



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

VYUŽITÍ VZÁCNÝCH OLEJŮ V KOSMETICE

USE OF RARE OILS IN COSMETICS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Alina Pilipenco

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1295/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Alina Pilipenco**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Využití vzácných olejů v kosmetice

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše týkající se charakteristiky a účinků netradičních rostlinných olejů a způsobů jejich získávání ke kosmetickým účelům
- 2) základní analýza a charakteristika vybraných složek olejů
- 3) formulace závěrů na základě získaných výsledků a možnosti využití testovaných olejů v kosmetice

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

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

Alina Pilipenco
student(ka)

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo zkoumání vzácných olejů. V práci byly charakterizovány oleje z vybraných rostlin (mák, konopí, ostropestřec) z hlediska obsahu aktivních fenolických látek, složení mastných kyselin, antioxidační a antimikrobiální účinky. První část práce je literární rešerší na zadané téma, která obsahuje následující části: univerzální chemické složení rostlinných olejů, charakteristiky a účinků netradičních rostlinných olejů a způsobů jejich získávání ke kosmetickým účelům. Experimentální část je především zaměřena na základní analýzu vybraných složek olejů a na základě získaných výsledků návrh využití v kosmetice, konkrétně přípravu sprchového oleje. Na závěr je uveden přehled všech vlastností vybraných olejů, jejich praktické využití a zhodnocení z ohledu na jejich aplikace v kosmetice.

Klíčová slova

Makový olej, konopný olej, ostropestřecový olej, rostlinný olej, antioxidační aktivita, antimikrobiální aktivita, polyfenoly, flavonoidy, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie

Abstract

The purpose of this bachelor thesis was to research rare oils. The oils from selected plants (poppy, cannabis, thistle) is characterized by the content of active phenolic compounds, fatty acid composition, antioxidant and antimicrobial effects. First part of the thesis is a literary research on a given topic, which contains the following parts: the universal chemical composition of vegetable oils, the characteristics and effects of selected oils and the ways of their obtaining for cosmetic purposes. The experimental part is focused primarily on the basic analysis of selected oil components and the preparation of the shower oil based on the obtained results. In conclusion are presented an overview of all the properties of selected oils, their practical use and assessment of their application in cosmetics

Key words

Poppy oil, cannabis oil, oilseed oil, vegetable oil, antioxidant activity, antimicrobial activity, polyphenols, flavonoids, gas chromatography, hplc

PILIPENCO, A. *Využití vzácných olejů v kosmetice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 50 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé vedoucí Ing. Andrea Hároniková, Ph.D. za účinnou metodickou a pedagogickou pomoc, a také za cenné rady a připomínky.

Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi Ing. Nadzeya Mikheichyk za velikou ochotu a pomoc při řešení experimentální části práce.

Určitě bych taky poděkovala prof. Ivaně Márově, za ochotu a vstřícný přístup. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině za podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Chemie olejů.....	8
2.2	Chemické složení.....	8
2.2.1	Hlavní složky.....	9
2.2.2	Minoritní složky	10
2.3	Charakteristika vzácných rostlinných olejů.....	12
2.3.1	Makový olej.....	12
2.3.2	Konopný olej	14
2.3.3	Olej z ostropestřce mariánského	15
2.4	Výroba oleje	16
2.4.1	Úprava a příprava osiva pro získ olejů.....	16
2.4.2	Získávání olejů	17
2.4.3	Rafinace olejů.....	17
2.5	Kvalitativní změny olejů během skladování	18
2.6	Charakterizace olejů	19
2.6.1	Senzorická analýza	20
2.6.2	Tuková čísla	20
2.6.3	Stanovení antioxidační aktivity	21
2.6.4	Metody stanovení antimikrobní aktivity olejů	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1	Použité chemikálie.....	23
3.2	Přístroje a pomůcky.....	23
3.3	Použité kmeny pro kultivaci	24
3.4	Vzorky	24
3.4.1	Porovnání vzorků	24
3.5	Stanovení tukových čísel.....	25
3.5.1	Číslo kyselosti	25
3.5.2	Číslo zmydlnění.....	25
3.5.3	Jodové číslo	25
3.5.4	Peroxidové číslo	26
3.6	Kvantifikace mastných kyselin pomocí GC	26

3.7	Stanovení antioxidační aktivity metodou TEAC	27
3.8	Stanovení celkových polyfenolů spektrometricky	27
3.9	Stanovení celkových flavonoidů	27
3.10	Stanovení antimikrobiální aktivity pomocí zákalu	28
3.11	Diskový antimikrobiální test.....	28
3.12	Stanovení vitamínu E (tokoferolu) metodou HPLC	28
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	29
4.1	Tuková čísla.....	29
4.1.1	Číslo kyselosti	29
4.1.2	Číslo zmýdelnění.....	29
4.1.3	Jodové číslo	30
4.1.4	Peroxidové číslo	31
4.2	Analýza mastných kyselin plynovou chromatografií	31
4.2.1	Makový olej.....	33
4.2.2	Konopný olej	33
4.2.3	Ostropestřecový olej.....	34
4.3	Stanovení antioxidační aktivity	35
4.4	Obsah celkových polyfenolů a flavonoidů	35
4.5	Stanovení vitamínu E.....	36
4.6	Stanovení antimikrobiální aktivity pomocí zákalu	36
4.7	Diskový antimikrobiální test	38
4.8	Využití olejů	40
4.8.1	Příprava sprchového oleje	41
4.8.2	Analýza sprchového oleje	41
5	ZÁVĚR.....	44
6	LITERATURA.....	46
7	ZKRATKY	50

1 ÚVOD

Slovo kosmetika pochází z řečtiny *kosmeîn* (krášlit) – *kosmētikós* (zkrášlování) s významem péče o vnější vzhled pleti, vlasů atp. Kosmetikou se nazývají způsoby a prostředky pro péči o pleť, vlasy, nehty, které se používají ke zlepšení vzhledu člověka, jakož i komponenty, které se přidává svěžest a krásu tváře a těla [1].

V moderních kosmetických produktech jsou rostlinné oleje používány jako účinné složky, které ovlivňují fyziologické procesy. Rostlinné oleje se přidávají do mnoha kosmetických přípravků a parfémů ne náhodou. Jsou dobře vnímány kůží, jelikož složení je velmi podobné tukům produkovaným kožními žlázami. Hlavním úkolem oleje je výživa kůže, protože rostlinné oleje obsahují vitaminy rozpustné v tucích - vitamin A a D a fytohormony - látky podobné struktuře jako lidské steroidy, které hrají důležitou roli při regeneraci kůže.

Kosmetické oleje jsou cenné díky jejich přirozenému složení. Rostlinné oleje v kosmetologii mohou vyřešit problémy suché, šupinaté, mastné, poškozené kůže, křehkých a slabých nehtů, slabých a lámavých vlasů.

Léčivé vlastnosti rostlin závisí na obsahu chemických látek, které mohou mít terapeutický účinek na živý organismus. Tyto sloučeniny mohou být buď v celé rostlině, nebo pouze v jejích jednotlivých částech. Aktivní látky patří do skupiny organických sloučenin - alkaloidy, glykosidy, saponiny, estery, ethery, vitaminy a phytoncidy.

Cíl této práce je zpracovat literární rešerše na téma využití vzácných olejů v kosmetice. Budou popsány chemické složení vybraných rostlin olejů a způsoby jejich získávání ke kosmetickým účelům. Pro práci byly vybrány následující oleje: makový, konopný a ostropestřecový olej. Každý z vybraných olejů obsahuje přehled hlavních i vedlejších složek (tedy především obsah mastných kyselin a vitaminů) a jejich účinek na pokožku. Práce je zaměřena na hodnocení kvality vybraných olejů. Na základě těchto výsledků následuje kosmetické využití těchto oleje a výroba kosmetického přípravků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chemie olejů

Oleje jsou přírodní organické látky, které jsou složené z esterů glycerolu a mastných monokarboxylových kyselin; jsou zahrnuty v třídě lipidů. Lipidy jsou přirozeně biologicky aktivní deriváty vyšších mastných kyselin a alkoholů. Obvykle se definují jako přírodní sloučeniny obsahující vázané mastné kyseliny o více než 3 atomech uhlíku v molekule.

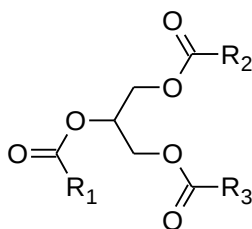
Představují směs různého složení acylglycerolů, která obsahuje jako doprovodné látky jiné lipidy a jiné látky nelipidového charakteru. Do skupiny doprovodných látek náleží velké množství sloučenin, jako jsou různé terpenoidy, např. steroidy a karotenoidy. Doprovodnými látkami lipidů jsou dále lipofilní vitaminy, některá barviva, přírodní antioxidanty a další lipofilní sloučeniny.

Ze všech známých lipidů jsou tuky největší skupinou. Tuk, který se extrahuje z rostlinného materiálu, jsou označovány jako rostlinné oleje. Největší množství oleje, který je možné obsaženo v rostlinách, se obvykle koncentruje v semenech a jádrech, v jejich aktivní tkáni (v embryích semen a jejich zásobních tkáních), zatímco jiné rostlinné orgány jsou poměrně chudé na olej. Vysoká koncentrace oleje v určitých rostlinných orgánech umožňuje jejich využití pro komerční výrobu. Rostliny různých rodů a druhů, které mají schopnost koncentrovat velké množství oleje v jejich tělech, jsou známé jako olejné.

Nenasycené mastné kyseliny vykazují antibiotický účinek na acidorezistentní bakterie. Zavedením nenasycených mastných kyselin do buněk bakterií dochází k vytěsnění specifických mastných kyselin z jejich lipidů. Tato činnost se projevuje ve snížení aktivity mikroorganismů za pomoci těchto kyselin. Podobnou antibiotickou aktivitu vyznačují nenasycené acyklické kyseliny, které jsou obsaženy v některých rostlinných tucích [2].

2.2 Chemické složení

Strukturu tuku stanovili francouzští vědci M. Chevreul a M. Berthelot. V roce 1811, M. Chevreul zjistil, že zahříváním směsi vody a tuku v alkalickém prostředí získá glycerol a karboxylové kyseliny (stearová a olejová kyselina). V roce 1854 chemik M. Berthelot provedl opačnou reakci a poprvé syntetizoval tuk, zahříváním směsi glycerolu a karboxylových kyselin[3].



Obrázek 1 Chemická struktura tuku[4].

Struktura tuku má obecný vzorec (viz Obrázek 1), ve kterém R_1 , R_2 a R_3 - mohou být stejné nebo různé řetězce mastných kyselin, které jsou esterovou vazbou vázány na molekulu glycerolu. Přírodní tuky obsahují ve svém složení dvě skupiny kyselin mající nerozvětvenou

strukturu a, typicky, sudý počet atomů uhlíku (lichý počet uhlíku v lipidech obvykle je méně než 0,1%). Estery mohou být jednoduché, kdy všechny alkoholické skupiny jsou esterifikovány stejnou kyselinou, nebo složené, kdy se vazby účastní různé mastné kyseliny.

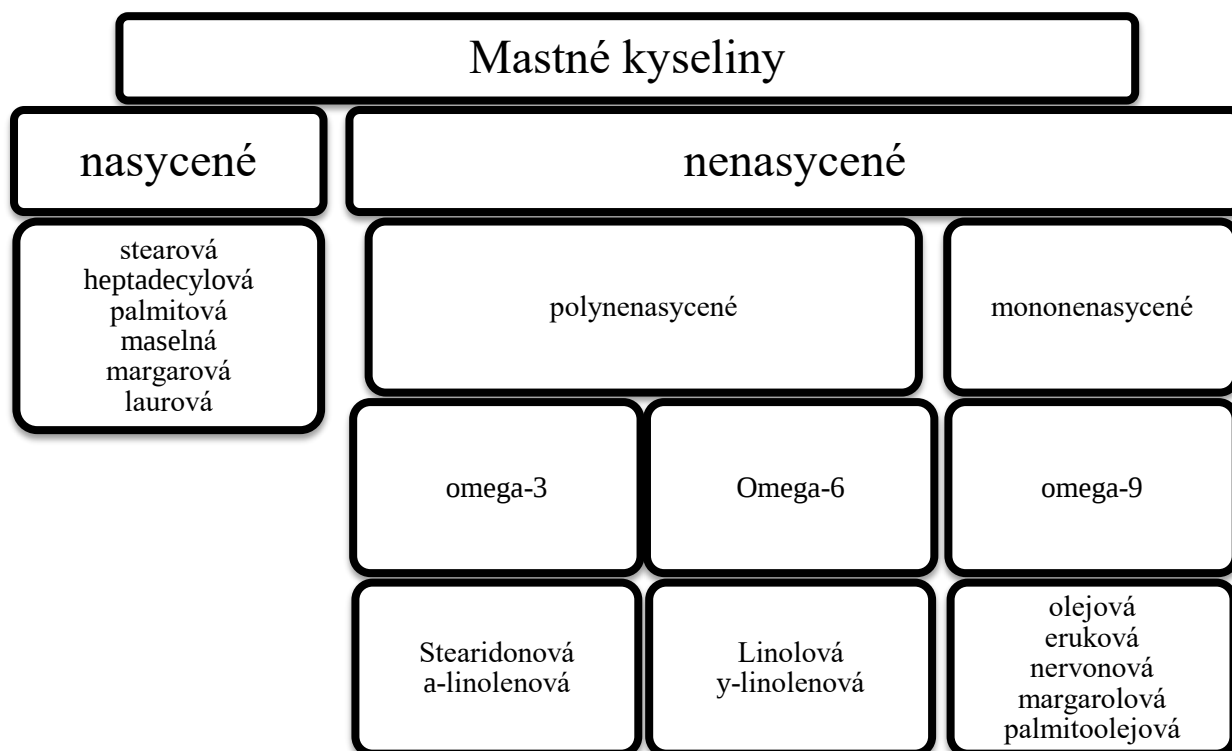
Tuky jsou z chemického hlediska hydrofobní molekuly, v podstatě nerozpustné ve vodě, rozpustné v organických rozpouštědlech, a částečně rozpustné v etanolu (5-10%). Majoritní složku tvoří triacylglyceroly, minoritní složku tvoří volné mastné kyseliny, přirozená barviva, vitaminy, esence, fosfolipidy a lipoidy. Poslední jsou látky rozpustné v tucích a patří do této skupiny steroly, lipofilní vitaminy (zejména vitamin E), karotenoidy a jiné lipofilní sloučeniny[5].

2.2.1 Hlavní složky

Triacylglyceroly jsou estery vyšších mastných kyselin a glycerolu. Mastné kyseliny obsažené v rostlinných olejích se dělí na:

- *nasycené*: nemají dvojnou vazbu a jsou od 12-ti uhlíkaté kostry tuhé za běžné teploty
- *nenasycené*: mají dvojnou vazbu, za běžné teploty jsou tekuté a dále se dělí na
 - *mononenasycené* : mají ve své struktuře jednu dvojnou vazbu
 - *polynenasycené*: mají více dvojných vazeb

Přírodní tuky často obsahují mastné kyseliny, které jsou znázorněné na obrázku 2:



Obrázek 2 Schéma rozdělení zastoupených mastných kyselin [6].

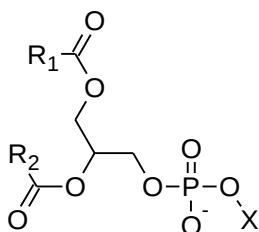
Antibakteriální účinnost nenasyčených mastných kyselin s dlouhým řetězcem je již mnoho let dobře známá. Mastné kyseliny fungují jako klíčové složky antimikrobiálních doplňků, které brání růstu nežádoucích mikroorganismů. Vedle normálních mastných kyselin existují v

přírodě deriváty mastných kyselin, které vykazují silné antimikrobiální účinky. Mohou zprostředkovat chemickou obranu proti mikroorganismům. Kromě toho jsou nenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem baktericidní pro důležité patogenní mikroorganismy, včetně *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* a *Mycobacteria* [7].

2.2.2 Minoritní složky

2.2.2.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy – jsou komplexní lipidy, estery vícesytných alkoholů vyšších mastných kyselin. Struktura molekuly fosfolipidů se obecně skládá ze dvou "hydrofobních" konců mastných kyselin a hydrofilní "hlavy" sestávající z fosfátové skupiny (viz Obrázek 3). Dvě složky jsou spojeny dohromady molekulou glycerolu. Fosfátové skupiny mohou být modifikovány jednoduchými organickými molekulami, jako je například cholin [8].

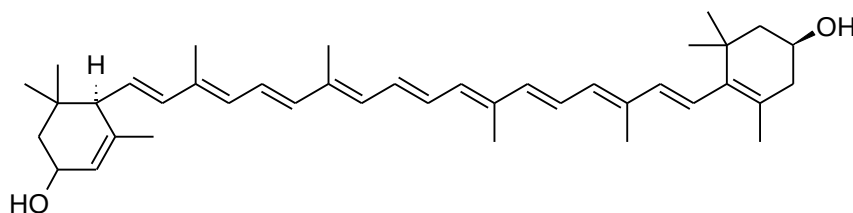


Obrázek 3 Struktura fosfolipidů [8].

Jsou základní složkou biologických membrán všech živých buněk, proto fosfolipidy jsou netoxické a velmi dobře vstřebávají kůží. Nejběžnější v tkáních rostlin a živočichů je typ fosfolipidů známý jako fosfatidylcholin (lecitin), který se skládá ze strukturních zbytků kyseliny fosforečné, cholinu, mastných kyselin a glycerolu. Lecitin je také hlavní fosfolipid, který se používá v kosmetických přípravcích [9].

2.2.2.2 Karotenoidy

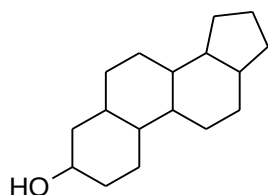
Karotenoidy jsou přírodní organické pigmenty žluté, oranžové nebo červené barvy. Patří do kategorie tetraterpenoidů (tj. obsahují 40 atomů uhlíku, které jsou postaveny z 8 izoprenových jednotek, z nichž každá obsahuje 5 atomů uhlíku). Strukturně karotenoidy mají formu polyenového uhlovodíkového řetězce, který je někdy zakončen kruhy a může nebo nemusí mít připojené další atomy kyslíku. Karotenoidy s molekulami obsahujícími kyslík, jako je lutein (viz Obrázek 4) a zeaxantin, jsou známy jako xantofylové látky. Neoxidované (bez kyslíku) karotenoidy, jako je α -karoten, β -karoten a lykopen, jsou známy jako karoteny. Karoteny typicky obsahují pouze uhlík a vodík (tj. uhlovodíky) a jsou v podtřídě nenasycených uhlovodíků [10].



Obrázek 4 Chemická struktura luteinu [11].

2.2.2.3 Steroly

Steroly jsou přírodní látky, steroidní deriváty obsahující hydroxylovou skupinu. Struktura vychází z nasyceného tetracyklického uhlovodíku steranu (viz Obrázek 5) [12].



Obrázek 5 Chemická struktura sterolu [13].

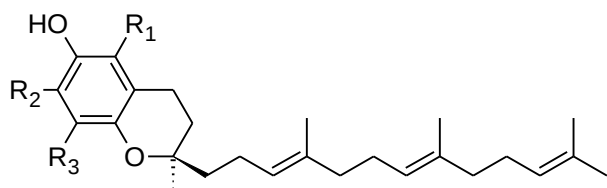
Většina sterolů jsou krystalické látky, které jsou rozpustné v organických rozpouštědlech a nerozpustné ve vodě [14].

Steroly lze rozdělit podle zdroje získávání na následující skupiny:

- zoosteroly (zvířata)
- fytoosteroly (rostliny)
- mikosteriny (houby)

2.2.2.4 Vitamin E

Jako Vitamin E (Obrázek 6) označujeme skupinu sloučenin, které zahrnují tokoferoly i tokotrienoly. Nutriční obsah vitaminu E je určen aktivitou α -tokoferolu. Molekuly, které podporují aktivitu α -tokoferolu, jsou čtyři tokoferoly a čtyři tokotrienoly identifikované předponou alfa (α -), beta (β -), gama (γ -) a delta (δ -). Nejvíce rozšířen je RRR- α -tokoferol (starším názvem d- α -tokoferol), který má také největší antioxidační aktivitu. Syntetická forma obsahuje osm různých stereoizomerů a nazývá se "all-rac" - α -tokoferol. Jako potravinářská přísada se používá ve vodě rozpustná forma, jako je d- α -tokoferylsukcinát [15].

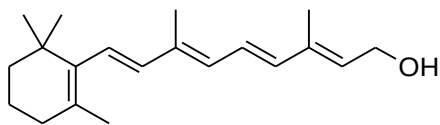


Obrázek 6 Chemická struktura tokotrienolů. U α -tokotrienol: R_1, R_2, R_3 představuje methylskupinu; β -: $R_2 = H, R_1, R_3$ představuje methylskupinu; γ -: $R_1 = H, R_2, R_3$ představuje methylskupinu; δ -: $R_1, R_2 = H, R_3 =$ methylskupina [16].

2.2.2.5 Vitamin A

Vitamin A (Obrázek 7) je z chemického hlediska skupina nenasycených organických sloučenin, které obsahují retinol, retinální kyselinu, retinovou kyselinu a několik karotenoidů provitaminu A (zejména beta-karoten). Retinoidy se nacházejí v živočišných produktech, ale karotenoidy v rostlinách. Všechny tyto látky jsou snadno rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech (například oleje) a špatně rozpustné ve vodě. Při předávkování dochází k intoxikaci. Vitamin A funguje také v odlišné roli, než kyselina retinová (nevratně oxidovaná

forma retinolu), což je důležitý hormon podobný růstovému faktoru pro epiteliální a jiné buňky [17].



Obrázek 7 Vitamin A [18].

2.2.2.6 Vitamin D

Vitaminy D jsou skupinou biologicky aktivních látek, sloužících jako steroidní hormonální prekurzory, souhrnně označované též jako kalciferoly. Vitamin D je chemická skupina v tuku rozpustných sekosteroidů, které jsou zodpovědné za zvýšení intestinální absorpce vápníku, železa, hořčíku, fosfátu a zinku. U lidí jsou nejdůležitějšími sloučeninami v této skupině vitamin D₃ (také známý jako cholekalciferol) a vitamin D₂ (ergocalciferol) [19].

2.2.2.7 Vitamin K

Vitamin K je skupina strukturně podobných vitaminů rozpustných v tucích, které lidské tělo vyžaduje pro úplnou syntézu určitých proteinů, které jsou esenciální pro správnou koagulaci krve a které tělo také potřebuje pro kontrolu vazby vápníku v kostech a jiných tkáních. Chemicky skupina vitaminu K obsahuje deriváty 2-methyl-1,4-naftochinonu. Vitamin K obsahuje dva přírodní vitaminy: vitamin K₁ a vitamin K₂. Vitamin K₂ se opět skládá z množství příbuzných chemických podtypů s různými délkami uhlíkových postranních řetězců vyrobených z isoprenoidních jednotek. Vitamin K₁, také známý jako fylochinon, je vyráběn rostlinami a nachází se v největších množstvích v zelené listové zelenině, protože se přímo podílí na fotosyntéze. Lze ji považovat za rostlinnou formu vitaminu K [20].

2.2.2.8 Silice

Silice neboli éterické oleje jsou v malých koncentracích složkou každého rostlinného materiálu, to však není překážkou jejich širokému použití, ať už samotné – v aromaterapii přímo nebo v kombinaci s tzn. nosnými oleji. Lze je díky jejich těkavosti snadno oddestilovat. Jejich význam je především pozitivní. Pokud jsou silice nepříjemného zápachu, jsou odstraněny nebo překryty jinou silicí [21].

2.3 Charakteristika vzácných rostlinných olejů

2.3.1 Makový olej

Makový olej - rostlinný olej z máku setého (Obrázek 8), zejména uspávacího máku *Papaver somniferum*.



Obrázek 8 Mák setý [22].

2.3.1.1 Charakteristika rostliny

Mák je rod rostlin z čeledi makovitých. Zahrnuje asi 50 druhů rostoucích v Evropě, Asii, Africe a USA. Máky jsou jednoleté, dvouleté i vytrvalé byliny. Obsahují latex. Plody jsou tobolky – makovice. Semena máku setého obsahují v sušině 42- 58 % oleje (zejména glycerid kyseliny linolové, dále samotnou kyselinu linolovou, stearovou, palmitovou), 18-20 % bílkovin,

16-24 % sacharidů, 5-8 % vlákniny a asi 6 % minerálních látek, kde převažuje vápník a fosfor, dále pak hořčík, draslík a sodík. Pro obsah těchto stopových prvků představuje zásadotvornou potravinu, která tvoří vhodný protipól naší běžné, většinou kyselé stravy. Z mastných kyselin dominuje kyselina linolová, jejíž obsah dosahuje až 70 %. Maková semena jsou pozoruhodná zejména proto, že jsou obzvláště nasycené tokoferoly jiných forem než vitamin E (alfa-tokoferol) [23].

2.3.1.2 Vlastnosti makového oleje

Stejně jako mák má makový olej vysoký obsah vitaminu E a obsahuje opiové alkaloidy jako morfin a kodein v množství až do 400 mg/l. Steroly v makovém oleji sestávají téměř výhradně z kampesterolu, stigmasterolu, sitosterolu a delta δ -5-avenasterolu. Tento olej má vysoký obsah kyseliny linolové. Jiné přítomné triglyceridy ve významných množstvích jsou kyselina olejová a kyselina palmitová. Přehled mastných kyselin s největším obsahem je uveden v tabulce 1 [24].

Tabulka 1 Přehled nejvíce zastoupených mastných kyselin v makovém oleje [24].

NÁZEV KYSELINY	PROCENTUÁLNÍ OBSAH [%]
KYS. PALMITOVÁ	8-12
KYS. STEAROVÁ	2-3
KYS. OLEJOVÁ	11

Makový olej je široce používán jako základní olej pro masáž. Také makový olej, díky svému chemickému složení, dokonale posiluje vlasy, pokožku hlavy, zlepšuje stav nehtů. Nejenže vyživuje pokožku a nasycuje ji pomocí nezbytných stopových prvků, ale také chrání, měkkí, zvyšuje pružnost, zabraňuje vysoušení, zvlhčuje, pomáhá rychle vyléčit různé škody a vady. Díky regeneračním vlastnostem olej obnovuje poškozenou vrstvu pokožky a posiluje bariérovou funkci. Makový olej je tedy vhodný pro obohacení krémů, balzámů, různých tonik, balzámů a kondicionérů, stejně jako pro vytvoření masky pro pokožku obličeje nebo pro vlasy[25].

2.3.2 Konopný olej

Konopný olej je rostlinný olej získaný z plodů konopné rostliny. Tato rostlina je zařazena do rodiny *Cannabaceae* a má tři hlavní typy: *C. sativa* (Obrázek 9), *C. indica* a *C. ruderalis*.



Obrázek 9 Konopí seté [26].

2.3.2.1 Charakteristika rostliny

Konopí je tradiční kulturní olejnatá a jednoletá bylina, původem z podhůří Himaláje. *Cannabis sativa* se vyznačuje dlouhými, tenkými květy a špičatými listy. Konopné semeno je bohaté na vitaminy A, C a E; minerály; a β -karoten a má výjimečnou nutriční hodnotu. Obsahuje 20-25 % bílkovin, 20-30 % sacharidů, 25-35 % olejů, 10-15 % nerozpustných vláken a bohatou řadu minerálů, zejména fosforu, draslíku, hořčíku, síry, vápníku, železa a zinku. Konopné semeno má vedle své nutriční hodnoty také pozitivní přínos pro zdraví, včetně snížení hladiny cholesterolu a vysokého krevního tlaku [27].

2.3.2.2 Vlastnosti konopného oleje

Esenciální olej získaný z konopí obsahuje těkavé sloučeniny, zejména monoterpeny, seskviterpeny a další terpenoidní sloučeniny. Mezi jeho složení patří fosfor, draslík, zinek, vápník, mangan, železo, síra, vitaminy A, B₁, B₂, B₃, B₆, C, D, E, antioxidanty, proteiny, karoteny, fosfolipidy a fytosterol. Také v jeho složení jsou různé mikroelementy a aminokyseliny.

Nedávné studie ukázaly, že olej obsahuje karoteny, chlorofyly a taniny v dostatečném množství pro kosmetické použití. Konopný olej byl navržen jako dokonale vyvážený pro lidskou výživu, z důvodu poměru 3:1 dvou podstatných polynenasycených mastných kyselin (kyseliny linolové a kyseliny linolenové). Olej je díky této vlastnosti a přítomnosti kyseliny γ -linolenové ideální jako složka pro oleje a krémy obohacené lipidem, které jsou známé díky vysokému pronikání do kůže. Mezi další mastné kyseliny v konopném oleji patří: kyselina palmitooleová, kyselina heptadekanová, kyselina arachidová, kyselina eikosenová, kyselina behenová, kyselina eruková, kyselina lignocerová a kyselina nervonová; ale obsahuje také několik vyšších mastných kyselin. Přehled mastných kyselin s největším obsahem je uveden v tabulce 2 [28].

Tabulka 2 Přehled nejvíce zastoupených mastných kyselin v konopném oleje [28].

NÁZEV KYSELINY	PROCENTUÁLNÍ OBSAH [%]
KYS. PALMITOVÁ	5-9
KYS. STEAROVÁ	2-3
KYS. OLEJOVÁ	10-16
KYS. LINOLOVÁ	50-70
KYS. LIOLENOVÁ	15-34

Nerafinovaný konopný olej extrahovaný metodou lisování za studena má proměnlivou barvu v odstínech žlutozelené až tmavě zelené, ale má příjemnou ořechovou chuť. Vysoce polynenasycený olej z konopných semen je použit pro detergenty a mýdla. Doporučuje se při péči o dehydrovanou, unavenou pokožku a suché, křehké, matné vlasy. Konopný olej se používá jako analgetikum pro popáleniny a abscesy [28].

2.3.3 Olej z ostropestřce mariánského

Olej z ostropestřce mariánského je rostlinný olej získaný z plodů rostliny z čeledi hvězdčovitě (*Asteraceae*), zejména z bylin *Silybum marianum* (Obrázek 10).



Obrázek 10 *Ostropestřec mariánský* [29].

2.3.3.1 Charakteristika rostliny

Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) je jednoletá až dvouletá bylina původem ze Středomoří, která se dnes rozšířila do teplých a suchých oblastí jižní Evropy a Asie. Rostlina obsahuje asi 65-80 % silymarinu (komplex flavonolignanů) a 20 až 35 % mastných kyselin, včetně kyseliny linolové. Silymarin je složitá směs polyfenolových molekul včetně sedmi úzce příbuzných flavonolignanů (silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, silychristin, isosilychristin, silydianin) a jeden flavonoid (taxifolin) Silibinin. Kromě toho obsahuje alkaloidy, saponiny, mastný olej (až 25 %), bílkoviny, vitamin K, hlien, tyramin, histamin a makro a mikroelementy. Semena ostropestřece dále obsahují betanin, trimethylglycin, které spolu s esenciálními FA a silymarinem vykazují hepatoprotektivní účinky [30].

2.3.3.2 Vlastnosti oleje

Ostropestřecový olej se získává ze semen rostliny, která obsahují až 22 % oleje. Tento olej se svým složením příliš neliší od jiných rostlinných olejů. Dle mnoha studií byl zjištěn vysoký obsah linolové kyseliny (49-53 %) a kyseliny olejové (22-30 %). Přehled mastných kyselin s největším obsahem je uveden v tabulce 3. Olej je navíc i bohatým zdrojem vitaminu E [31].

Tabulka 3 Přehled nejvíce zastoupených mastných kyselin v ostropestřecovém oleji [31].

NÁZEV KYSELINY	PROCENTUÁLNÍ OBSAH [%]
KYS. PALMITOVÁ	7-8
KYS. STEAROVÁ	4-6
KYS. OLEJOVÁ	22-30
KYS. LINOLOVÁ	49-53
KYS. LIOLENOVÁ	0-1

2.4 Výroba oleje

Technologické procesy moderní výroby rostlinných olejů jsou závislé od rostlinného materiálu, ze kterého se získává příslušný olej. Procesy získávání oleje z dužin plodů olejnin jsou specifické pro země, které tyto oleje produkují, protože plody nelze pro jejich biologické vlastnosti vůbec skladovat a přepravovat. Tyto oleje musí být ihned zpracovány na místě.

Technologické zpracování semen se rozděluje do 3 stupňů:

1. Úprava a příprava osiva pro získání olejů
2. Získávání olejů
3. Rafinace olejů

Obsah triacylglycerolů a lipidických látek nezávisí na zvolené technologii, naproti tomu koncentrace glycerol fosfolipidů a glykolipidů na technologickém procesu závisí. Teplota procesu ovlivňuje koncentraci vosků a fosfolipidů. Vyšší koncentraci fosfolipidů je v extrahovaných olejích a nižší v olejích lisovaných [32].

2.4.1 Úprava a příprava osiva pro získání olejů

Posklizňová úprava semen je záležitostí zemědělské prvovýroby a skládá se z čištění, sušení a skladování. Příprava pro lisování zahrnuje procesy loupání, mletí (mechanický proces) a kondicionaci – klimatizaci semen (soubor fyzikálně-chemických procesů s působením tepla a páry). Cílem rozmělnění je zničení buněčné struktury pro maximální výtěžky oleje při dalších

technologických operacích. Vstupující materiál do extrakce se obvykle neupravuje, protože stupeň narušení buněk je postačující a rovněž tak vyhovuje i velikosti výlisků [32].

2.4.2 Získávání olejů

V současné době se oleje získávají z rostlinných semen dvěma základními pochody a to lisováním (mechanickým oddělením oleje z rostlinných pletiv za tlaku) a extrakcí (extrakce oleje z rostlinných pletiv organickým rozpouštědlem – obvykle hexanem). Řada významných výrobců kombinuje oba pochody. Extrahovaný a lisovaný surový olej se po oddělení mechanických nečistot obvykle dále zpracovávají společně. Jedním z kritérií, které rozhodují o volbě základního procesu surovarny je olejnatost vstupující olejnin. Za hranici, při které se už proces lisování nevyplatí, se považuje rozmezí 23-30 % oleje v semeni, olejnin pod touto hranici se tedy již nelisují a spíše extrahují. Pro získání olejů se používají se tato základní technologická schémata:

1. Kombinace technologie předlisování – dolisování, případně dvojité lisování. Olejnatost ve výliscích z dolisu se pohybuje pod hranici 10 %.
2. Kombinace technologie předlisování – extrakce. Olejnatost se výliscích z předlisu se pohybuje pod hranici 20 %. Tzn., že asi 2/3 představuje surový lisovaný olej a 1/3 surový extrahovaný olej.
3. Technologie přímé extrakce.

Extrahované oleje obsahují vyšší koncentraci fosfolipidů kvůli vyšší teplotě procesu.

Lisování může probíhat i za studena. Zvýšením teploty lisování se dosáhne lepší výtěžnosti oleje. Pro efektivní extrakci oleje se provádí tepelné zpracování s konstantní vlhkostí za nepřetržitého a důkladného míchání. Ve výrobních podmínkách se proces tepelného zpracování vlhkostí skládá ze dvou stupňů. První stupeň je ohřev na teplotu 80-85 ° C při současném navlhčení vodou nebo horkou párou. V tomto případě dochází k selektivnímu navlhčení a snižování vazebné energie oleje s nelipidovou částí semen. Druhým stupněm je sušení a ohřívání navlhčeného materiálu. Tím se mění fyzikální vlastnosti oleje – snižuje viskozitu, hustotu a povrchové napětí [32].

2.4.3 Rafinace olejů

Rafinací se oleje zbavují zbytků mechanických nečistot, buněčných tkání, bílkovin a sacharidů, vody a doprovodných látek, kterými mohou být stopy pesticidů, případně těžkých kovů nebo dalších kontaminantů, které přešly z životního prostředí, dále některé barevné látky jako např. chlorofyl, které negativně ovlivňují chuťové vlastnosti oleje, zbytkový obsah vody do 1 %, který se může vázat na rostlinné slizy a fosfolipidy a spolu s přítomnými bílkovinami může být živnou půdou pro mikroorganismy, zbytkové části buněk semen, obsahující lipolytické enzymy, které z tuku uvolňují volné mastné kyseliny a zhoršují jeho jakost. Všechny tyto doprovodné látky a kontaminanty se rafinací odstraní. Výsledným produktem rafinace je plně rafinovaný rostlinný olej, který představuje směs acylglycerolů s minimální koncentrací fosfolipidů (0-1 ppm P), volných mastných kyselin (0,1-0,2 %), barviv (slabě nažloutlé kapaliny) a senzoricky je z hlediska chuti a vůně plně neutrální.

Nečistoty zahrnují následující skupiny látek:

- látky přidružené k triglyceridům, které přicházejí do oleje ze surovin;
- látky vzniklé v důsledku chemických reakcí během extrakce a skladování tuku;
- příměsi jako minerální nečistoty, částice buničiny, zbytkové rozpouštědlo, mýdlový kal (soapstock), barviva a pachové látky (aldehydy, ketony, alkoholy)

Kromě nežádoucích nečistot z tuků se při rafinaci odstraňují látky užitečné pro organismus: vitaminy rozpustné v tucích, fosfatidy, esenciální polynenasycené mastné kyseliny. Rafinované tuky jsou jednodušeji oxidovatelné, protože z nich jsou odstraněny přírodní antioxidanty – fosfatidy a tokoferoly. Proto se požaduje, aby se rafinace prováděla takovým způsobem, aby se uchovalo největší množství užitečných látek. Všechny metody rafinace jsou rozděleny do: fyzikální (sedimentace, centrifugace, filtrace); chemická (neutralizace); fyzikálně-chemické (hydratace, deodorace, bělení).

Mechanické (primární) čištění olejů se provádí za účelem odstranění různých mechanických nečistot a částečně koloidních látek. Toto čištění se provádí sedimentací, centrifugací nebo filtrací olejů.

Hydratace-odslizení olejů se provádí za účelem odstranění fosfatidů, sliznic a dalších látek, které mají hydrofilní vlastnosti. Při ošetřování olejů horkou vodou vznikají fosfatidy, nerozpouštějí se v oleji a vysráží se ve formě vloček. Odpadá hydratační kal, ze kterého se odpaří voda a získá se tzv. lecithin obsahující 60-65 % fosfolipidů, 1-2 % glykolipidů, zbytek tvoří triacylglyceroly, volné mastné kyseliny a další doprovodné látky.

Alkalická rafinace (neutralizace) olejů je založená na neutralizaci volných mastných kyselin vodným roztokem hydroxidu sodného za vzniku mýdel, které přecházejí do vodné fáze. Výsledné soli mastných kyselin (mýdla) adsorbují další příbuzné látky (fosfatidy, pigmenty), takže neutralizovaný olej je čistší než hydratovaný olej.

Při *bělení (adsorpční rafinace)* odstraňují se karotenoidní a feofytinová barviva (pigmenty) z olejů. Pro čištění oleje používejte pevné adsorbenty: bělicí hlinky, aktivní uhlí. Bělení se podrobí olejům používaným při zpracování k výrobě margarín a tuků na vaření.

Při *deodoraci* rostlinných olejů se odstraňují pachové a chuťové látky, volné mastné kyseliny, steroly a tokoferoly. Deodorace se provádí odstraněním aromatických látek ve vakuu s horkou párou, která prochází tukem při vysoké teplotě (210-230 °C). V procesu rafinace mohou být z olejů odstraněny látky, které mají antioxidační vlastnosti a mají také fyziologickou hodnotu, například vitaminy [32].

2.5 Kvalitativní změny olejů během skladování

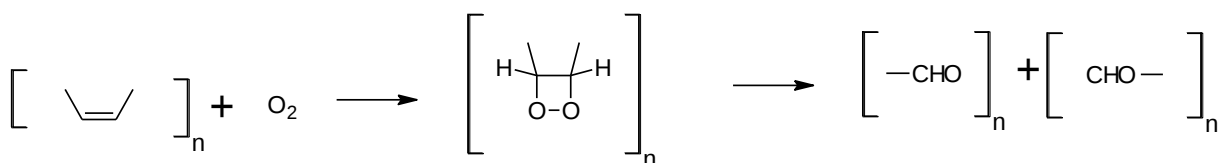
Skladovatelnost oleje závisí na typu a počtu mastných kyselin, počtu dvojných vazeb, přítomnosti antioxidantů a podmínkách, ve kterých oleje jsou skladovány. Doba skladování se zmenšuje kvůli vysokým teplotám, intenzivnímu osvětlení a přítomnosti těžkých kovů. Díky působení vzdušného kyslíku dochází k oxidaci tuků a olejů. Jedná se o nežádoucí reakci, snižující

jejich kvalitu. Tento proces se zpomaluje nebo úplně zastaví, když produkt obsahuje antioxidanty nebo nemá přístup kyslíku.

Žluknutí tuků, které se projevuje zvláštním zápachem a nepříjemnou chutí, je způsobeno tvorbou nízkomolekulárních karbonylových sloučenin a je způsobeno řadou chemických procesů. Výsledkem tohoto procesu jsou nežádoucí produkty, zejména aldehydy a ketony, které negativně mění jak zdravotní působení, tak i chuťový projev a vůni potravin obsahujících nenasycené mastné kyseliny. Při žluknutí oleje se nejprve zvyšuje koncentrace kyseliny máselné. Olej, který má příjemnou chuť, obsahuje 3-5 mg/kg kyseliny máselné a olej se žluklou příchutí – více než 10 mg/kg [33].

Existují tři typy žluknutí – biochemické, chemické a mikrobiální [34].

Chemickou podstatou žluknutí je adice molekuly O_2 na dvojnou vazbu mastné kyseliny za vzniku peroxidu, s následným štěpením uhlíkového řetězce. Výsledné peroxidy a hydroperoxidy obsahují volné radikály, které předurčují karcinogenní onemocnění. Reakce (viz Obrázek 11) je způsobena světlem, teplem a sloučeninami tvořícími volné radikály (peroxidy, přechodné kovy). Peroxidové radikály začínají nerozvětvené a rozvětvené řetězové reakce a také se rozpadají s tvorbou řady sekundárních derivátů - hydroxykyselin, epoxidů, ketonů a aldehydů. Oxidace se vyskytuje především u nenasycených tuků. Tento proces lze potlačit vyloučením kyslíku. Pro zpomalení a prevenci chemické žluknutí se používají inhibitory radikálových reakcí: směs 2- a 3-terc.butyl-4-hydroxyanisolu (BOA), 3,5-ditercbutyl-4-hydroxytoluenu (BOT), estery kyseliny galové a také sloučeniny, které tvoří komplexy s těžkými kovy (například kyselina citrónová, kyselina askorbová) [35], [36].



Obrázek 11 Reakce chemického žluknutí oleje [36].

Hydrolytické žluknutí může být zcela chemického rázu, obvyklejší je však hydrolýza katalyzovaná enzymy, hlavně lipasami a fosfolipasami. Při tom se hydrolyzují triglyceridy a uvolňují se volné mastné kyseliny. Enzymová hydrolýza probíhá při skladovacích teplotách, pokud je přítomno dostatečné množství vody. Na hydrolytickém žluknutí se aktivně podílejí mikroorganismy, hlavně plísňe [37], [38].

Mikrobiální žluknutí se týká způsobu, při kterém mikroorganismy, jako jsou bakterie nebo plísňe, používají enzymy k odbourávání tuků. Mikroorganismy napadají a prostřednictvím enzymu způsobují hydrolytické žluknutí. Tuto cestou lze zabránit sterilizací [38].

2.6 Charakterizace olejů

Kvalitu olejů můžeme hodnotit na základě fyzikálních, chemických a senzorických charakteristik. Parametry zahrnují chuť, vůni, barvu, průhlednost, hustotu, tuková čísla a

přítomnost antioxidantů. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin a vitaminů se stanovuje pomocí chromatografických metod. Dalším z důležitých parametrů pro charakterizaci kosmetických olejů je stanovení antimikrobiálních účinků [33].

2.6.1 Senzorická analýza

Senzorickou analýzou se rozumí hodnocení potravin bezprostředně našimi smysly, včetně zpracování výsledků lidským centrálním nervovým systémem. Analýza probíhá za takových podmínek, kdy je zajištěno objektivní, přesné a reprodukovatelné měření.

Chuť a vůně oleje závisí na druhu suroviny, způsobu přípravy, stupni čištění, podmínkách a době skladování. Podle vůně a chuti se určuje druh oleje a stupeň jeho čerstvosti, protože za nepříznivých podmínek skladování se chuť oleje stává nepříjemná a hořká. Pro stanovení vůně je olej rozetřen na dlani, chuť je určena zkouškou při teplotě oleje asi 20 ° C.

Jasná zlatavá barva oleje závisí na přítomnosti karotenu a xantofylu a zelené odstíny jsou způsobeny vyšší koncentrací chlorofylů. Barva oleje se stanoví při průchodu a odražení denního světla ve skle při teplotě 20 ° C; olejová vrstva by při tom měla být nejméně 5 cm. Průsvitnost se stanoví po umístění oleje na bílém světle ve válec při 20 ° C. Průhledný olej nemá zákal a suspendované vločky [40].

2.6.2 Tuková čísla

Tuková čísla slouží k charakterizaci vlastností a jakosti oleje. Vlastnosti vyjádřené hodnotou určitého čísla lze dnes určit objektivněji a konkrétněji modernějšími metodami (GC, HPLC). Stále má však význam stanovení čísla kyselosti, čísla zmydlnění, esterového a jodového čísla, které se stanovují pomocí titrací [41].

2.6.2.1 Číslo kyselosti

Číslo kyselosti udává obsah volných mastných kyselin v tuku a vyjadřuje se jako hmotnost hydroxidu draselného v mg potřebné k neutralizaci 1 g tuku. Vzorek se rozpustí za horka v ethanolu a titruje se odměrným roztokem hydroxidu sodného na fenolftalein. Číslo kyselosti lipidů v potravinách je mírou hydrolyzy, protože množství volných kyselin v přírodních tucích je malé (ale není nulové). Hydrolyza probíhající během skladování za přístupu kyslíku, bude doprovázena silnou oxidací, protože rychlost oxidace volných mastných kyselin je podstatně vyšší než u triglyceridů. Při stárnutí tuků a olejů dochází ke štěpení TAG, uvolňování mastných kyselin a ke zvýšení čísla kyselosti [41].

2.6.2.2 Číslo zmydlnění

Číslo zmydlnění je hmotnost hydroxidu draselného v mg potřebná k neutralizaci volných i estericky vázaných kyselin v 1 g tuku. Vzorek se zmydlní varem s nadbytkem alkoholického roztoku hydroxidu draselného a přebytečný nezreagovaný hydroxid se stanoví zpětnou titrací kyselinou chlorovodíkovou na fenolftalein [41].

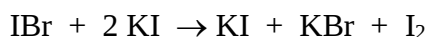
2.6.2.3 Esterové číslo

Esterové číslo je hmotnost hydroxidu draselného v mg potřebná k neutralizaci estericky vázaných kyselin v 1 g tuku. Vypočítá se z rozdílu čísla zmydlnění a čísla kyselosti. Z esterového čísla lze vypočítat přibližný procentuální obsah glycerolu v tuku podle vztahu:

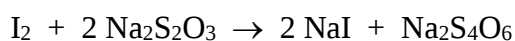
$$\% \text{ glycerolu} = 0,0547 \cdot \check{C}_e \text{ [41]}$$

2.6.2.4 Jodové číslo

Jodové číslo udává hmotnost jodu v gramech, která se aduje na 100 gramů tuku za podmínek metody. Je měřítkem celkového obsahu dvojných vazeb v tuku a slouží k posouzení jeho čistoty, k identifikaci neznámých tuků a k posouzení použitelnosti tuku pro různé účely. Jod však reaguje příliš pomalu, brom a chlor jsou naopak příliš reaktivní, takže vedle adice dochází i k substituci. Kvůli své reaktivitě byl zvolen bromid jodný (jodmonobromid), který je vhodný pro stanovení nenasycenosti tuků. Nezareagovaný jodmonobromid se přidáním jodidu draselného převede na jod podle rovnice:



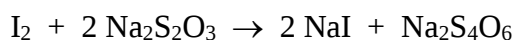
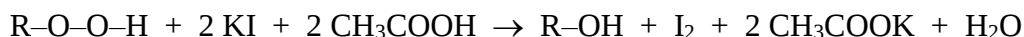
Jod se stanoví thiosíranem na škrobový maz.



Hodnotu jodového čísla lze použít např. ke sledování hydrogenačního procesu anebo pro zjišťování míry oxidace oleje [41].

2.6.2.5 Peroxidové číslo

Peroxidové číslo udává množství peroxidů v tuku, které jsou schopny oxidovat jodid na jod za podmínek metody. Vyloučený jod se stanoví titrací roztokem thiosíranu.



Peroxidové číslo se vyjadřuje v mikrogramech kyslíku v 1 g tuku. Metoda je vhodným měřítkem stupně oxidace tuků. Reakci ruší přítomnost látek, které mohou rovněž oxidovat jodid na jod, např. kyslíku, nebo naopak přítomnost redukujících látek, např. antioxidantů. Uvolněný jod se může rovněž částečně adovat na přítomný tuk. U čerstvých, vysoce kvalitních olejů by měla být hodnota peroxidového čísla nízká [41].

2.6.3 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidant je látka, jejíž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů. Antioxidační vlastnosti jim mohou být přisuzovány dle obsahu fenolických látek a jejich schopnosti zachycovat volné radikály. Fenolické látky se vyskytují v celé rostlinné říši. V závislosti na druhu rostliny nalézáme různé zastoupení jednotlivých skupin fenolů [42].

2.6.3.1 Stanovení celkových polyfenolů a antioxidačních účinků

Pro **hodnocení antioxidační aktivity** jsou používány především metody založené na eliminaci syntetických radikálů. Metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) je založena na testování schopnosti vzorku zhášet kation-radikál ABTS⁺ (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Využívá činidla, které za účasti iniciace jiné látky přechází ve svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku se redukuje, a tím odbarvuje. Zhášení radikálu ABTS⁺ antioxidanty měříme spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm na základě změny absorpčního spektra ABTS⁺. Antiradikálová aktivita vzorku je pak

porovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické standardní látky – derivátu vitamínu E s názvem Trolox (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2-karboxylová) [42].

Stanovení **obsahu celkových polyfenolů** se provádí spektrometrickou metodou s Folin-Ciocalteavým činidlem (roztok wolframových a molybdenových oxidů). Při reakci dochází k redukci látky na chromogeny. Metoda stanovení je založena na redukční reakci činidla s polyfenoly za vzniku modrého zbarvení, které lze následně spektrofotometricky stanovit při vlnové délce 750 nm. Intenzita zbarvení se odvíjí od koncentrace polyfenolů přítomných ve vzorku. Standardní látkou pro toto stanovení je kyselina gallová [42].

Metoda **stanovení celkových flavonoidů** je založena na detekci barevných komplexů chloridů hlinitého s karbonylovou a hydroxylovou skupinou flavonoidů. Dochází ke vzniku oranžovo-žlutých komplexů, které lze spektrofotometricky detekovat při vlnové délce 510 nm. Standardním roztokem je roztok katechinu [42].

2.6.4 Metody stanovení antimikrobní aktivity olejů

Antimikrobiální aktivita znamená zastavení nebo potlačení růstu mikroorganismu. Metody, pomocí kterých je možné sledovat antimikrobiální účinek olejů, lze rozdělit na difúzní a diluční metody [43].

Difúzní metody se provádí na pevných médiích, na jejichž povrch jsou naočkovány mikroorganismy. Testovaná látka je pipetovaná do jamek vyhloubených do ztuhlého média. Metody tohoto typu jsou velice často využívány, jsou jednoduché a rychlé. Principem je difúze testované látky do okolního média a vytvoření inhibiční zóny kolem jamky, tzn. zóny bez nárůstu buněk [43].

Podstatou **dilučních metod** je přidání testované látky přímo do kultivačního média. Po zočkování se měří vliv látky na růst mikroorganismů. Poskytují tak přesnější informace. Hodnocení pak lze provést vizuálně, turbidimetricky nebo měřením absorpance [44].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- ABTS, Sigma Aldrich, SRN
- Agar, Himedia, Indie
- Diethylether, p.a., LachNer, ČR
- Dusitan sodný, p.a., Lachema, ČR
- Ethanol (96%), p.a., LachNer, ČR
- Ethanol, pro UV-VIS, Lachema, ČR
- Fenolftalein, LACHEMA, ČR
- Folin-Ciocalteu činidlo, Serva, SRN
- Glukosa monohydrát, p.a., LachNer, ČR
- Hydroxid draselný, p.a., LachNer, ČR
- Hydroxid sodný, p.a., LachNer, ČR
- Chlorid hlinitý, p.a., LachNer, ČR
- Chlorid sodný, p.a., Lachema, ČR
- Chloroform, VWR Chemicals BDH PROLABO, USA
- Jodid draselný p.a., PENTA, ČR
- Jodobromid (98%), ALFA AESAR, GB
- Katechin, Sigma Aldrich, SRN
- Kyselina chlorovodíková (35%), LachNer, ČR
- Kyselina gallová, Sigma Aldrich, SRN
- Kyselina octová (99%) p.a., K.MARTYČÁK ML CHEMICA, ČR
- Kyselina sírová (96%), LachNer, ČR
- Laureth-4, ACETRADE, ČR
- Lysogeny Broth, Himedia, Indie
- Methanol, p.a., Lachema, ČR
- Nutrient Broth Medium, Himedia, Indie
- Octan sodný, p.a., LachNer, ČR
- PEG-40 Hydrogenated Castor Oil, ACETRADE, ČR
- Pepton, Himedia, Indie
- Peroxodisíran draselný, p.a., Sigma Aldrich, SRN
- Škrob rozpustný (podle Lauliera) p.a., LACH-NER, ČR
- Thiosíran sodný bezvodý p.a., LACH-NER, ČR
- α -tokoferol, Sigma Aldrich, SRN
- Trolox, Sigma Aldrich, SRN
- Uhličitan sodný, p.a., LachNer, ČR

3.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Boeco, SRN
- Automatické pipety v různém rozsahu objemu, Discovery a Biohit, SRN
- Centrifuga Sigma Laborzentrifugen, SRN
- ELISA ReaderBio Tek Elx808, Biotek, SRN
- Flow box Aura mini, Bio Air Instrument, USA
- HPLC/PDA/UV-VIS, ThermoFisher Scientific, Ultimate 3000, USA

- Plamenově ionizační detektor (FID)
- Spektrofotometr VIS, Helios δ , Unicam, GB
- Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom, ČR
- Termostat IP60, Biotech, ČR
- TRACE GC/FID, ThermoQuest S.p.A, Itálie
- Třepačka IKA Yellow Line, SRN
- Ultrazvuková lázeň PS 02000, ČR
- Vakuová odparka RV 06, IKA, SRN
- Vodní lázeň EL-20, Merci a.s., ČR

3.3 Použité kmeny pro kultivaci

- *Candida Glabrata* CCM 8270
- *Escherichia coli* CCM 7395
- *Micrococcus luteus* CCM1569

3.4 Vzorky

Pro práci byly použité oleje z následujících rostlin: mák, konopí a ostropestřec mariánský (viz Obrázek 12). Oleje byly extra panenské, 100% obsah rostliny, chemicky neošetřené, lisované za studena ze semínek při zachování všech výživných látek, tzn., nedošlo k žádné chemické ani tepelné úpravě a zachování původní chutě i vůně. Země původu je Slovensko, provoz Turčianska Štiavnica. Vyrobené dne 10. 04. 2017. U těchto olejů nebyla pozorována sedimentace, což je zřejmě způsobeno tím, že oleje neprošly úpravou po výrobě např. filtrací. Oleje měly po celém objemu stejnou konzistenci i barvu.



Obrázek 12 Řada vzorků olejů

3.4.1 Porovnání vzorků

V tabulce 4 nalezneme popis a porovnání vzorků rostlinných olejů.

Tabulka 4 Porovnání vlastností studovaných olejů

Vzorek	Makový olej	Ostropestřecový olej	Konopný olej
Vzhled			
Barva	jasně žlutá	temně žlutá	žlutozelená
Průsvitnost	Průhledný, nemá zakal	Průhledný, nemá zakal	Průhledný, nemá zakal
Sraženina	Není	Není	není

Chuť	Olejnata, příjemná	Olejnata, příjemná	Olejnata, bylinná
-------------	--------------------	--------------------	-------------------

3.5 Stanovení tukových čísel

Stanovení tukových čísel slouží k charakterizaci vlastnosti a kvality tuku [41].

3.5.1 Číslo kyselosti

Do menší kádinky byl navážen 1 g oleje s přesností na 1 mg. Pomocí 25 ml etanolu byla navážka kvantitativně převedena do titrační baňky. Směs byla přivedena k varu a následně k ní byly přidány 3 kapky indikačního činidla, fenolftaleinu. Za horka byla směs titrována odměrným roztokem 0,1 M hydroxidem draselným do růžového zbarvení, které bylo stálé 30 sekund. Zároveň byl proveden slepý pokus pouze s 25 ml etanolu.

Výpočet: Ze spotřeby odměrného roztoku hydroxidu draselného bylo vypočteno množství KOH v mg KOH na gram vzorku [41].

3.5.2 Číslo zmýdelnění

Do menší kádinky bylo naváženo asi 2 g oleje s přesností na 1 mg. Navážka byla kvantitativně převedena prostřednictvím 25 ml KOH do destilační baňky, byly přidány varné kuličky a směs se nechala zmýdelňovat po dobu 30 minut pod zpětným chladičem na topném hnízdě. Až bylo dosaženo čirosti vzorku, bylo přidáno do něj za horka 3 kapky indikátoru-fenolftaleinu a ihned byl titrován odměrným roztokem 0,5 M kyselinou chlorovodíkovou do odbarvení indikátoru. Stejným postupem byl proveden slepý pokus bez vzorku.

Výpočet: Spotřeba na titraci vzorku byla odečtena od spotřeby na slepý pokus. Číslo zmýdelnění bylo vypočteno jako hmotnost hydroxidu draselného v mg, potřebného k neutralizaci 1 g vzorku [41].

3.5.3 Jodové číslo

Do malých kádinek bylo naváženo asi 0,3 g oleje s přesností na 1 mg. Navážka byla kvantitativně převedena do zábrusové Erlenmayerovy baňky pomocí 10 ml chloroformu a rozpuštění bylo urychleno mírným zahřátím. K roztokům bylo napipetováno 25 ml jodmonobromidového roztoku a baňky byly uzavřeny zábrusovou zátkou ovlhčenou v roztoku KI, aby byl zadržen unikající jod. Obsah baněk byl promíchán lehkým krouživým pohybem a bez přístupu světla, za občasného promíchání, se nechal stát 1 hodinu. Paralelně byl připraven slepý pokus bez navážky oleje. Po hodině se zátky byly opláchnuty destilovanou vodou do baněk a do každé baňky bylo přidáno 25 ml jodidu draselného odměrným válcem. Po 1–2 minutách se ke směsi přidalo 100 ml destilované vody. Poté proběhla titrace odměrným roztokem thiosíranem sodným do žlutého zbarvení. Následně byly ke směsi přidány 3–5 ml škrobového mazu a titrovalo se do odbarvení vodné fáze. V případě zbarvení spodní chloroformové fáze do fialova, musela být směs protřepána a dotitrována. Chloroformová vrstva smí být zbarvena pouze rozpuštěným tukem do nažloutlého až hnědého zbarvení.

Výpočet: Ze spotřeby thiosíranu na slepý pokus bylo vypočteno celkové látkové množství jodu v reakční směsi a ze spotřeby thiosíranu na titraci vzorku bylo vypočteno látkové množství nezreagovaného jodu. Z rozdílu těchto dvou hodnot bylo vypočteno látkové množství a poslezena hmotnost adovaného jodu v gramech a přepočteno na 100 g vzorku [41].

3.5.4 Peroxidové číslo

Peroxidové číslo bylo stanoveno jodometrickou titrací. Princip spočívá v reakci peroxidů, hydroperoxidů přítomných v olejích s jodidem draselným a následné titraci uvolněného jódu thiosíranem sodným (viz kapitola 2). Do malých kádínek bylo naváženo s přesností na 1 mg asi 3 g oleje. Navážka byla kvantitativně převedena 50 ml směsí kyseliny octové a chloroformu do zábrusových Erlenmayerových baněk, do každé bylo přidáno 1 ml roztoku jodidu draselného a obsah baňky byl promíchán lehkým krouživým pohybem. Baňky byly uzavřeny zábrusovou zátkou a ponechány v temnu při teplotě místnosti. Paralelně byl připraven slepý pokus bez navážky oleje. Po 20 minutách do každé baňky bylo přidáno 100 ml destilované vody. Poté proběhla titrace odměrným roztokem thiosíranem sodným do žlutého zbarvení. Následně byly ke směsi přidány 3–5 ml škrobového mazu a titrovalo se do odbarvení vodné fáze a spodní pouze nažloutlá nebo hnědá. V případě zbarvení spodní chloroformové fáze do fialova, musela být směs protřepána a dotitrována. Chloroformová vrstva smí být zbarvena pouze rozpuštěným tukem do nažloutlého až hnědého zbarvení.

Výpočet: Ze spotřeby odměrného roztoku thiosíranu bylo vypočítáno látkové množství peroxidů ve vzorku: $n(-O-O-) = n(Na_2S_2O_3)/2$. Od této hodnoty se bylo odečteno látkové množství peroxidů ve slepém pokusu a výsledek se přepočítá na μg peroxidového kyslíku v 1 g oleje [41].

3.6 Kvantifikace mastných kyselin pomocí GC

Bylo naváženo 0,1 g oleje s přesností na 1 mg. Tato navážka byla rozpuštěna v chloroformu tak, aby koncentrace tuku byla přibližně 10 mg/ml. Tento roztok byl zředěn 5x. Následně byla připravena transesterifikační směs (15% H_2SO_4 v MeOH(p.a.), 0,5 mg/ml C14(interný standard)). 1 ml vzorku byl kvantitativně převeden do krymplovací zkumavky. Pak bylo přidáno 0,8 ml transesterifikační směsi. Takto připravené zkumavky byly zakrymplovány a proběhla inkubace v termobloku po dobu 3 hodin při 90°C. Z vychladnutých zkumavek byl přelit celý obsah do 5 ml vialky, která obsahovala 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH. Směs byla uzavřena a intenzivně promíchána. Po dokonalém oddělení fází, bylo ze spodní chloroformové fáze odebráno 0,5 ml vzorku a převedeno do čisté vialky se závitkem pro GC. Vialka byla dále doplněna 0,5 ml chloroformu a do 48 hodin byla analyzovaná na GC [45].

Podmínky separace GC-FID analýzy

- Plynový chromatogram TRACE GC (ThermoQuestS p.A., Itálie).
- Plamenově ionizační detektor (FID), 250 °C, průtok vodíku: 35 ml/min, průtok vzduchu: 350 ml/min, make-up dusíku: 30 ml/min.
- Dávkování: autosampler bez děliče toku (1 μl), ventil uzavřen po dobu 5 minut.
- Teplota injektoru: 250 °C
- Nosný plyn: dusík s průtokem 0,5 ml/min.
- Kapilární kolona: DB-23 o rozměrech 60 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μm .
- Teplotní program: 60 °C, 10 minut, vzestupný gradient 12 °C/min do 200 °C s výdrží 10 min, vzestupný gradient 5 °C/min do 220 °C s výdrží 15 min, vzestupný gradient 10 °C/min do 240 °C s výdrží 7 min.
- Celková doba analýzy: 60 minut [45].

3.7 Stanovení antioxidační aktivity metodou TEAC

Před samotným měřením bylo nutné připravit kation-radikál ABTS^{•+}. Do odměrné baňky o objemu 10 ml, bylo množství ABTS rozpuštěno v destilované vodě tak, aby bylo dosaženo koncentrace 7 mM (0,0036 g ABTS). Následně byl do odměrné baňky přidán peroxodisíran draselný o koncentraci 2,45 mM (0,0066 g v 10 ml H₂O) a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Odměrnou baňku bylo potřeba obalit alobalem a uložit do tmavého místa, aby nedošlo k reakci se světlem, při pokojové teplotě po dobu 12 hodin. Po uplynutí této doby, byl kation-radikál ABTS^{•+} zředěn etanolem pro UV-VIS tak, aby byla výsledná absorbance tohoto zásobního roztoku, měřená při 734 nm, $0,700 \pm 0,02$ (měřeno proti etanolu pro UV-VIS). Dále do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml připraveného zásobního roztoku ABTS^{•+} a 10 μ l destilované vody, poté byla změřena absorbance v čase nula (A_0). Do další kyvety byl napipetován 1 ml zásobního roztoku ABTS^{•+} a 10 μ l vzorku. Směs byla promíchána a ponechána v tmavém místě 10 minut. Po uplynutí této doby, byl měřen pokles absorbance (A_1). Spektrofotometrické měření absorbancí probíhalo při vlnové délce 734 nm. Výsledná absorbance byla stanovena na základě rozdílu A_0 a A_1 .

Pro kalibraci byl připraven zásobní roztok Troloxu o koncentraci 400 μ g/ml tak, že navážka 40 mg byla rozpuštěna ve 100 ml odměrné baňce 60 % roztokem etanolu pro UV-VIS. Koncentrační řada byla připravena v rozmezí (50–400) μ g/ml. Měření probíhalo obdobně, jako u měření samotných vzorků. Namísto vzorku byl použit roztok standardu Troloxu a místo destilované vody, pro zjištění absorbance v čase nula, byl použit 60 % roztok etanolu pro UV-VIS. Jako slepý vzorek byl rovněž použit 60 % roztok etanolu pro UV-VIS [42].

3.8 Stanovení celkových polyfenolů spektrometricky

Nejprve byla provedena kalibrace, kde byla jako standard použita kyselina gallová o koncentraci (0–0,5) mg/ml. Do zkumavky byly napipetovány 1 ml Folin-Ciocalteova činidla, 1 ml destilované vody a 50 μ l vzorku. Směs byla promíchána pomocí vortexu a nechala se 5 minut odstát. Následně byly přidány 2 ml nasyceného roztoku Na₂CO₃ (7,5 g Na₂CO₃ v 95 ml H₂O) opět byla směs promíchána a ponechána 15 minut stát. Nakonec proběhlo měření absorbance při vlnové délce 750 nm pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Současně byl připraven i slepý pokus, kde se místo vzorku do směsi přidalo 50 μ l destilované vody [42].

3.9 Stanovení celkových flavonoidů

Nejprve byla provedena kalibrace, pro kterou byl použit jako standard katechin o koncentracích (0,05–0,30) mg/ml. Do zkumavky byl napipetován 0,5 ml vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% NaNO₂ (5 g NaNO₂ v 100 ml H₂O). Směs byla promíchána na vortexu a nechala se 5 minut odstát. Ke směsi bylo přidáno 0,2 ml 10 % AlCl₃ (10 g AlCl₃ v 100 ml H₂O), opět došlo k promíchání, a po 5 minutovém odstátí byl přidán 1,5 ml NaOH (4 g NaOH v 100 ml H₂O). Směs byla naposledy promíchána a po 15 minutách bylo provedeno měření absorbance pomocí UV-VIS spektrofotometrie, při vlnové délce 510 nm. Současně byl připraven i slepý pokus pouze s 0,5 ml destilované vody [42].

3.10 Stanovení antimikrobiální aktivity pomocí zákalu

Jako testovací modelové mikroorganismy byly zvoleny dva kmeny bakterií a jeden kvasinkový kmen (*Candida glabrata*). Z bakteriálních kmenů byl použit jeden gram-pozitivní kmen – *Micrococcus luteus* a jeden gram-negativní kmen – *Escherichia coli*. Kultury byly dlouhodobě uchovávány v podobě křížového roztěru na agarové plotně při 4 °C v lednici. Pro kultivaci bakterií *Micrococcus luteus* bylo dle návodu na obalu připraveno médium Nutrient Broth, pro *E.coli* – Lysogeny Broth, ale pro *Candida glabrata* - Yeast Extract Peptone Dextrose . Pro kultivaci bylo připraveno do 100 ml Erlenmayerovy baňky 50 ml média a sterilizováno v tlakovém hrnci. Po vychladnutí bylo médium zaočkováno ze zásobní kultury. Zaočkované médium bylo inkubováno 24 h v termostatu při 37 °C za stálého třepání. Takto připravená inokula byla použita pro stanovení antimikrobiální aktivity na mikrotitrační destičce. Do 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo vždy k 150 μ l buněčné kultury, připravené vhodným zředěním inokula připraveného dle předchozího postupu (ředění bylo provedeno příslušným sterilním médiem na koncentraci buněk přibližně $5E+8$ /ml), přidáno 50 μ l extraktu oleje. Jako blank byla používána příslušná kultura s přídavkem 50 μ l 29 60 % etanolu. Růst bakterií a absorbance při 630 nm byla měřena v čase 0 a po 24 h [46].

3.11 Diskový antimikrobiální test

Na Petriho misky bylo rovnoměrně rozmístěno 0,1ml 24hodinového inokula kultur *Candida glabrata*, *Micrococcus luteus* a *E.coli*. Do média byly vytvořeny jamky pomocí špičky na pipety, do kterých bylo napipetováno 50 μ l l extraktu oleje. Jako blank byl použit 60 % líh, v kterém jsou připraveny tinktury. Po 24 hodinách byly změřeny inhibiční zóny [46].

3.12 Stanovení vitaminu E (tokoferolu) metodou HPLC

Nejaktivnější formou vitamin E je α -tokoferol. Nejúčinnější stanovení této formy tokoferolu je možné s využitím kapalinová chromatografie (HPLC). Nejprve byla provedena kalibrace za použití standardního roztoku α -tokoferolu o koncentraci (0–1) mg/ml. Pak byly připraveny extrakty vzorků: 1 g každého oleje byl kvantitativně převeden do zkumavky, která obsahovala už 10 ml CH₃OH pro HPLC a nechaly se 1 hodinu protřepávat. Po této době zkumavky byly ponechány stát po dobu, dokud se neobjevilo zřetelné rozhraní mezi fázemi. Horní organická fáze byla odpipetována.

Pro HPLC analýzu byly zvoleny izokratické podmínky za použití kolony Kinetex C18 s parametry 4,6 mm $\times$ 150 mm $\times$ 2,6 μ m. Jako mobilní fáze byl zvolen metanol s průtokem 1 ml/min. Teplota separace byla 30 °C a objem dávkovací smyčky 20 μ l. HPLC analýza byla ukončena UV-VIS detekcí při vlnové délce 295 nm.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Tuková čísla

Všechna stanovení byla provedena celkem třikrát, z jednotlivých výsledků byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka rovněž za použití programu Excel.

4.1.1 Číslo kyselosti

Číslo kyselosti tuku stanoví stupeň hydrolytického štěpení tuku (uvolnění mastných kyselin), k hydrolytickému štěpení dochází při stárnutí tuku. Taký udává množství KOH potřebné k neutralizaci volných mastných kyselin v 1 g tuku. Jeho hodnota se mění při stárnutí tuků a olejů, kdy dochází ke štěpicím procesům v triacylglycerolech, uvolňování mastných kyselin a ke zvýšení čísla kyselosti. Důvodem pro vysokou hodnotu čísla kyselosti oleje může být nezralost semen nebo jejich poškození během skladování. Při nepříznivých podmínkách skladování (vysoká vlhkost a teplota, skladování ve špatně vyčištěných kontejnerech nebo venku) se zvyšuje obsah volných mastných kyselin v semenech olejnatých semen, rozštěpení oleje a jeho žluknutí, a dále také rozklad jiných látek za vzniku sloučenin, které mají nepříjemný zápach a chuť. Tyto produkty rozpadu se při extrakci částečně rozpouštějí v oleji. V tabulce 5 můžeme pozorovat deklarované hodnoty, které jsou uváděné v odborné literatuře a výsledky shrnující hodnoty čísla kyselosti sledovaných olejů.

Tabulka 5 Výsledky stanovení čísel kyselosti ve vzorcích olejů [48],[49],[50].

Olej	Číslo kyselosti [mg KOH/g] ± SD	Standardizované číslo kyselosti [mg KOH/g]
Makový	2,248±0,085	max. 4
Konopný	1,948±0,068	1,5–2,2
Ostropestřecový	4,730±0,105	max. 2,5

Největší hodnotu čísla kyselosti vykazoval ostropestřecový olej 4,73 mg KOH/g oleje, zatímco nejnižší hodnota byla stanovena u oleje konopného, a to 1,95 mg KOH/g oleje. V porovnání s tabelovanými hodnotami tradičních tuků (rafinované tuky 0–1, surové tuky 1–10, tuky špatné kvality 10–50) vypočtená čísla kyselosti ukazují dobrou kvalitu. V publikaci číslo kyselosti ostropestřecového oleje činilo max. 4 mg KOH/g oleje [50]. Tyto hodnoty neodpovídají průměrné hodnotě získané při naší analýze, což mohlo být způsobeno např. tím, že k tomuto stanovení byl použit nerafinovaný olej, který díky tomu, že neprošel procesem rafinace, může obsahovat vysoké množství volných mastných kyselin. Při porovnání čísel kyselosti dalších studovaných olejů s literaturou se některé hodnoty od sebe mírně lišily, ale rozdíly nebyly tak výrazné jako u zmíněného ostropestřecového oleje. U konopného oleje se hodnota čísla kyselosti udává v rozmezí 1,5–2,2 mg KOH/g oleje, naměřená hodnota činila 1,95 mg KOH/g oleje [48]. V makovém oleji bylo stanoveno číslo kyselosti na 2,25 mg KOH/g oleje, podle publikace hodnota pohybuje na max. 4 mg KOH/g oleje [49]. Tyto rozdílné hodnoty čísel kyselosti mohou být způsobeny např. z důvodu použití různých extrakčních postupů při izolaci oleje, nebo odlišným složením oleje [41].

4.1.2 Číslo zmýdelnění

Číslo zmýdelnění udává množství KOH v mg potřebných k neutralizaci volných mastných kyselin a k hydrolyze (zmýdelnění) jejich esterů v 1 g vzorku tuku. Je mírou obsahu volných

a esteticky vázaných mastných kyselin v analyzovaném vzorku tuku. Číslo zmýdelnění většiny tuků se obvykle liší u rostlinných olejů v rozmezí od 180 do 199. Malý počet zmýdelnění naznačuje přítomnost vysokomolekulových kyselin nebo nezmýdelnitelných látek. Vysoký počet zmýdelnění naznačuje zvýšený obsah kyselin relativně nízké molekulové hmotnosti. Číslo charakterizuje povahu tuku: čím nižší je molární hmotnost TAG, tím větší je číslo saponifikace. Je ovlivněno obsahem nezmýdelnitelných lipidů. V tabulce 6 můžeme pozorovat deklarované hodnoty, které jsou uváděné v odborné literatuře a výsledky shrnující hodnoty čísla kyselosti sledovaných olejů [41].

Tabulka 6 Výsledky stanovení čísel zmýdelnění ve vzorcích olejů [48],[49],[50].

Olej	Číslo zmýdelnění [mg KOH/g] ± SD	Standardizované zmýdelnění [mg KOH/g]	číslo
Makový	217,37±8,46	189-198	
Konopný	207,21±4,44	188-194	
ostropestřecový	212,16±0,45	189-198	

Z výsledků bylo zjištěno, že největší číslo zmýdelnění vykazoval makový olej 217,37 mg KOH/g oleje. Naproti tomu nejmenší hodnota čísla zmýdelnění byla zjištěna u konopného oleje, a to 207,21 mg KOH/g oleje. Naměřené hodnoty čísel zmýdelnění testovaných olejů se neshodují s hodnotami uváděných v literatuře. Číslo zmýdelnění makového oleje byla stanovena na 217,37 mg KOH/g oleje, v publikaci se uvádí hodnota nižší, a to 189-198 mg KOH/g oleje [49]. U konopného oleje byla hodnota čísla zmýdelnění stanovena na 207,21 mg KOH/g oleje, což nespadá do rozmezí hodnot uvedených v literatuře (184 až 190 mg KOH/g oleje) [48]. U ostropestřecového oleje bylo číslo zmýdelnění 212,16 KOH/g oleje. Podle publikace se má pohybovat v rozmezí 189 – 198 mg KOH/g oleje [50]. Naše naměřené hodnoty vyšly vyšší, protože jsme použili bio fermentované oleje.

4.1.3 Jodové číslo

Jodové číslo udává množství halogenu (přepočteného na jod) v gramech navázaného na 100 g vzorku za daných podmínek. Je mírou obsahu nenasycených mastných kyselin, tj. obsahu dvojných vazeb v analyzovaném vzorku. Čím nižší hodnota je, tím je odolnější proti žluknutí olej. V tabulce 7 můžeme pozorovat deklarované hodnoty, které jsou uváděné v odborné literatuře a výsledky shrnující hodnoty čísla kyselosti sledovaných olejů.

Tabulka 7 Výsledky stanovení jodových čísel ve vzorcích olejů [48],[49][50].

Olej	Jodové číslo [g I ₂ /100g] ± SD	Standardizované jodové číslo [g I ₂ /100g]
Ostropestřecový	35,98±1,44	132-157
Makový	41,88±0,59	132-157
Konopný	43,47±1,53	154-165

Největší hodnota jodového čísla ze všech vzorků olejů byla zjištěna u konopného oleje 43,47 g I₂/100g, což je hodnota nižší než uvedená v publikaci 154-165 g I₂/100g [48]. Naopak nejnižší hodnota jodového čísla byla stanovena u ostropestřecového oleje 35,98 g I₂/100g, se má pohybovat v rozmezí 132 – 157 g I₂/100g [50]. Jodové číslo makového oleje bylo stanoveno na 41,88 g I₂/100g, v publikaci se uvádí hodnota vyšší, a to v rozmezí 132-157 g

I2/100g [49]. Z naměřených hodnot jodových čísel vyplývá, že největší podíl nenasycených mastných kyselin obsahuje konopný olej, u kterého lze předpokládat, že jeho náchylnost k oxidaci bude oproti ostatním testovaným olejům vyšší.

4.1.4 Peroxidové číslo

Peroxidové číslo udává obsah primárních oxidačních produktů (hydroperoxidů) ve vzorku tuku. Jejich přítomnost snižuje senzoričké vlastnosti olejů. Pomocí peroxidového čísla lze pozorovat průběh oxidačních změn tuků a olejů. Vzhledem k velmi nízkým hodnotám peroxidového čísla lze konstatovat, že testované oleje vykazují minimální stupeň oxidace, který se v závislosti na podmínkách skladování mění. Vyšší hodnota peroxidového čísla by poukazovala na probíhající proces oxidace oleje, což by mohlo vést až k degradaci prospěšných složek obsažených v oleji. Výsledky naměřených peroxidových čísel studovaných olejů jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8 Výsledky stanovení peroxidových čísel ve vzorcích olejů

Olej	Peroxidové číslo [$\mu\text{g/g}$] $\pm$ SD
Konopný	49,59 $\pm$ 5,32
Makový	10,86 $\pm$ 5,36
Ostropestřecový	16,84 $\pm$ 5,55

Tabelované hodnoty jsou: čerstvé tuky 0–16, čerstvé oleje 8–40, tuky po smažení 40–200, žlукlé tuky 40–400, silně oxidované tuky 160–1600, foukané oleje 800–4000 [41]. Nejvyšší peroxidové číslo vykazoval ze všech testovaných olejů konopný olej, jehož hodnota činila 49,59 $\mu\text{g/g}$ oleje, zatímco nejnižší hodnota byla zjištěna u makového oleje, a to 10,86 $\mu\text{g/g}$ oleje. Peroxidová čísla analyzovaných olejů se od sebe lišila. Vzhledem k nízkým hodnotám peroxidového čísla makového a ostropestřecového oleje lze konstatovat, že tyto testované oleje vykazují minimální stupeň oxidace, který se v závislosti na podmínkách skladování mění a jde o velmi čerstvých olejích. Vyšší hodnota peroxidového čísla u konopného oleje říká na probíhající proces oxidace oleje, což může přivést až k degradaci prospěšných složek obsažených v oleji.

4.2 Analýza mastných kyselin plynovou chromatografií

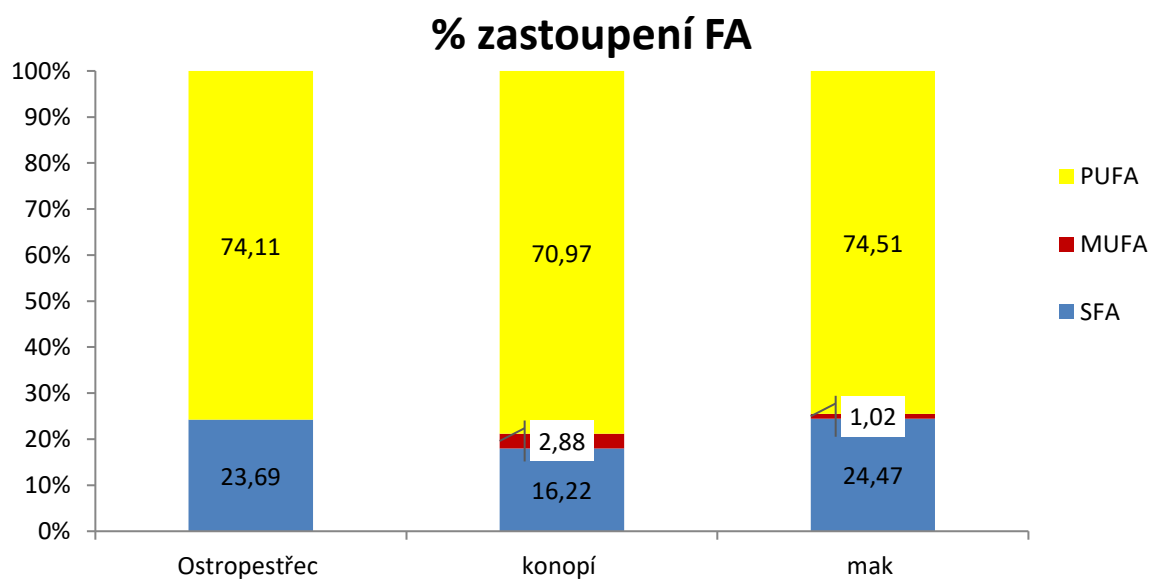
Identifikace a obsah mastných kyselin byl stanoven metodou GC-FID. V tabulce 9 jsou uvedené kvalitativní a kvantitativní zastoupení mastných kyselin, obsažených ve vzorcích. U všech vzorků bylo vypočítáno pouze procentuální zastoupení mastných kyselin s největším obsahem, jelikož podrobnější analýza by vyžadovala rozsáhlejší, samostatnou práci. Výpočet byl proveden pomocí standardů pro GC analýzu, které zahrnují retenční časy, koncentrace a plochy píků methylesterů mastných kyselin za optimálních podmínek.

Tabulka 9 Přehled nejvíce zastoupených mastných kyselin ve vzorcích olejů

Mastné kyseliny		Makový olej	Konopný olej	Ostropestřecový olej
Laurová	C12:0	0,701	0,732	1,302
Tridekanová	C13:0	3,649	1,880	0,301
Myristová	C14:0	0,523	0,365	1,096

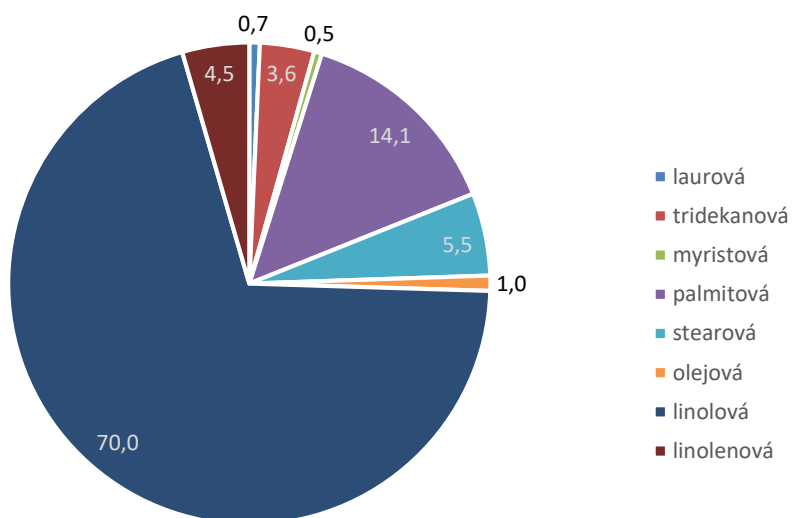
Palmitová	C16:0	14,053	6,417	15,631
Stearová	C18:0	5,540	3,748	-
Olejová	C18:1n9c	1,020	0,568	-
Linolová	C18:2n6c	70,025	36,881	71,607
Linolenová	C18:3n3	4,489	34,093	2,507

Na obrázku 13 můžeme pozorovat, že největší obsah polynenasycených mastných kyselin (PUFA) má makový olej (74,51 %), kde hlavním zástupcem je linolová kyselina (70 %), ale tato hodnota je moc podobná s hodnotou ostropestřecového oleje (74,11 %). Nejnížší hodnotu má konopný olej (70,97 %) a množství linolové a linolenové kyseliny bylo přibližně kolem 35 %. Na rozdíl od ostropestřecového oleje makový olej obsahuje jen 1 % mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a to je tvořeno převážně olejovou kyselinou. Konopný olej má největší obsah MUFA (2,88%) a z toho je 2,3 % erukové kyseliny, kterou neobsahovaly ostatní oleje. Největší množství nasycených mastných kyselin (SFA) má makový olej 24,47 %, hlavním zástupcem je palmitová kyselina. Na druhém místě je ostropestřecový olej, který obsahoval 23,69 % SFA a nejnižší množství SFA má makový olej (16,22 %). Na rozdíl od ostatních ostropestřecový olej neobsahoval stearovou a olejovou kyselinu. Studované oleje obsahovaly docela velké množství linolové kyseliny, která patří k esenciálním mastným kyselinám, což je dobrým faktem. Hodnoty jodového čísla konopného a makového oleje byly srovnatelné, což se potvrdilo pomocí plynové chromatografie, která ukázala, že tyto oleje obsahuje větší počet nenasycených



Obrázek 13 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vzorcích olejů

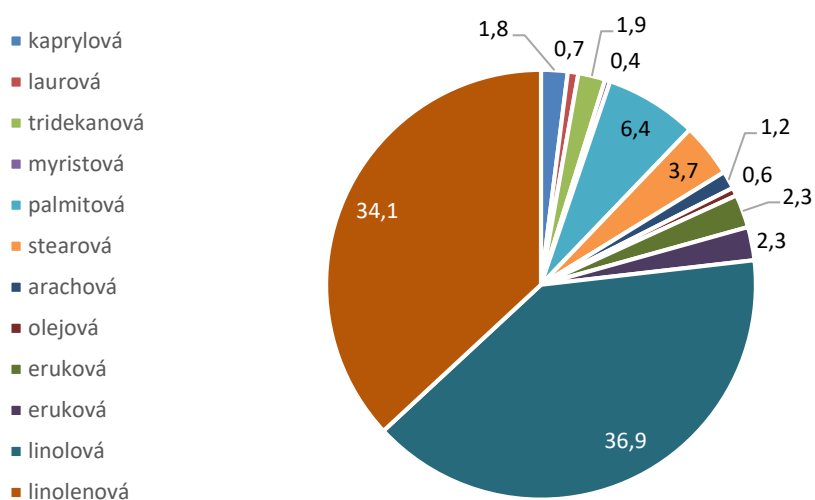
4.2.1 Makový olej



Obrázek 14 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vzorku makového oleje

Obrázek 14 ukazuje procentuální zastoupení všech mastných kyselin, které byly detekovány ve vzorcích makového oleje. Hlavními zástupci mastných kyselin jsou kyselina linolová (70 %), palmitová (14 %), stearová (5,5 %), linolenová (4,5 %) a tridekanová kyselina (4 %). Tyto hodnoty se trochu liší od hodnot dostupných v odborné literatuře. Kdy obsah kyseliny palmitové, stearové a linolenové je větší zhruba o 2 %, ale kyselina olejová na rozdíl od hodnot v literatuře (11 %) je nižší o 10 %. Obsah kyseliny linolové se shoduje s daty v literatuře [24].

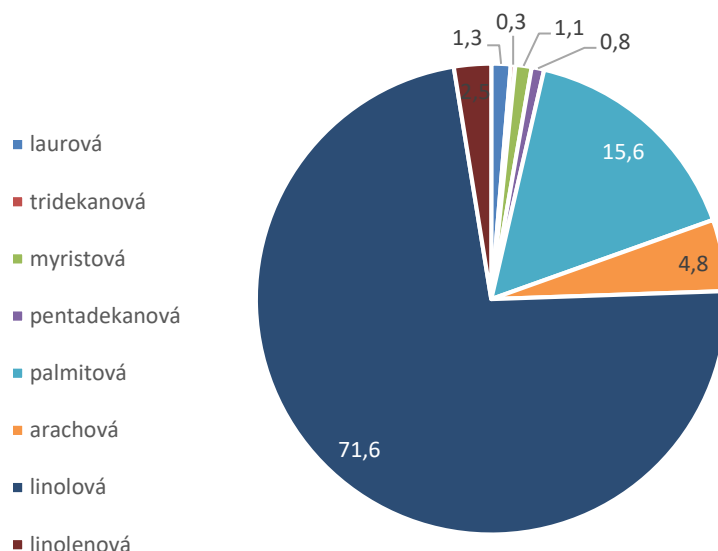
4.2.2 Konopný olej



Obrázek 15 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vzorku konopného oleje

Konopný olej obsahoval následující kyseliny: linolová (37 %), linolenová (34 %), palmitová (6 %), stearová (4 %), eruková (2 %). Studovaný olej obsahoval 0,5 % olejové kyseliny na rozdíl od hodnoty ukázané v literatuře (10-16 %). Kyseliny linolové a linolenové bylo detekováno 37 % a 34 %, což se liší od hodnot udávaných v odborné literatuře o 50-60 % v případě linolové kyseliny, a 20 % v případě kyseliny linolenové. Naměřené zastoupení palmitové a stearové kyseliny se shodovaly s literaturou. Na obrázku 15 je uveden přehled detekovaných mastných kyselin s největším obsahem [28].

4.2.3 Ostropestřecový olej



Obrázek 16 Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vzorku ostropestřecového oleje

Hlavními zástupci mastných kyselin, detekovanými ve vzorku ostropestřecového oleje jsou kyseliny linolová (72 %), palmitová (16 %), arachová (5 %), linolenová (2,5 %). Tyto hodnoty se také liší od hodnot ukázaných v odborné literatuře, kdy obsah kyseliny linolové neodpovídá rozmezí 49-53 %, které udává literatura. V případě kyseliny palmitové je naměřený obsah 2x větší. Vyššího obsahu v porovnání s literaturou bylo pozorováno také u kyseliny linolenové, kdy by mělo být maximálně 1%, oproti detekovaným 2,5 %. V neposlední řadě literatura zmiňuje vysoký obsah (přibližně 22 %) kyseliny olejové, která nebyla v našich vzorcích vůbec naměřena. Přehled detekovaných mastných kyselin s největším obsahem je možné pozorovat na obrázku 16 [31].

Tyto rozdíly mohou být způsobeny různými podmínkami pěstování a způsobem výroby oleje. Dále velký vliv má také skladování: v jakých podmínkách se uchovávaly a jak dlouho se skladovaly vzorky. Také tyto oleje obsahují minoritní látky, které mohly rušit tvorbu methylesteru a následující GC analýzu. Chyba mohla nastat také v samotné chromatografické analýze při postupu transesterifikace.

4.3 Stanovení antioxidační aktivity

Měření absorbance proběhlo u každého vzorku celkem třikrát a následně byl z těchto hodnot vypočítán průměr, rovněž byla pomocí Excelu vypočítána i směrodatná odchylka. K výpočtu byla použita rovnice regrese z kalibrační přímky: $y = 0,00138913x$.

Hodnoty antioxidační aktivity jednotlivých vzorků je uváděna v tabulce 10.

Tabulka 10 Výsledky stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích olejů

Olej	Konopný	Makový	Ostropestřecový
Antioxidační aktivita (mg TEAC/ml)+SD	902,243±0,007	597,496±0,004	295,149±0,005

Pohledem do tabulky zjistíme, že nejvyšší antioxidační aktivita 902,243 mg/ml je u konopného oleje. Nejnižší hodnota antioxidační aktivity je u ostropestřecového oleje, což se rovná 295,149 mg/ml. Vyšší antioxidační aktivitu může potvrdit i obsah polyfenolů (Tabulka 11), kde konopný olej obsahoval větší množství těchto látek.

4.4 Obsah celkových polyfenolů a flavonoidů

Měření absorbance proběhlo u každého vzorku celkem třikrát a následně byl z těchto hodnot vypočítán průměr, rovněž byla pomocí Excelu vypočítána i směrodatná odchylka. Celková koncentrace polyfenolů byla vypočtena pomocí rovnice: $c=(A+0,00043)/1,2875$, ale pro flavonoidy byla použita rovnice: $c=(A-0,0081)/3,3663$, kde c je celková koncentrace, A je naměřená absorbance.

Výsledky obsahu polyfenolů studovaných olejů jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11 Výsledky stanovení obsahu polyfenolů ve vzorcích olejů

Olej	Konopný	Makový	Ostropestřecový
Koncentrace polyfenolů [mg/g]+SD	2,037±-0,044	1,994±0,009	1,701±0,020

Pohledem do tabulky zjistíme, že nejvyšší obsah polyfenolů 2,037 mg/g je u konopného oleje. Hodnoty u makového a konopného olejů se od sebe moc neliší. Nejnižší hodnota je u ostropestřecového oleje, což se rovná 1,701 mg/g.

Výsledky obsahu flavonoidů studovaných olejů jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích olejů

Olej	Konopný	Makový	Ostropestřecový
Koncentrace flavonoidů [mg/g]+SD	4,687±0,009	3,866±0,063	5,352±0,047

Nejvyšší obsah flavonoidů 5,352 mg/g je u ostropestřecového oleje. Nejnižší hodnota je u makového oleje, což se rovná 3,866 mg/g.

Rozdílné hodnoty jsou pravděpodobně způsobeny tím, že různé oleje obsahuje řadu různých chemicky odlišných látek a druhově závislou distribuci antioxidantů. Množství polyfenolů můžeme potvrdit i barvami olejů, čím byla intenzivnější barva, tím množství polyfenolů bylo větší.

4.5 Stanovení vitaminu E

Stanovení vitaminu E proběhlo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Při vyhodnocení byl použit software Chromeleon Local a rovnice kalibrační křivky: $A=24222 \cdot c$. Výsledné množství bylo pak přepočítáno na 1 ml vzorku. Výsledky jsou uváděny v tabulce 13.

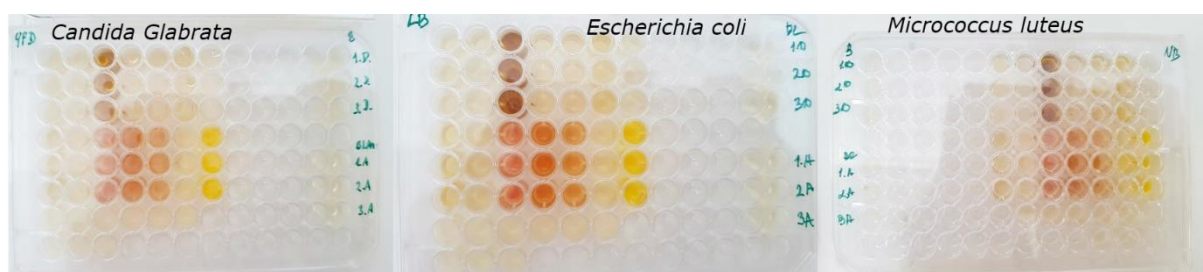
Tabulka 13 Výsledky stanovení obsahu vitaminu E ve vzorcích olejů

Olej	Konopný	Makový	Ostropestřecový
Obsah vitaminu E [µg/ml]	0,063385	0,116857	0,116588

Ve všech olejích byl detekován vitamin E. Navíc makový a konopný olej obsahovaly i fytosteroly. Naměřené hodnoty makového a ostropestřecového oleje byly moc přibližné. Naopak nejnižší hodnotu ukazoval konopný olej 0,0634 µg/ml, což bylo 2x nižší než u ostatních olejů. V odborné literatuře je ukázáno, že konopí obsahuje největší množství vitaminu E. Naměřená hodnota mohla být způsobena tím, že jsme používali oleje, a ne samotnou rostlinu, a taky během skladování se množství vitaminu mohlo snížit. Kvůli přístupu světla a vzduchu mohlo dojít k oxidaci oleje, taky při výrobě oleje nějaké množství vitaminu E mohlo být zničeno.

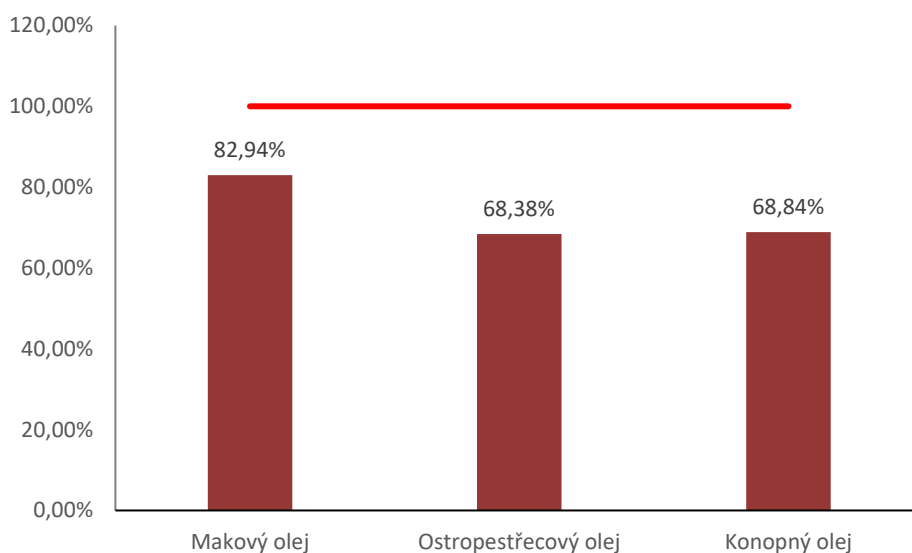
4.6 Stanovení antimikrobiální aktivity pomocí zákalu

Stanovení antimikrobiální aktivity bylo stanoveno dle postupu 3.10 pomocí mikrotitrační destičky (viz Obrázek 17). Zákal byl měřen pomocí ELISA readeru. Rozpad buněk byl sledován v čase 0. Pak v čase 24 hodin bylo možné stanovit inhibici růstu mikroorganismů, která byla způsobena přítomností detekovaných látek. Jako blank byl použit 60% ethanol, v kterém byly vytvořeny extrakty. V případě, že naměřené hodnoty vzorků jsou nižší než hodnoty líhu, tzn., že je prokázána inhibice růstu a vzorky mají antimikrobiální aktivitu. Potlačení růstu na použité mikroorganismy bylo detekované u všech olejů.

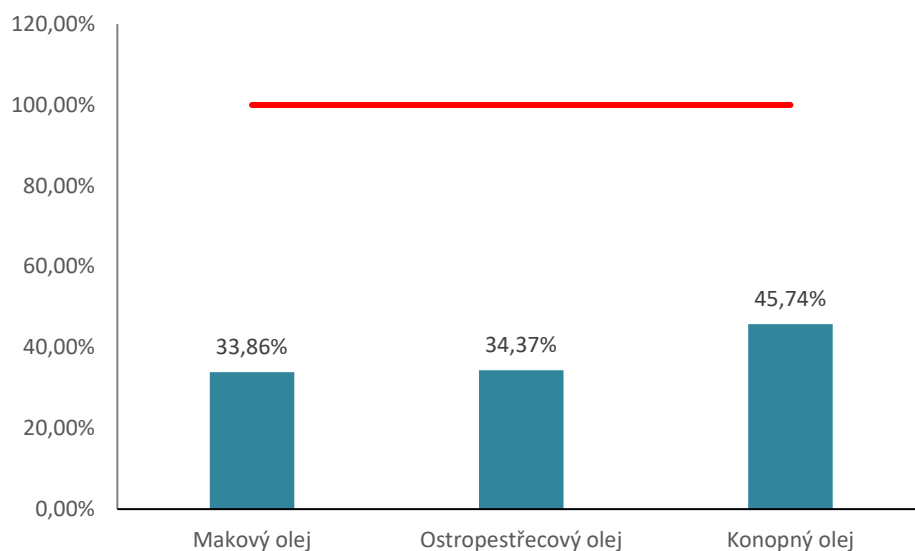


Obrázek 17 Použité mikrotitrační destičky

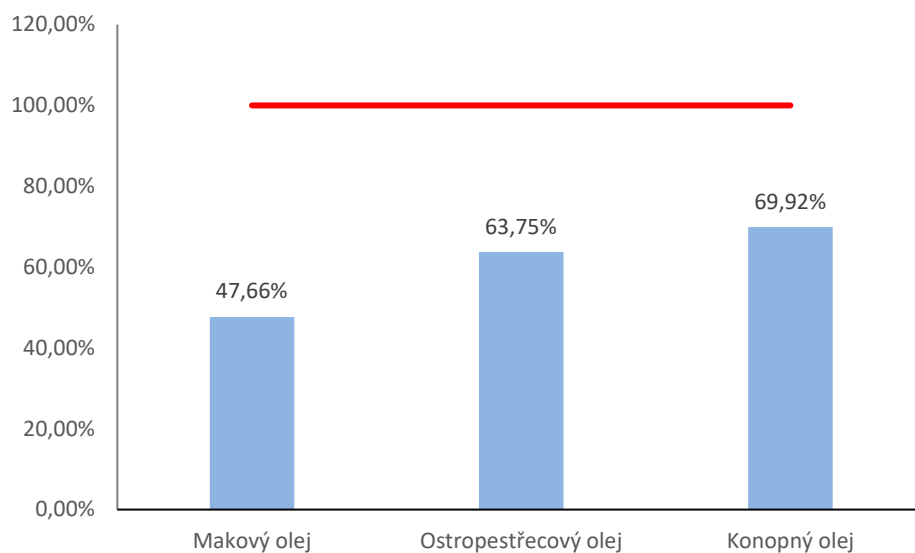
Na obrázku 18 je viditelný výsledný efekt olejových extraktů na kmeni *Candida Glabrata*. Červená vodorovná čára představuje rozdíl absorbance nárůstu daného mikroorganismu bez přidaného testovaného oleje, který se počítá jako 100 %, takže antimikrobiální aktivita se projevila u vzorku, které sahají pod tuto hranici. Nejvyšší antimikrobiální schopnosti byly na gram-pozitivním kmeni *Micrococcus luteus* a nejmenší na kvasinkovém kmeni *Candida glabrata*. Tento jev může být způsoben strukturou těchto mikroorganismů. Struktura stěny gram-pozitivní bakterie umožnila lepší vstup látky do buňky, tímto měly oleje větší vliv na mikroorganismy. Především na gram-pozitivních bakteriích měl největší vliv makový olej, což ale nebylo v porovnání s účinky ostropestřecového oleje znatelně větší, hodnoty se lišily pouze o 0,51 %. Nejmenší vliv měl konopný olej (viz Obrázek 19). Největší antimikrobiální účinky na gram-negativním kmeni bakterie *Escherichia coli* byl pozorován u makového oleje, a nejmenší byl u konopného oleje (viz Obrázek 20). Vliv ostropestřecového a konopného oleje na kvasinku *Candida glabrata* byl srovnatelný. Na rozdíl od těchto olejů, makový olej měl nižší inhibiční aktivitu.



Obrázek 18 Výsledná efektivita olejových extraktů na *Candidu Glabratu*



Obrázek 19 Výsledná efektivita olejových extraktů na *Micrococcus luteus*



Obrázek 20 Výsledná efektivita na *Escherichia coli*

4.7 Diskový antimikrobiální test

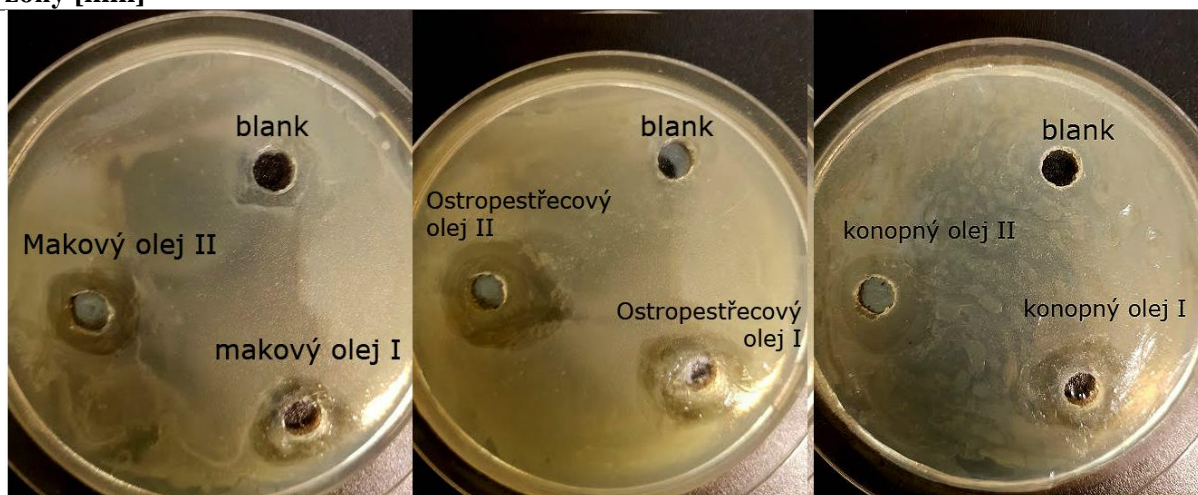
V tomto experimentu byly zaznamenány inhibiční zóny, které byly způsobeny přítomností detekovaných látek. Vyhodnocení inhibičních účinků bylo provedeno na základě vizuálního posouzení. U každého měření bylo provedeno paralelní stanovení a oba výsledky byly poté zprůměrovány.

Escherichia coli

Potlačení růstu bakterie *E.coli* je možné pozorovat po aplikaci extraktů všech olejů (viz Obrázek 21). Růst mikroorganismů nebyl výrazný na povrchu, ale projevoval se ve formě mléčného zákalu kultivačního média. Ostrost zón byla hladká u všech vzorků. Významně vyšší celkovou inhibiční účinností v porovnání s ostatními měl ostropestřecový olej. Tím pádem tento olej vykazoval nejlepší antimikrobiální aktivitu vůči gram-negativním bakteriím, poté následoval makový olej. Nejmenší inhibiční zóna byla detekována u konopného oleje. Shrnutí výsledků je možné pozorovat v tabulce 14.

Tabulka 14 Přehled velikostí inhibičních zón po aplikaci extraktů všech olejů na bakteriální kmen *Escherichia coli*

Vzorek	Makový olej	Ostropestřecový olej	Konopný olej
Rozhraní	Hladký	Hladký	Hladký
Velikost zóny [mm]	4,5	5,5	2,5



Obrázek 21 Přehled inhibičních zón na Petriho miskách po aplikaci extraktů všech olejů na bakteriální kmen *Escherichia coli*

Micrococcus luteus

Antimikrobiální aktivitu studovaných olejů na *Micrococcus luteus* je možné pozorovat v tabulce 15. Potlačení růstu gram-pozitivní bakterie se projevilo u všech vzorků. Nejlepší inhibiční schopnosti vykazoval makový olej, a to výrazně větší, než v případě zbylých olejů. Nejmenší antimikrobiální aktivita na Petriho misce byla pozorována u konopného oleje. Ostrost inhibičních zón byla stejná jako u *Escherichia coli*, a to hladká.

Tabulka 15 Přehled velikostí inhibičních zón po aplikaci extraktů všech olejů na bakteriální kmen *Micrococcus luteus*

Vzorek	Makový olej	Ostropestřecový olej	Konopný olej
Rozhraní	Hladké	Hladké	Hladké
Velikost zóny [mm]	10,5	5	3

Candida glabrata

Vliv studovaných olejů na růst kvasinky *Candida glabrata* byl nejmenší na rozdíl od ostatních mikroorganismů. Inhibiční zóny byly velmi podobné. Nicméně, nejlepší antimikrobiální aktivitu měly extrakty makového oleje, pak následoval ostropestřecový olej a nejmenší detekována inhibiční zóna byla u konopného oleje. Rozhraní u všech olejů bylo ostré. Tabulka 16 ukazuje přehled velikosti inhibičních zón pod vlivem extraktů všech olejů.

Tabulka 16 Přehled velikostí inhibičních zón po aplikaci extraktů všech olejů na kvasinkový kmen Candida glabrata

Vzorek	Makový olej	Ostropestřecový olej	Konopný olej
Rozhraní	Ostré	Ostré	Ostré
Velikost zóny [mm]	2,5	2	1,5

Výsledky diskového antimikrobiálního testu potvrzují i výsledky z antimikrobiálního testu pomocí zákalu. Pouze při sledování antimikrobiálních schopností na kvasinku pomocí dilučního testu, měl makový olej větší inhibiční zóny než ostropestřecový olej jako vyšlo v difuzním testu, kde hodnoty těchto olejů byly moc přibližné. Tento jev mohl být způsoben tím, že diskový antimikrobiální test je moc citlivý a velmi závisí na lidské spolehlivosti.

4.8 Využití olejů

Ze získaných výsledků se nabízí několik využití v kosmetice. Mezi nejběžnější aplikace olejů patří masáže, koupele, a využití ve vlasové kosmetice.

Makový olej je možné využít díky svému složení pro výživu nehtů a nehtové ploténky. Často lakované nehty se štěpí, lámou. Makový olej zabezpečí nehty krásně vyživené a zpevněné. Olej se hodí také na ošetření suché kůže při různých kožních onemocněních, jako je například lupénka nebo ekzém. Ještě lepší využití makového oleje se ale nabízí pro vnitřní užití. Pro vysoký obsah nenasycených mastných kyselin, je ideálním doplňkem pro zvýšení „dobrého“ tuku ve výživě. Působí tak preventivně proti kardiovaskulárním onemocněním.

Ostropestřecový olej má blahodárné účinky především pro vnitřní užití, díky vysokému podílu nenasycených mastných kyselin, vitaminu E, a také látky zvané sylimarín, která se podílí při regeneraci a podpoře funkčnosti jater. Ostropestřecový olej působí protizánětlivě, v kosmetice má také své místo především v regeneraci spálené a podrážděné pokožky a dalším kožním problémům.

Konopný olej se řadí mezi nejvyváženější zdroje esenciálních mastných kyselin, tedy je ideálním olejem pro vnitřní využití. Olej se stále více využívá i v kosmetice. Používá se pro hydrataci pokožky, protože svým složením dokáže snižovat suchost kůže, která vede k podráždění a svědění. Využívá se v různých krémech, v kosmetice proti akné nebo i proti lupům. Je vhodný i pro citlivou pleť, působí proti stárnutí.

4.8.1 Příprava sprchového oleje

V praktické části této práce jsme se proto zaměřili na využití konopného oleje do mycích prostředků. Mycí a šamponovací kosmetické výrobky obsahují tenzidy, které často pokožku ještě víc vysušejí. Pokusili jsme se vyrobit konopný sprchový olej pro problematickou pokožku s 91% přírodních pečujících olejů, jehož složení je možné vidět v tabulce 17. Sprchový olej dobře hydratuje pokožku a bez nadměrného promaštění a vysušení smývá nečistoty. Konopný olej díky svému chemickému složení má antimikrobiální a antioxidační účinky, proto je vhodný taky i pro problematickou pokožku. Směs éterických olejů má pozitivní vliv na psychologický stav spotřebitele.

Výroba sprchového oleje probíhala několikanásobnou optimalizací složení. Bylo důležité, aby olej nebyl příliš mastný, neulpíval na pokožce, dokázal smýt nečistoty a zároveň zanechat příjemný nemastný olejový film. Pěnivost výrobku byla dalším kladným bonusem.

Po veškerých pokusech jsme získali konopný sprchový olej s níže uvedeným složením:

Tabulka 17 Složení sprchového olejů

Složka	Množství (g/100 g)
<i>Vitis vinifera seed oil</i>	73
<i>Cannabis seed oil</i>	11
<i>Castor oil</i>	7
<i>PEG-40 Hydrogenated Castor oil</i>	4,5
<i>Laureth-4</i>	4,5
<i>Parfum</i>	0,9
<i>Ostatní (tocopherol, ascorbic acid atd.)</i>	0,9

Na začátku bylo odváženo potřebné množství olejů a celá ta směs byla rozmíchána. Pak postupně byly přidány PEG-40 a Laureth-4. Po homogenizace byla přidána askorbová kyselina pro neutralizace pH a směs éterických olejů.

4.8.2 Analýza sprchového oleje

Pro porovnání výsledků byl koupen konopný sprchový olej značky Saloos, který je možné pozorovat na obrázku 22.



Obrázek 22 Konopný sprchový olej Saloos

Vyrobený sprchový olej má homogenní strukturu. Konzistence je jako u tekutého oleje kvůli malé viskozitě. Náš olej má zelenější barvu než zakoupený olej (viz Obrázek 23). K tomu došlo pravděpodobně kvůli tomu, že námi vyrobený olej obsahoval větší koncentraci tokoferolu a barevných látek.



Obrázek 23 Porovnání sprchových olejů

Při kontaktu s vodou se hydrofilní olej emulguje do mléka s lehkou vzduchovou pěnou, která se neliší od oleje Saloos. Jak je možné vidět na obrázku 24, tyto oleje nemají žádný rozdíl ve vlastnostech, tzn. mají stejný emulgační účinek.



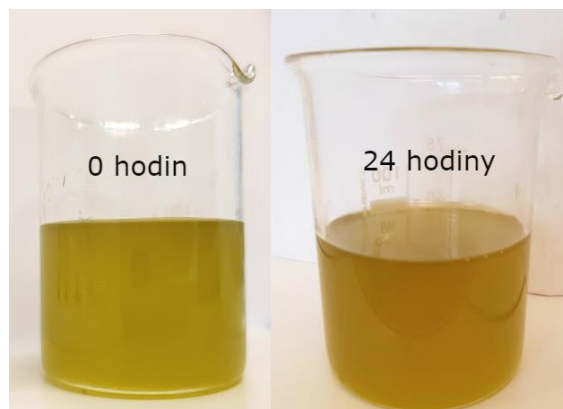
Obrázek 24 Porovnání sprchových olejů po styku s vodou

Test zmýdelnění ukazuje, že náš vyrobený olej má mírně lepší zmýdelňovací schopnosti, vyrábí více pěny a lépe čistí pokožku (viz Obrázek 25). Po umytí zůstává jemný olejový film a příjemné pocity.



Obrázek 25 Test zmýdelnění sprchových olejů

Byla také testována stabilita. Olej neobsahoval zákal a ani nevznikla žádná sraženina. Tzn., že vyrobený olej má dobrou stabilitu (viz Obrázek 26).



Obrázek 26 Test na stabilitu vyrobeného oleje

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na posouzení kvality vybraných vzácných olejů a možnosti jejich využití v kosmetice. Literární rešerše se zabývala řešením následujících úkolů: všeobecná chemie olejů, charakteristika vybraných netradičních rostlinných olejů a způsobů jejich získávání ke kosmetickým účelům. Pro práci byly vybrány následující oleje: makový, konopný a ostropestřecový olej.

Bylo zjištěno, že na obsah aktivních látek má vliv odrůda rostliny, země původu, klimatické podmínky, způsob získávání a skladování. Na základě těchto všech faktorů každý rostlinný olej má individuální chemické složení.

Experimentální část je především zaměřena na základní analýzu vybraných složek olejů a na základě získaných výsledků přípravu sprchového oleje. Pomocí základních analytických metod byl v olejích sledován obsah mastných kyselin, antioxidační a antimikrobiální aktivita.

Stanovení tukových čísel posloužilo k primární charakterizaci vlastnosti a kvality tuku, což bylo poté potvrzeno pomocí ostatních experimentů. Vzhledem k nízkým hodnotám peroxidového čísla makového a ostropestřecového oleje lze konstatovat, že tyto oleje vykazují minimální stupeň oxidace. Vyšší hodnota peroxidového čísla u konopného oleje říká o probíhajícím procese oxidace oleje, což může přivést až k degradaci prospěšných složek obsažených v oleji.

Hodnoty jodového čísla konopného a makového oleje byly srovnatelné, což se potvrdilo pomocí plynové chromatografie, která ukázala, že tyto oleje obsahuje větší počet nenasycených mastných kyselin. Lze předpokládat, že náchylnost k oxidaci těchto olejů bude oproti ostropestřecového olejů vyšší. Konopný olej má největší obsah mononenasycených mastných kyselin. Studované oleje obsahují velké množství linolové kyseliny, která patří k esenciálním mastným kyselinám, což je dobrým znakem. Námi stanovené množství mastných kyselin sice neodpovídalo odborné literatuře. Tento rozdíl mohl být kvůli tomu, že tyto oleje obsahují minoritní látky, které mohly rušit tvorbu methylesteru a následující GC analýzu.

Kromě mastných kyselin jsou důležitým parametrem antioxidační aktivita, za kterou jsou odpovědné fenolické látky a vitamin E. Tyto látky zpomalují proces stárnutí tím, že váže volné radikály. Nejvyšší antioxidační aktivitu ukázal konopný olej, tento jev byl potvrzen stanovením obsahu polyfenolů. Ve všech olejích byl detekován vitamin E. Navíc makový a konopný oleje obsahovali fytosterol.

Pomocí difuzních a dilučních metod byla stanovena antimikrobiální aktivita. Potlačení růstu na použité mikroorganismy bylo detekované u všech olejů. Nejvyšší antimikrobiální schopnosti byly na gram-pozitivním kmeni *Micrococcus luteus* a nejmenší na kvasinkovém kmeni *Candida glabrata*. Tento jev může být způsoben strukturou stěny gram-pozitivní bakterie, která umožnila lepší přístup látky do buňky. Nejvyšší antimikrobiální vlastnosti vykazoval makový olej, který měl nejúčinnější inhibiční vliv na gram-pozitivní a gram-negativní bakterie. Na kvasinkový kmen měly oleje přibližně stejný vliv. Výsledky diskového antimikrobiálního testu potvrzují i výsledky z antimikrobiálního testu pomocí zákalu.

Po analýze všech olejů bylo rozhodnuto, že konopný olej má nejlepší složení pro kosmetické účely. Tím pádem byl vyroben konopný sprchový olej pro problematickou pokožku s 91% přírodních pečujících olejů. Tento kosmetický produkt vykazoval dobrou stabilitu, vysoké pěnicí a čisticí schopnosti. Po umytí zanechával na pokožce jemný olejový film.

V této bakalářské práci bylo potvrzeno, že vzácné rostlinné oleje mají dobré vlastnosti a blahodárné účinky pro využití v kosmetice. Navíc ostropestřecový a makový olej se doporučuje radši používat k vnitřnímu užití díky svému chemickému složení.

6 LITERATURA

- [1] SVOBODOVÁ, Lenka. *Přejatá slova v oblasti odívání a kosmetické péče na stránkách chorvatské a české mutace časopisu*. 2007. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Mgr. Pavel Krejčí, Ph. D.
- [2] TIUTIUNNIKOV, B.N., Z.I. BUHSHTAB a F.F. GLADKII. *Chemistry of oil*. Moskva, Kolos, 1992. ISBN 5-10-001446-6.
- [3] *Big Medical Encyclopedia: TRIGLYCERIDES* [online]. [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <http://bigmed.info/index.php/TRIGLYCERIDES>
- [4] OWN WORK BY USER: LENNERT B USING CHEMDRAW 7.0 AND ADOBE ILLUSTRATOR 10. General structural formula of triglycerides. In: *Wikipedia.org* [online]. 2005 [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Triglyceride.svg>
- [5] KUSMIREK, J. *Tekuté slunce*. Praha: One woman press, 2005. ISBN 80-86356-41-8.
- [6] KOHOUTKOVÁ, Nina. *Možnosti využití vybraných rostlinných olejů v kosmetice = Possibilities of utilization of chosen vegetable oils in cosmetic field*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2007, 1 elektronický optický disk [CD-ROM / DVD]. : pdf.
- [7] ZHENG, Chang Ji, Jung-Sung YOO, Tae-Gyu LEE, Hee-Young CHO, Young-Ho KIM a Won-Gon KIM. *Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids*. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.08.028. ISBN 10.1016/j.febslet.2005.08.028. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2005.08.028>
- [8] WAJDA, R., B. PRUSSEIT a P. VAN HOOGEVEST,. *Phospholipids for Cosmetic Products: Natural Functional Ingredients and Actives for Cosmetic Products*. *SOFW-Journal: International Journal for Applied Science* [online]. **8-2013** [cit. 2017-05-06]. ISSN 139. Dostupné z: [http://www.lipoid-kosmetik.com/sites/default/files/files/Publikation%20-%20SOFW_8_2013%20Phospholipids\(2\).pdf](http://www.lipoid-kosmetik.com/sites/default/files/files/Publikation%20-%20SOFW_8_2013%20Phospholipids(2).pdf)
- [9] SCHROIT, Alan J. a Robert F.A. ZWAAL. *Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes*. DOI: 10.1016/0304-4157(91)90019-S. ISBN 10.1016/0304-4157(91)90019-S. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030441579190019S>
- [10] ARMSTRONG, GA a JE HEARST. *Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis*. , ASEB J February 1996 10:228-37.
- [11] KOUSHAN, Keyvan, Raluca RUSOVICI, Wenhua LI, Lee FERGUSON a Kakarla CHALAM. *The Role of Lutein in Eye-Related Disease*. DOI: 10.3390/nu5051823. ISBN 10.3390/nu5051823. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/5/5/1823>
- [12] *Sterols* [IUPAC Recommendations 1995 on page 1367]. [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://goldbook.iupac.org/html/S/S06006.html>
- [13] SEGURA, Ramon, Casimiro JAVIERRE, M Antonia LIZARRAGA, Emilio ROS a Kakarla CHALAM. *Other relevant components of nuts: phytosterols, folate and minerals*. DOI: 10.1017/BJN20061862. ISBN 10.1017/BJN20061862. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114506003576

- [14] *Sterols* [online]. [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://www.cyberlipid.org/sterols/ster0003.html>
- [15] EVANS, H. M. a K. S. BISHOP. *ON THE EXISTENCE OF A HITHERTO UNRECOGNIZED DIETARY FACTOR ESSENTIAL FOR REPRODUCTION*. DOI: 10.1126/science.56.1458.650. ISBN 10.1126/science.56.1458.650. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.56.1458.650>
- [16] GAGNÉ, Amélie, Shu QINWEI, William D.FRASER a Pierre JULIEN. Absorption, Transport, and Bioavailability of Vitamin E and its Role in Pregnant Women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* [online]. Elsevier, March 2009, 210-217 [cit. 2018-05-06]. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(16\)34118-4](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(16)34118-4). Dostupné z: [https://www.jogc.com/article/S1701-2163\(16\)34118-4/pdf](https://www.jogc.com/article/S1701-2163(16)34118-4/pdf)
- [17] SEMBA, Richard D. a Xuân Nam. PHẠM. *On the Discovery of Vitamin A: the origin, evolution, and impact of doi moi*. DOI: 10.1159/000343124. ISBN 10.1159/000343124. Dostupné také z: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000343124>
- [18] *Structure of all-trans retinol* [online]. In: . [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:All-trans-Retinol2.svg>
- [19] Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. *IOM (Institute of Medicine)*. [online]. Washington, DC: The National Academies Press.: National Academy of Sciences., 2011 [cit. 2017-05-06]. DOI: 10.17226/13050. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56070/>
- [20] FURIE B, BOUCHARD BA, FURIE BC. *Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid*. *Blood*, 1999, 93(6):1798-808.
- [21] KUSMIREK, Jan. *Tekuté slunce: rostlinné oleje pro masáže, aromaterapii, kosmetiku a výživu*. Praha: One Woman Press, 2005, 213 s. ISBN 80-86356-41-8.
- [22] *Poppy, Turkish Red (Papaver somniferum)* [online]. In: . [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: https://i0.wp.com/strictlymedicinalseeds.com/wp-content/uploads/2018/03/Turkish_poppy_7_300.jpg?fit=300%2C295&ssl=1
- [23] KRIST, Sabine, Gerald STUEBIGER, Heidrun UNTERWEGER, Franz BANDION a Gerhard BUCHBAUER. Analysis of Volatile Compounds and Triglycerides of Seed Oils Extracted from Different Poppy Varieties (*Papaver somniferum* L.). *International journal of advanced studies in Computer Science and Engineering IJASCSE, Volume 4, Issue 1, 2015* [online]. [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1021/jf0580869. ISBN 10.1021/jf0580869. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0580869>
- [24] BOZAN, B a F TEMELLI. *Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils*. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.12.009. ISBN 10.1016/j.biortech.2007.12.009. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407010176>
- [25] İNAN, Özlem, Mehmet Musa ÖZCAN a Fahad Y. AL JUHAIMI. *Antioxidant effect of mint, laurel and myrtle leaves essential oils on pomegranate kernel, poppy, grape and linseed oils*. DOI: 10.1016/j.jclepro.2012.01.003. ISBN 10.1016/j.jclepro.2012.01.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652612000054>
- [26] *History of Cannabidiol (CBD): Cannabis Sativa* [online]. In: . [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <http://cbdcentury.com/history-of-cannabidiol-cbd/>

- [27] OOMAH, B.Dave, Muriel BUSSON, David V GODFREY a John C.G DROVER. Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2002, **76**(1), 33-43 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00245-X. ISSN 0308-8146.
- [28] DUNFORD, N.T. Hemp and flaxseed oil: Properties and applications for use in food. *Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition*. Oklahoma State University, Stillwater, OK, USA, , 39-63.
- [29] *Silybum marianum* [online]. In: . [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <https://dalinvest.ro/>
- [30] CHRTEK, Jindřich, ŠTĚPÁNKOVÁ, Jitka a Bohumil SLAVÍK, ed. *Květena České republiky*. 6. Praha: Academia. 2000. ISBN 80-200-0306-1.
- [31] FATHI-ACHACHLOUEI, Bahram a Sodeif AZADMARD-DAMIRCHI. *Milk Thistle Seed Oil Constituents from Different Varieties Grown in Iran*. DOI: 10.1007/s11746-009-1399-y. ISBN 10.1007/s11746-009-1399-y. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-009-1399-y>
- [32] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin I*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická [Praha], 2002. ISBN 80-7080-509-9.
- [33] Shahidi, Fereidoon *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Volumes 1-6 (6th Edition). John Wiley & Sons. Online version available at: http://knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1432&VerticalID=0
- [34] *Velká sovětská encyklopedie: Žluknutí tuků*. 1990. ISBN 5-85270-292-7.
- [35] Vítová E.: *Hygiena potravin*. ,VUT v Brně ,FCh, 2004, 128 s., ISBN 80-214-2680-2
- [36] Žluknutí: oxidace tuků. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%BDluknutí%C3%AD>
- [37] HÁJEK, J. a kol. Využití infračervené spektrofotometrie pro sledování změn při oxidaci řepkového oleje. *Chemické listy*. 1998, 92, p. 434 – 440.
- [38] BAYSAL, T. et al. Lipxygenase in Fruits and Vegetables. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, 40(4), p. 491 – 496.
- [39] HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidants: Updating a Personal View. *Nutrition Reviews*. 2012, 70(5), p. 257 – 265.
- [40] ISO 3960-2013. *Vegetable oils. Acceptance rules and methods of sampling*. 2014-07-01.
- [41] HRSTKA, Miroslav a Lenka SOMROVÁ. *PRAKTIKUM Z ANALYTICKÉ CHEMIE POTRAVIN*. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ FAKULTA CHEMICKÁ. Brno, 2017.
- [42] MÁROVÁ, Ivana a Dana VRÁNOVÁ. *PRAKTIKUM Z BIOCHEMIE: Pracovní sešit*. Fakulta chemická VUT v Brně. Ústav chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně, inovace 2016.
- [43] ALVAREZ-BARRIENTOS, A., J. ARROYO, R. CANTON, C. NOMBELA a M. SANCHEZ-PEREZ. *Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology*. DOI: 10.1128/CMR.13.2.167-195.2000. ISBN 10.1128/CMR.13.2.167-195.2000. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.13.2.167-195.2000>

- [44] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renata KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. Mikrobiologické laboratorní metody. Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6. Skriptum. VFU Brno
- [45] ČSN EN ISO 5509 (588767). *Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Příprava methylesterů mastných kyselin*. 2001.
- [46] VACKOVÁ, H. Studium biologických účinků technického konopí a jeho frakcí. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 54 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
- [47] VINKLEROVÁ, Bc. Kateřina. *Netradiční oleje s antimikrobními účinky*. 2015. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Doc. Ing. Věra Kašpárková, Csc.
- [48] STAMENKOVIĆ, Olivera S., Ana V. VELIČKOVIĆ, Milan D. KOSTIĆ, Nataša M. JOKOVIĆ, Katarina M. RAJKOVIĆ, Petar S. MILIĆ a Vlada B. VELJKOVIĆ. Optimization of KOH-catalyzed methanolysis of hempseed oil. *Energy Conversion and Management*. 2015, (Volume 103), 235-243. DOI: 10.1016/j.enconman.2015.06.054. ISBN 10.1016/j.enconman.2015.06.054. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890415005956>
- [49] RASHID, Umer, Muhammad IBRAHIM, Imededdine Arbi NEHDI, Saud Ibrahim AL-RESAYES, Sammi ULLAH, Muhammad Aamer MEHMOOD a Saira SHAHZADI. Synthesis and characterization of poppy seed oil methyl esters. *Energy Conversion and Management*. 2015, (Volume 103), 235-243. DOI: 10.1016/j.cjche.2016.01.007. ISBN 10.1016/j.cjche.2016.01.007. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1004954116000082>
- [50] APOSTOL, Livia, Sorin IORGA a Radu Ciprian RACOVITA. THE EFFECTS OF PARTIALLY DEFATTED MILK THISTLE (SILYBUM MARIANUM) SEED FLOUR ON WHEAT FLOUR. *Agriculture and Food: 1314-8591*. 2017.

7 ZKRATKY

ABTS — 2,2-azinobis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

FA – mastné kyseliny

G⁻ — gram-negativní bakterie

G⁺ — gram-pozitivní bakterie

GC-FID plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

MK mastné kyseliny

MUFA – mononenasycené mastné kyseliny

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

SFA – nasycené kyseliny

TAG – tryacylglycerol

UV-VIS záření v ultrafialové – viditelné oblasti spektra