigmentaci a zvlhčuje pokožku. Tea Tree olej - zklidňující, protizánětlivý, antiseptický. Biocomplex™ - antioxidant, vitamíny A, Ester C, E, koenzym Q10, alfa lipoová kyselina, přináší vyváženou kombinaci základních antioxidantů a účinně bojuje proti volným radikálům.
ESENCIÁLNÍ OLEJE
Mandarinka, Miča a Harašta s.r.o.
100% přírodní esenciální olej Ingredience: Citrus Nobilis oil, Citrus Aurantium Dulcis peel oil Limonene, Linalool, Citral.
Jasmín, Miča a Harašta s.r.o.
Vonný olej Ingredience: parfém, amyl cinnamal, cinnamyl alcohol, benzyl salicylate, benzyl alcohol, linalool, hydroxycitronellal
Citronová tráva silice, Fichema s.r.o.

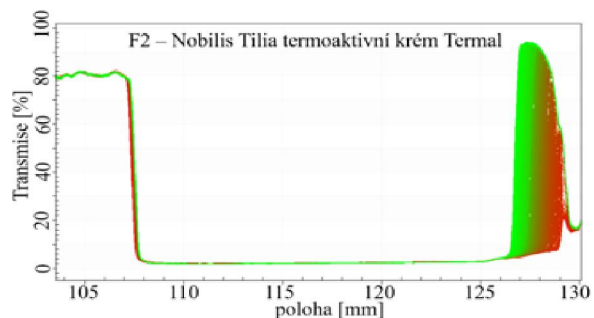
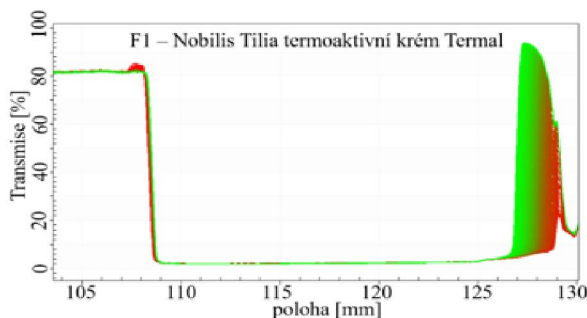
Silice z citrónové trávy 100% přírodní, Cymbopogon Flexuosus Herb Oil
Mandarinková silice, Fichema s.r.o.
Mandarinková silice 100% přírodní, Citrus reticulata Blanco oil
Pomerančová silice španělská, Fichema s.r.o.
Pomerančová silice 100% přírodní
Grapefruitová silice, Fichema s.r.o.
Grapefruitová, grepová silice 100% přírodní, silice z Citrus paradisi Macf.
Citronová silice – Lemon oil, Fichema s.r.o.
100% přírodní Silice z Citrus limon (L.) Burm.f.
Levandulová silice přírodní, Fichema s.r.o.
Levandulová silice 100% přírodní z rostliny <i>Lavandula angustifolia</i> .
Levandulový výtah, Fichema s.r.o.
Výtah z květů levandule lékařské (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.), Složení: glycerin, extraktivní látky z květu levandule, 1 kg výrobku obsahuje extrakt z 207 g květů
Skořicová silice, Fichema s.r.o.
100% přírodní skořicová silice, Cinnamomum Zeylanicum bark oil
Hřebíčková silice, Fichema s.r.o.
hřebíčková silice 100% přírodní, Eugenia Caryophyllus leaf oil
OLEJE
Meruňkový olej, Ekokoza
Prunus Armeniaca Kernel Oil
Olej z vinných hroznů, Ekokoza
Vitis Vinifera Seed Oil (rostlinný olej z hroznových jader)
Švestkový olej, Ekokoza
Olej lisovaný za studena ze švestkových semen, Prunus domestica Seed Oil
Brusinkový olej, Ekokoza
Olej lisovaný za studena, Vaccinium macrocarpan (Cranberry) Seed Oil
Moringa olej, Ekokoza
ze semen stromu Moringa oleifera, lisován za studena, INCI Moringa Oleifera Seed Oil
Opunciový olej, Ekokoza
Opuntia ficus indica Seed Oil
Buriti olej, Ekokoza
olej lisovaný za studena vyniká přirozeně vysokým obsahem beta-karotenu
Borůvkový olej, Ekokoza
ze semen Vaccinium myrtillus, druh evropských borůvek, <i>vaccinium myrtillus seed oil</i>
Třešňový olej, Ekokoza
Olej z třešňových semen lisovaný za studena, Prunus cerasus
BYLINY
Achyrocline satureioides čaj 80 g Diochi
Achyrocline satureioides se používá jako digestivum žaludku, jater a střev. Ochraňuje játra proti poškození. Zklidňuje centrální nervový systém a uvolňuje gastrointestinální svalstvo. Je vynikajícím relaxačním a tonizačním čajem s výbornou chutí.
Levandule
Všechny živé rostliny levandule byly objednány z e-shopu https://www.levandule-online.cz/ .
POTRAVINÁŘSKÉ VÝROBKY
Černý čaj s kousky květů levandule McCoy teas
Černý čaj (Srí Lanka), kousky květů levandule, modrý kukuřičný květ, přírodní aroma

bergamotu, 10x2g pyramidy
Černý čaj s aroma levandule Liran spol. s.r.o.
Čistý ceylonský černý čaj a sušená levandule s přírodně identickým levandulovým aroma.
Jahodový džem s levandulí LEVANDULAND
Jahody (50 %), cukr, levandulový macerát 5 % (lavandula augustifolia), regulátor kyselosti: kyselina citrónová, želírující látka: pektin. 50 g ovoce na 100 g výrobku, min. 60 g cukru na 100 g výrobku.
Rescue plus bonbony Fleur de Bach
Bonbony s obsahem vitamínů B5, B12, beta karotenu, směsí originálních Bach®květů RESCUE. Doplněk stravy se sladidly. Složení: sladidla (Isomalt, maltit, xylitol, stevia), voda, kyselina citronová – regulátor kyselosti, přírodní aroma pomeranče a černého bezu, pantothenan sodný (vitamín B5), kyanokobalamin (vitamin B12), směs originálních Bach® květů RESCUE®- Devaterník penízkovitý, Netýkavka žláznatá, Bílá lesní réva, Snědek okoličnatý, Slíva třešňová.
Bio raw jahoda s Levandulí Chodouňskou
BIO sušené datle, BIO sušená jablka, jádra sladkých mandlí, BIO levandulový květ, BIO levandulový prach, BIO sušené jahody 4,8 %, BIO jahodové aroma, BIO kakaové máslo 1,5 %. Může obsahovat stopy jiných skořápkových plodů a sezamu. Slazeno pouze sušeným ovocem. Bez cukru a umělých sladidel, dochucovadel, lepku, chemie.
Bylinné bonbony s meduňkou lékařskou Vitalp
Cukr, glukosový sirup, regulátor kyselosti: pufovaná kyselina mléčná a citrónová, mix dvaceti bylin 0,4 % (extrakt z heřmánku, květů měsíčku lékařského, prvosenky jarní, chrpy modré, divizny, slézu, řebříčku, bezu, lipových květů, máty peprné, jitrocelu kopinatého, listů ostružiníku, šalvěže, meduňky, eukalyptu, tymiánu, pukléřky islandské, kořene lékořice, anýzu, fenyklu), přírodní citronové aroma, přírodní aromata, extrakt z kurkumy, extrakt z meduňky 0,1 %.
Homemade cookies s levandulí chodouňskou, ručně vyráběné sušenky v bio kvalitě
BIO mouka, BIO moučkový cukr, BIO máslo, BIO bramborový škrob, BIO vejce, BIO citronová šťáva a kůra, Levandule chodouňská v BIO kvalitě

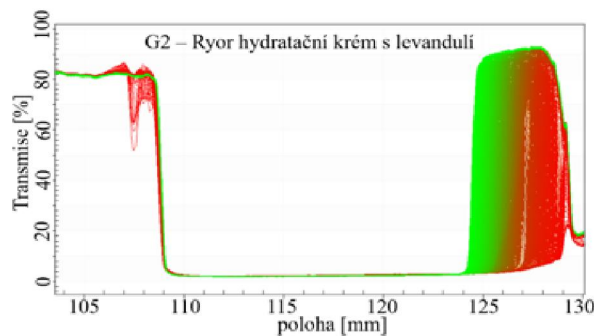
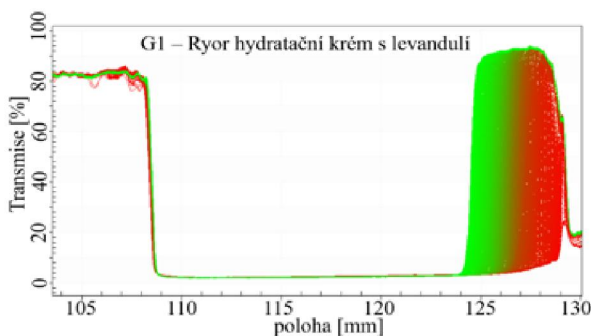
PŘÍLOHA 2: VÝSLEDKY STABILITNÍCH TESTŮ KOMERČNÍCH VÝROBKŮ A PŘIPRAVENÉ EMULZE



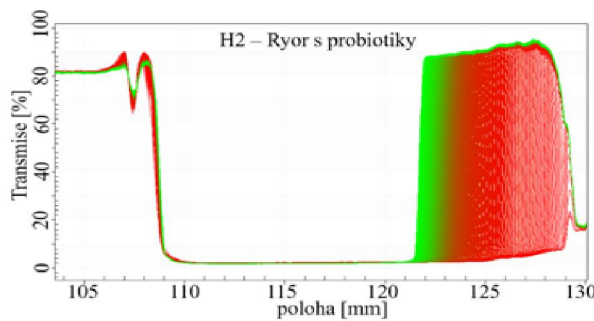
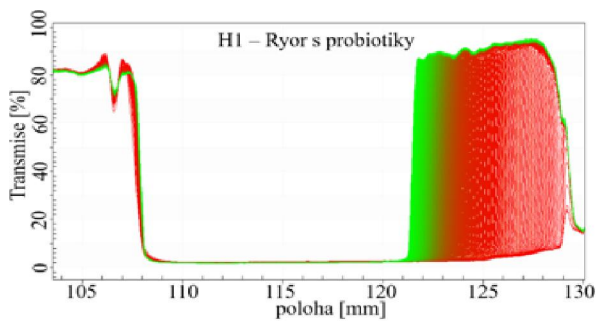
Obrázek 44: Odstředivý test - Emulze 1 - stabilní



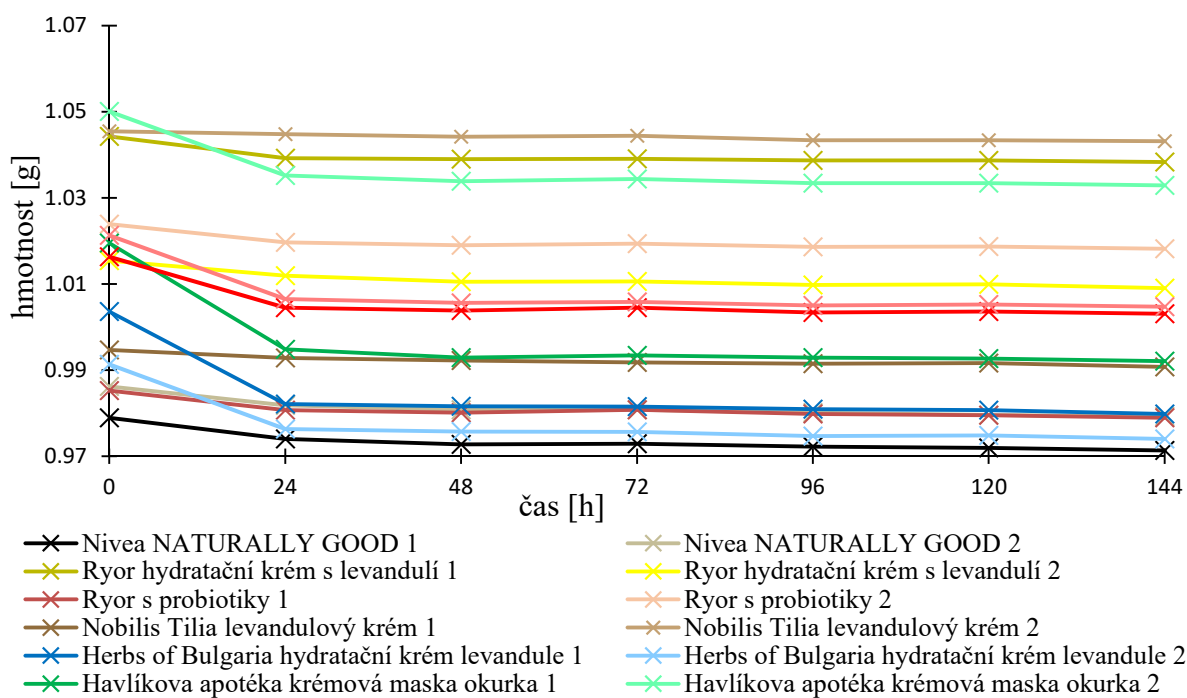
Obrázek 45: Odstředivý test - Termoaktivní krém Nobilis Tilia - nestabilní



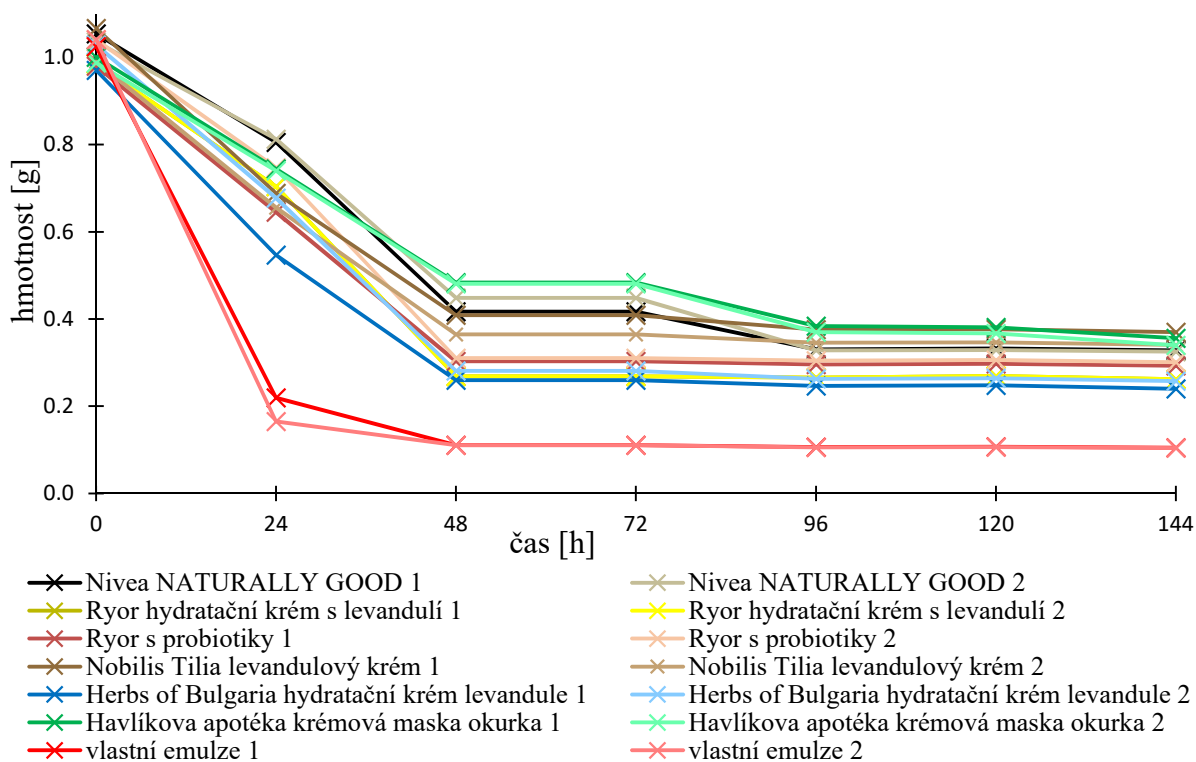
Obrázek 46: Odstředivý test - Ryor krém s levandulí - nestabilní



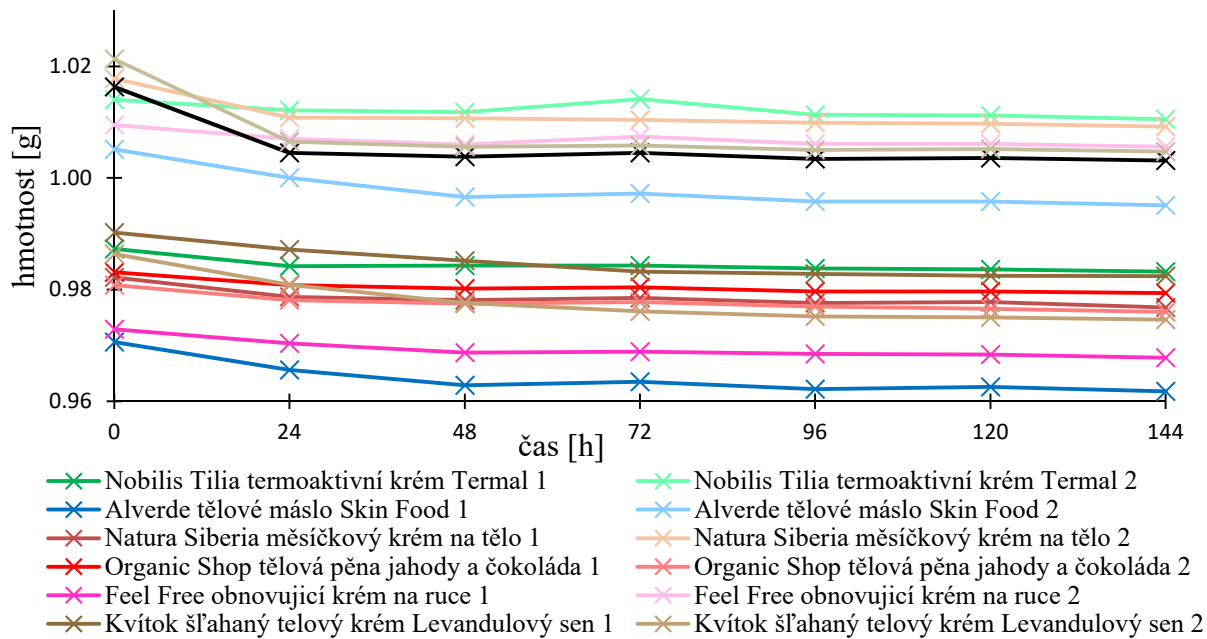
Obrázek 47: Odstředivý test - Ryor krém s probiotiky - nestabilní



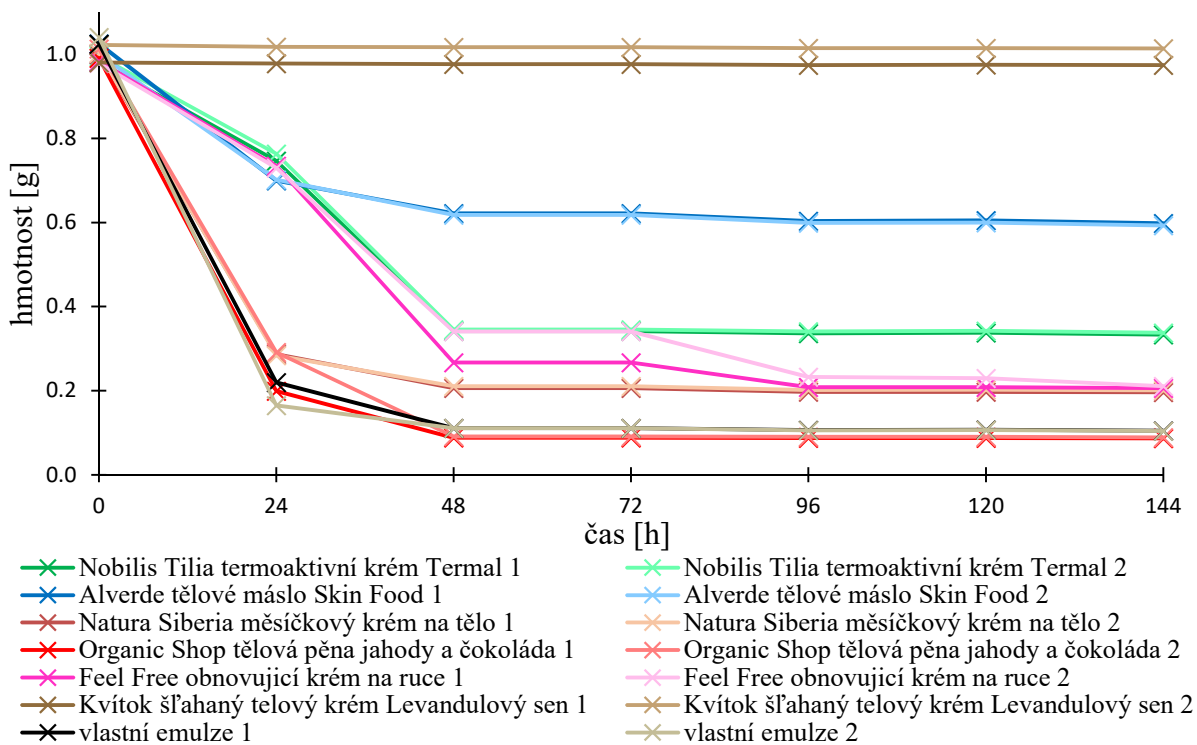
Obrázek 48: Cyklický test - závislost hmotnosti vzorků pleťových přípravků v Eppendorf zkumavkách na čase



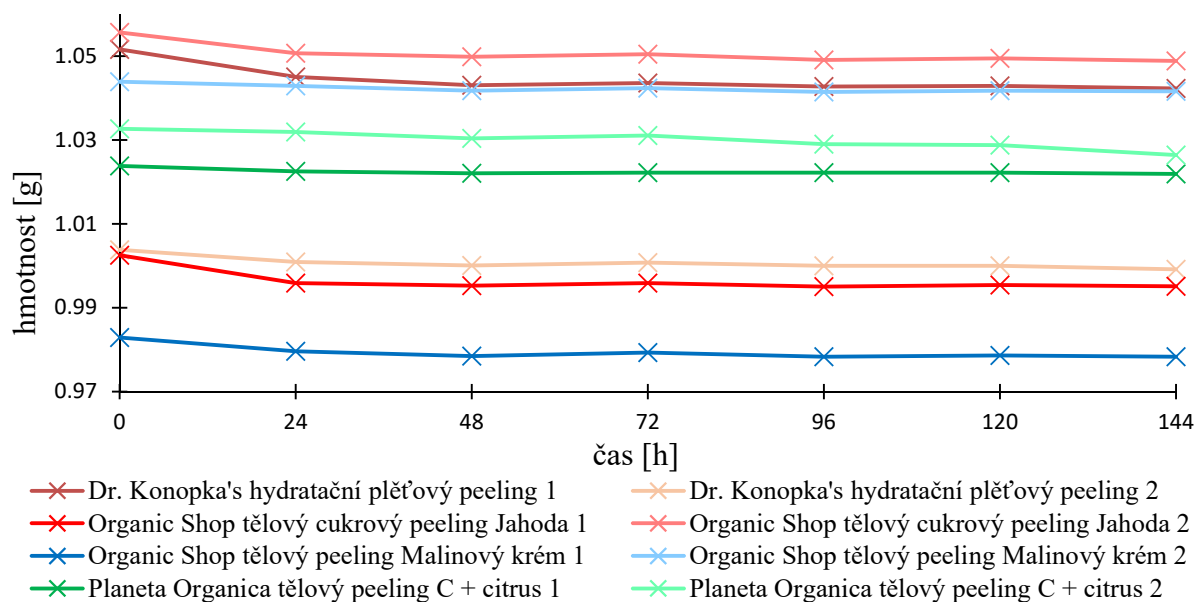
Obrázek 49: Cyklický test - závislost hmotnosti vzorků pleťových přípravků na vážících miskách na čase



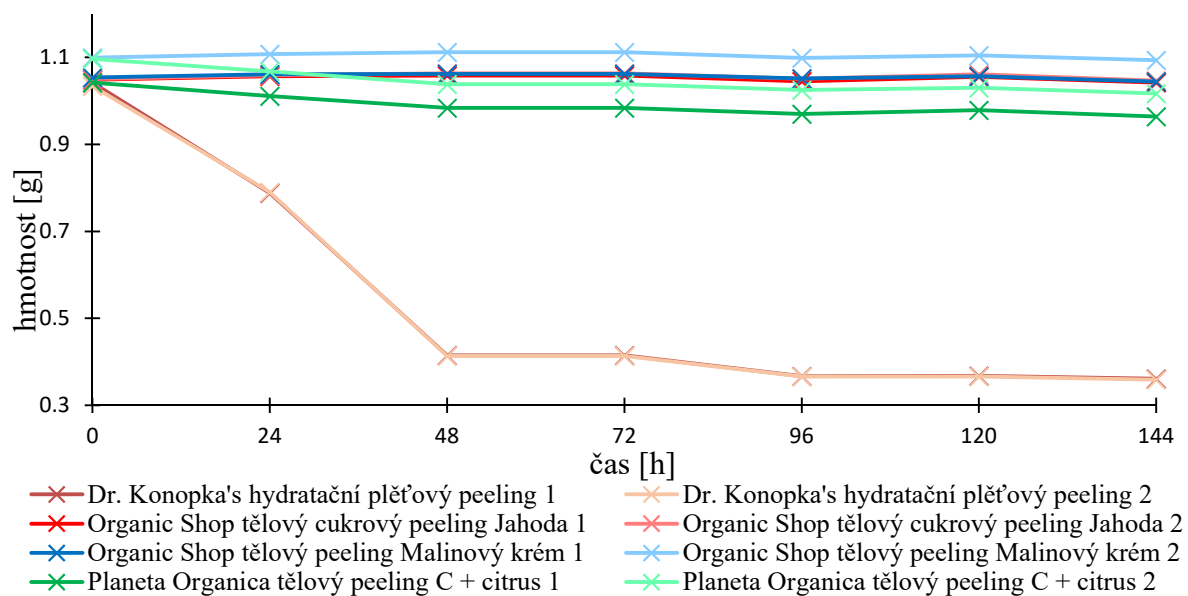
Obrázek 50: Cyklický test - závislost hmotnosti vzorků tělových přípravků v Eppendorf zkumavkách na čase



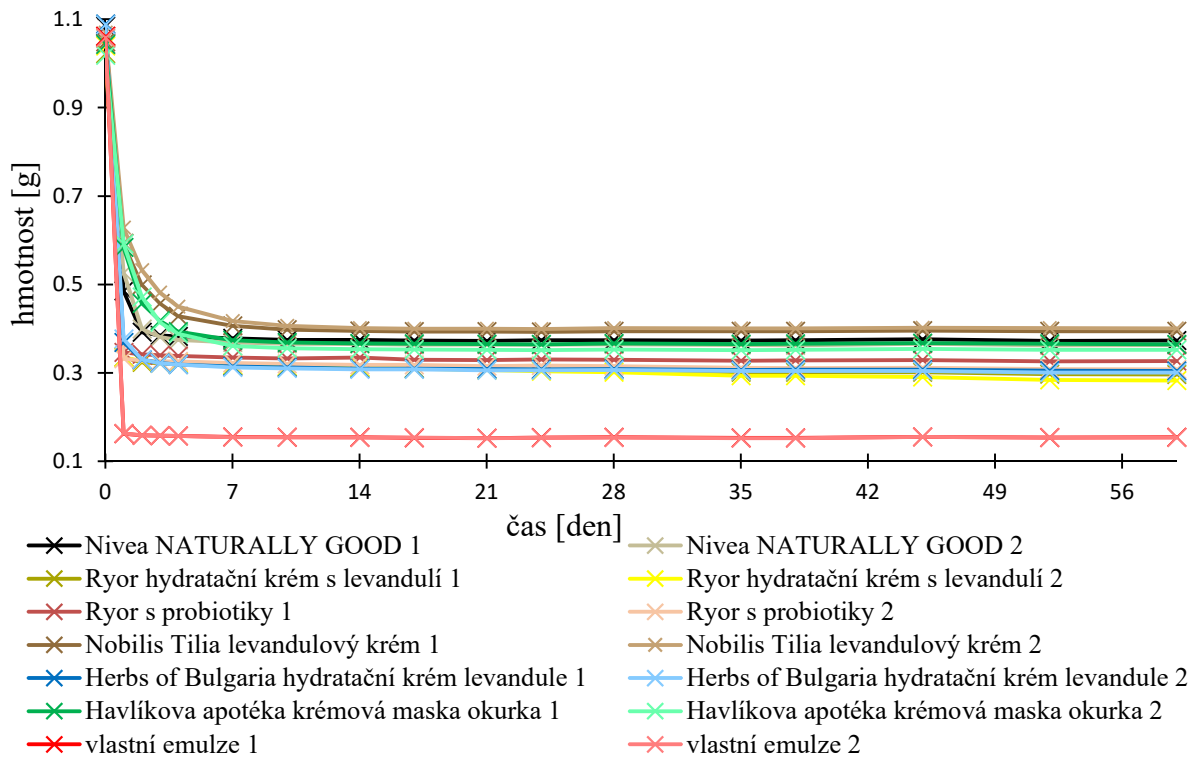
Obrázek 51: Cyklický test - závislost hmotnosti vzorků tělových přípravků na vážících miskách na čase



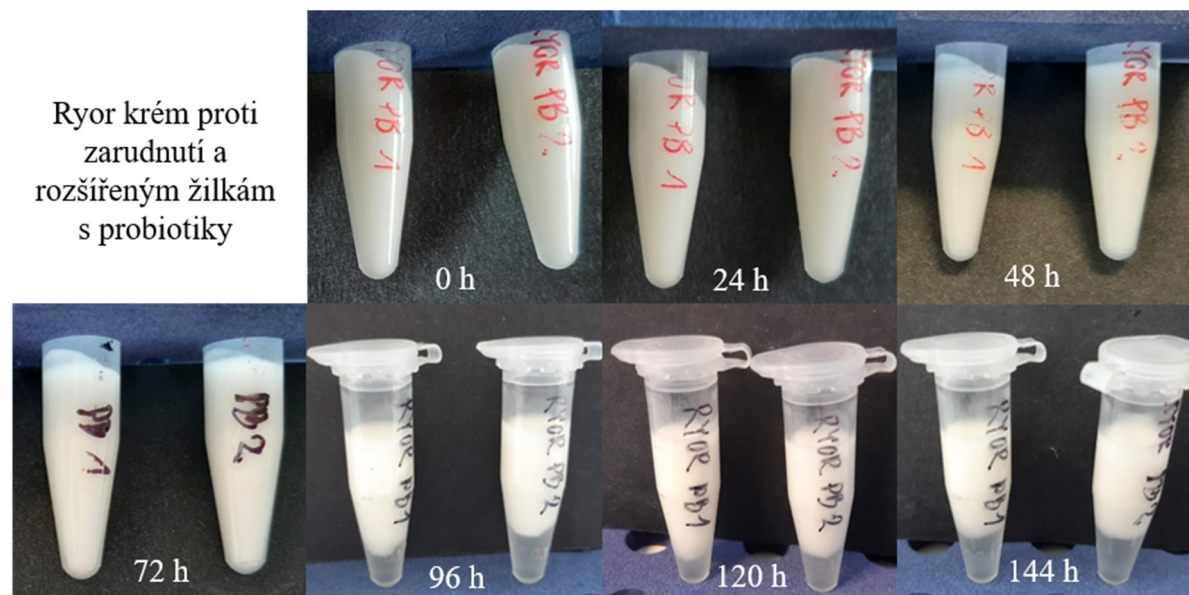
Obrázek 52: Cyklický test - závislost hmotnosti vzorků peelingů v Eppendorf zkumavkách na čase



Obrázek 53: Cyklický test - závislost hmotnosti vzorků peelingů na vážicích miskách na čase

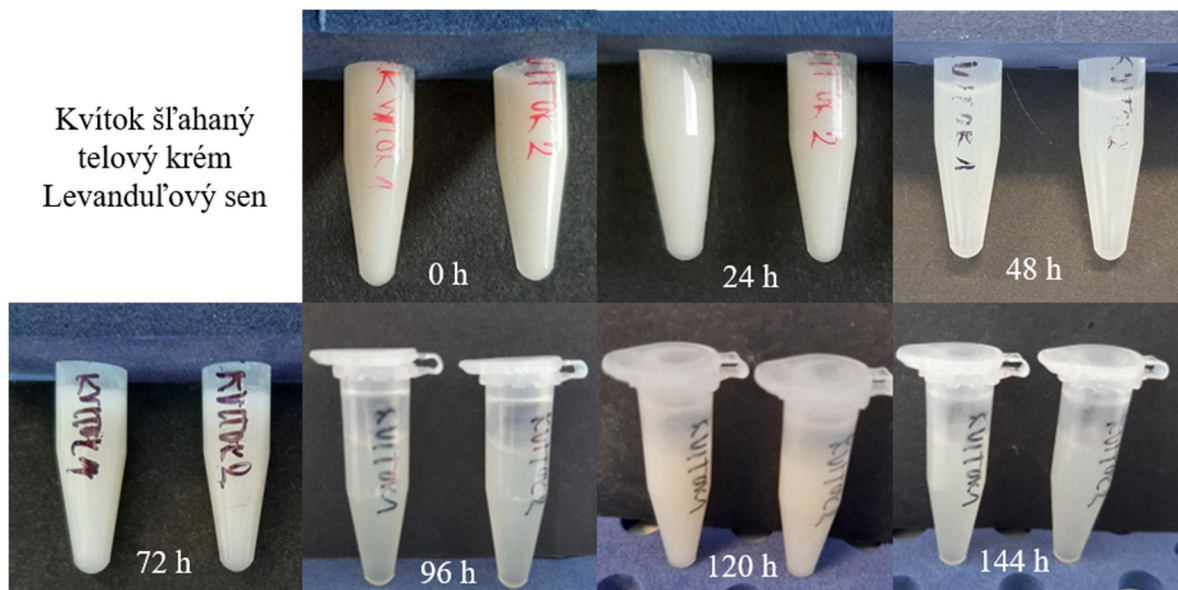


Obrázek 54: Termický test - hmotnost navážky v závislosti na čase



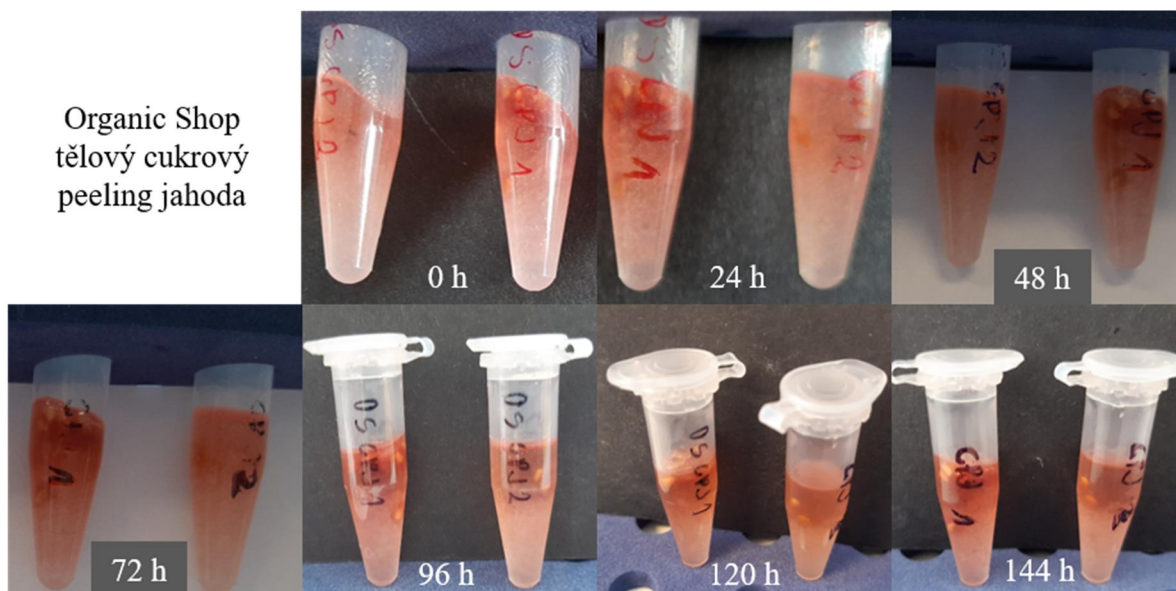
Obrázek 55: Projevy nestability krému Ryor v průběhu cyklického testu

Kvítok šľahaný
telový krém
Levandul'ový sen



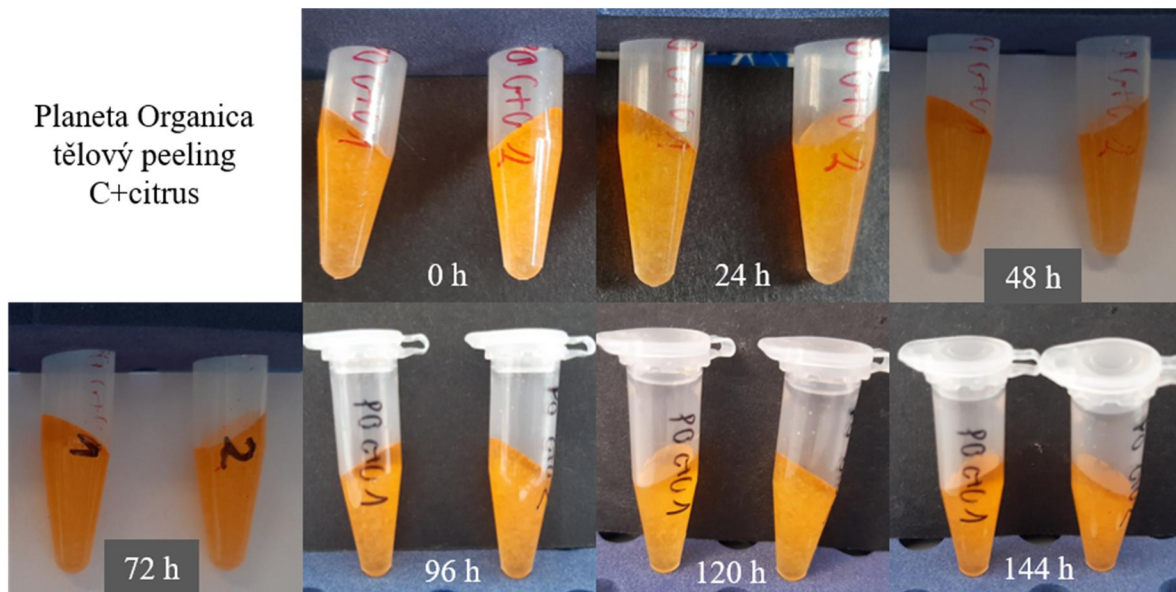
Obrázek 56. Projevy nestability krému Kvítok v průběhu cyklického testu

Organic Shop
tělový cukrový
peeling jahoda



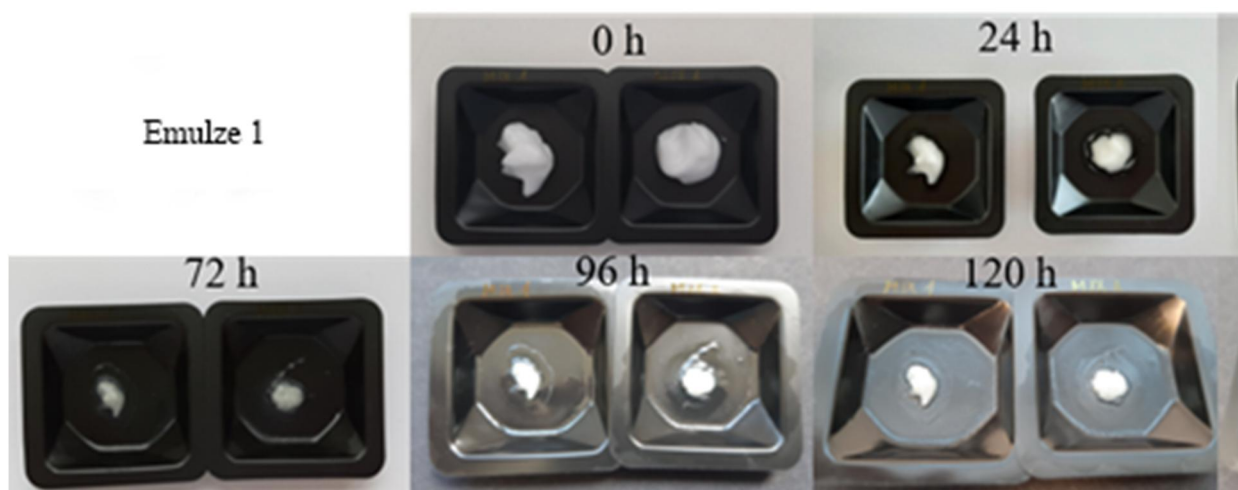
Obrázek 57: Projevy nestability peelingu Organic Shop v průběhu cyklického testu

Planeta Organica
tělový peeling
C+citrus



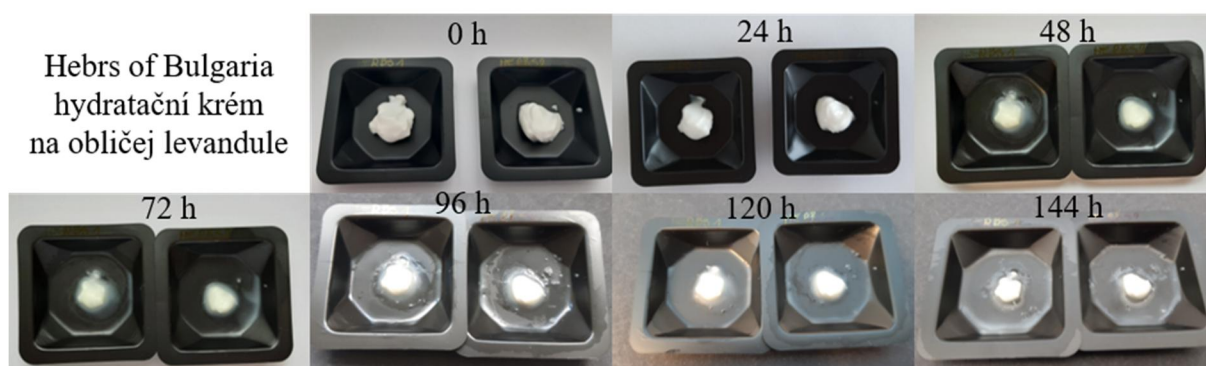
Obrázek 58: Projevy nestability peelingu Planeta Organica v průběhu cyklického testu

Emulze 1

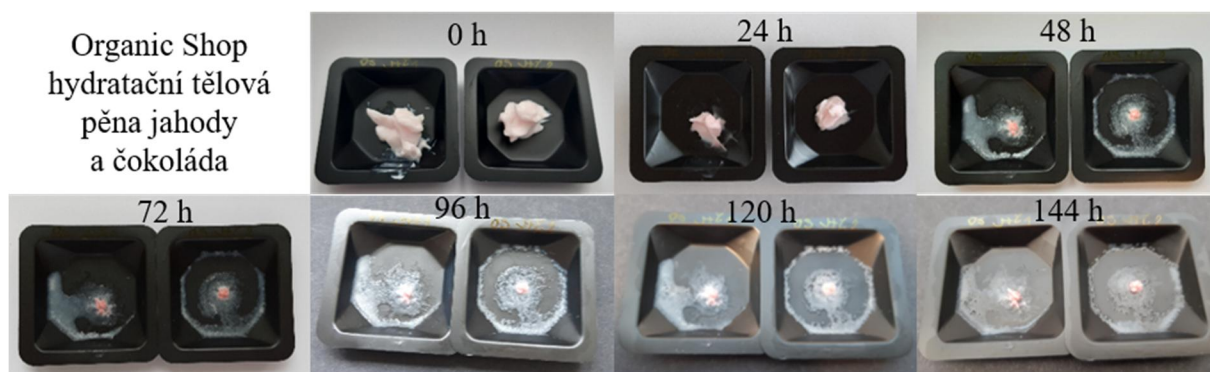


Obrázek 59: Změna hmotnosti v důsledku odparu vody v průběhu cyklického testu Emulze 1

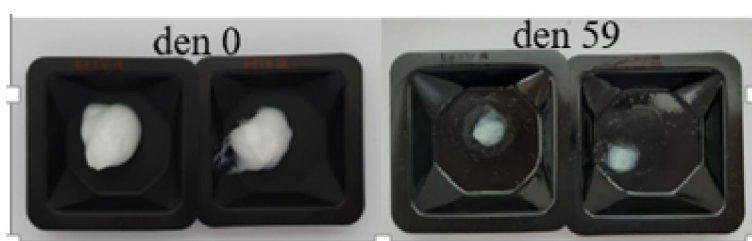
Herbs of Bulgaria
hydratační krém
na obličej levandule



Obrázek 60: Změna hmotnosti v důsledku odparu vody v průběhu cyklického testu krému Herbs of Bulgaria



Obrázek 61: Změna hmotnosti v důsledku odparu vody v průběhu cyklického testu tělové pěny Orhanic Shop



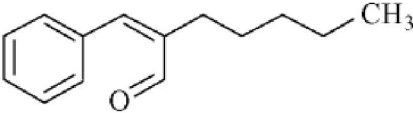
Obrázek 62: Termický test - Emulze 1



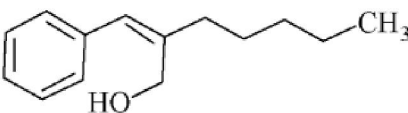
Obrázek 63: Termický test - peeling Planeta Organica

PŘÍLOHA 3: SPECIFIKACE A DOPLŇKOVÉ INFORMACE O ANALYZOVANÝCH VONNÝCH ALERGENECH

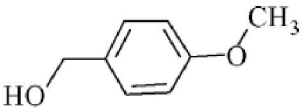
Tabulka 45: Amylcinnamal - vlastnosti [24; 135; 136]

Název dle INCI a strukturální vzorec	 <p>Amyl cinnamal (CAS: 122-40-7)</p>
Další názvy	α -amylcinnamaldehyd; α -pentyl skořicový aldehyd; 2-namyl-3-phenylpropen-2-al; α -n-amyl- β -phenyl-acrolein; 2- benzylidenheptal; α -amylzimtaldehyd; α -amylcinnamaldehyde; jasminal; jasmínový aldehyd; 2- (fenylmetylen)-heptanal; heptanal, 2-(phenylmethylene)
Vzhled a aroma	žlutá, čirá kapalina, vůně připomíná jasmín nebo lilie
Rozpustnost	Ethanol, oleje, nerozpustný ve vodě
Výskyt a použití	Přirozeně se vyskytuje v silicích květů, zejména jasmínu, také v černém čaji a sójových bobech. Díky své příjemné jasmínové vůni se velmi často používá do vonných kompozic, zejména pro parfemaci kosmetických výrobků (mýdla), čistících prostředků (aviváže) a v potravinářství (bonbóny, nealkoholické nápoje).
Výroba	Synteticky – kondenzace n-amylaldehydu s cinnamaldehydem.

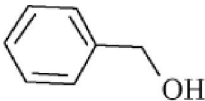
Tabulka 46: Amylcinnamylalkohol – vlastnosti [24; 137]

Název dle INCI a strukturální vzorec	 <p>Amylcinnamyl alcohol (CAS: 101-85-9)</p>
Další názvy	skořicový α -amylalkohol; α -pentylskořicový alkohol; 3- phenyl-2-pentylprop-2-en-1-ol; 2-benzylidene-1-heptanol; 2- (phenylmetylen)-1-heptanol; 2-(phenylmethylidene)heptan1-ol; 2-amyl-3-phenyl-2-propen-1-ol; (2E)-2-pentyl-3- phenyl-2-propen-1-ol; amyl cinnamic alcohol; 2-pentyl cinnamyl alcohol; Buxinol
Vzhled a aroma	Bezbarvá, čirá kapalina, vůně je lehká, květinová
Rozpustnost	Alkoholy, ve vodě nerozpustný
Výskyt a použití	Často a široce používaná vůně v kosmetickém průmyslu (dekorativní kosmetika, šampóny) a čistících prostředcích. V potravinářství využívána v cukrovinkách, nápojích a aromatizovaných čajích. V přírodě se nevyskytuje.
Výroba	Synteticky pomocí redukce α -amylcinnamaldehydu.

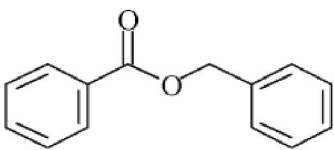
Tabulka 47: Anisylalkohol – vlastnosti [24; 138; 139]

Název dle INCI a strukturální vzorec	 <p>Anisyl alcohol (CAS:105-13-5)</p>
Další názvy	methoxybenzyl alkohol; 4-methoxybenzyl alkohol; p-Anisyl alkohol; p-methoxybenzyl alkohol; p-Anisol alkohol; 4-methoxybenzene methanol; (4-methoxyphenyl)methanol
Vzhled a aroma	Bezbarvá nebo nažloutlá kapalina, výjimečně pevná látka, květinová až ovocná vůně připomínající broskve
Rozpustnost	alkoholy, nerozpustný v parafinovém oleji a ve vodě
Výskyt a použití	V přírodě se vyskytuje v květech hyacintů, jabloní, meruněk, banánů, karafiátů, hroznů, v anýzu, medu a vanilce. Nalézt ho můžeme také semínečkách anýzu, medu nebo vanilkových luscích. V kosmetických výrobcích se používá v rámci vonných kompozic (např. šeříku, broskve, fíků). Lze ho nalézt v drahých parfémtech, krémech, pudrech, ale i vonných svíčkách, detergentech, šamponech, atd. V potravinářství se přidává do nápojů a bonbonů.
Výroba	Nejčastěji redukcí anisaldehydu

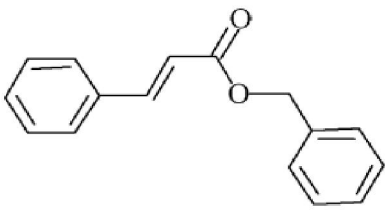
Tabulka 48: Benzylalkohol - vlastnosti [24; 140]

Název dle INCI a strukturální vzorec	 <p>Benzyl alcohol (CAS: 100-51-6)</p>
Další názvy	fenylmethanol; benzenemethanol; phenylcarbinol; phenylmethanol; α-hydroxytoluene; alcoholum benzylicum
Vzhled a aroma	Čirá bezbarvá kapalina, vůně příjemná, nasládlá, ovocná
Rozpustnost	Voda, mísitelný s ethanolem, chloroformem, éterem
Výskyt a použití	V přírodě se nachází v jasmínu, pomerančových květech, tabáku, čaje, ylangylang, v čerstvých jablcích a meruňkách, v oleji z mandarinkové kůry, v jahodách, borůvkách, malinách a dalších rostlinách. Používá se v potravinářství, kosmetických přípravcích i léčivech. V kosmetickém průmyslu se používá jako konzervační látka nebo rozpouštědlo pro želatinu, kasein nebo šelak. Dále také do vonných kompozic typu jasmín, šeřík, hyacint, karafiát a jako rozpouštědlo pevných vonných látek. Průmyslově se používá např. jako rozpouštědlo při výrobě barev. Ve farmaceutickém průmyslu se používá jako konzervant např. pro roztoky aplikované v dutině ústní. V potravinářství se využívá jako aditivum v bonbónech nebo sirupech, ovocných nápojích a do aromat peckového ovoce.
Výroba	Z benzylchloridu působením uhličitanu sodného nebo draselného.

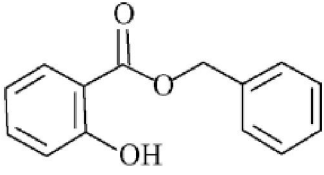
Tabulka 49: Benzylbenzoát – vlastnosti [24; 141]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 <p>Benzyl benzoate (CAS: 120-51-4)</p>
Další názvy	Benzyl ester kyseliny benzoové; fenylmethylbenzoát; benzylbenzoát; benzyl benzenecarboxylate; Malathion; Scabicide; Venzonate; Ascabiol; Novoscabin; Scabitox; Benylate; Peruscabin; Scabiozon; Quassia; Colebenz; Scabanca; Ascabin; Vanzoate
Vzhled a aroma	Bezbarvá viskózní kapalina, lehká balsamická vůně připomínající mandle
Rozpustnost	mísitelný s ethanolem, etherem, dichlormethanem, mastnými oleji, nerozpustný ve vodě a glycerinu
Výskyt a použití	Přirozeně se vyskytuje v Peru balzámu a květech hyacintu, ylang-ylang, skořici, heřmánku, papáji a mnoha dalších. V kosmetice je součástí parfémovaných produktů (voda po holení, pěna do koupele, čistící přípravky na pelt, deodoranty, šampony, kondicionéry, krémy, rtěnky). Ve farmaceutickém průmyslu se používá jako ektoparazitikum k léčbě svrabu. V potravinářství je používán jako stabilizátor syntetických příchutí. Dále je součástí aromat a původce hořkosladké chuti.
Výroba	Esterifikace benzoátu sodného a benzoylchloridu nebo reakcí benzylátu sodného s benzaldehydem

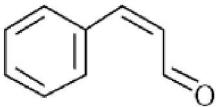
Tabulka 50: Benzylcinnamát – vlastnosti [142; 143; 24; 144]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 <p>Benzyl cinnamate (CAS: 103-41-3)</p>
Další názvy	Benzylester kyseliny skořicové; phenylmethyl 3- phenylprop-2-enoate; benzyl-3-phenylprop-2-enoate; benzyl beta-phenyl acrylate; benzyl-3-phenyl propenoate; Cinnamein
Vzhled a aroma	Bílá až žlutá krystalická látka, při laboratorní teplotě taje, vůně je sladká, těžká, připomíná balzamico
Rozpustnost	etanol, oleje, nerozpustný v glycerinu, propylenglykolu
Výskyt a použití	Vyskytuje se v přírodních komplexních látkách. Široce využíván v kosmetice (krémy, mýdla, voda po holení, pěny do koupele, kondicionéry, šampony, deodoranty). Přidává se do detergentů a čistících prostředků. Přidává se do těžkých sladkých aromat. Schválen jako ochucovadlo vhodné pro použití v potravinářství.
Výroba	Extrakcí z propolisu, nebo listů Oxalis pes-caprae, esterifikace kyseliny skořicové

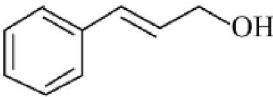
Tabulka 51: Benzylsalicylát – vlastnosti [145; 146; 24]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 Benzyl salicylate (CAS: 118-58-1)
Další názvy	benzyl salicylát; benzyl ester kyseliny salicylové; benzyl-2-hydroxybenzoát; phenylmethyl ester 2-hydroxybenzoic acid; benzyl-2-hydroxybenzoát; salicyl acid benzyl ester; salicyläurebenzylester
Vzhled a aroma	Bezbarvá až světle žlutá látka, sladká vůně
Rozpustnost	Etanol, oleje, nerozpustný v glycerinu a propylenglykolu
Výskyt a použití	Lze ho nalézt v dekorativní kosmetice, mýdlech, šamponech a opalovacích krémech. Dále v čistících prostředcích a svíčkách. V léčivech je přítomen díky svému antipyretickému a analgetickému účinku. Je přidáván do potravin jako ochucovadlo a vonná látka.
Výroba	V přírodě se vyskytuje v esenciálních olejích jasmínu a ylang ylang. Synteticky esterifikací kyseliny salicylové benzylalkoholem.

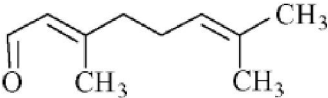
Tabulka 52: Cinnamal – vlastnosti [24; 147]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 Cinnamal (CAS: 104-55-2)
Další názvy	skořicový aldehyd; trans-3-phenyl-2-propenal; βphenylacrolein; 3-fenylprop-2-enal; 3-phenyl-2-propenal; fenyl-2-propenal
Vzhled a aroma	Žlutá kapalina, vůně skořicová, chuť skořicová
Rozpustnost	mísitelný s éterem, etanolem a oleji, nerozpustný ve vodě
Výskyt a použití	Vyskytuje se přirozeně ve skořici, hřebíčku, meduňce, medu, čaji. Přidává se do kosmetických výrobků (zubní pasty, ústní vody), čistících prostředků a aviváží. V potravinářství je součástí kořenících směsí, žvýkaček, ovocných zmrzlin a nápojů.
Výroba	Izolací i přírodních zdrojů, synteticky kondenzací benzaldehydu a acetaldehydu

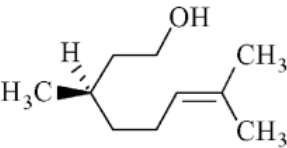
Tabulka 53: Cinnamylalkohol – vlastnosti [24; 148]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 Cinnamyl alcohol (CAS: 104-54-1)
Další názvy	skořicový alkohol; 3-phenyl-2-propen-1-ol; 3-fenylprop-2-en-1-ol; γ -phenylallyl alcohol; Styron; fenyl-2-propenol; Styryl carbinol; Zimtalkohol
Vzhled a aroma	Bílá až žlutá pevná látka, květinová až skořicová vůně, hořká chuť
Rozpustnost	Oleje, etanol, málo rozpustný ve vodě
Výskyt a použití	Přírodně se vyskytuje ve skořicové silici z kůry i listů, také v hyacintových květech a narcisovitých rostlinách a v peruánském balzámu. Vyskytuje se také, že se nachází v ovoci (třešních, citrusy, fíky, meloun, mučenka, malina, ostružina, borůvka, guava), oleji z citronové kůry, listech kasie a bourbonské vanilce. Široce využíván jako vonná látka v parfemované kosmetice. V potravinářství se přidává do nápojů a bonbonů.
Výroba	Saponifikací balzámu storax. Synteticky ze styrenu nebo redukcí cinnamaldehydu hydroxidem sodným nebo draselným.

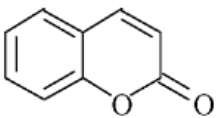
Tabulka 54: Citral – vlastnosti [24; 149]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 Citral (CAS: 5392-40-5)
Další názvy	3,7-dimethyl-2,6-octadienal; 3,7-dimethylokta-2,6-dienal; Geranial; Lemonal; Geranialdehyde
Vzhled a aroma	Olejovitá nažloutlá kapalina, vůně citronová, chuť hořká
Rozpustnost	Etanol, propylenglykol, oleje, nerozpustný v glycerolu, málo rozpustný ve vodě
Výskyt a použití	Vyskytuje se ve dvou izomerech – geranial a neral. Prodává se jako směs obou. Geranial je obsažen v citrusových plodech (až 80 % v citronové silici).. Nachází se v meruňce, šalvěji, zázvoru, hroznu, grapefruitu, citronu, limetce, mandarince, pomeranči, malině, švestce, mandarince a čaji. Přidává se do mnoha výrobků jako vonná látka, např. citrusové oleje, parfémy, kolínské vody, insekticidy. V potravinářství se přidává do čajových směsí, nápojů, sýrů, žvýkaček, omáček a dalších aromatizovaných výrobků.
Výroba	Izolace ze silic <i>Cymbopogon citratus</i> (citronová tráva) a <i>Litsea cubeba</i> (vavřín). Synteticky chemickou syntézou (z β -pinenu, isoprenu,...).

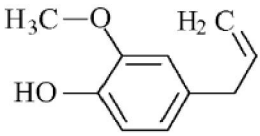
Tabulka 55: Citronellol – vlastnosti [24; 150]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 <p>Citronellol (CAS: 106-22-9)</p>
Další názvy	3,7-dimethyl-6-octen-1-ol; 2,6-dimethyl-2-octen-8-ol; 3,7-dimethylokt-6-en-1-ol; 3,7-dimethyl-6-okten-1-ol; Cefrol; Rhodinol; Cephrol, dihydrogeraniol
Vzhled a aroma	Bezbarvá kapalina, aroma květů růží
Rozpustnost	Mísitelný s etanolem a petrolejem, ve vodě nerozpustný
Výskyt a použití	<p>Přírodně se vyskytuje v rostlinných olejích, čeném čaji a ovoci (zejména citrusy). Jsou známy 2 izomery, pravotočivá varianta (+) je přítomna např. v Jávském oleji. V levotočivé variantě (-) je přítomen v růžovém a geraniovém oleji. Bulharský růžový olej obsahuje více než 50 % l-citronellolu. Vyskytuje se v plodech guava, pomeranči, borůvkách, černém rybízu, muškátovém oříšku, zázvoru, čaji, semenech koriandru, kardamomu.</p> <p>V kosmetickém průmyslu se používá do parfémových kompozic, krémů, šamponů, mýdel a dalších. V potravinářství se využívá k ochucování nápojů a čajových směsí, a přidává se do nápojů, žvýkaček, bonbonů.</p>
Výroba	Destilace listů rostlin (např. Cymbopogon winterianus). Synteticky dl-citronellol lze připravit katalytickou hydrogenací geraniolu nebo oxidací allo-cyrnenu; l-citronellol se připravuje z (+) d-pinenu.

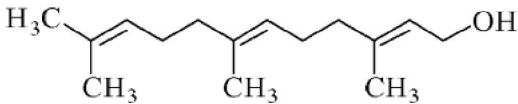
Tabulka 56: Kumarin – vlastnosti [24; 151]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 Coumarin (CAS: 91-64-5)
Další názvy	γ -lakton kys. 3-(2-hydroxyfenyl)-2-propenové; anhydrid kys. o-kumarové; 3-(2-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid deltalacton; 2H-1-benzopyran-2-one; 2-oxo-1,2-benzopyran; 1,2- benzopyrone; 2H-benzo(beta)pyran-2-one
Vzhled a aroma	Lesklá krystalická látka bílé barvy, vůně podobná vanilce
Rozpustnost	Etanol, voda, alkoholy, eter, chloroform
Výskyt a použití	<p>Přírozně se vyskytuje ve formě glykosidu v některých rostlinách (Mařinka vonná, Tomka vonná, Routa vonná, Vstavač nachový, Komonice lékařská a další). Dále byl jeho výskyt potvrzen v čaji, medu, šlavi a dalších. V kosmetice se používá jako fixativum vůně, do parfémových kompozic s vůní levandule, sena a heliotropu. Dále je přidáván do mýdla a deodorantů. V potravinářství se používá do aromatizovaných alkoholických nápojů, např. Zubrowka a mařinkové víno (macerát Tomky vonné ve víně).</p> <p>V čisté formě je jeho přidávání do potravin zakázané.</p>
Výroba	Synteticky ze salicylového aldehydu působením anhydridu kyseliny octové a octanu sodného.

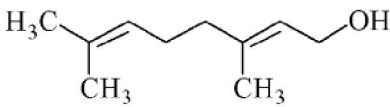
Tabulka 57: Eugenol – vlastnosti [24; 152]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 <p>Eugenol (CAS: 97-53-0)</p>
Další názvy	4-allylbenzkatechin-2-methyläther; 4-hydroxy-3-methoxy-1-allylbenzol; 4-allylkatechol-2-methyl ether; 4-allyl-2-methoxyphenol; 2-methoxy-4(2-propenyl)-phenol; 4-allyl-2-methoxy phenol caryophyllic acid; 1-hydroxy-2-methoxy-4-prop-2-enylbenzene; 4-allylguajakol; Eugenol; 4-Allylguaiacol
Vzhled a aroma	Bezbarvá až nažloutlá kapalina, aroma připomíná hřebíček a koření
Rozpustnost	Etanol, chloroform, ether, olej, nerozpustný ve vodě
Výskyt a použití	Lze ho nalézt v hřebíčkovém a vavřínovém oleji, a v květech fialek. Vysoké množství eugenolu lze nalézt v Ocimum sanctum a Ocimum gratissimum. Dále se vyskytuje v meruňkách, citrusových olejích, malinách, jahodách, rajčatech, anýzu, skořici, hřebíčku, mangu, estragonu, vavřínu, myrtě a celé řadě dalších látek. Má antibakteriální, antiseptické a analgetické účinky. Přidává se do ústních vod a do orientálních a karafiátových parfémových směsí. V potravinářství ho lze nalézt v kořenících směsích, pudinku, bonbonech, žvýkačkách a nápojích. Používá se při výrobě vanilinu.
Výroba	Alkalická extrakce silice hřebíčku.

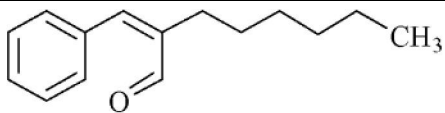
Tabulka 58: Farnesol – vlastnosti [153; 24]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 <p>Farnesol (CAS: 4602-84-0)</p>
Další názvy	3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol; 2,6,10-dodecatrien-1-ol
Vzhled a aroma	Čirá bezbarvá kapalina, květinová vůně
Rozpustnost	Etanol, oleje, ve vodě nerozpustný
Výskyt a použití	Přírodně se vyskytuje ve více než 30 esenciálních olejích, ale množství farnesolu jsou poměrně nízká. Nachází se v citronové trávě, semenech ambrette, ylang-ylang, peruánském balzámu, atd. Dále se v malém množství nachází v meruňkách, olejích z citrusové kůry, grapefruitové šťávy, jahodovém džemu, zázvoru, hřebíčku, kardamonu, zázvoru, tymiánu, bazalce, papáje, anýzových semínkách atd. Často je přidáván do kosmetických výrobků (mýdly, parfémy, deodoranty). Používá se do vonných kompozic banánu, meruňky, broskve, maliny a rybízu. V potravinářství se přidává do nápojů, pudinků, bonbonů.
Výroba	Výchozím materiálem je strom cabreuva (švýcarský patent 261,120-Givaudan and Co.) nebo semena ambrette (německý patent 149, 603-Haarmann and Reimer)

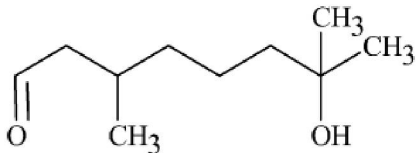
Tabulka 59: Geraniol – vlastnosti [154; 155; 24]

Název dle INCI a strukturální vzorec	 Geraniol (CAS: 106-24-1)
Další názvy	geraniový olej; 6-cis-2,6-dimethyloctadien-2,6-ol-8; 3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol; 2,6-dimethyl-2,6-octadien-8-ol; (2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-ol; Lemonol
Vzhled a aroma	Bezbarvá kapalina, květinová vůně (růže)
Rozpustnost	Etanol, éter, nerozpustný ve vodě
Výskyt a použití	<p>Vyskytuje se ve více než 160 esenciálních olejích (citronová tráva, ylang-ylang, kosatec, levandule, jasmín, koriandr, myrha, eukalyptu, limetka, mandarinka, citron, pomeranč). Nachází se též v jablečné šťávě, citrusové kůře, borůvkách, brusinekách, skořici, zázvoru, čaji, medu, švestkách, kardamomu, rozmarýnu, šalvěji a heřmánkovém oleji.</p> <p>Má mírné antiseptické účinky, proto je přidáván do krémů a stomatologických přípravků. Je přidáván do aromat anasu, jablka, meruňky nebo broskve.</p> <p>V potravinářství se přidává do nápojů, pudinků, bonbonů.</p>
Kontaktní alergie	Sám o sobě slabý senzibilizátor, oxidací v vzduchu vznikají vysoce alergenní sloučeniny.
Výroba	Frakční destilace esenciálních olejů bohatých na geraniol.

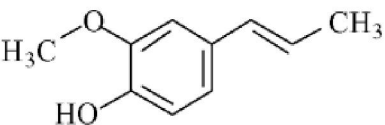
Tabulka 60: Hexylcinnamal – vlastnosti [24; 156]

Název dle INCI a strukturální vzorec	 Hexyl cinnamal (CAS: 101-86-0)
Další názvy	α -hexylcinnamaldehyde; 2-hexyl-3-fenyl-2-propenal; 2-benzylidenoktanal; α -n-hexyl- β -phenyl acrolein; caproaldehyde; octanal, 2-(phenylmethylene); HCA
Vzhled a aroma	nažloutlá kapalina, jemná jasmínová vůně
Rozpustnost	Nerozpustný ve vodě, mísitelný s etanolem a oleji
Výskyt a použití	<p>Široce využíván v kosmetických výrobcích např. antiperspiranty, šampony, mýdla, aviváže, pěny do koupele, parfémy. Také se přidává do aromat.</p> <p>V potravinářství se vyskytuje v nealkoholických nápojích a bonbonech. Byl nalezen v červeném víně.</p>
Výroba	Kondenzace benzaldehydu a oktanal

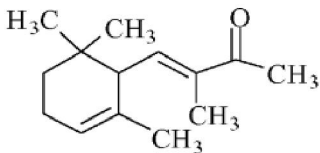
Tabulka 61: Hydroxycitronellal – vlastnosti [24; 157]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 Hydroxy-citronellal (CAS: 107-75-5)
Další názvy	3,7-dimethyl-7-hydroxyoctanal; 7-hydroxy-3,7- dimethylcatn-1-al; Lavrine; Hydronal; Cyclosia; Majal
Vzhled a aroma	Bezbarvá kapaliny, sladká květinová vůně (lilie)
Rozpustnost	Etanol, oleje, propylenglykol, nerozpustný v glycerinu
Výskyt a použití	Syntetická látka (i přes to byl nedávno nalezen i v pepři), používá se ke korekci a zesílení aroma parfemovaných výrobků, např. kolínské vody, mýdla, parfémy, osvěžovače vzduchu, insekticidy. Je přidávána zejména k vůním květů (konvalinky, lilie, lípa, magnóie,...) a do aromat (med, lípa). V potravinářství přidáván do nápojů, ovocných zmrzlin, cukrovinek a žvýkaček.
Výroba	Synteticky hydratací citronellalu.

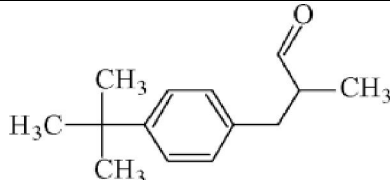
Tabulka 62: Izoegenol – vlastnosti [24; 158]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 Isoeugenol (CAS: 97-54-1)
Další názvy	4-hydroxy-3-methoxy-1-propenylbenzene; 4-propenylbrenzcatechin-2-methyl)äther; 4-propenylguajacol; 2- methoxy-4-propenylphenol; 4-hydroxy-3-methoxypropenylbenzol; 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)fenol
Vzhled a aroma	Viskózní kapalina, světle žlutá, květinová vůně
Rozpustnost	Oleje, éter, etanol, nerozpustný v glycerinu
Výskyt a použití	V přírodě je přítomen ve dvou formách, cis a trans. Přirozeně se vyskytuje v esenciálních olejích (ylang-ylang, muškátový oříšek). Dále se vyskytuje v borůvce, guavě, ostružinách, rajčatech, skořici, hřebíčku čaji, kávě, švestce, kopru, sladovce, květu černého bezu. Přidává se do kosmetiky pro korekci vůně, např. výrobky pro dentální hygienu. V potravinářství je přidáván do aromatizovaných čajů a kořenících směsí.
Výroba	Alkalickou izomerizací eugenolu.

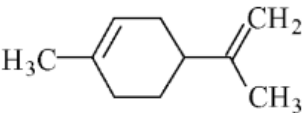
Tabulka 63: alfa-isomethylionon – vlastnosti [159; 24]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 <p>Alpha-isomethyl ionone (3-Methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one) (CAS: 127-51-5)</p>
Další názvy	1-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohex-2-enyl)pent-1-en-3-one; (4E,6E)-7,11-dimethyldodeca-4,6,10-trien-3-one; Cetone alpha; Methyl ionone gamma coeur
Vzhled a aroma	Bezbarvá až nažloutlá kapalina, jemná vůně připomínající fialky
Rozpustnost	Alkoholy, nerozpustný ve vodě
Výskyt a použití	Syntetická látka, v přírodě se nevyskytuje. Často se mísí s dalšími vonnými substancemi. Je součástí květinových parfémových kompozic a aromat. V potravinářství se přidává do nealkoholických nápojů, žvýkaček a cukrovinek.
Výroba	Synteticky z citralu a ethylmethylketonu

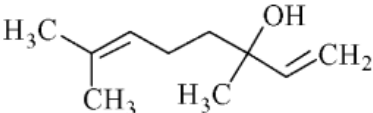
Tabulka 64: Lilial – vlastnosti [156; 160]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 <p>Lilial[®] (2-(4-tert-butylbenzyl)propionaldehyde) (CAS: 80-54-6)</p>
Další názvy	Butylphenyl Methylpropional; 2-(4-tercbutylbenzyl)propanal; 3-(4-tert-butylphenyl)butanal; 4-(dimethylethyl-α-(1,1-methyl) benzene propanal; Lilestralis; Lysmeral; Lilyall; Mefloral
Vzhled a aroma	Olejevité kapalina, bezbarvá nebo nažloutlá, květinová vůně
Rozpustnost	Alkoholy, parafinový olej, omezeně ve vodě
Výskyt a použití	V přírodě se nevyskytuje, vyrábí se synteticky. Lze ho nalézt v parfémeh s květinovou vůní (lilie, konvalinka, lípa). Přidává se také do kosmetických výrobků (mýdla, šampony, detergenty).
Výroba	Synteticky z p-terc-butylbenzaldehydu a propanalu
Poznámka	Dle nařízení Evropské komise 2021/1902 (příloha II – zakázané látky v kosmetických přípravcích) je zakázáno jeho používání v kosmetických výrobcích na evropském trhu z důvodu klasifikace této látky jako CMR:Repr.2, H361 – podezření na poškození reprodukční schopnosti nebo plodu v těle matky. Tím už tedy látka není řazena do přílohy III – seznam látek s omezeným použitím 1223/2009. Zákaz uvádění výrobků s touto látkou na trh nabyl účinnosti 1.3.2022. [161]

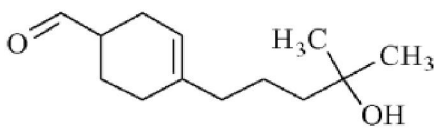
Tabulka 65: Limonen – vlastnosti [162; 24]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 <p>Limonene (CAS: 5989-27-5)</p>
Další názvy	D-limonen; D-limonene; 1-methyl-4-prop-1-en-2-yl cyclohexene; (4R)-1-methyl-4-prop-1-en-2-yl cyclohexene; Meadione; Carvene; Dextro-limonene; (R)- 1-methyl-4-(1-methyl ethenyl) cyclohexene; (R)-1-methyl-4-isopropenyl-1-cyklohexan; (R)-p-mentha-1,8-diene
Vzhled a aroma	Bezbarvá kapalina, citrusová vůně
Rozpustnost	Alkoholy, oleje, málo rozpustný v glycerolu, nerozpustný ve vodě a propylenglykolu
Výskyt a použití	V přírodě je velmi rozšířený, lze ho nalézt ve více než 300 esenciálních olejích, zejména v mandarinkách, pomerančích, citrónech. Vyskytuje se také v zázvoru, muškátovém oříšku, pepři, muškátu, chmelovém oleji, semenech koriandru, kopru, kmínu, rozmarýnu a dalších. D-forma je nejrozšířenější, následuje racemická forma a poté l-limonen. V potravinářství se vyskytuje v nápojích, žvýkačkách a bonbonech.
Výroba	Destilace kůry a dužiny citrusových plodů.

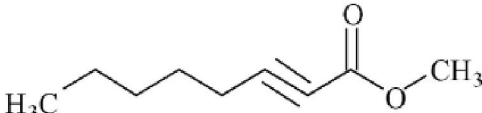
Tabulka 66: Linalol – vlastnosti [163; 24; 164]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 <p>Linalool (CAS : 78-70-6)</p>
Další názvy	3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol; 3,7-dimethyl-3-hydroxy-1,6-octadiene; Allo-ocimenol; 2,6-dimethyl octa-2,7-dien-6-ol; (3S)-3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol
Vzhled a aroma	Bezbarvá kapalina, příjemná květinová vůně
Rozpustnost	Etanol, alkoholy, oleje, propylenglykol, Oleje, parafinový olej, nerozpustný ve vodě a v glycerinu
Výskyt a použití	<p>Přírodně se vyskytuje ve dvou opticky aktivních formách, l-forma je přítomna v 80 až 85 % v destilátech z listů <i>Cinnamomum camphora</i> var. <i>orientalis</i> a <i>Cinnamomum camphora</i> var. <i>Occidentalis</i>. Také se nachází v ylang-ylang, neroli, bergamotu a lavandinu. Směs d- a l-linaloolu byla nalezena v brazilském palisandru. d-forma byla nalezena v muškátu, pomerančových květech, koriandru. Vyskytuje se jablcích, citrusové kůře, hroznech, skořici, hřebíčku, zázvoru, kardamomu, ve šťávách z ovoce (pomeranč, mandarinka, jablka), jahodách, levanduli, meruňkách, broskvích, švestkách, majoránce, tymiánu, brusinkách. V kosmetických produktech ho lze nalázt v pěnách do koupele, šamponech, mýdlech a květinových kompozicích.</p> <p>V potravinářství se přidává do pudinků, žvýkaček, bonbonů a nealkoholických nápojů.</p>
Kontaktní alergie	Sám o sobě není senzibilující. Senzibilizační jsou oxidační produkty – hydroperoxydy.
Výroba	Frakční destilací ze silic některých rostlin (<i>Licasia guaianensis</i> , <i>Ocotea parviflora</i> , <i>Coriandrum sativum</i>). Synteticky hydrogenací dehydrolinaloolu nebo z myrcenu.

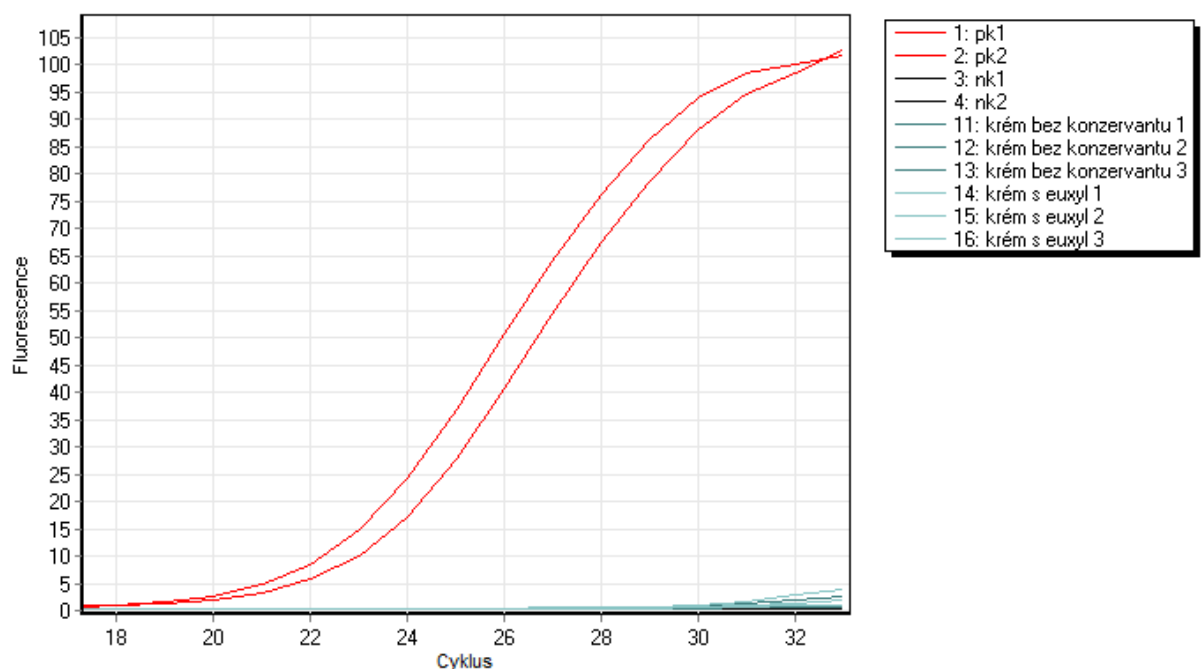
Tabulka 67: Lyrál – vlastnosti [165]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 <p>Lyrál[®] (hydroxy-methylpentylcyclohexene carboxaldehyde) (CAS: 31906-04-4)</p>
Další názvy	4-(4-hydroxy-4-methylpentyl)-3-cyklohexen-1- karboxaldehyd (HICC); hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde
Vzhled a aroma	Viskózní bezbarvá kapalina, sladká květinová vůně (lilie, cyklámen)
Rozpustnost	Etanol
Výskyt a použití	V přírodě se nevyskytuje. Často nahrazuje v parfémových kompozicích hydroxycitronellal. V parfémech se přidává do květinových kompozic (konvalinka, hyacint, šerík). V kosmetických výrobcích je přidáván do detergentů, deodorantů, aviváží, mýdel, šamponů a dalších.
Výroba	Z myrcenu, myrcenolu nebo myrcenalu.
Poznámka	Dle nařízení Evropské komise 2017/1410 (příloha II – zakázané látky v kosmetických přípravcích) je zakázáno jeho používání v kosmetických výrobcích na evropském trhu z důvodu vysokého počtu případů alergických reakcí na tuto látku. Tím už tedy látka není řazena do přílohy III – seznam látek s omezeným použitím. Zákaz uvádění výrobků s touto látkou na trh nabyl účinnosti 3.8.2017 [166].

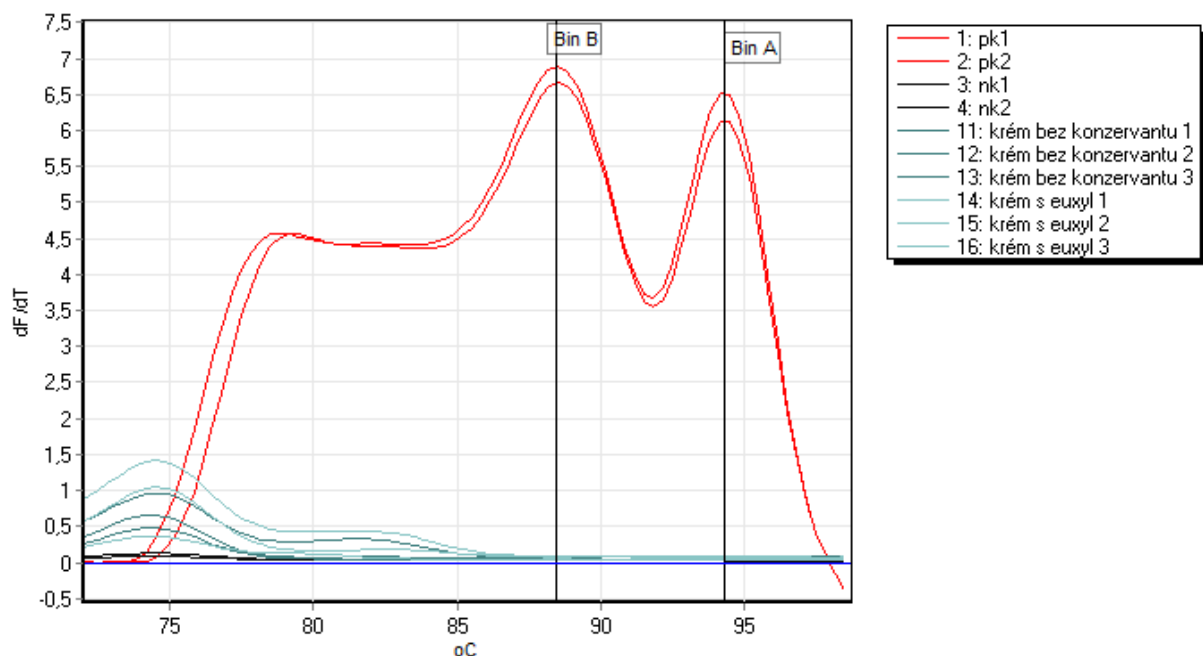
Tabulka 68: Methylheptinkarbonát – vlastnosti [24; 167]

Název dle INCI a strukturní vzorec	 <p>Methylheptin carbonate (CAS: 111-12-6)</p>
Další názvy	methyl 2-octynoate; methyl oct-2-ynoate; methyl 2- octinate; methyl hept-1-yne-1-carboxylate; methyl ester 2- octynoic acid; methyl pentyl acetylen ecarboxylate; methyl 2-octynoate; Folione
Vzhled a aroma	Bezbarvá nebo nažloutlá kapalina, fialková vůně
Rozpustnost	Alkoholy, oleje, málo rozpustný v propylenglykolu, nerozpustný ve vodě a glycerinu
Výskyt a použití	V přírodě se nevyskytuje. Přidává se do celé škály vonných kompozic, od banánu po jasmín. V potravinářství ho lze nalézt např. v aroma vína a jahody.
Výroba	Synteticky z heptaldehydu na karboxylovou kyselinu, která je následně esterifikována

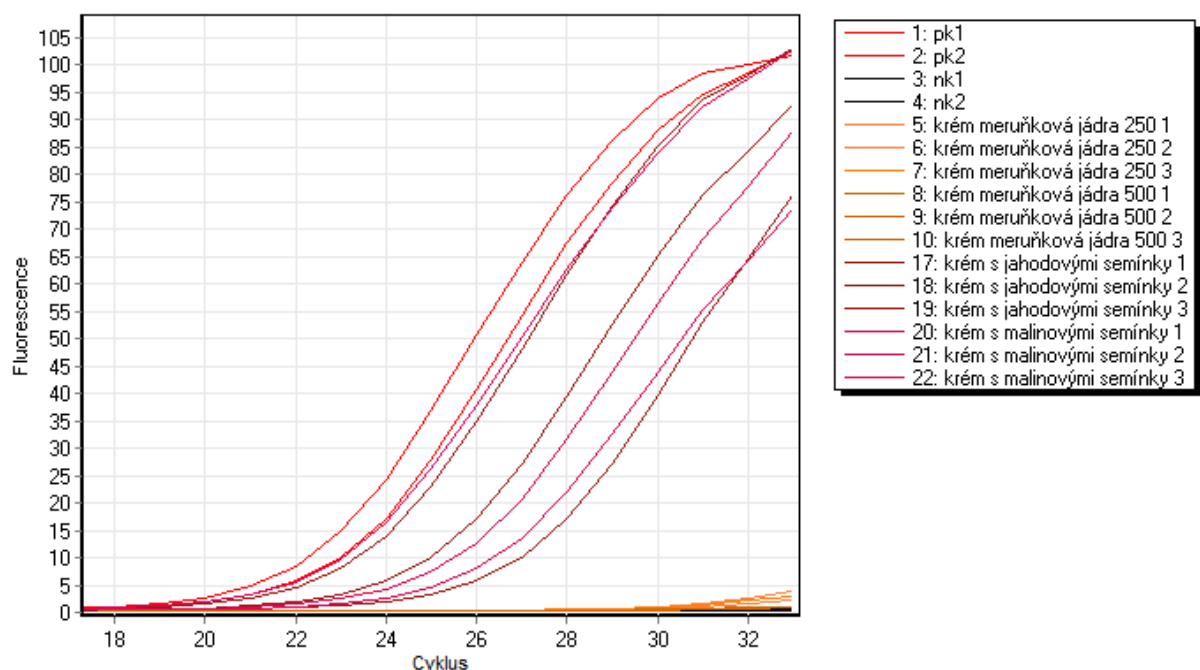
PŘÍLOHA 4: AMPLIFIKAČNÍ KŘIVKY, ANALÝZA KŘIVEK TÁNÍ A VÝSLEDKY GELOVÉ ELEKTROFORÉZY



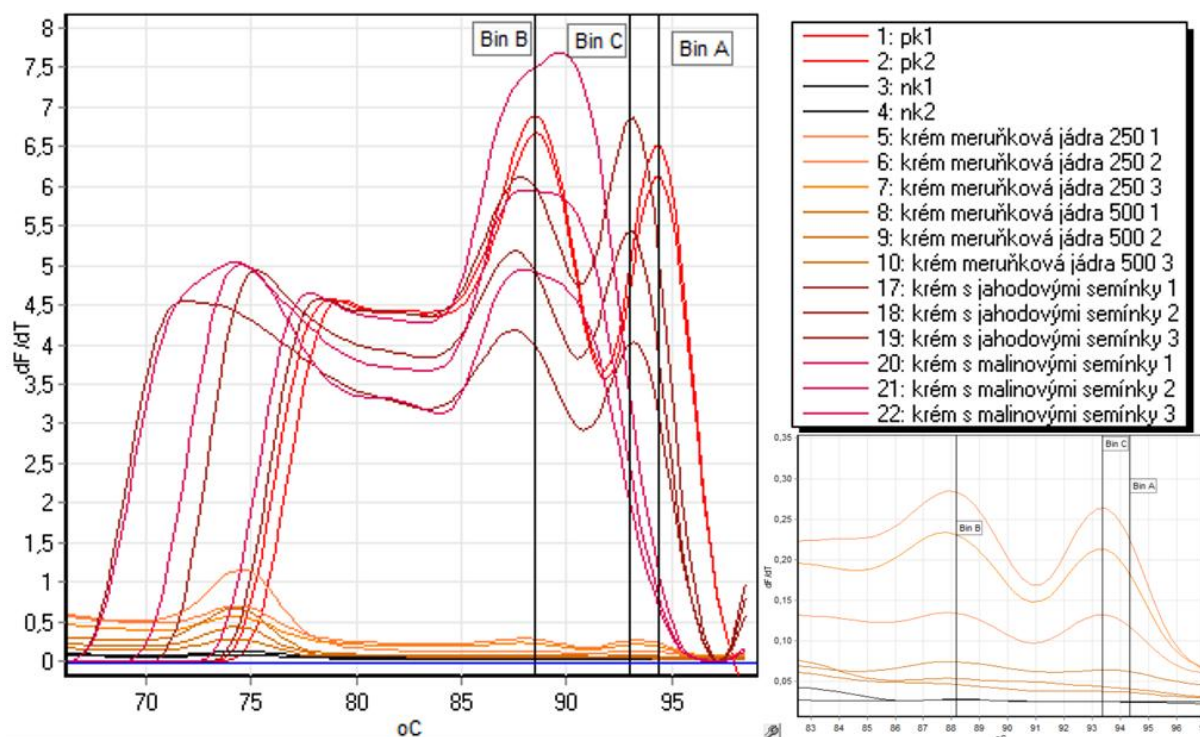
Obrázek 64: Ověření amplifikovatelnosti čisté Emulze 1 bez příměsí, amplifikační křivky, PK - *N.tabacum* Ing/ul



Obrázek 65: Ověření amplifikovatelnosti čisté Emulze 1 bez příměsí, melt analýza, PK - *N.tabacum* Ing/ul, BinA = 95,35 °C, BinB = 88,36 °C



Obrázek 66: Amplifikační křivky - vzorky Emulze 1 s příměsí abraziv, PK - *N.tabacum* Ing/ul

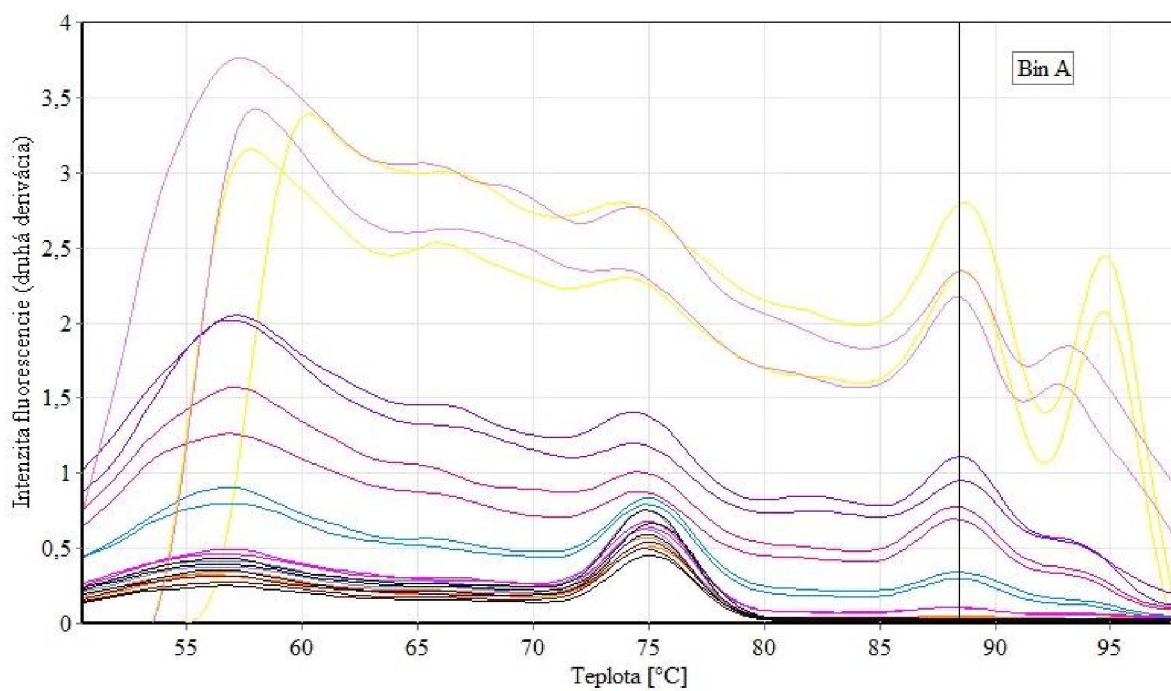
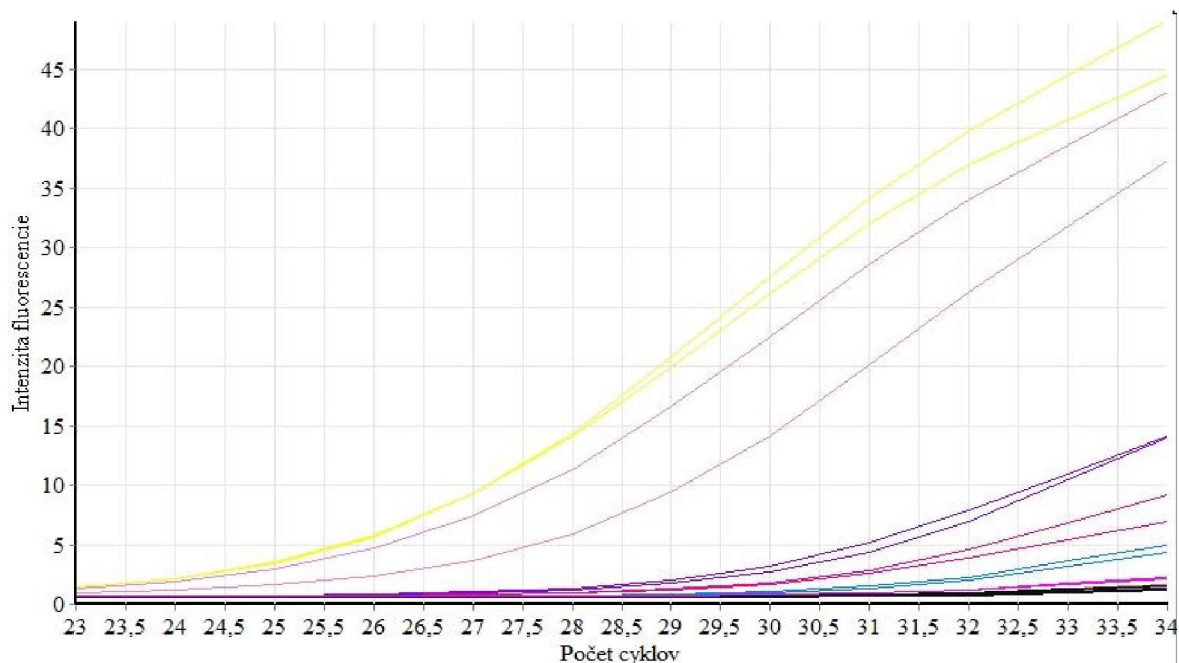


Obrázek 67: Melt analýza - vzorky Emulze 1 s příměsí abraziv, PK - *N.tabacum* Ing/ul, BinA = 95,35 °C, BinB = 88,36 °C, BinC = 93,37 °C

Tabulka 69:Legenda pro následující tabulky a grafy

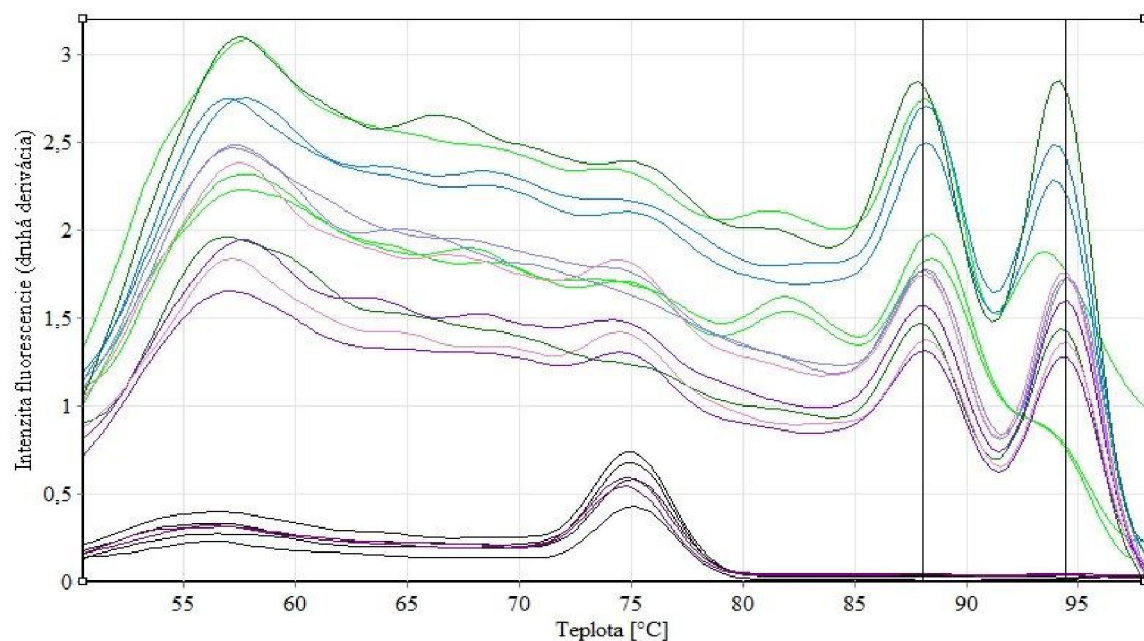
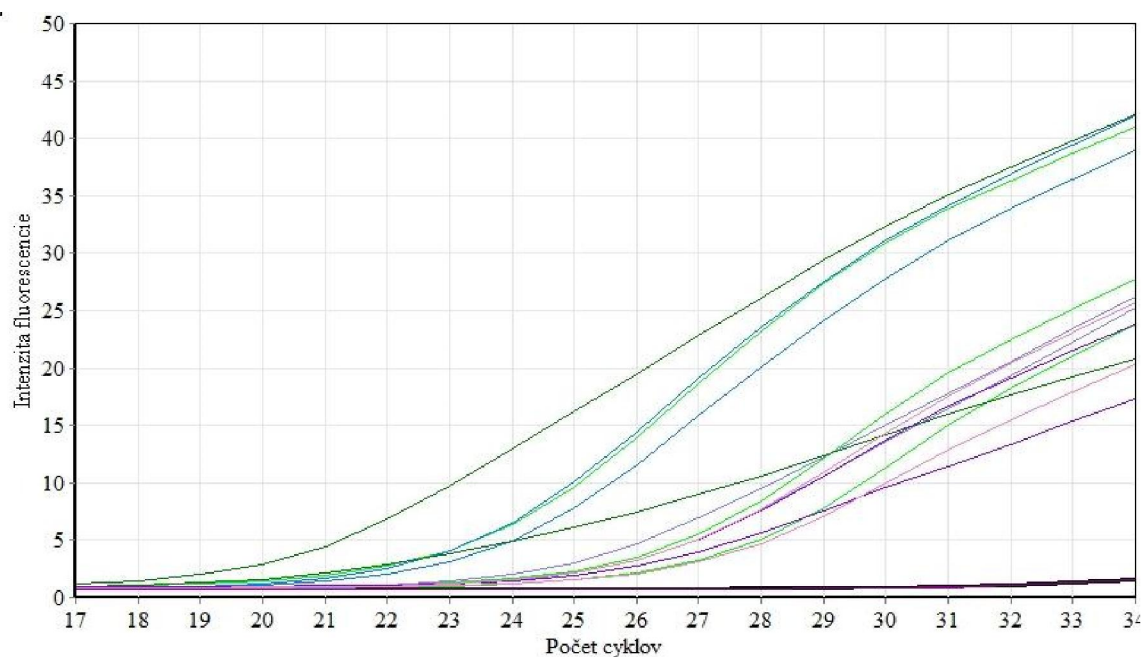
Emulze 1 s přídavkem	Označení vzorků	Komerční výrobky	Označení vzorků
silice červený pomeranč	1A, 1B	Balea handcreme protect	17A, 17B
Silice citronová tráva	2A, 2B	Cosmos natural repairing hand protect	18A, 18B
Silice máta peprná	3A, 3B	Konopka´s face commage moist	19A, 19B
Silice peprno-mátová	4A, 4B	Planeta organica natural body scrub	20A, 20B
Silice pomerančová španělská	5A, 5B	N.A.E. shampoo bar	21A, 21B
Silice mandarinková	6A, 6B	Naturalis sugar body scrub	22A, 22B
Silice grapefruitová	7A, 7B	Balea sugar scrub	23A, 23B
Silice mandarinka	8A, 8B	Alverde skinfood Bio-limette	24A, 24B
Lyofilizátu citronové kůry	9A, 9B	Alverde pflege-dusche bio-minze	25A, 25B
Mentha Gentilis Varieta Citrata "lemon"	10A, 10B	Organic shop strawberry body scrub	26A, 26B
Mentha Piperita "citaro"	11A, 11B	Organic shop strawberry body mousse	27A, 27B
Mentha pycnanthemum pilosum	12A, 12B	N.T. Levandulový krém	28A, 28B
Mentha almira strawberry pepermint	13A, 13B	Kvítok Levandulový sen	29A, 29B
Sušeného květu levandule	14A, 14B	Herbs of Bulgaria face cream s levandulí	30A, 30B
Silice levandule	15A, 15B	Ryor hydratačný krém	31A, 31B
Sušeného květu levandule i levandulové silice	16A, 16B		

- | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 5: biocitrón 1 | 10: biocitrón 2 | 11: krém s matou lemon 1 |
| 12: krém so silicou tangerinka 1 | 13: silica tangerinka 1 | 14: krém s mäťou lemon (usadenina) 1 |
| 15: krém s mäťou lemon 2 | 16: krém so silicou tangerinka 2 | 17: silica tangerinka 2 |
| 18: krém s mäťou lemon (usadenina) 2 | 19: mentha lemon 1 | 20: mentha lemon 2 |
| 21: mentha citaro 1 | 22: mentha citaro 2 | 23: mentha pilosum 1 |
| 24: mentha pilosum 2 | 25: mentha pepermint 1 | 26: mentha pepermint 2 |
| 27: NK1 | 28: NK2 | 29: NK3 |
| 30: NK4 | | |



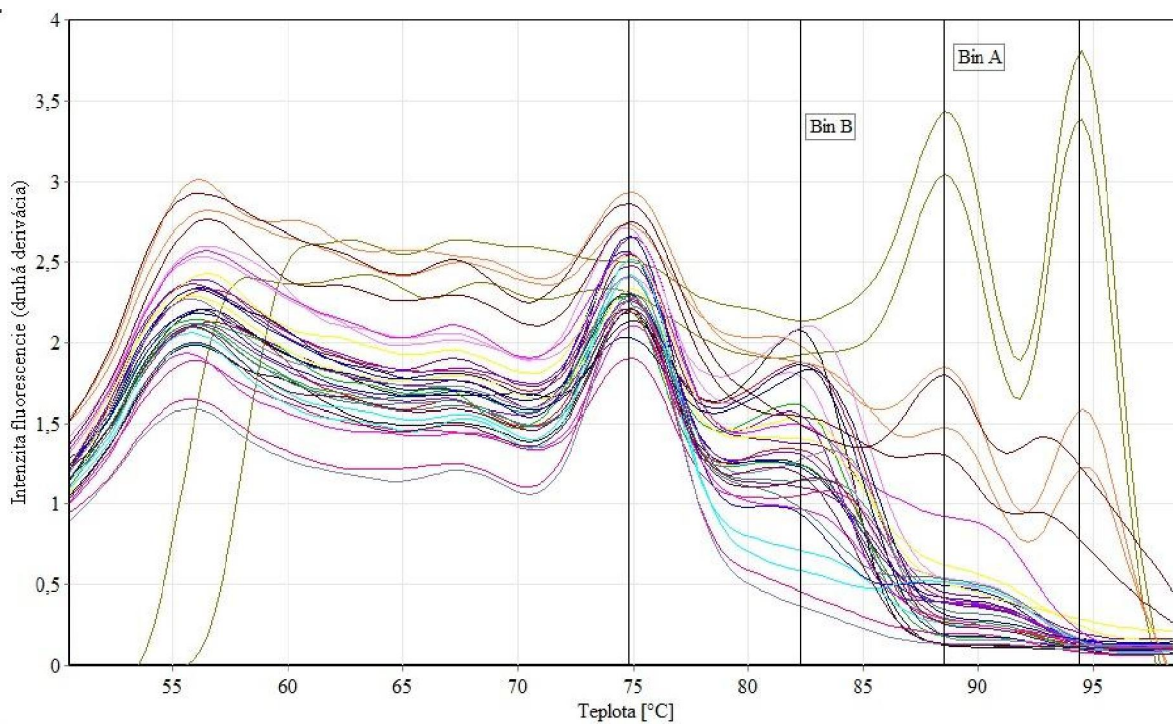
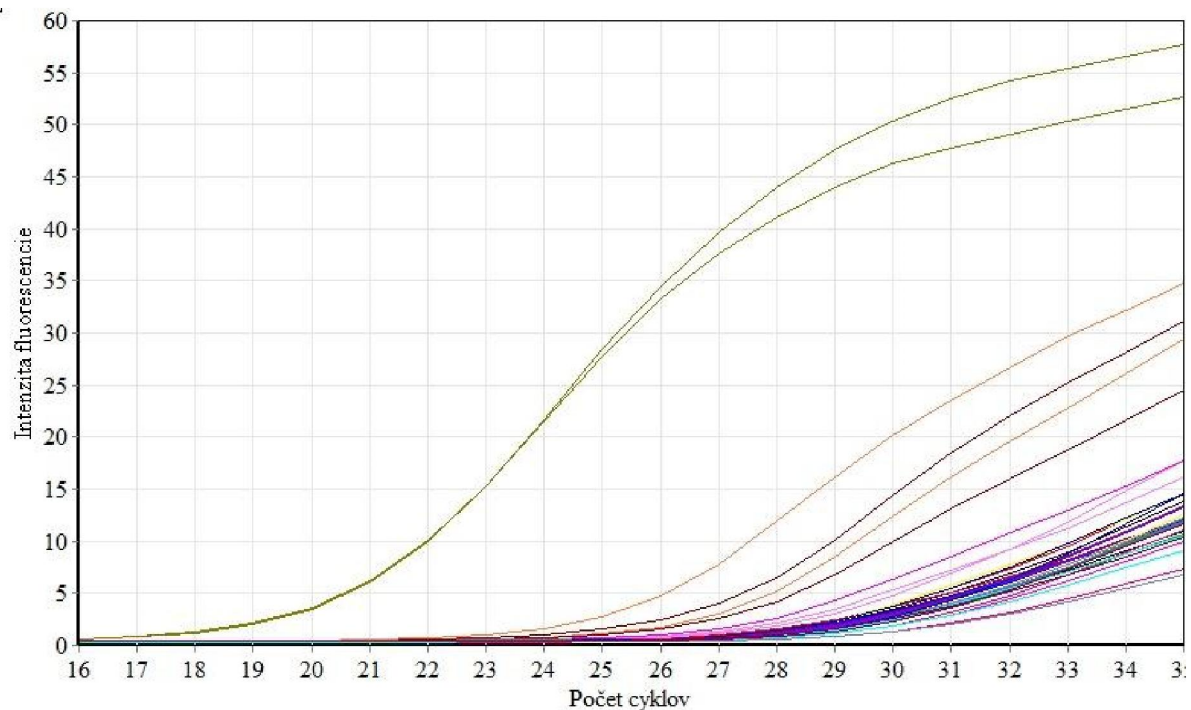
Obrázek 68: Amplifikační křivky a analýza křivek tání ($T_m = 88,5^{\circ}\text{C}$), primery S2F/S3R

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



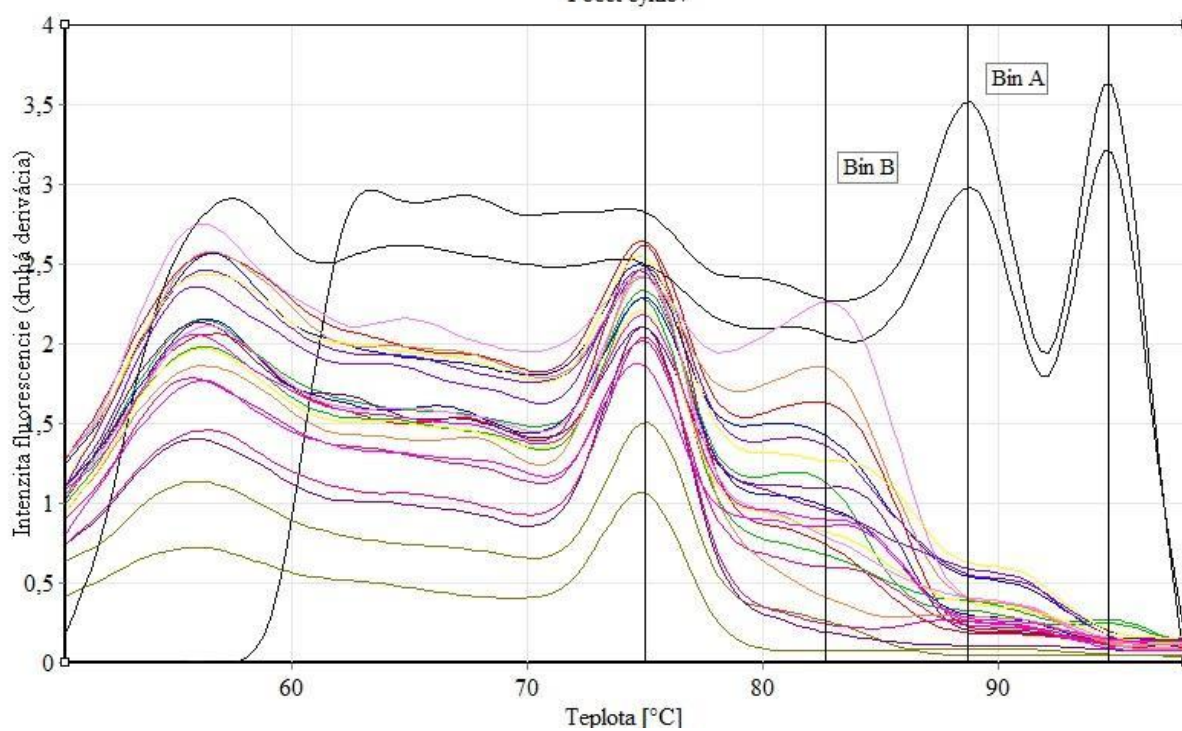
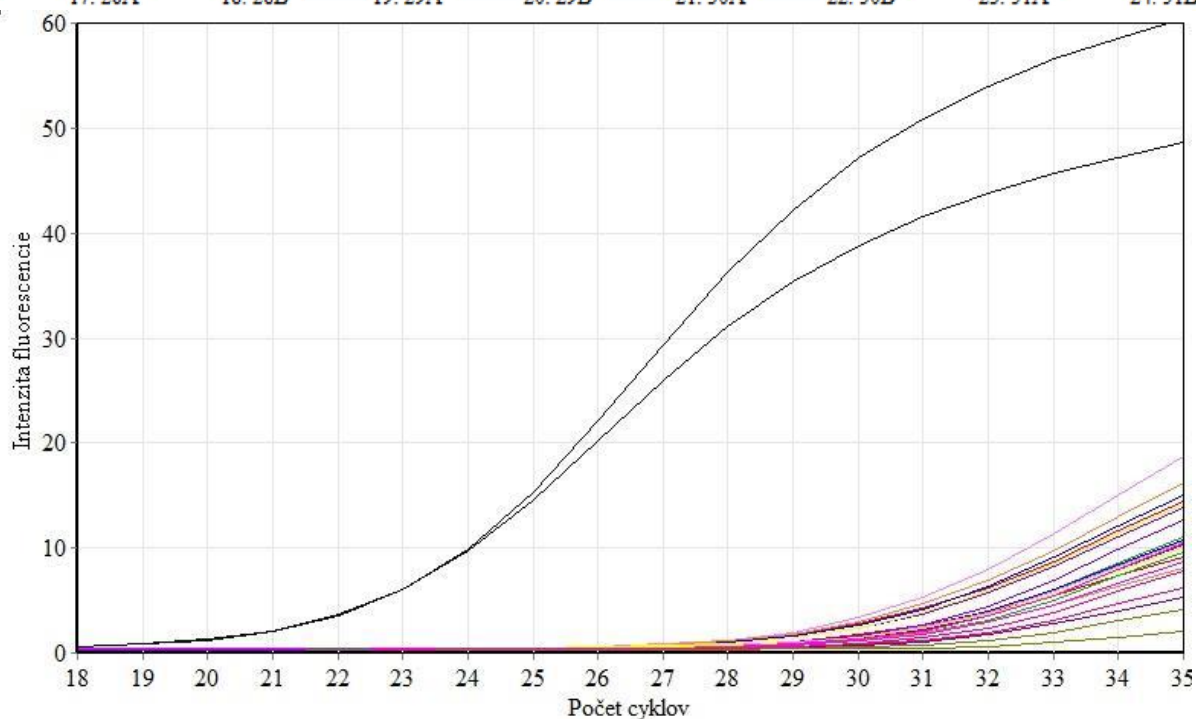
Obrázek 69: Amplifikační křivky a analýza křivek tání ($T_m = 88,1^{\circ}\text{C}$, $94,7^{\circ}\text{C}$), primery S2F/S3R

1: PK1 2: PK2 3: NK1 4: NK2 5: 1A 6: 1B 7: 2A 8: 2B 9: 3A 10: 3B 11: 4A 12: 4B 13: 5A
 14: 5B 15: 6A 16: 6B 17: 7A 18: 7B 19: 9A 20: 9B 21: 11A 22: 11B 23: 12A 24: 12B 25: 13A 26: 13B
 27: 17A 28: 17B 29: 18A 30: 18B 31: 19A 32: 19B 33: 20A 34: 20B 35: 21A 36: 21B

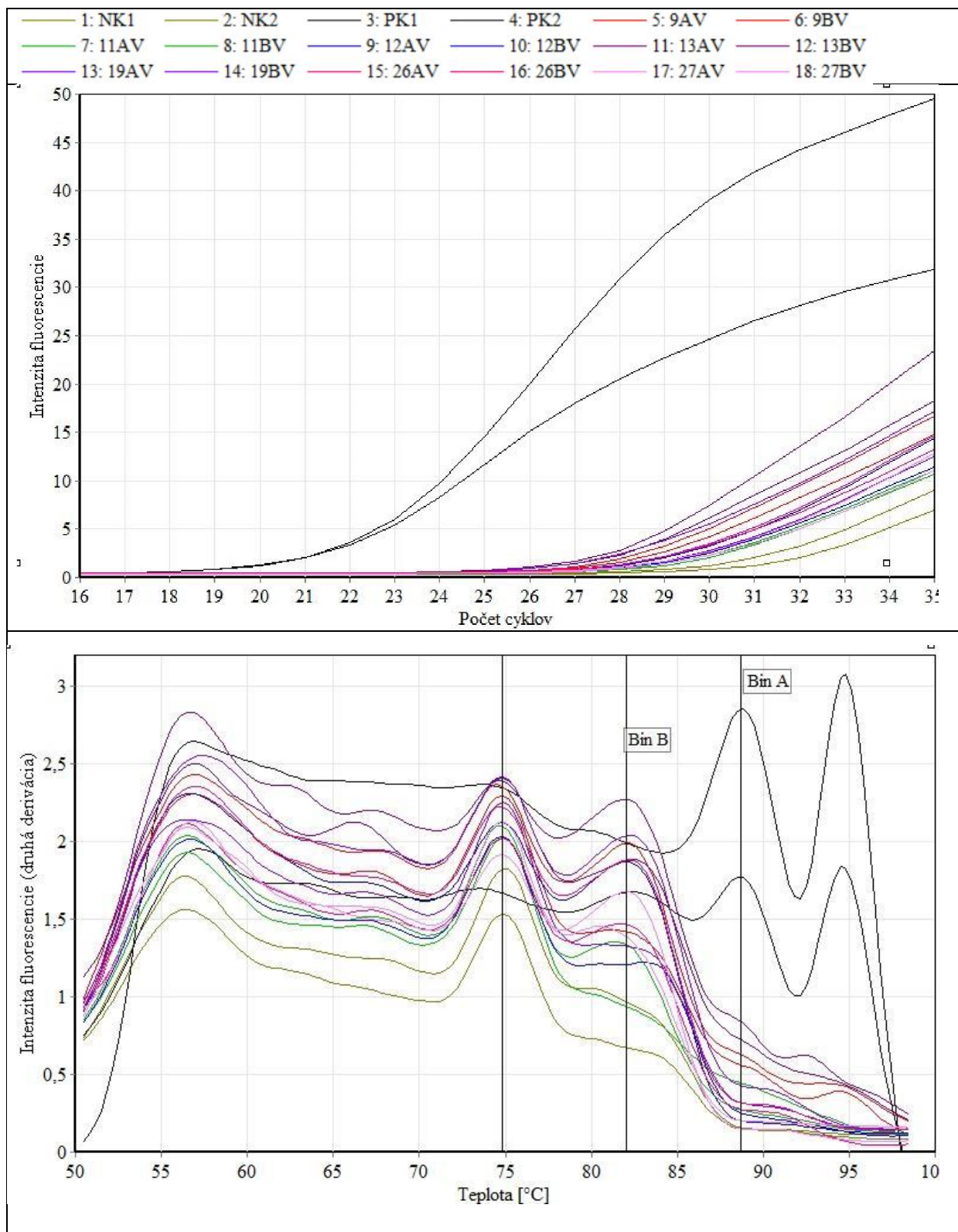


Obrázek 70: Amplifikační křivky a analýza křivek tání ($T_m = 88,1^{\circ}\text{C}$, $82,5^{\circ}\text{C}$), primery S2F/S3R, komerční kosmetické produkty, legenda – Příloha 4, Tabulka 69

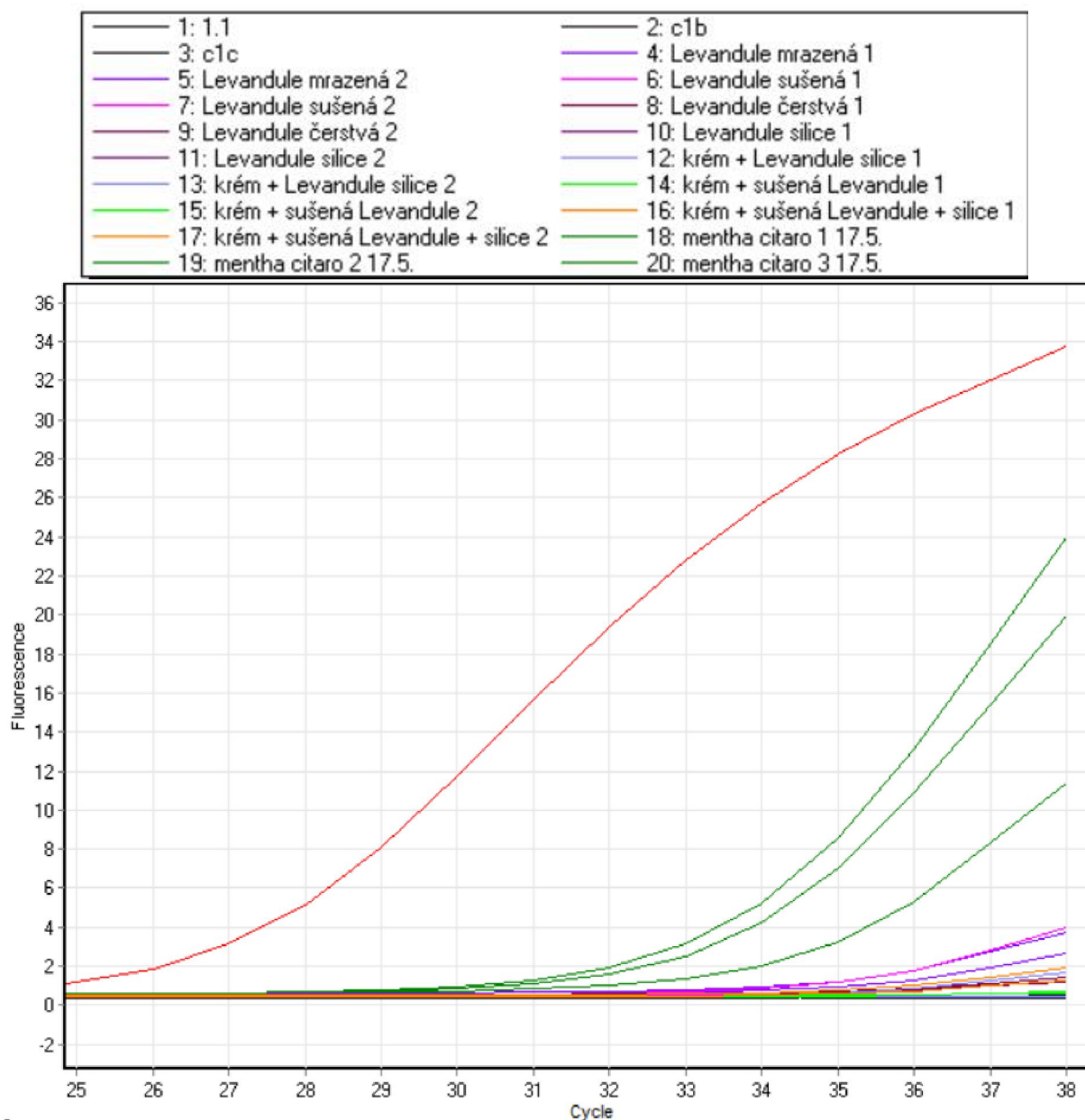
1: NK1 2: NK2 3: PK1 4: PK2 5: 22A 6: 22B 7: 23A 8: 23B
 9: 24A 10: 24B 11: 25A 12: 25B 13: 26A 14: 26B 15: 27A 16: 27B
 17: 28A 18: 28B 19: 29A 20: 29B 21: 30A 22: 30B 23: 31A 24: 31B



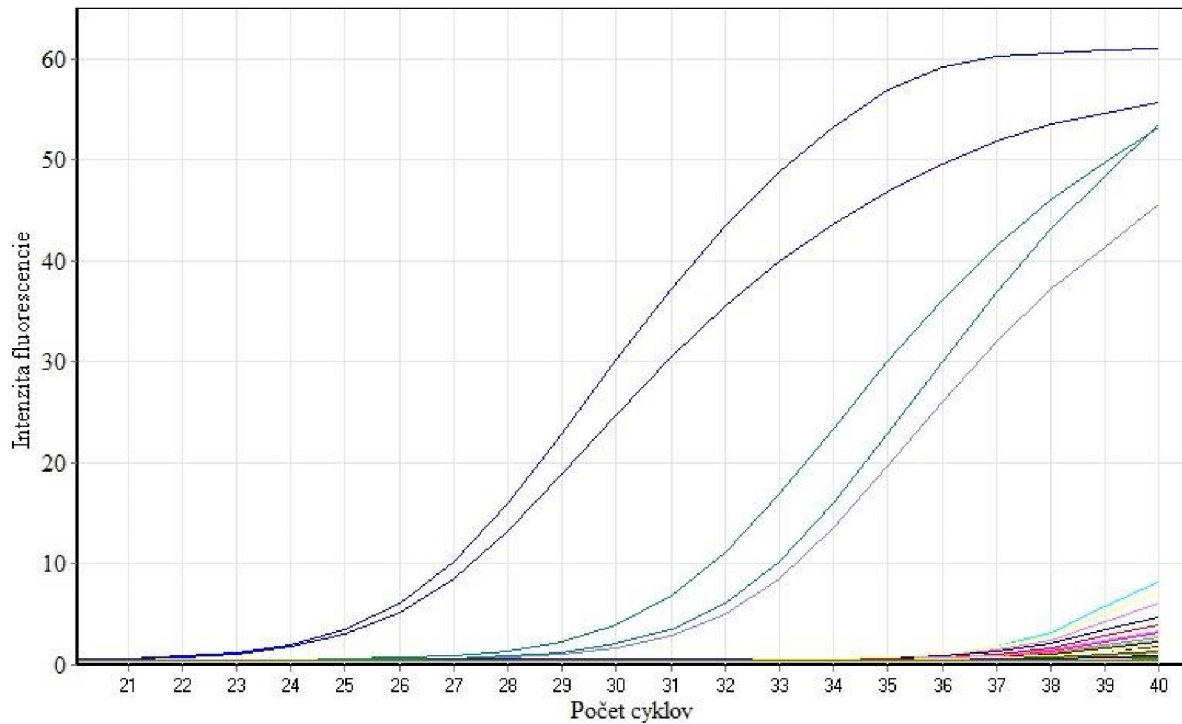
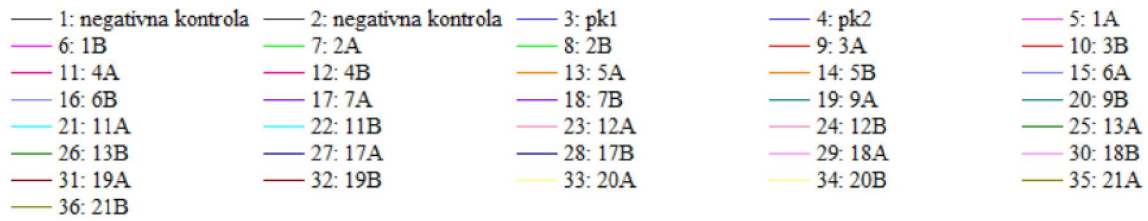
Obrázek 71: Amplifikační křivky a analýza křivek tání ($T_m = 88,1^{\circ}\text{C}$, 82°C), primery S2F/S3R, komerční kosmetické produkty, legenda – Příloha 4, Tabulka 69



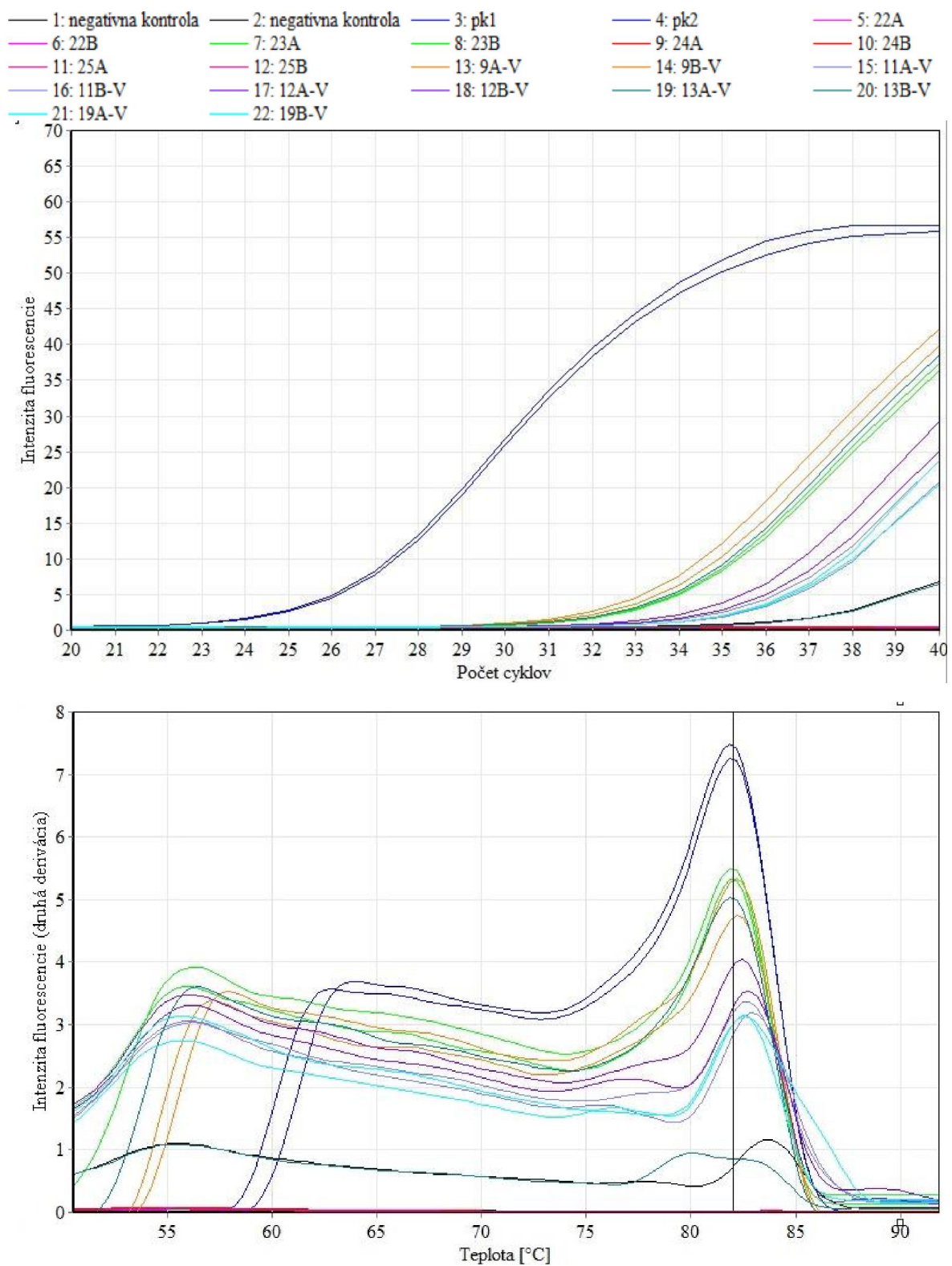
Obrázek 72: Amplifikační křivky a analýza křivek tání ($T_m = 88,1^\circ\text{C}$, 82°C), primery S2F/S3R, komerční kosmetické produkty – sediment po centrifugaci, legenda – Příloha 4, Tabulka 69



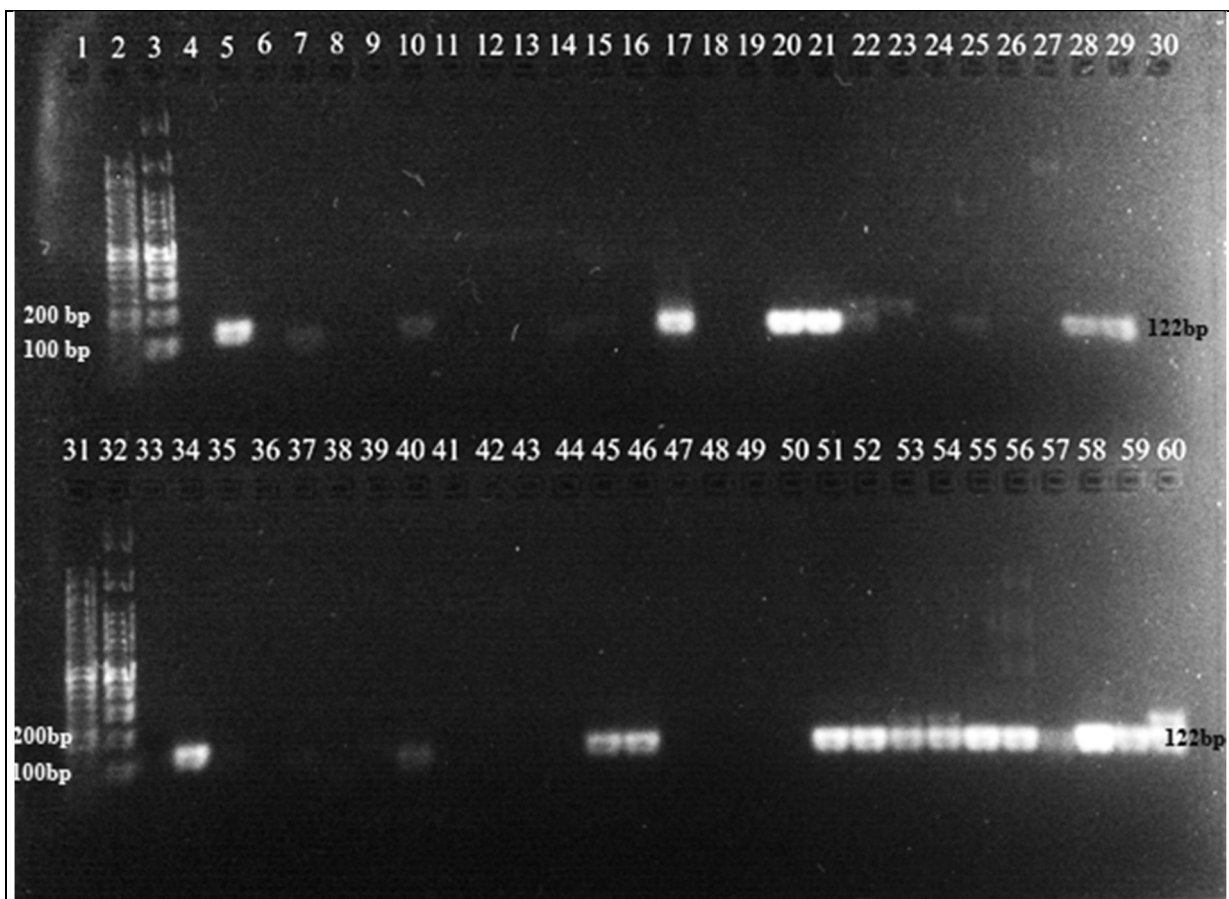
Obrázek 73: Amplifikační křivky, primery Lim2F/R, vzorky DNA izolované z levandule a modelových Emulzí 1



Obrázek 74: Amplifikační křivky, primery, *Lim2F/R*, vzorky 1A až 21B, pozitivní kontrola - DNA izolována z kůry biocitronu, komerční kosmetické produkty, legenda – Příloha 4, Tabulka 69



Obrázek 75: Amplifikační křivky a analýza křivek tání, použité primery Lim2F/R, modelové vzorky Emulze 1 a komerční vzorky krémů ($T_m = 82\text{ }^{\circ}\text{C}$) legenda – Příloha 4, Tabulka 69



Běh	DNA	PCR produkt	Běh	DNA	PCR produkt
1	x		31	DNA standard 50 bp	
2	DNA standard 50 bp		32	DNA standard 100 bp	
3	DNA standard 100 bp		33	nk	-
4	Nk	-	34	pk	+++
5	Pk	+++	35	Cosmos natural repairing hand protect*	-
6	Emulze 1+ Silice	-	36	Konopka's face commage moist*	-
7	červený pomeranč	+	37	Planeta organica natural body scrub*	-
8	Emulze 1+ Silice	-	38	N.A.E. shampoo bar*	-
9	citrónová tráva	-	39	Naturalis sugar body scrub	-
10	Emulze 1+ Silice máta	+	40	Balea sugar scrub	+
11	peprná	-	41	Alverde skinfood Bio-limette	-
12	Emulze 1+ Peprno-	-	42	Alverde pflege-dusche bio-minze	-
13	mátová silice	-	43		-
14	Emulze 1+ Pomerančová silice španělská	+	44		-
15	Emulze 1+	+	45		++
16	Mandarinková silice	-	46		++
17	Emulze 1+ Grapefruitová silice	++	47		-
18		-	48		-
19		-	49		-
20	Emulze 1+ Citronová	+++	50		-

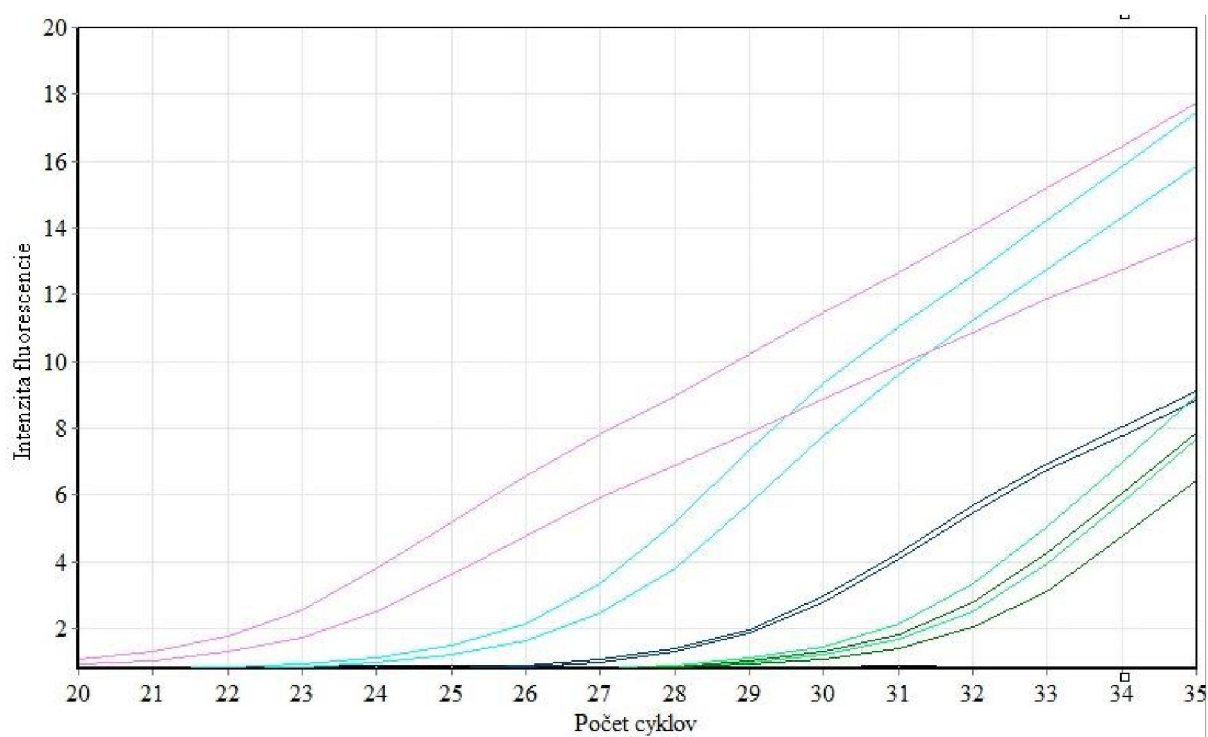
21	kůra	+++	51	Citrónová kůra**	+++
22	Emulze 1+ Mentha	+	52		+++
23	Piperita "citaro"	+	53	Mentha Piperita "citaro" **	++
24	Emulze 1+ Mentha	-	54		++
25	pycnanthemum pilosum	+	55	Mentha pycnanthemum pilosum **	+++
26	Emulze 1+ Mentha	-	56		+++
27	strawberry pepermint	-	57	Mentha almira strawberry pepermint **	+
28	Balea handcreme	++	58		+++
29	protect*	++	59	Konopka's face commage moist**	+++
30	x		60		+++

Obrázek 76: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR, primery Lim2F/R, (122 bp) (x-žádný vzorek; - nedetekované; PCR produkt: + slabá, ++ střední, +++ silná intenzita),

* komerční produkty

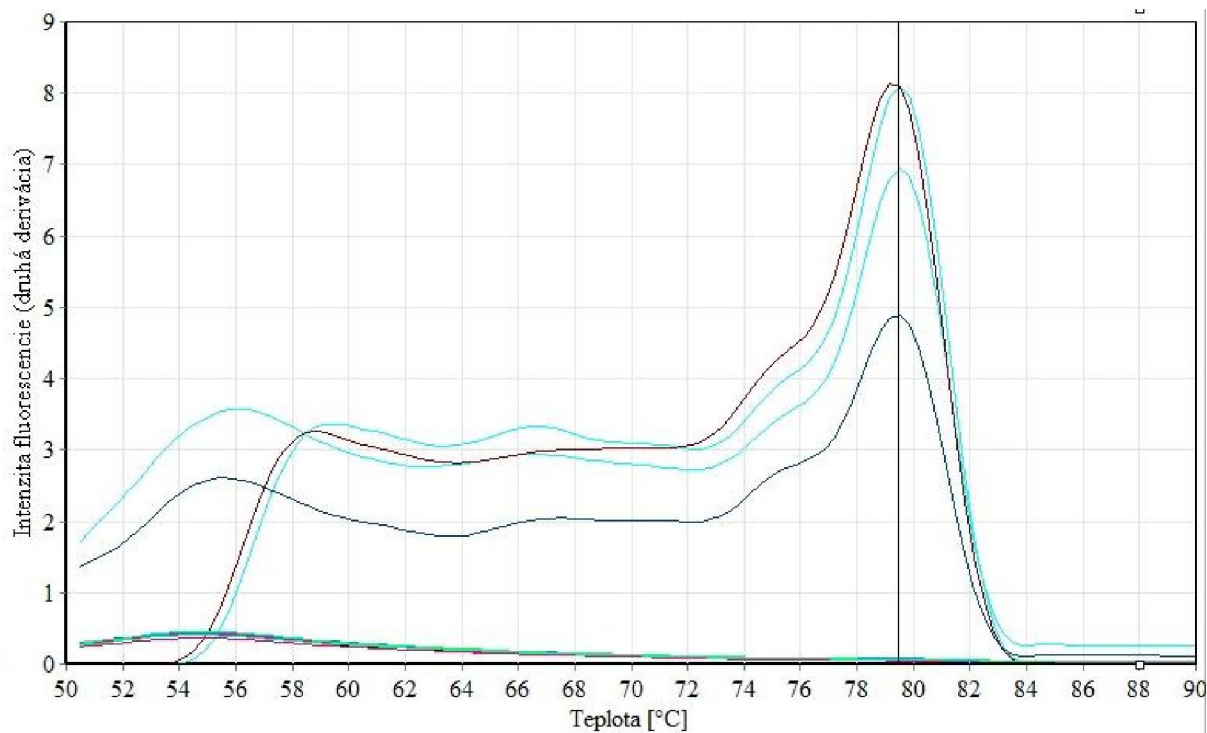
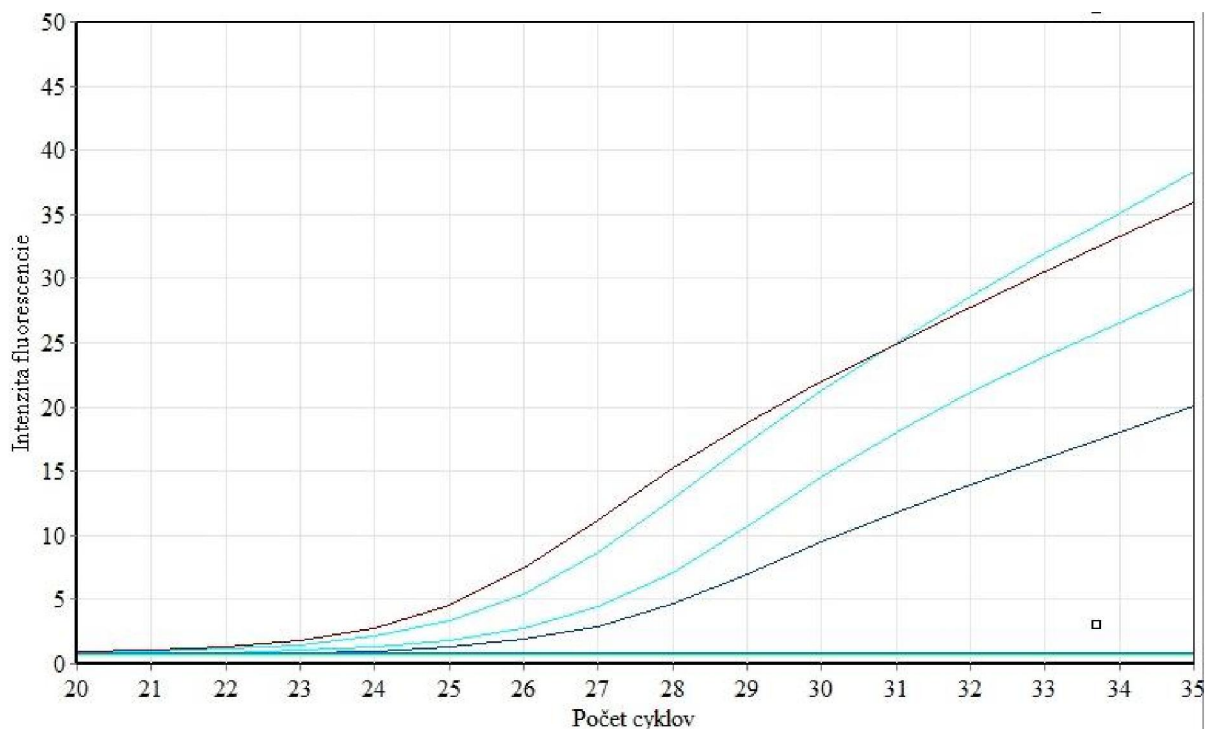
** izolace ze sedimentu

- | | |
|--|--|
| — 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 | |

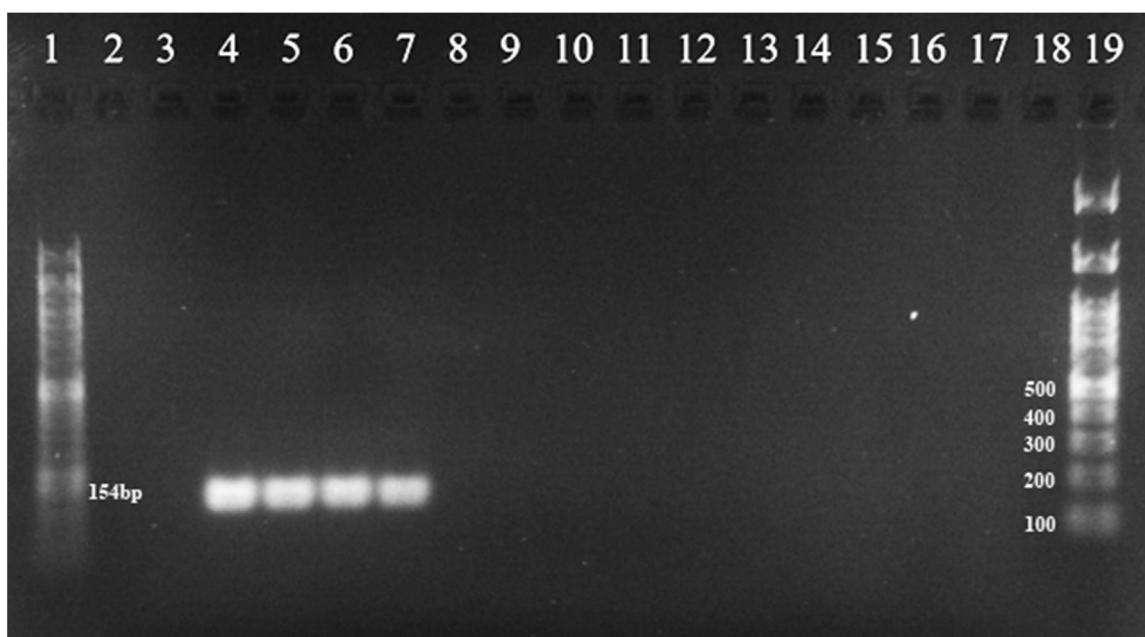


Obrázek 77: Amplifikační křivky, primery LavIFR, vzorky bylin a modelové vzorky krémů Emulze 1

— 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



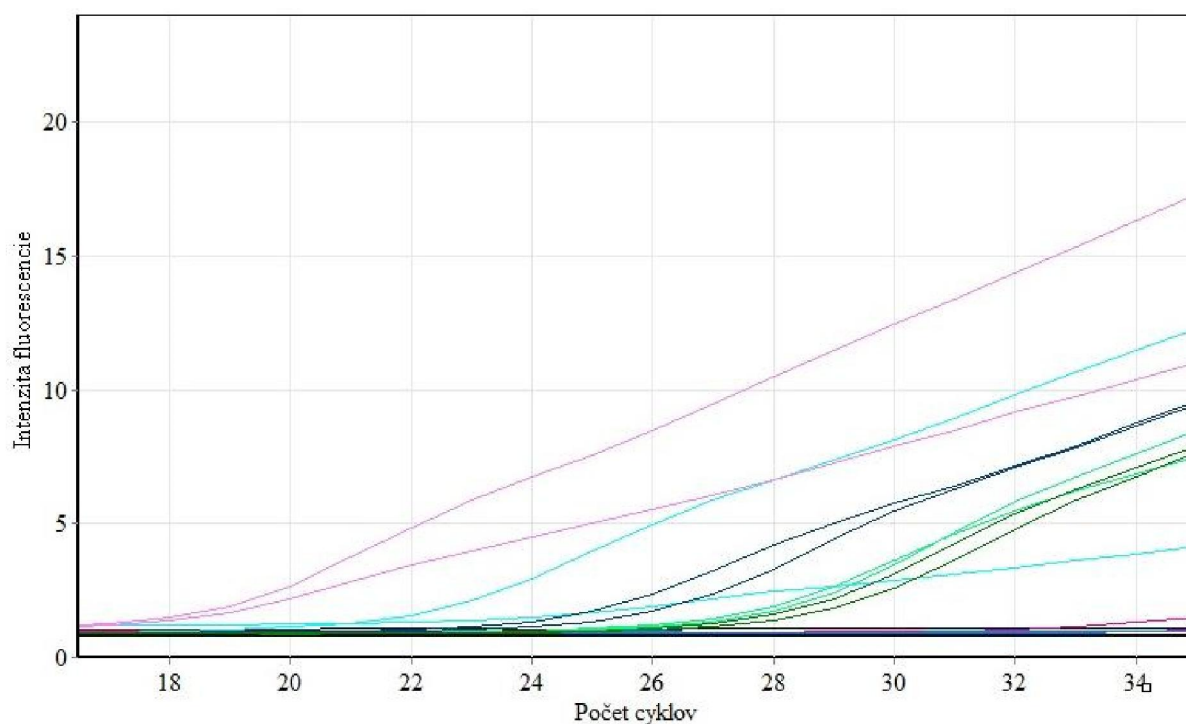
Obrázek 78: Amplifikační křivky a analýza křivek tání, primery LavlFR, vzorky kosmetických výrobků ($T_m = 79,5 \text{ } ^\circ\text{C}$) legenda – Příloha 4, Tabulka 69



Běh	DNA	PCR produkt
1	DNA standard 50 bp	
2	x	
3	Nk	-
4	PK, sušená levandule květ 10 ng · μl ⁻¹	+++
5	PK, sušená levandule květ 10 ng · μl ⁻¹	+++
6	levandule mrazená - květ	+++
7	sušená levandule - květ	+++
8	N.T. Levandulový krém	-
9		-
10	Kvítok Levandulový sen	-
11		-
12	Herbs of Bulgaria face cream s levandulí	-
13		-
14	Ryor hydratační krém s levandulí	-
15		-
16	x	
17	Nk	-
18	x	
19	DNA standard 100 bp	

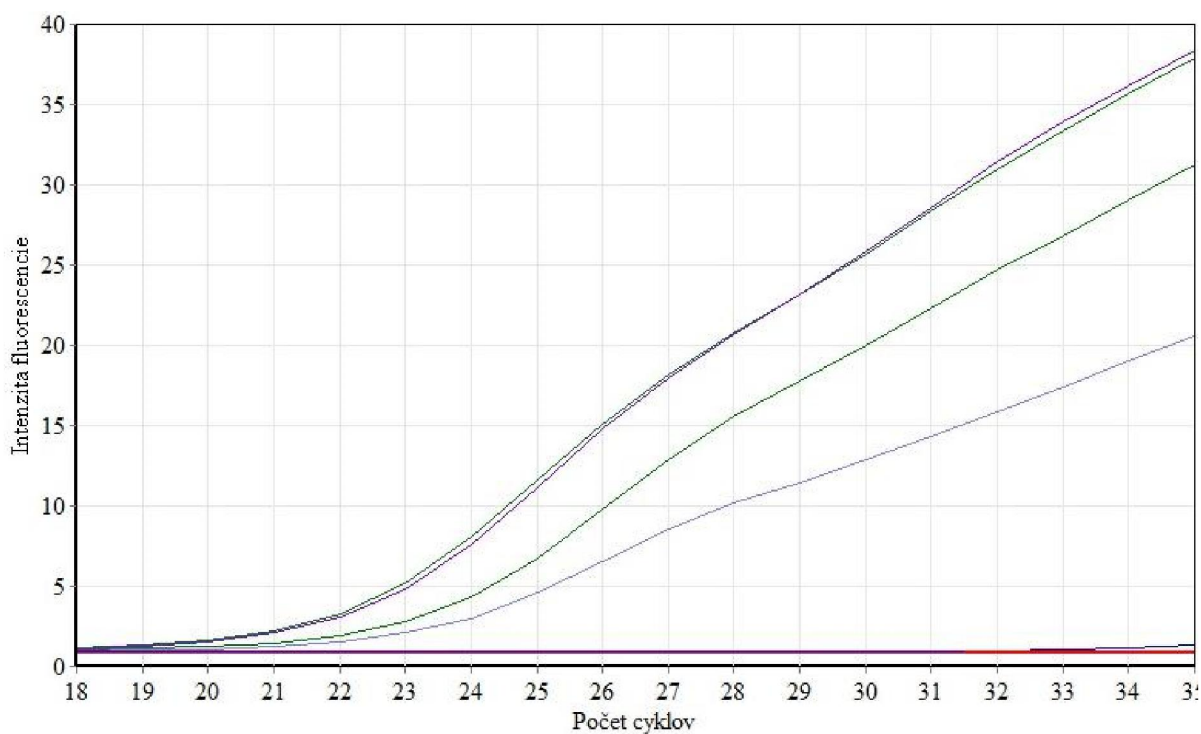
Obrázek 79: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR, primery Lav1FR (154 bp) (x - mezera, - nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

- | | |
|--|--|
| — 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 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 | |

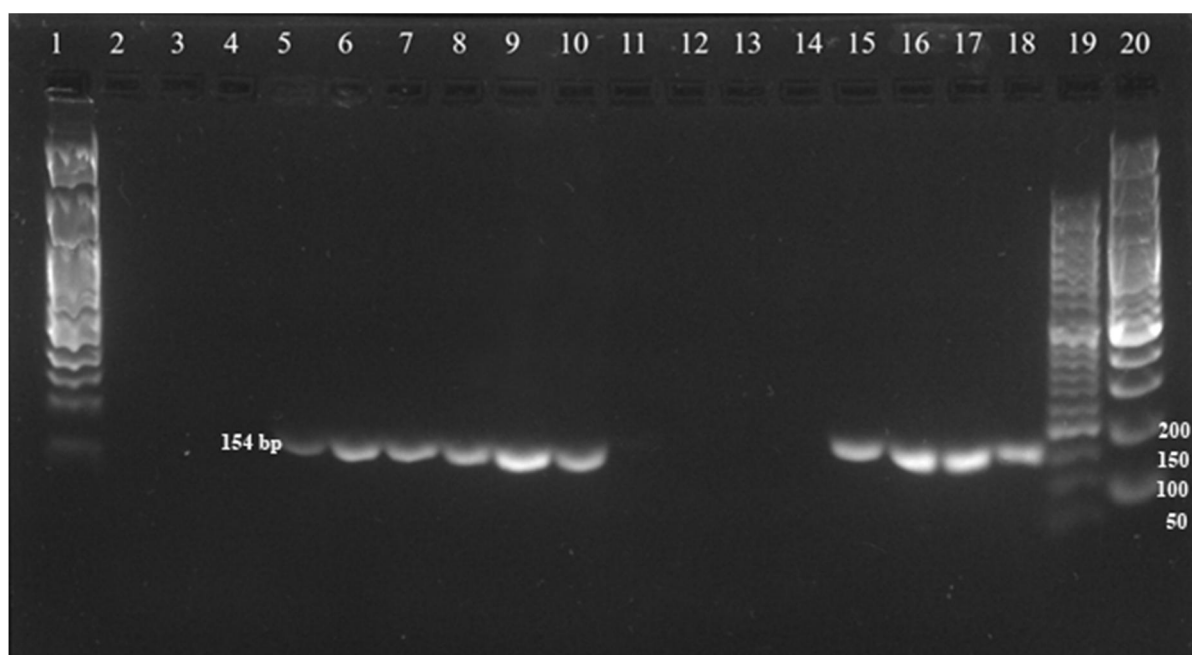


Obrázek 80: Amplifikační křivky, primery *Lav1modFR*, vzorky bylin a modelové vzorky krémů Emulze 1

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



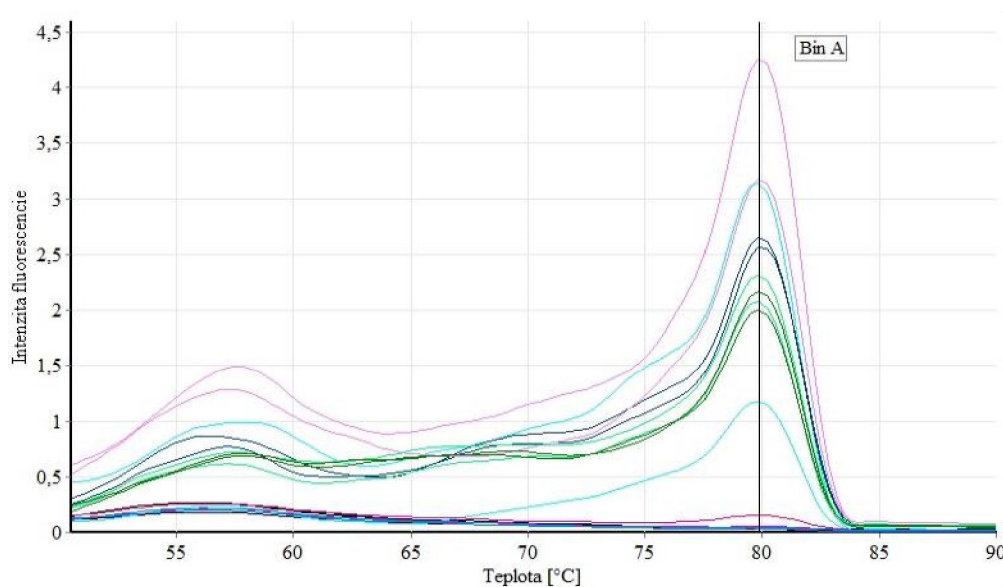
Obrázek 81: Amplifikační křivky izolované DNA při použití primerů Lav1modFR, vzorky komerčních krémů, legenda – Příloha 4, Tabulka 69



Běh	DNA	PCR produkt
1	DNA standard 100 bp	
2	Nk	-
3	Nk	-
4	x	
5	levandule mrazená - květ	+
6		++
7	sušená levandule - květ	++
8		++
9	čerstvá levandule – list	+++
10		++
11	Levandulová silice	-
12		-
13	Emulze 1+ levandulová silice	-
14		-
15	Emulze 1+ levandule sušená	++
16		+++
17	Emulze 1+ levandule sušená, levandulová silice	+++
18		++
19	DNA standard 50 bp	
20	DNA standard 100 bp	

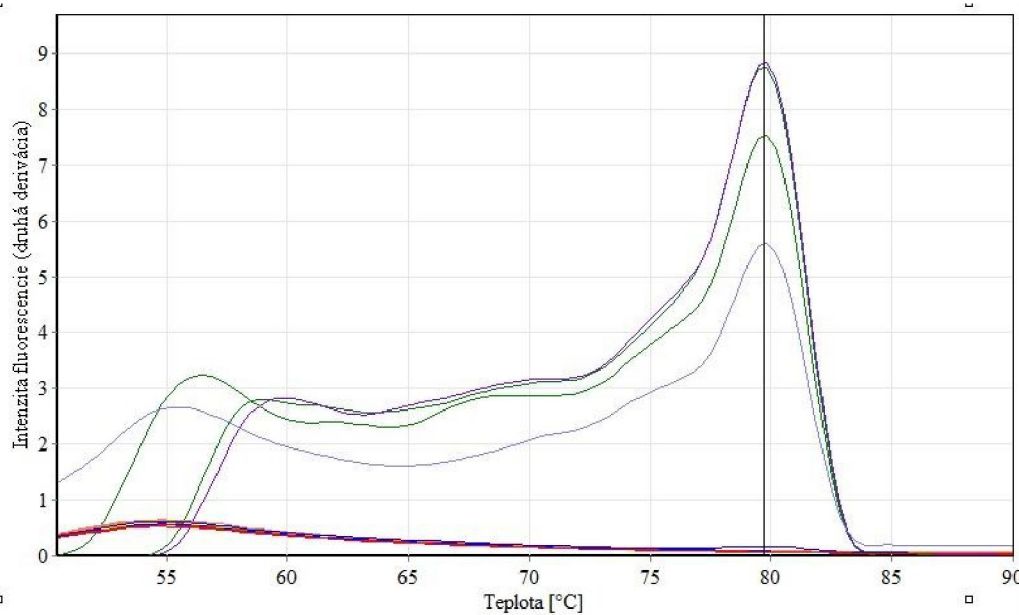
Obrázek 82: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR, primery LavI modFR (154 bp) (x - mezera, - nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

- | | |
|--|--|
| 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 | |

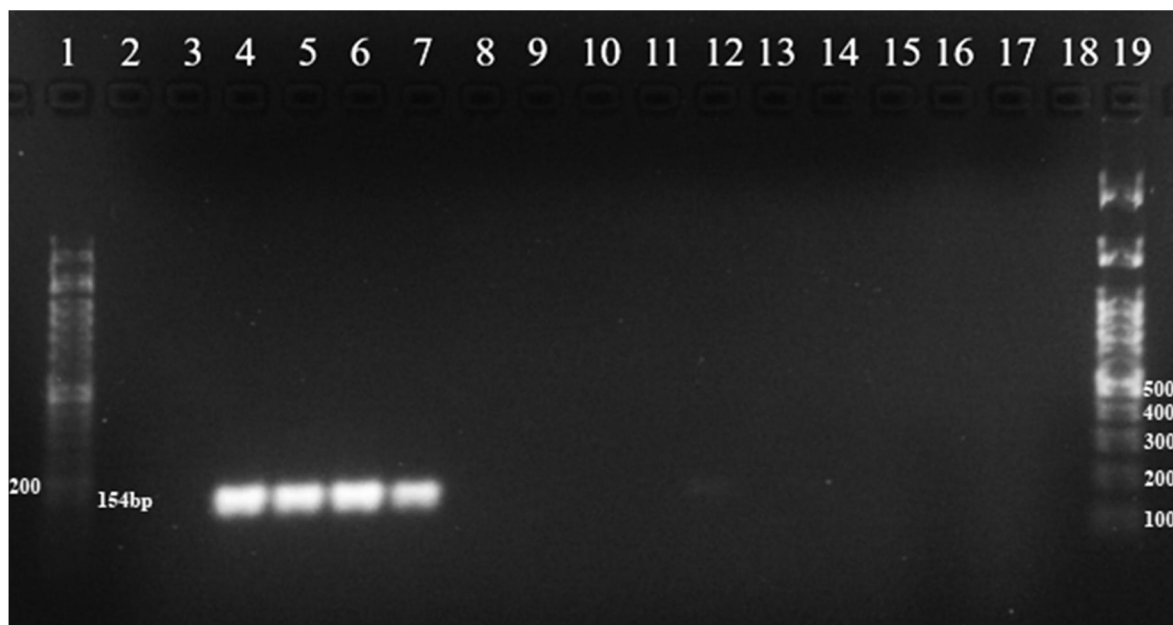


Obrázek 83: Analýza křivek tání, primery LavI modFR, Emulze 1 (Bin A: $T_m = 79,8\text{ °C}$)

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

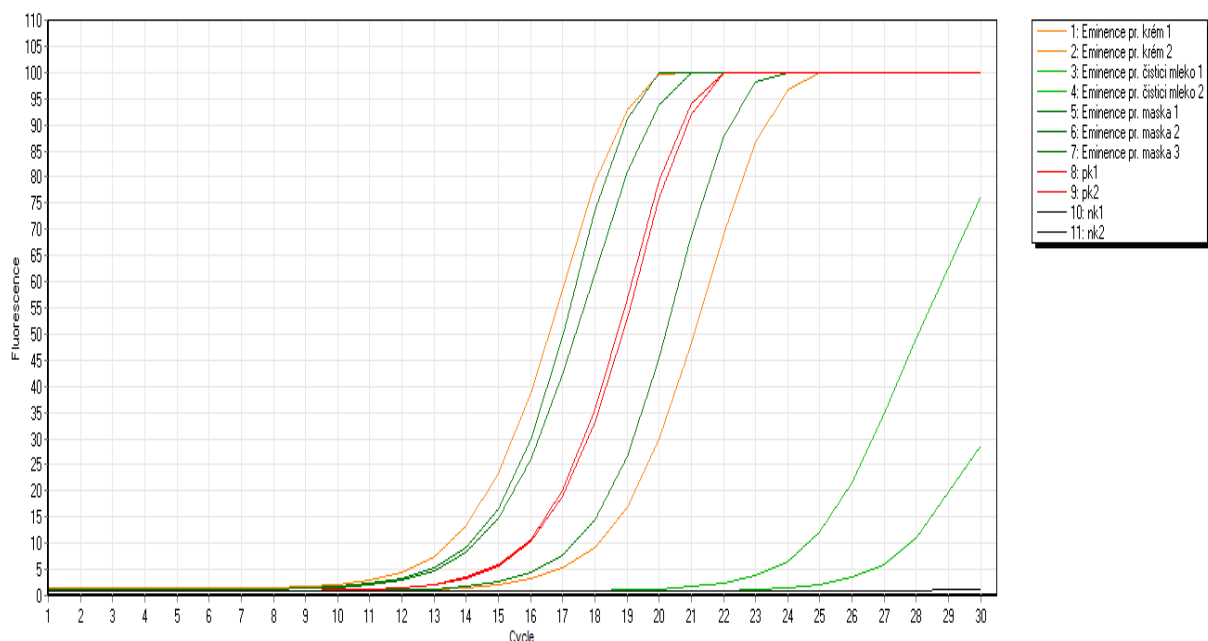


Obrázek 84: Analýza křivek tání, primery LavI modFR, vzorky komerčních produktů ($T_m = 79,5\text{ °C}$)

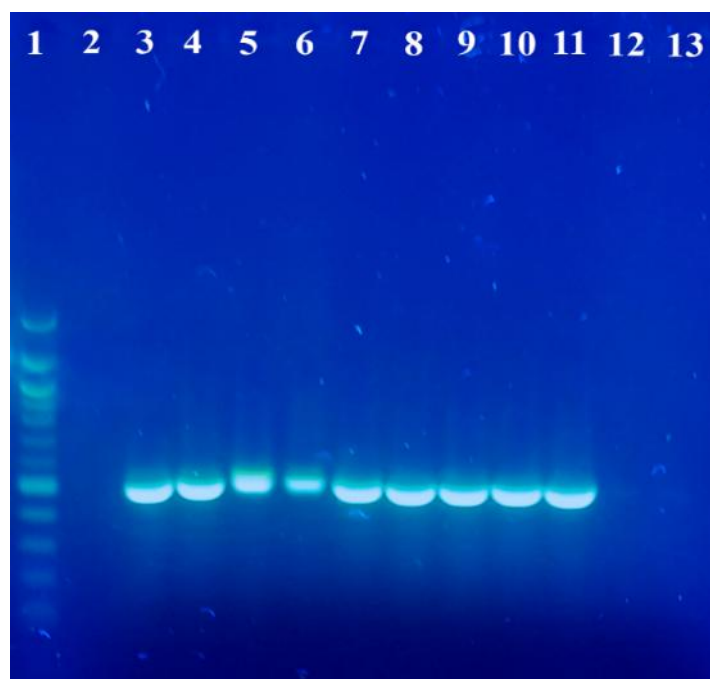


Běh	DNA	PCR produkt
1	DNA standard 50 bp	
2	x	
3	Nk	-
4	PK, sušená levandule květ 10 ng · μl ⁻¹	+++
5	PK, sušená levandule květ 10 ng · μl ⁻¹	+++
6	levandule mrazená - květ	+++
7	sušená levandule - květ	+++
8	N.T. Levandulový krém	-
9		-
10	Kvítok Levandulový sen	-
11		-
12	Herbs of Bulgaria face cream s levandulí	-
13		-
14	Ryor hydratační krém s levandulí	-
15		-
16	x	
17	Nk	-
18	x	
19	DNA standard 100 bp	

Obrázek 85: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR, primery LavI modFR (154 bp) (x - mezera, - nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

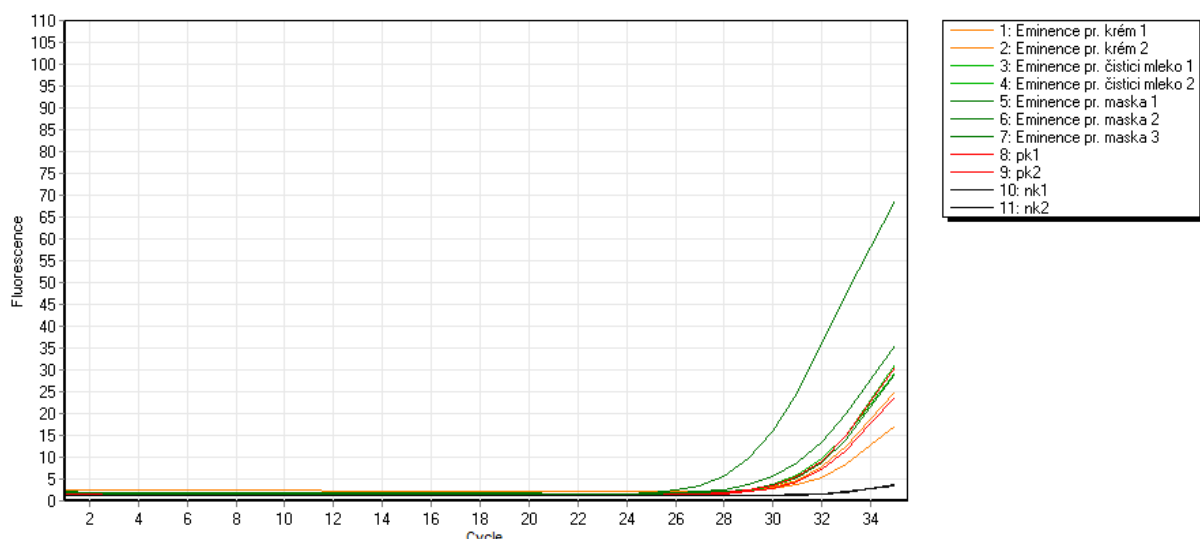


Obrázek 86: Bakterie v kosmetických přípravcích s obsahem rostlinné složky a probiotik - Amplifikační křivky - PCR specifická pro doménu Bacteria

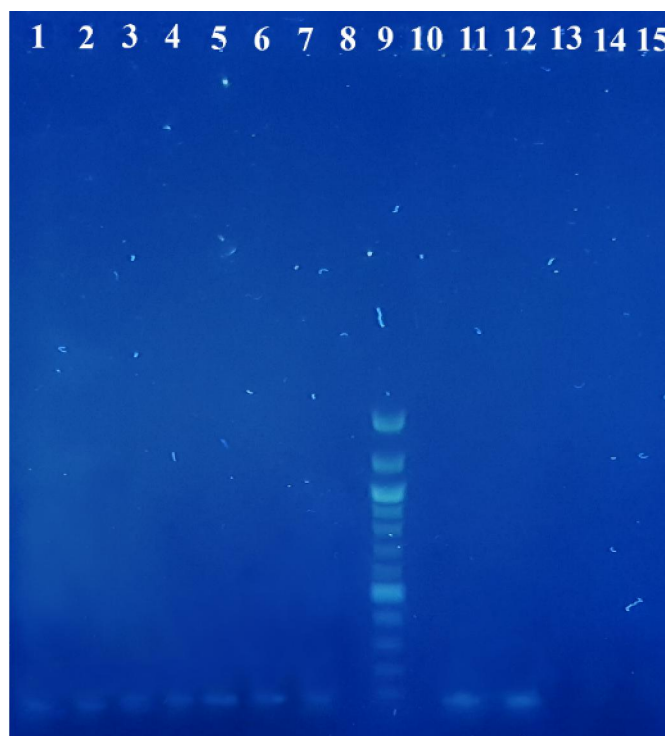


Č.	Vzorek	Detekce
1	DNA standard	
3,4	Eminence probiotický krém s okurkou	+++ / +++
5,6	Eminence probiotické čisticí mléko s okurkou	+++ / ++
7,8,9	Eminence probiotická maska s okurkou	+++ / +++ / +++
10,11	PK (<i>L. pentosus</i>)	+++ / +++
12,13	NK	- / -

Obrázek 87: Bakterie v kosmetických přípravcích s obsahem rostlinné složky a probiotik – agarózová gelová elektroforéza, produkty specifické pro doménu Bacteria (466 bp) - nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

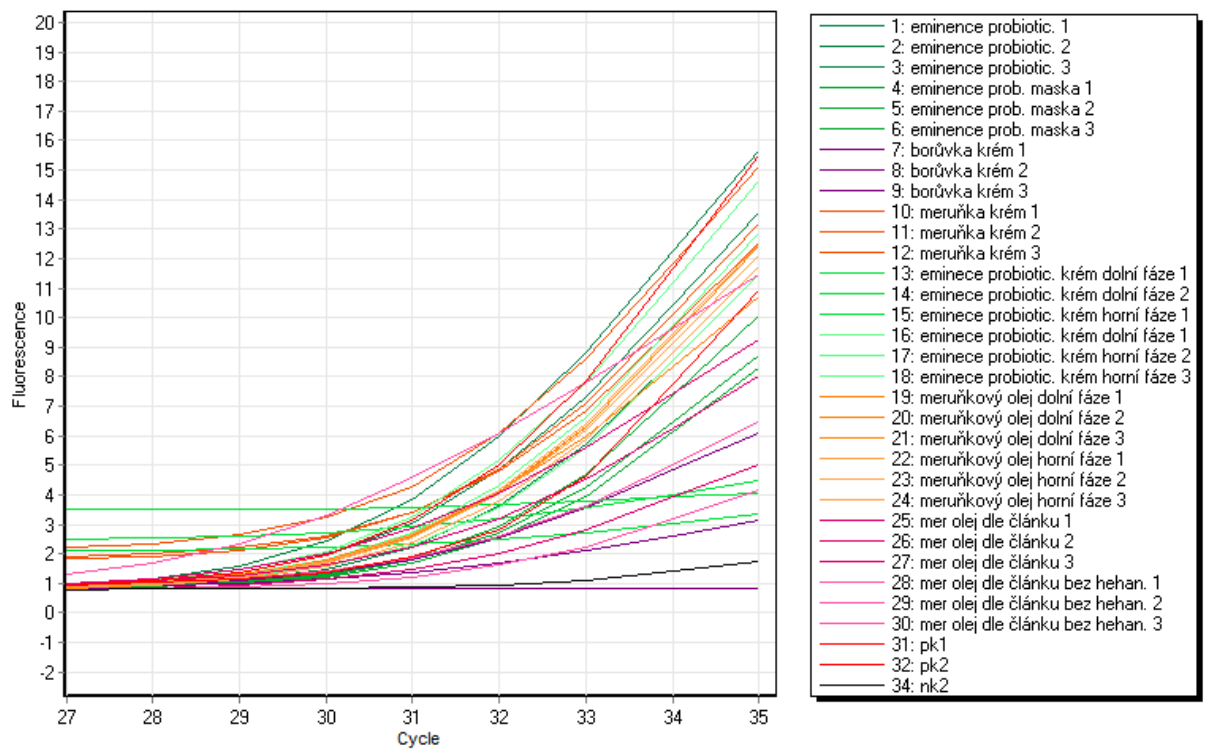


Obrázek 88: Bakterie v kosmetických přípravcích s obsahem rostlinné složky a probiotik - Amplifikační křivky - PCR specifická pro rod *Lactobacillus*



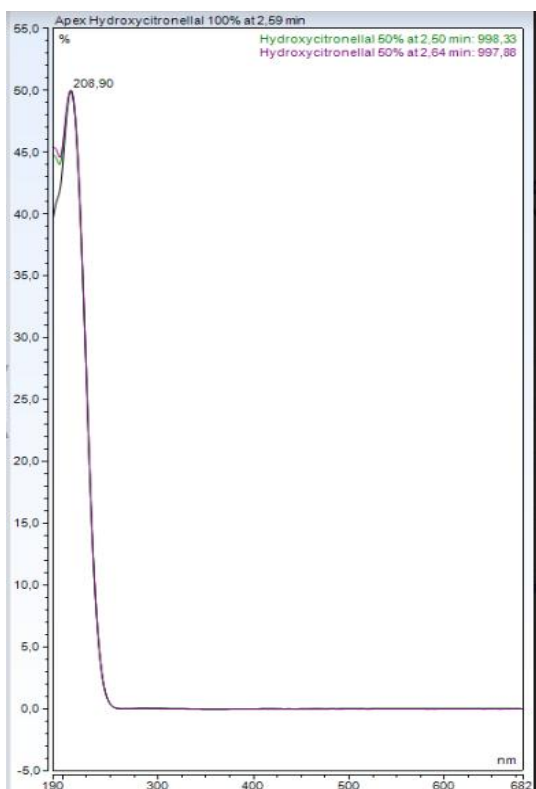
Č.	Vzorek	Detekce
1,2	Eminence probiotický krém s okurkou	+ / +
3,4	Eminence probiotické čistící mléko s okurkou	+ / +
5,6,7	Eminence probiotická maska s okurkou	+ / + / +
9	DNA standard	
11,12	PK (<i>L. pentosus</i>)	++ / ++
14,15	NK	- / -

Obrázek 89: Bakterie v kosmetických přípravcích s obsahem rostlinné složky a probiotik – agarózová gelová elektroforéza, produkty specifické pro rod *Lactobacillus* (92 bp) - nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

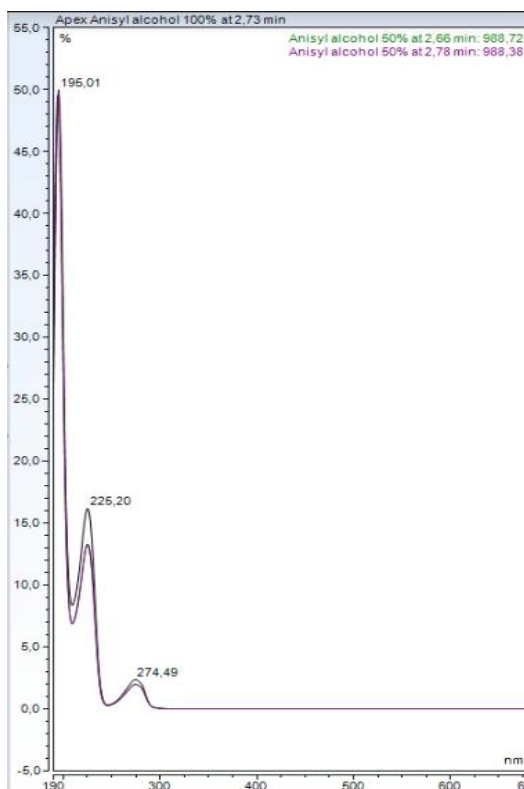


Obrázek 90: Detekce rostlinné DNA v kosmetických přípravcích s obsahem rostlinné složky a probiotik - Amplifikační křivky, primery (F_26S/R)

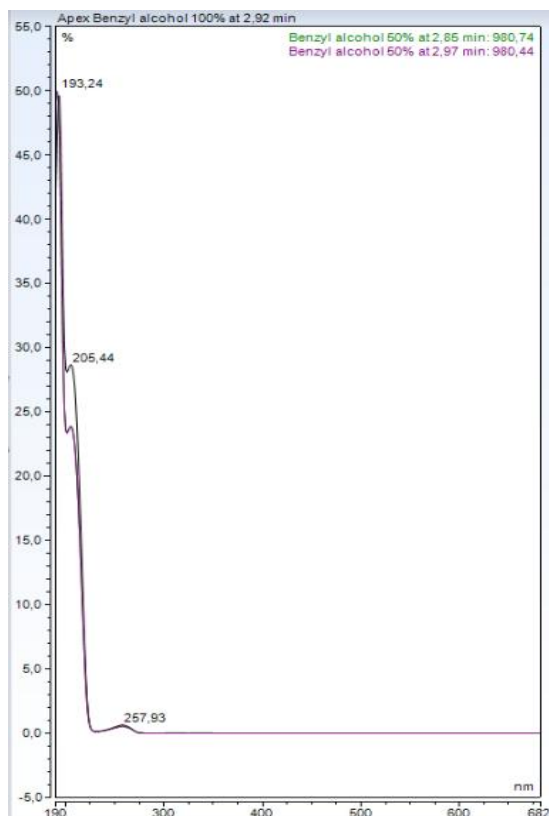
PŘÍLOHA 5: UV-VIS SPEKTRA VONNÝCH ALERGENŮ



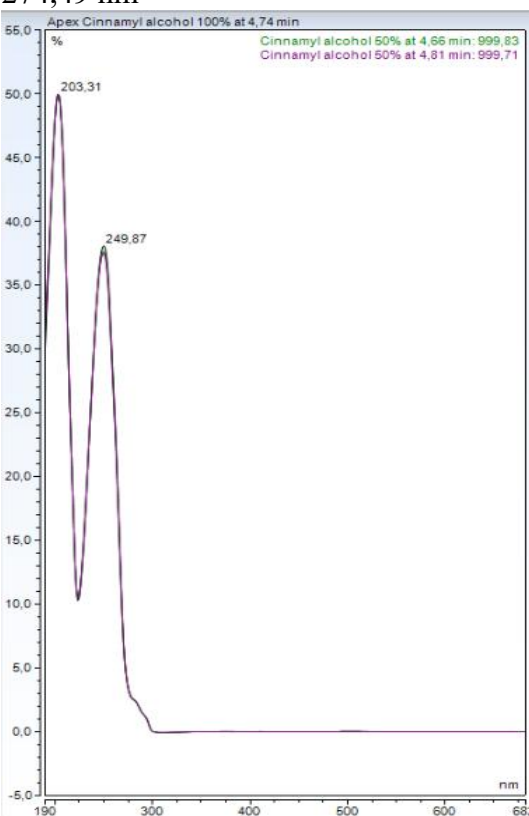
Hydroxycitronelal – 208,90 nm



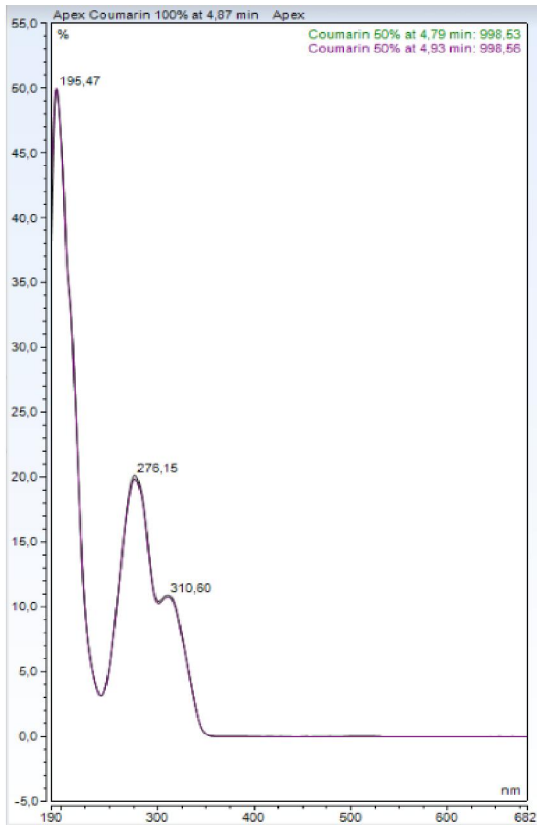
Anisylalkohol – 196,01 nm, 225,20 nm,
274,49 nm



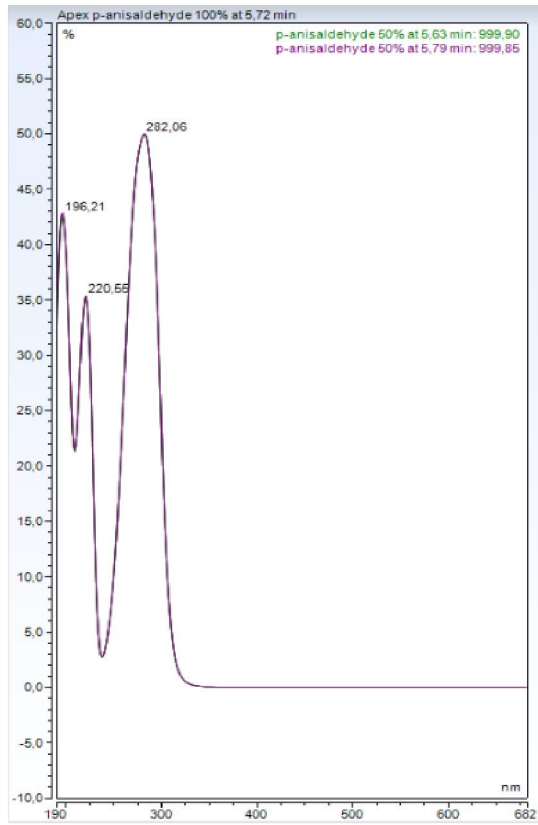
Benzylalkohol – 193,24 nm, 205,44 nm,
257,93 nm



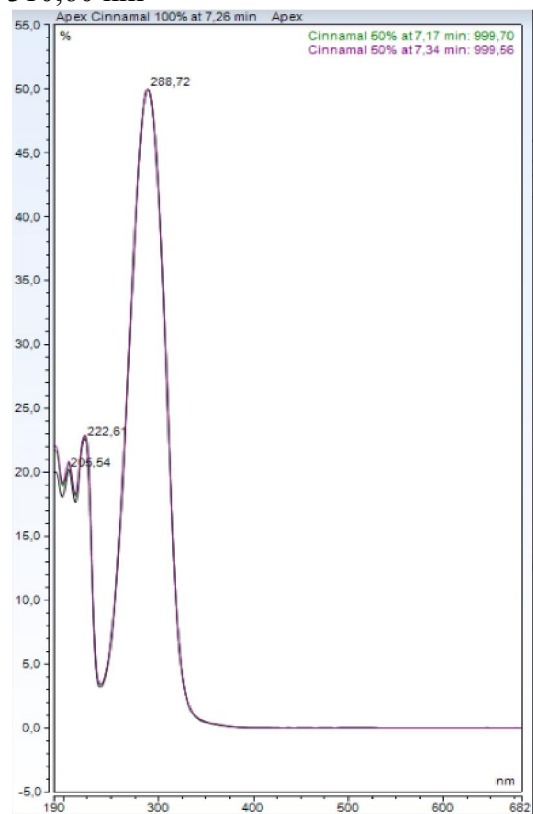
Cinamylalkohol – 203,31 nm, 249,87 nm



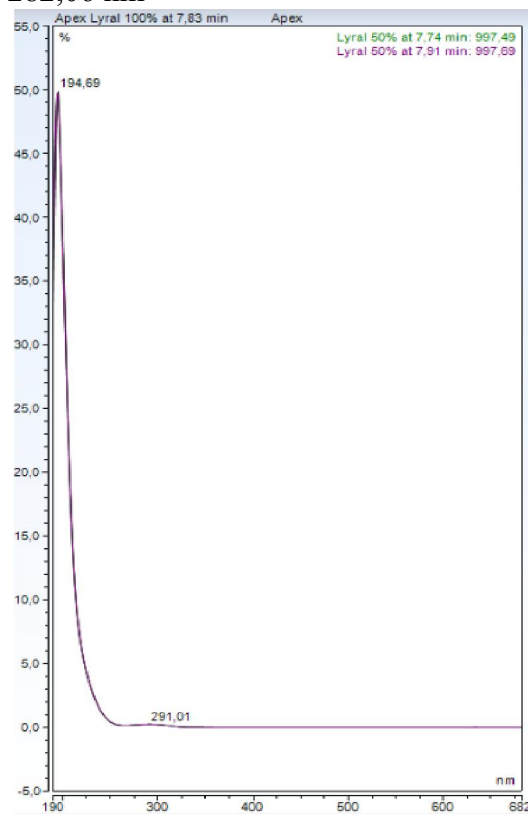
Kumarin – 195,47 nm, 276,15 nm,
310,60 nm



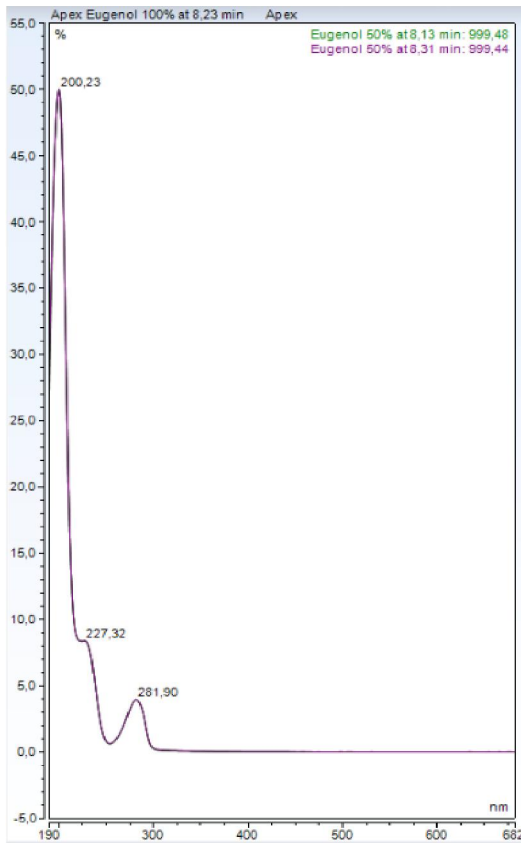
p-anisaldehyd – 196,21 nm, 220,65 nm,
282,06 nm



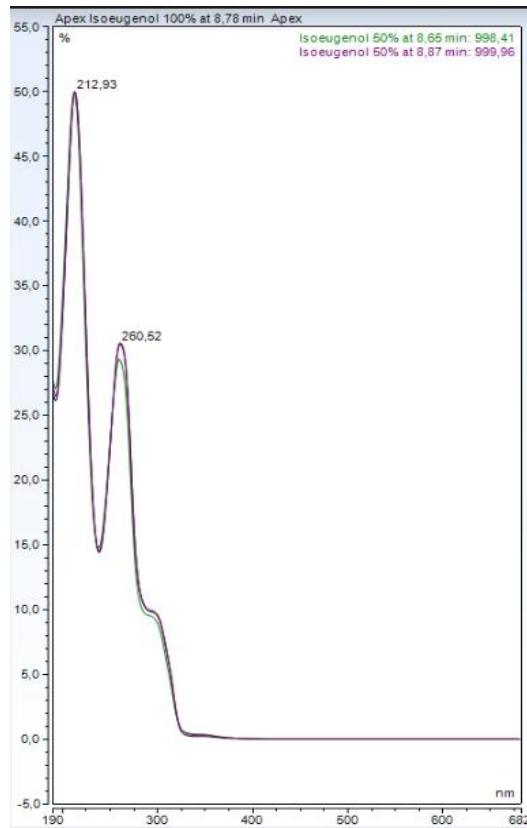
Cinamal – 205,54 nm, 222,61 nm,
288,72 nm



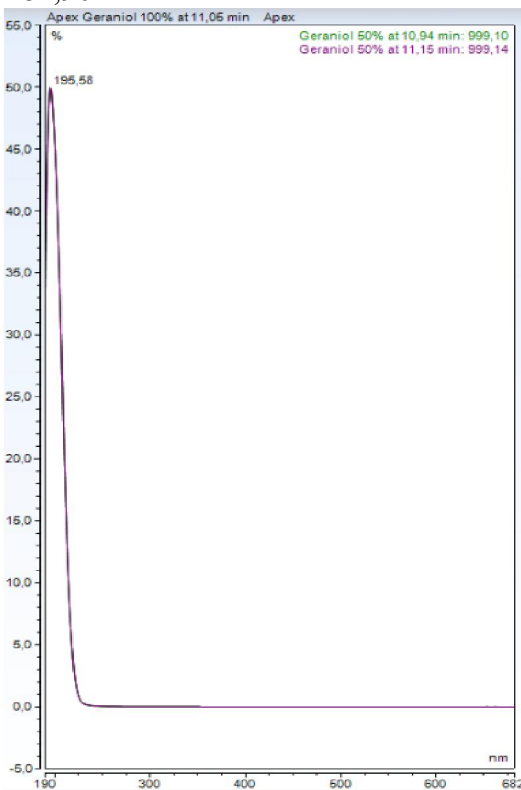
Lyral – 194,69 nm, 291,01 nm



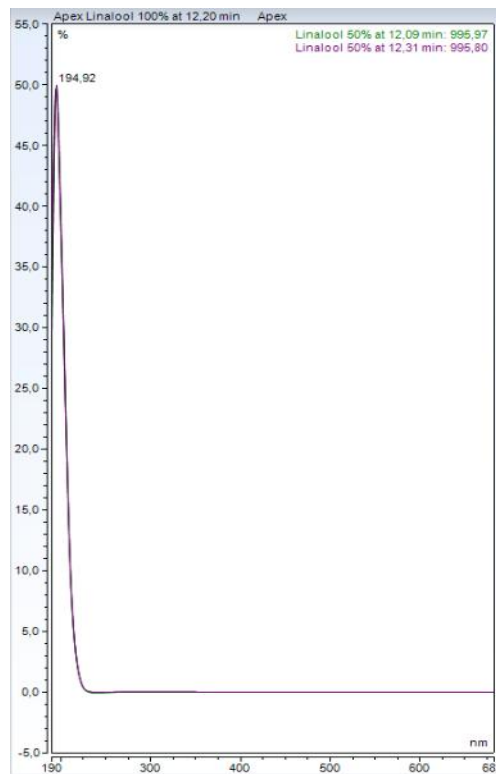
Eugenol – 200,23 nm, 227,32 nm,
281,90 nm



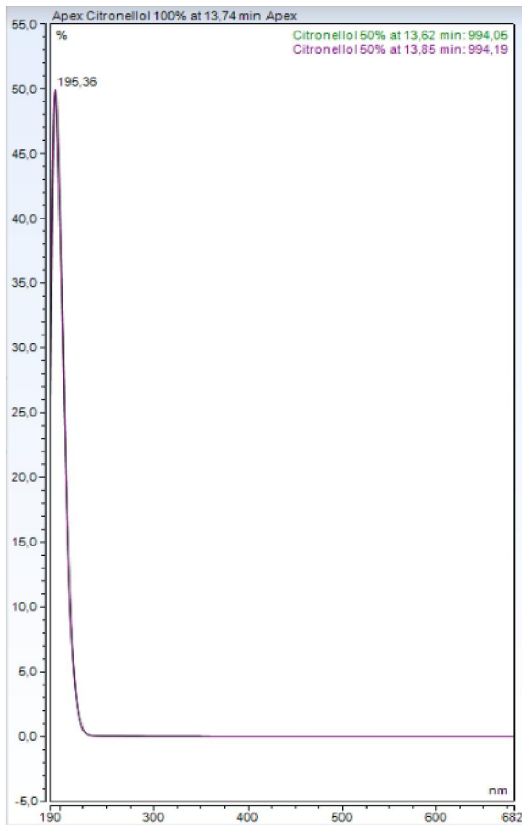
Isoeugenol - 212,93 nm, 260,52 nm



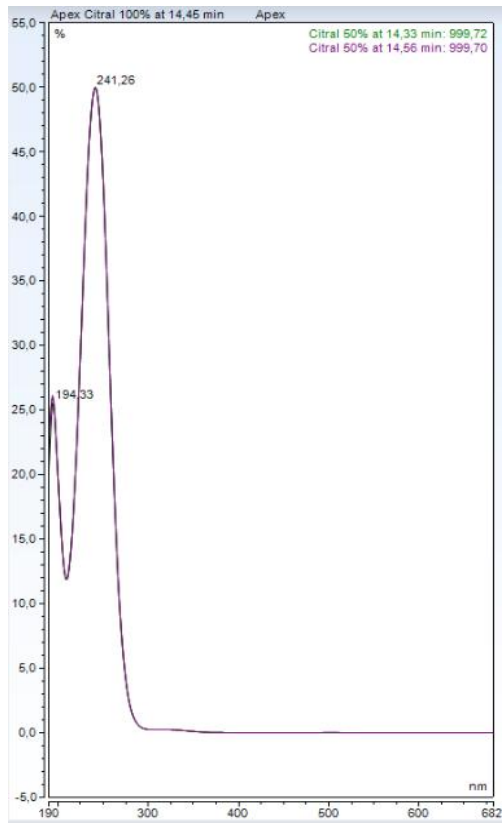
Geraniol – 195,58 nm



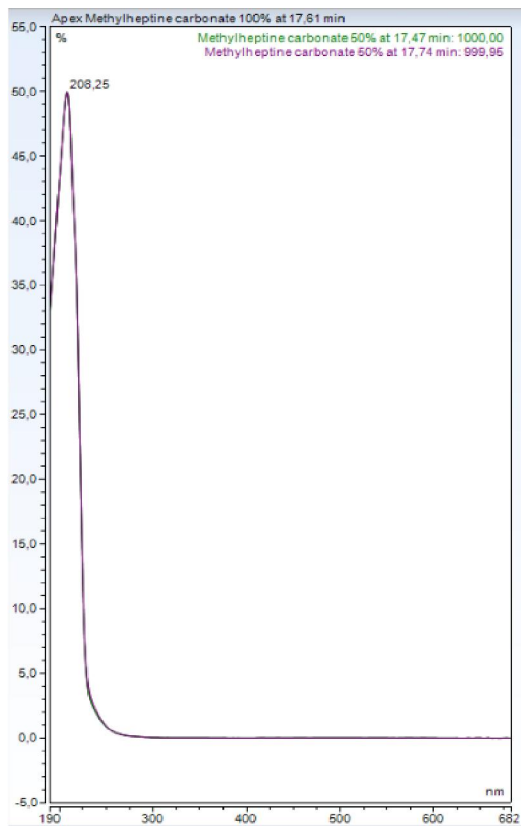
Linalol – 194,92 nm



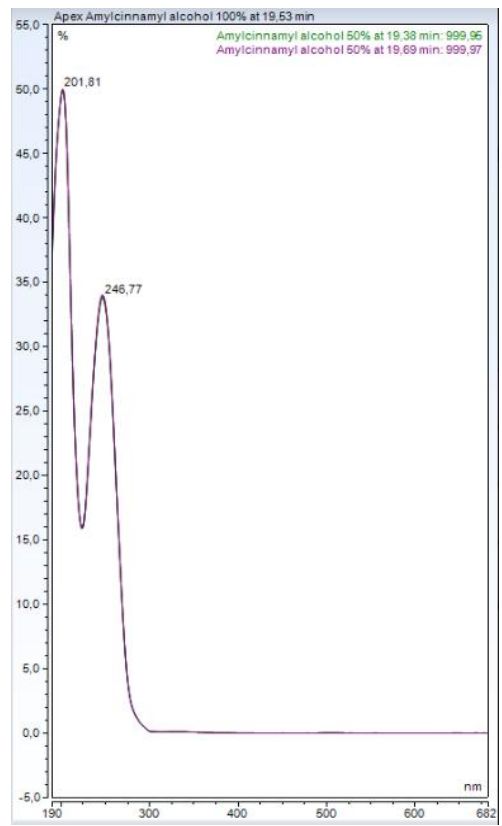
Citronelol – 195,36 nm



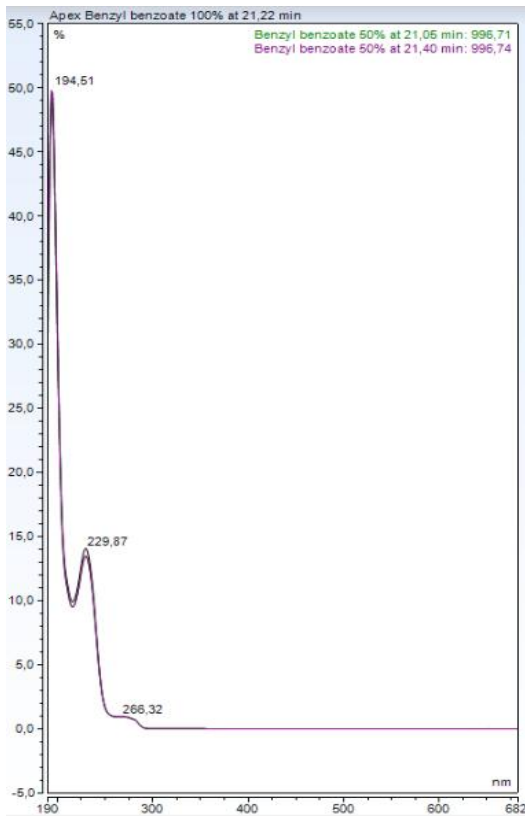
Citral – 194,33 nm, 241,26 nm



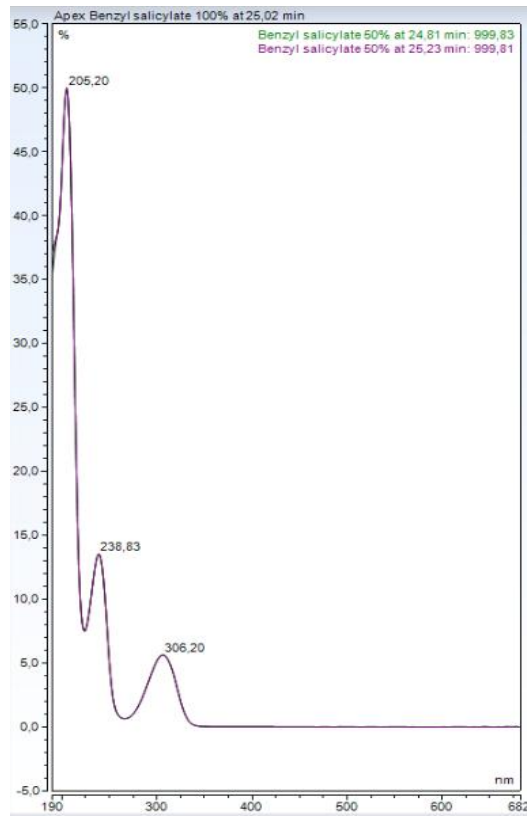
Methylheptinkarbonát – 208,26 nm



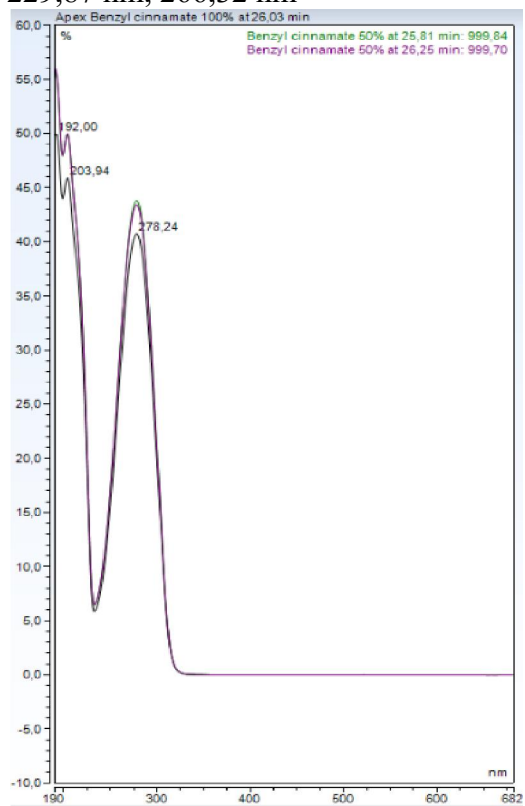
Amylcinnamylalkohol – 201,81 nm,
245,77 nm



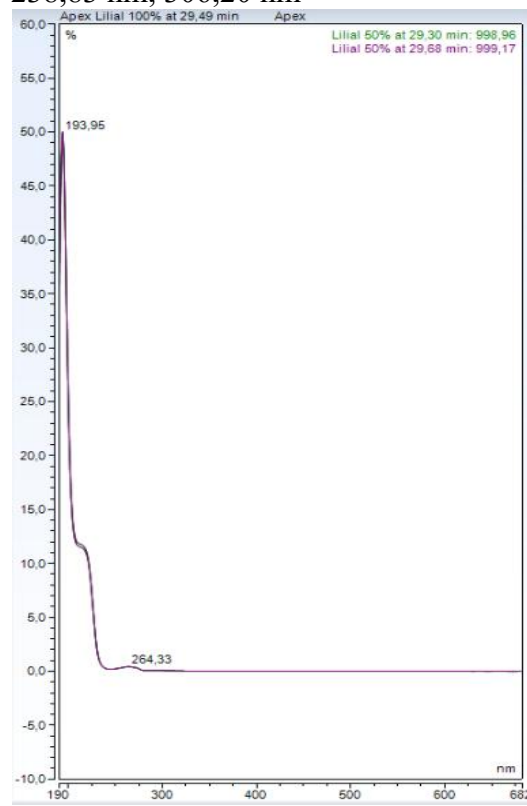
Benzylbenzoát – 194,61 nm,
 229,87 nm, 266,32 nm



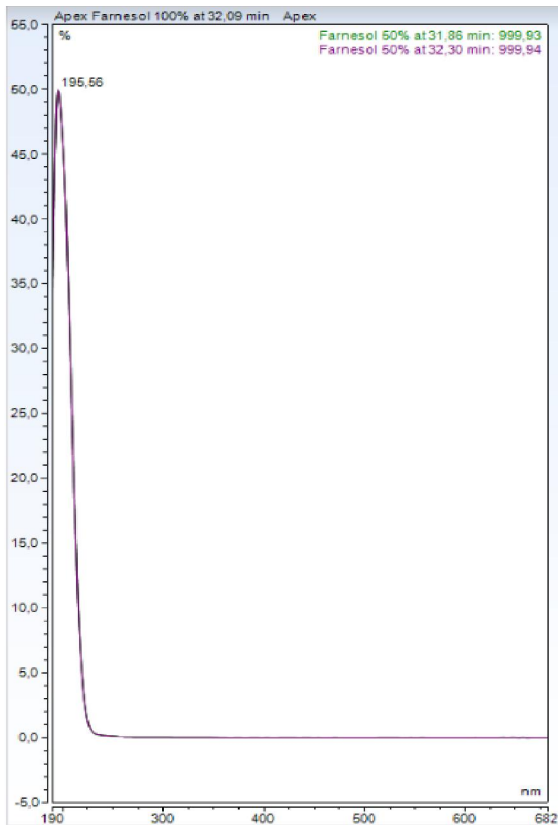
Benzylsalicylát – 205,20 nm,
 238,83 nm, 306,20 nm



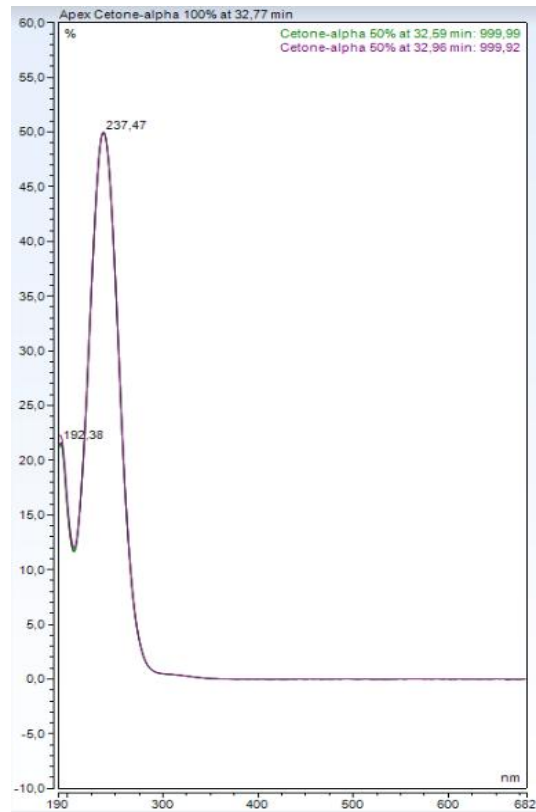
Benzylcinamát – 192,00 nm,
 203,94 nm, 278,24 nm



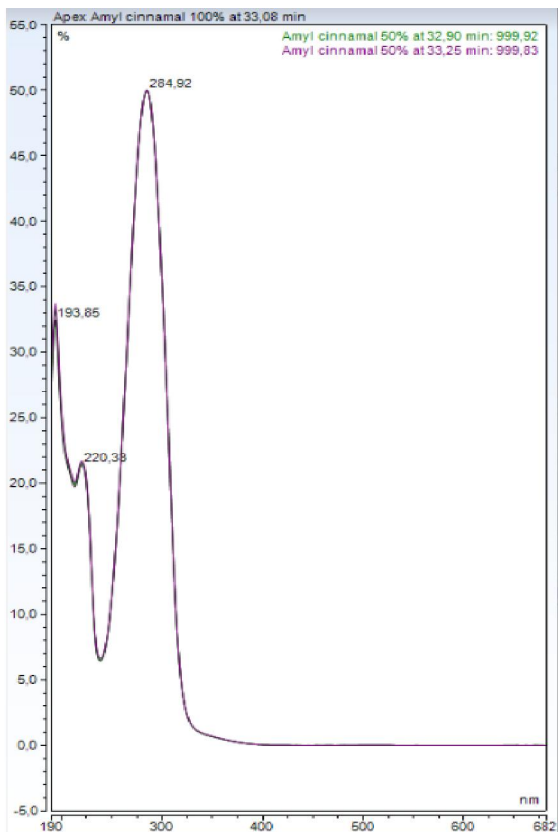
Lilial – 193,95 nm, 264,33 nm



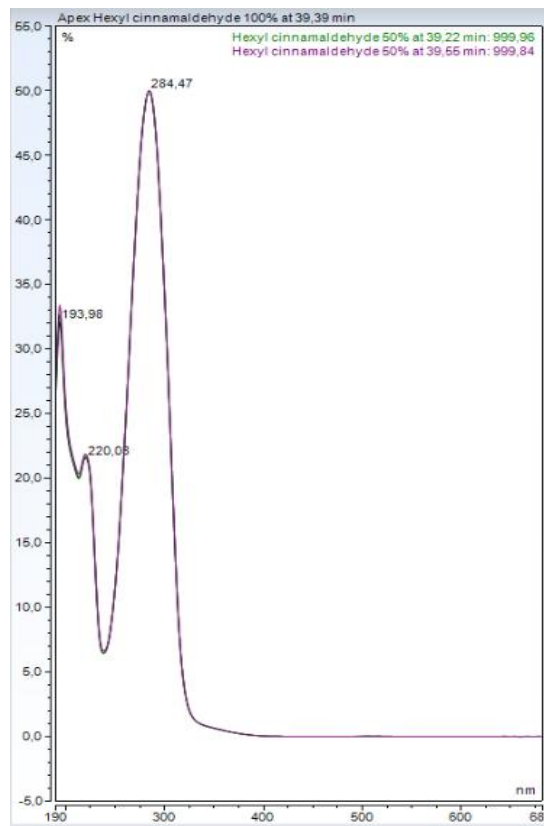
Farnesol – 195,56 nm



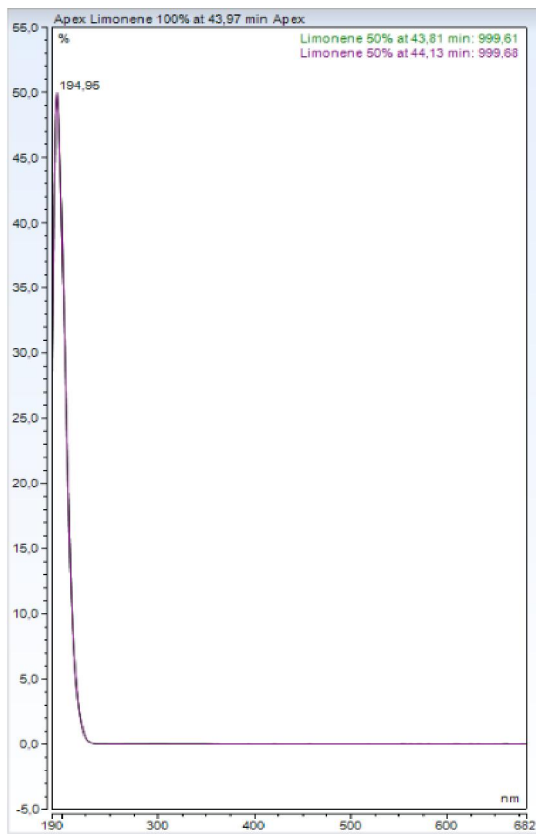
Ceton-alfa – 192,38 nm, 237,47 nm



Amylcinamal - 193,85 nm, 220,38 nm,
284,92 nm



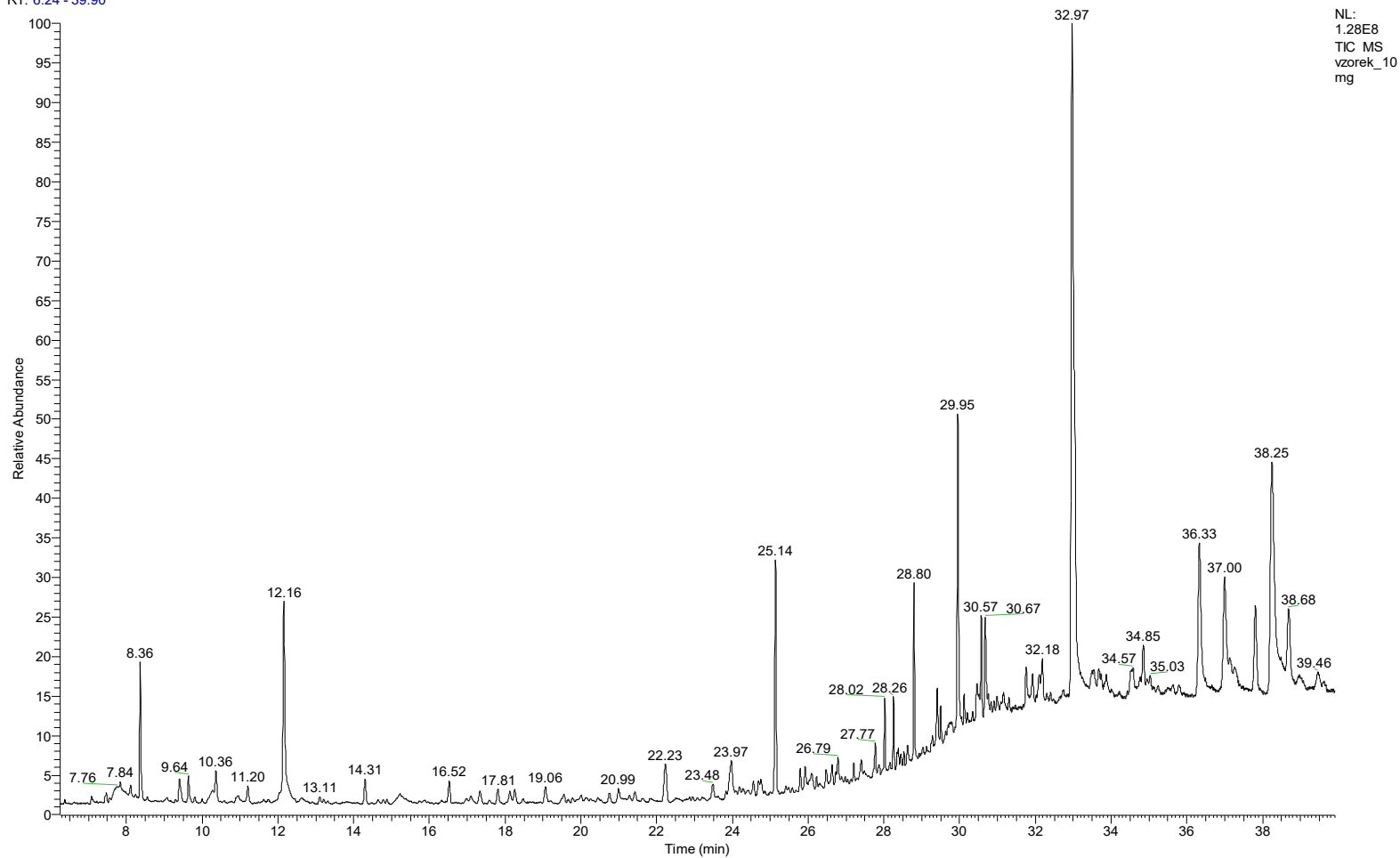
Hexyl cinamaldehyd – 193,98 nm,
220,08 nm, 284,47 nm



Limonen – 194,95 nm

PŘÍLOHA 6: GC-MS CHROMATOGRAMY STANDARDŮ ALLERGEN MIX 1 A 2, CHROMATOGRAMY EXTRAKTU Z *A.SATUREIODES* PRO NAVÁŽKY 10 A 25 MG

RT: 6.24 - 39.90

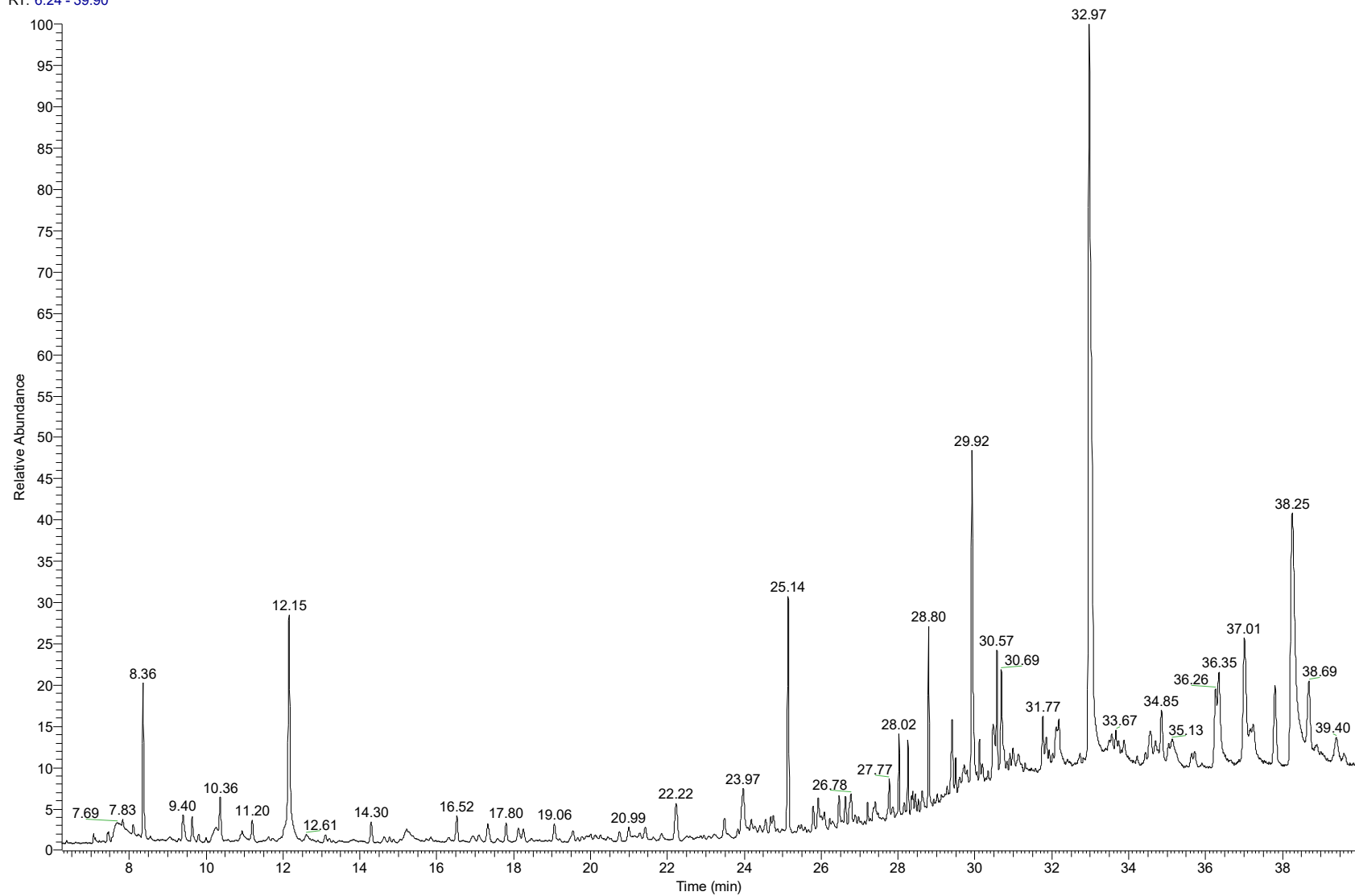


Obrázek 91: GC-MS chromatogram extraktu z *A.satureioides* (navážka 10 mg)

Legenda k Obrázku 91

Retenční čas (RT)	Start RT	konec RT	Látka	Číslo CAS
8.36	8.30	8.61	Linalool	78-70-6
9.40	9.33	9.58	beta-Caryophyllene	87-44-5
10.24	10.07	10.59	Menthol	89-78-1
11.20	11.10	11.32	alpha-Terpineol	98-55-5
12.16	12.09	12.25	Carvone	2244-16-8
14.31	14.15	14.40	trans-Anethole	4180-23-8
23.48	23.42	23.62	Eugenol	97-53-0
29.43	29.39	29.55	Vanillin	121-33-5

RT: 6.24 - 39.90



NL:
2.14E8
TIC MS
vzorek_25
mg

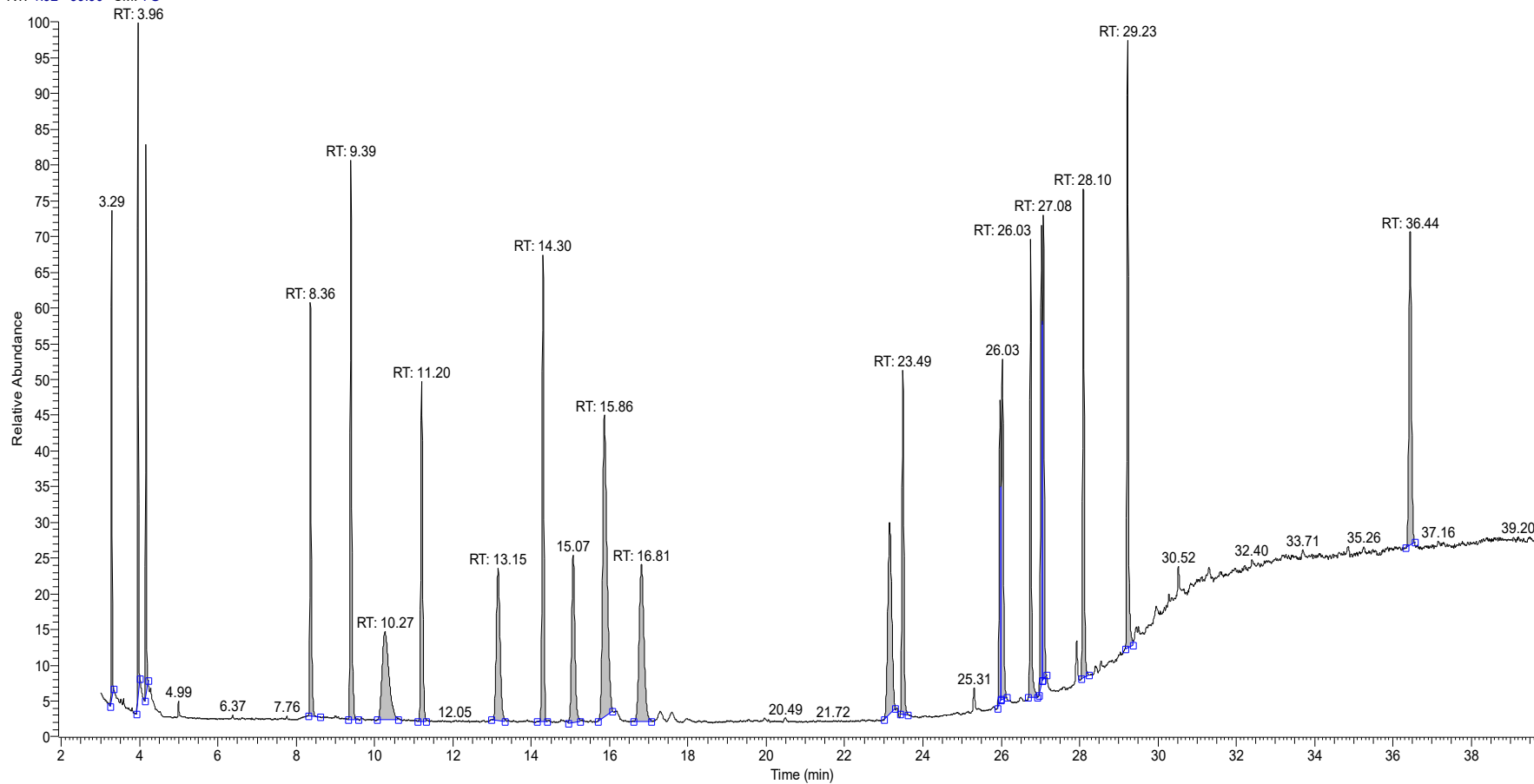
Obrázek 92: GC-MS chromatogram extraktu z *A. satureioides* (navážka 25 mg)

Legenda k Obrázku 92

Retenční čas (RT)	Start RT	konec RT	Látka	Číslo CAS
8.36	8.30	8.61	Linalool	78-70-6
9.40	9.33	9.58	beta-Caryophyllene	87-44-5
10.24	10.07	10.59	Menthol	89-78-1
11.20	11.10	11.32	alpha-Terpineol	98-55-5
12.16	12.09	12.25	Carvone	2244-16-8
14.31	14.15	14.40	trans-Anethole	4180-23-8
23.49	23.42	23.62	Eugenol	97-53-0
29.43	29.39	29.55	Vanillin	121-33-5

RT: 1.92 - 39.90 SM: 7G

NL:
6.53E7
TIC MS
st3_smes_
a1



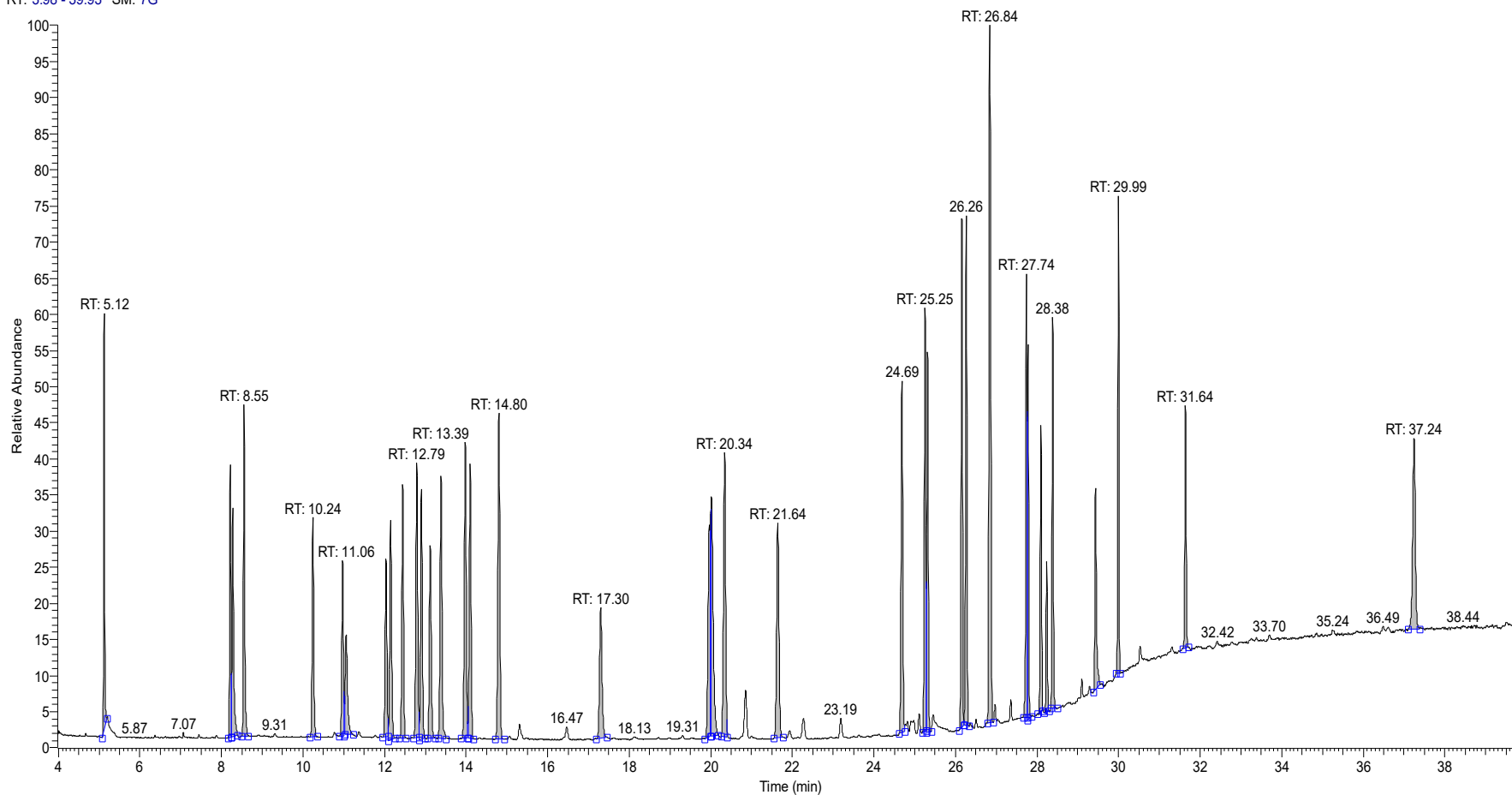
Obrázek 93: GC-MS chromatogram Allergen Mix 1

Legenda k Obrázku 93

Retenční čas (RT)	Start RT	konec RT	Látka	Číslo CAS
3.29	3.24	3.33	beta-Pinene	18172-67-1
3.96	3.92	4	alpha-Terpinene	99-86-5
4.16	4.12	4.21	Limonene	5989-27-5
8.36	8.3	8.61	Linalool	78-70-6
9.39	9.33	9.58	beta-Caryophyllene	87-44-5
10.27	10.07	10.59	Menthol	89-78-1
11.2	11.1	11.32	alpha-Terpineol	98-55-5
13.15	12.97	13.33	Citronellol	106-22-9
14.3	14.15	14.4	trans-Anethole	4180-23-8
15.07	14.95	15.25	Geraniol	106-24-1
15.86	15.7	16.08	Benzyl alcohol	100-51-6
16.81	16.61	17.05	Ebanol 1+2	67801-20-1
23.15	23	23.29	Trimethyl-benzenepropanol	103694-68-4
23.49	23.42	23.62	Eugenol	97-53-0
25.97	25.9	26	Anise alcohol	105-13-5
26.03	26	26.13	Cinnamyl alcohol	104-54-1
26.75	26.69	26.93	Isoeugenol (E)	5932-68-1
27.03	26.96	27.05	trans,trans-Farnesol	106-28-5
27.08	27.05	27.15	alpha-Santalol	115-71-9
28.1	28.04	28.23	beta-Santalol	77-42-9
29.23	29.17	29.36	alpha-Amylcinnamyl alcohol	101-85-9
36.44	36.33	36.55	Sclareol	515-03-7

RT: 3.98 - 39.93 SM: 7G

NL:
1.09E8
TIC MS
st3_smes_
a2



Obrázek 94: GC-MS chromatogram Allergen Mix 2

Legenda k Obrázku 94

Retenční čas (RT)	Start RT	konec RT	Látka	Číslo CAS
5.12	5.07	5.19	Terpinolene	586-62-9
8.22	8.17	8.25	Camphor	464-49-1
8.28	8.25	8.39	Benzaldehyde	100-52-7
8.55	8.48	8.66	Linalyl acetate	115-95-7
10.24	10.17	10.34	Methyl-2-octynoate	111-12-6
10.97	10.89	11.01	Citral - Neral	5392-40-5
11.06	11.03	11.22	Salicylaldehyde	90-02-8
12.04	11.95	12.08	Citral - Geranial	5392-40-5
12.15	12.09	12.25	Carvone	2244-16-8
12.44	12.36	12.52	Geranyl acetate	105-87-1
12.79	12.7	12.84	alpha-Damascone	43052-87-5
12.9	12.84	12.99	Dimethylbenzylcarbiny acetate (DMBCA)	151-05-1
13.12	13.04	13.24	Methyl salicylate	119-36-8
13.39	13.31	13.51	beta-Damascone (E)	23726-91-2
13.98	13.88	14.03	delta-Damascone (Rose Ketone-3)	57378-68-4
14.1	14.05	14.18	beta-Damascenone (Rose Ketone-4)	23696-85-7
14.8	14.7	14.94	alpha-Isomethylionone	127-51-5
17.3	17.18	17.45	Hydroxycitronellal	107-75-5 2
19.97	19.85	19.98	Cinnamaldehyde	14371-10-9
20.02	20	20.18	Butylphenyl methylpropional	80-54-6
			Tetramethylacetyloctahydro-naphthalene	
20.34	20.25	20.4	(ISO E®)	68155-67-9; 54464-57-2; 68155-66-8
21.64	21.55	21.78	Amyl salicylate	2050-08-0
24.69	24.62	24.76	alpha-Acetyl cedrene	32388-55-9
25.25	25.18	25.28	alpha-Amylcinnamaldehyde	78605-96-6

25.32	25.29	25.41	Eugenyl acetate	93-28-7
26.15	26.08	26.2	Galaxolide 1	1222-05-5
26.26	26.21	26.32	Galaxolide 2	1222-05-5
26.84	26.77	26.91	Hexadecanolactone / Dihydroambrettolide	109-29-5
27.74	27.65	27.76	Isoeugenyl acetate	93-29-8
27.78	27.76	27.86	3-Propylidene phthalide	17369-59-4
28.1	28.01	28.14	Coumarin	91-64-5
28.24	28.17	28.3	Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde (HICC)	31906-04-4
28.38	28.33	28.5	Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde (HICC)	31906-04-4
29.43	29.39	29.55	Vanillin	121-33-5
29.99	29.93	30.04	Benzyl benzoate	120-51-4
31.64	31.57	31.71	Benzyl salicylate	118-58-1
37.24	37.1	37.37	Benzyl cinnamate	103-41-3

PUBLIKAČNÍ ČINNOST A ŽIVOTOPIS

Publikace

VUT

LANGOVÁ Denisa, Maria Angélica Mera CORDOBA, Rodrigo SORRECHIA, Julie HOOVÁ, Zdeněk SVOBODA, Renata MIKULÍKOVÁ, Marcos Antonio CORREA, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues PIETRO and Ivana MÁROVÁ, Achyrocline satureioides hydroalcoholic extract as a hypoallergenic antimicrobial substitute of natural origin for commonly used preservatives in cosmetic emulsions, *Plants* 2023, (*v recenzním řízení*).

UHLÍŘOVÁ, Renata, Denisa LANGOVÁ, Agáta BENDOVI, Michal GROSS, Petra SKOUMALOVÁ a Ivana MÁROVÁ. Antimicrobial Activity of Gelatin Nanofibers Enriched by Essential Oils against *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. *Nanomaterials* 2023, 13, 844. <https://doi.org/10.3390/nano13050844>

FIALOVA, Lenka, Denisa LANGOVA a Ivana MAROVA. A Comparative Study of Some Procedures for Isolation of Fruit DNA of Sufficient Quality for PCR-Based Assays. *Molecules*. 2020, 25(18), 1-15. ISSN 1420-3049. Dostupné z: [doi:10.3390/molecules25184317](https://doi.org/10.3390/molecules25184317)

KONEČNÁ, Jana, Denisa LANGOVÁ, Daniel HORÁK a Štěpánka TRACHTOVÁ. Optimalization of deoxyribonucleic acid extraction using various types of magnetic particles. *Chemical Papers*. 2019, 73(5), 1247-1255. ISSN 2585-7290. Dostupné z: [doi:10.1007/s11696-018-00675-9](https://doi.org/10.1007/s11696-018-00675-9)

Další

LANGOVA, Denisa, Iva SLANA, Jana OKUNKOVA, Monika MORAVKOVA, Martina FLORIANOVA a Jirina MARKOVA. First Evidence of the Presence of the Causative Agent of Caseous Lymphadenitis *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Dairy Products Produced from the Milk of Small Ruminants. *Pathogens*. 2022, 11(12). ISSN 2076-0817. Dostupné z: [doi:10.3390/pathogens11121425](https://doi.org/10.3390/pathogens11121425)

Konference

Přednáška v AJ

LANGOVA, Denisa, Renata UHLÍŘOVÁ, Ivana MÁROVÁ. Antimicrobial activity of nanofibers enriched by essential oils against *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. Tomasek Days 2021. XXX. *Conference of Young Microbiologists Brno: Masarykova univerzita, Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně*, 2021. s. 20-20.

Konferenční příspěvky

FIALOVÁ, L.; LANGOVÁ, D.; PRACHÁROVÁ, A.; MÁROVÁ, I. Development of a Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Closely Related Fruit Species in Food. *Studentská odborná konference Chemie je život 2021* Sborník abstraktů. 2021. s. 34-35. ISBN: ISBN 978-80-214-6002.

LANGOVÁ, D.; FIALOVÁ, L.; MÁROVÁ, I. Newly designed primers targeting limonene synthase. *Special Issue: European Biotechnology Congress 2020*. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 35. Prague: Taylor and Francis, 2021. s. 119-119. ISBN: 1310-2818. ISSN: 1314-3530.

FIALOVÁ, L.; LANGOVÁ, D.; NĚMCOVÁ, A.; MÁROVÁ, I. Multiplex qPCR-HRM with intercalating dye: A possible way to verify red fruit presence in food. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2020. s. 400-400. ISSN: 1314-3530.

LANGOVÁ, D.; FIALOVÁ, L.; MÁROVÁ, I. Isolation and identification of genus *Fragaria* DNA in cosmetic products. *CECE 2019 : 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*, Gdańsk, Poland, 24-26th September, 2019, poster abstract. <https://ppm.edu.pl/info/book/GUMfddfa5e65eaa43bb87c5d7b54b5b6f98/>

NĚMCOVÁ, A.; LANGOVÁ, D.; ŽÁČKOVÁ, K.; MÁROVÁ, I. Use of technical hemp in cosmetics preparations. *Malta: International Society of Antioxidants*, 2019.

FIALOVÁ, L.; LANGOVÁ, D.; MÁROVÁ, I. Simultaneous detection of peach and apricot dna by multiplex real-time pcr-hrm with intercalating dye. 2019. *CECE 2019 : 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*, Gdańsk, Poland, 24-26th September, 2019, poster abstract. <https://ppm.edu.pl/info/book/GUMfddfa5e65eaa43bb87c5d7b54b5b6f98/>

UHLÍŘOVÁ, R.; LANGOVÁ, D.; PLACHÁ, M.; PLÁŠKOVÁ, A.; SKOUMALOVÁ, P.; NĚMCOVÁ, A.; MÁROVÁ, I. The use of natural extracts in cosmetics and subsequent detection of plant dna using molecular diagnostic methods. *7th Meeting on Chemistry and Life 2018*. Book of abstracts. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2018. s. 141-142. ISBN: 978-80-214-5488-0.

LANGOVÁ, D.; Š. TRACHTOVÁ, A. NĚMCOVÁ. Identifikace mikroorganismů v kosmetických výrobcích s obsahem probiotik. *Studentská odborná konference Chemie je život 2017* Sborník konferenčních příspěvků. Ing. Petr Dzik, Ph.D. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. s. 67-67. ISBN: 978-80-214-5489-7.

Zahraníční stáže

Belgie – European Commission Joint Research Centre in Geel

Listopad 2019 – březen 2020

V rámci stáže jsem pracovala v certifikovaných výzkumných laboratořích Evropské komise v belgickém Geelu. Náplní práce bylo zpracování vzorků rostlinného charakteru (vzorkování, izolace DNA (magnetické částice), optimalizace real-time PCR protokolů, výběr vhodných primerů, testování protokolů na ddPCR, charakterizace vzorků pomocí ddPCR).

Univerzita UNESP (Araraquara, Brasil)

Srpen - prosinec 2018

Experimentální práce byla zaměřena na přípravu extraktů léčivých rostlin, kultivaci mikroorganismů, testy antimikrobiální aktivity, přípravu kosmetického přípravku s antimikrobiální aktivitou.

Curriculum vitae (CV)

Osobní údaje

Jméno: Denisa Langová (roz. Romanovská), Ing.
Datum narození: 18. srpna 1993
E-mail: denisa.langova123@gmail.com
Telefon: 774 373 606



Zaměstnání

Červenec 2021 – září 2022 – Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

Odborný pracovník výzkumu – odebrání biologických vzorků v chovech v rámci celé ČR, odborná analýza, organizace práce v laboratoři, publikační činnost, zajištění provozu laboratoře

Březen 2021 – prosinec 2021 – Vysoké učení technické v Brně

Odborný technický pracovník ve výzkumu – organizace práce v laboratoři, vedení závěrečných prací studentů, zajištění chodu laboratoře, publikační a výzkumná činnost

Květen 2019 – listopad 2019 – Vysoké učení technické v Brně

Technický pracovník ve výzkumu – zajištění chodu laboratoře, odborná konzultace závěrečných prací studentů, výzkumná činnost

Srpen 2017 – červenec 2018 – Vysoké učení technické v Brně

Technický pracovník v laboratoři - zajištění chodu laboratoře, odborná konzultace závěrečných prací studentů

Vzdělání

2017 – dosud - Doktorské studium (VUT, Chemie a technologie potravin, Potravinářská chemie)

(Předměty: Pokročilá molekulární biotechnologie, Pokročilé bioanalytické metody, Potravinářská chemie a biochemie a.j.)

2015 – 2017 – Magisterské studium (VUT, Chemie a technologie potravin, Potravinářská chemie a biotechnologie)

(Předměty: Molekulární biotechnologie, Praktikum z molekulární biotechnologie, Biochemie II, Kosmetologie a technologie kosmetiky, Mikrobiologie v potravinářském průmyslu a biotechnologii, Biostatistika a.j.)

2012 – 2015 – Bakalářské studium (VUT, Chemie a technologie potravin, Potravinářská chemie)

2004 – 2012 – Gymnázium a střední odborná škola pedagogická ve Znojmě

1999 – 2012 – Základní škola JUDr. Mareše ve Znojmě